

## 前 言

消毒学是一门应用学科。近年来,由于经济建设、工农业生产、全民保健的需求,消毒学已经发展为预防医学中独立的二级学科,并成为国内很多高等(医药、农林、生物)院校本科生、研究生的选修课程之一。

消毒学是研究杀灭、去除和抑制外环境中病原微生物和其他有害微生物的理论、药物、器械与方法的科学。目的就是利用物理、化学或生物学的方法,消除各种外环境中可引起人和动物生病的少数有害微生物,控制造成经济损失的其他微生物,从而达到阻断传染病的传播,防止医院感染,减少微生物对食物和物品的损坏,促进工农业的大规模生产。根据杀灭微生物的程度,消毒学可分为灭菌、消毒、防腐与保藏四个方面。

消毒又是一门新兴的产业。有人估计,该产业在全球每年的产值可达千亿美元,在我国也能达到百亿人民币以上。消毒技术除了在传统的医药工业、医疗保健行业以及畜牧业得到广泛应用外,更进一步扩大到大规模农业、养殖业、生物工程行业,甚至航空航天业。

军事医学科学院自(1951年)建立时起,即将消毒研究作为重点发展方向之一。经过50年的连续工作,取得了一大批科研成果,创办了《中国消毒学杂志》,发起并成立了全国性的消毒学会,积极参与全国的消毒工作。军事医学科学院还是国内最早(1983年)招收消毒学研究生的单位,迄今已经培养了几十位硕士、博士研究生。为了适应消毒学发展的需要,这次由军事医学科学院牵头,组织该院新老消毒学教授、以及部分国内知名消毒学专家,查阅了大量最新的消毒学文献资料,共同编写了这部消毒学研究生教材,可供今后消毒学专业研究生、本科生学习使用,也可供从事消毒行业的同行们工作时参考。

在编写与出版本书的过程中,得到了刘育京教授、沈德林教授、王有森教授、袁洽勋教授、张朝武教授等很多消毒学界前辈的热情帮助,以及军事医学科学院和国内消毒企业的大力支持,在此深表感谢。

由于编写时间仓促,错误在所难免,敬请广大读者批评指正。

军事医学科学院

张文福

2002年2月10日

## 第一篇 消毒学原理

第一章	消毒学概论 .....	(3)
第二章	热力消毒与灭菌 .....	(18)
第三章	电离辐射消毒与灭菌 .....	(36)
第四章	紫外线消毒 .....	(44)
第五章	微波消毒 .....	(60)
第六章	等离子体灭菌 .....	(83)
第七章	过滤除菌 .....	(91)
第八章	常用化学消毒剂 .....	(102)
第九章	防腐与保藏 .....	(125)
第十章	消毒动力学与杀菌作用指标 .....	(168)

# 第一章 消毒学概论

人类生存环境中,无处不存在微生物。自然界中,空气、水、土壤、各种动植物体内外,都存在大量的微生物。它们当中绝大部分能够与人类和平共处,甚至给人类提供帮助,如净化环境、发酵食物、分解有毒物质、富集提炼稀有元素等。但是也有少数微生物可危害人类和动植物的健康生长,造成感染性疾病,或使食物变质腐败,或使物品侵蚀而失去使用价值。

消毒是一门研究和环境微生物进行斗争的科学。是采用物理、化学或生物学的方法,消除各种外环境中可引起人和动物生病的少数有害微生物,控制造成经济损失的其他微生物,从而达到阻断传染病的传播、防止医院感染、减少微生物对食物和物品的损坏、促进工农业生产的目的。因此,消毒学可以定义为:研究杀灭、去除和抑制外环境中病原微生物和其他有害微生物的理论、药物、器械与方法的科学。根据杀灭微生物的程度,消毒学可分为灭菌、消毒、防腐与保藏四个方面。在医学中,消毒是对传播媒介上的微生物,特别是病原微生物进行杀灭或清除,使达无害化处理的总称。达到无菌程度的消毒又称灭菌;对活组织表面的消毒又称抗菌;防止食品等无生命有机物腐败的消毒又称防腐与保藏。

## 第一节 消毒的发展史

从远古时代起,人类为保存事物,预防疾病,即不自觉地采取了多种杀灭或去除微生物的方法,例如火烧、煮沸、盐腌、日晒等等。下面将有历史记载的消毒发展史作一介绍。

古时曾经认为传染性疾病是由于空气污染导致环境变化所引起的,并称患者体内排出的、扩散在空气中的致病性不洁物为瘴毒(瘴毒学说)。公元前 117 ~ 26 年,Varro 曾就住宅卫生提出了很好的意见:“要考虑房屋的建筑地区有无沼泽,因为沼泽里有某种肉眼看不见的小动物,它们飞散到大气中,由人的鼻、口进入体内,可引起重病”。可见该时已提出了传染性疾病(这里指疟疾)的微生物病因学说。自此之后到中世纪为止是一个无惊人进步的黑暗时代。当然这期间也留下了一些有关感染或无感染创伤的治疗经验,例如罗马的 Galenos 在外伤的包扎上使用红酒绷带。这与后来 1266 年 Borgognoni 的葡萄酒绷带,以及日本华岗青洲(1760 ~ 1835)的刀伤治疗法中所用浸火酒棉布进行清洗的想法是一致的。

1546 年,Fracastorius 在其著作中提出了通过直接或间接接触以及空气而发生传染的学说,驳斥了 Galenos 的体液腐败发热说,并论述了各种“特殊传染病芽”的性质与发病作用,推测了今日病原微生物的特征。他认为感染的原因是由于存在着肉眼看不见的病芽(Seminaria morbi),这种病芽与蛇毒等毒性物质有所不同。还提出了破坏这种病芽的必要性。在 Fracastorius 的工作中最重要的是提出接触传染有三种途径:①由单纯接触引起的传染;②由衣服、被单、个人用品这类媒介物引起的传染;③相隔一定距离,病原菌通过空气进行传播,并附着于最适宜场所。之后,又过 200 多年,Plenciz 进行了接触传染原学说的研究,认为:“一定的疾病有一定的接触原(contagium)。同一疾病有不同的发病过程是因为其病原体的种类和患者的体质不同。另外,物质的腐败也是由这种小动物(animalcula)所引起的”。

肉眼看不见的病芽自然发生的观点持续了很长时间。直至 1768 年, Spallanzani 提出:“所有的动物必定由胚种发生”, 否定了有机体自然发生的学说。1837 年, Schwan 证明腐败作用是生物原因引起的, 并且可用加热的方法杀死这种生物。今天的“消毒”可以说是由此开始的。

1840 年, Schwan 的朋友 Henle 研究了微生物的病原性条件。他是微生物引起感染性疾病的最初主张者之一。在其论文中认为, 叫做病毒的物质不单是有机体, 而且是活体, 它有自身的生命, 可以寄生在病人的身体内。另外, Henle 提出论证微生物和传染病之间的关系, 必须考虑三个条件: ①对于一定的传染病必然存在着一定的微生物; ②此微生物的分离; ③用分离的微生物做的实验感染。具备了这三个条件, 就可以确定该微生物的病原关系。此时, 尽管对感染症原因的探讨还没有超出主观推测的范围, 且无定论, 但在此前后, 已开始对感染症采取了广泛的对策。Semmelweis 注意到, 在产科病房, 医学生实习时, 产褥热死亡率为 9.92%, 而助产妇实习时死亡率仅 3.3%。另外, 在做尸体解剖时, 他的同事不慎将手割伤而得败血症死亡, 其病理所见与产褥热相似。由此, 他认为产褥热是通过医生的手传播的。他在自己负责的产妇室里要求进行检查时, 检查者必须用漂白粉消毒双手。随之产褥热死亡率由 9.92% 减少到 3.8%。由于他肯定了不仅尸毒, 而且各种腐败性有机物都能引起传染的发热性疾病, 所以要求检查者的手、器械、敷料等均要事先消毒, 并且病妇和健康产妇要进行隔离, 从而其产妇室的死亡率很低, 1848 年仅为 1.27%。Semmelweis 的这一发现虽在得到细菌学证实前一直未被承认。但是, 此工作可以说是化学消毒法的开始。另外, 英国的 Wells (1817 ~ 1897) 在 Lister 抗菌疗法前, 根据经验就已提出了对“感染病芽”采取措施的必要性。他要求严格消毒手术者的手与器械, 由此使卵巢切除手术后死亡率显著减少。1857 ~ 1880 年, 进行了 1 000 例卵巢切除术, 这种过去极易死亡的手术, 其死亡率降低到只有 4%。

1865 年, Lister 为防止术后感染, 采用了石炭酸化学消毒法, 使复杂性骨折患者的死亡率显著下降。Lister 认为创伤化脓的原因是由于“菌芽”的侵入所致。他用氯化锌、亚硫酸盐、石炭酸等进行试验, 证明石炭酸最为有效。Lister 用 2.5% 的石炭酸进行创伤清洗与医生的洗手, 用 5% 的石炭酸溶液进行器械消毒。之后又改用 5% 的石炭酸喷雾杀灭手术室内浮游的细菌以防感染。用喷消毒药杀空中浮游菌的方法由此开始, 但因效果不大, Lister 自己在 4 ~ 5 年后也停用了。在最近 10 年评价消毒药时, 提出以环境消毒的效果来评价环境消毒剂。实际上, 这个概念 Lister 早在 100 年前即已提出。尔后, Lister 在 1867 年著述了《外科实践中的防腐原则》, 奠定了防腐外科的基础。

1683 年, Leeuwenhoek 设计了高倍数的显微镜, 从此看见了肉眼看不到的细菌形态。当时还发现人的体液中存在有多种微生物。1835 年, Bassi 发现并证实了蚕的 Muscardine 病的病原菌。1863 ~ 1866 年, Davine 将患有炭疽的动物血液接种到健康动物体内进行感染实验, 搞清楚了其病原关系。

1854 年, Schroeder 等发现用棉塞过滤煮沸后的水, 可使其中无微生物。Pasteur 在显微镜下看到过滤棉塞上有微生物, 将这些微生物放入煮沸后的营养液中可引起发酵。从灭菌与消毒的角度看, Pasteur 不仅发现煮沸可以破坏细菌, 并且否定了细菌的自然发生学说, 为 Lister 建立防腐外科开辟了道路。按 Pasteur 的看法, 医院中的任何地方都有病菌。因此他认为不仅手术器械要消毒, 而且医生的手也应严格清洗。洗手要用经加热至 110 ~ 120℃ 杀菌或煮沸的水, 擦手要用经加热 130 ~ 150℃ 杀菌后的纱布或海绵。即使这么做了, 也还要警惕大气中浮游的病原体。用事先杀过菌的水拭洗物体表面, 能够达到一定程度的洁净化。



Koch 发表的《创伤传染原因的研究》，肯定了各种细菌具有其生物学的及形态学的特性，可以互相区别，并认为各种传染病有各自的病原微生物。他还在《病原微生物的研究》中叙述了显微镜标本染色法、纯培养法、灭菌法、病原菌动物接种法、细菌菌落的观察等。Pasteur 和 Koch 的功绩在于不仅奠定了近代细菌学基础，而且对灭菌与消毒的认识论、方法论也做出了很大贡献。当然，他们所做的贡献也仰仗了不少前人的遗产。例如，Mose 早在 3 400 年前就做了火焰灭菌的记述，Susruia 在 2 600 年前提出要通过清洗以达到洁净，Hippocrates 在 2 400 年前即提出用经煮沸的水清洗创伤部位和医生的手，注意到煮沸消毒的重要性。

关于热杀菌法，除以上谈到利用煮沸法进行消毒的记载外，Spallanzani (1765) 发现煮沸 2 min 不能够杀死水中所有的细菌，但装在密封的瓶子里的液体经煮沸 1 h 后即可将微生物全部杀死。1804 年，Appert 发现密封在容器中的食物，煮沸加热处理后就不再腐败，可以长时间存放。此法为现代食品保存法奠定了基础。1832 年，Henry 发现在加热时温度越高杀菌力越大。1872 年，Bastian 发现有怎样煮也无法杀死的微生物。1876 年，Cohn 继而发现枯草杆菌的耐热芽孢，并对之进行了 108℃ 到 120℃ 加热效果的观察。1876 年，Tyndall 发明间歇灭菌法。此法系利用芽孢发芽后对热抗力下降这一特性，隔一定时间加热一次，使芽孢发芽成为营养型细菌而易达到灭菌。

在通常的情况下，煮沸时的温度不会超过 100℃，只有在高压条件下才能达到 100℃ 以上的温度。1880 年，Chamberland 研制出了高压灭菌器。1881 年初，Koch 进行了 117℃ 湿热和干热杀菌的比较，并指出了细菌的耐热性在有水汽存在的条件下差别很大。关于水蒸气饱和和不饱和时灭菌效果的研究开始于 1881 年，并为 1888 年 Esmarch 的工作所继承。高压灭菌器送入饱和水蒸气时，柜室内残存有空气可延缓温度的上升，并形成不饱和水蒸气以及使温度分布不均而需延长灭菌时间。1888 年 Kinyoun 提出在高压灭菌器的操作中，若能在通蒸气前设法从放置待灭菌物品的柜中将空气排出使之近于真空，可使灭菌易于成功。这种办法叫“预真空”。

1897 年，Kinyoun 研制了夹层高压蒸气灭菌器。用蒸气充满夹层保持高温，加之柜内预真空，使消毒后物品易于干燥。Rubner 认为具有夹层结构的高压蒸气灭菌器，若加上预真空，可防止灭菌失败。

1915 年，Underwood 根据利用重力清除空气的原理，设想在高压蒸气灭菌器上安装排气管。蒸气进入高压灭菌器内，当接触到灭菌对象时热被吸收，蒸气的比重随温度下降而增加，饱和蒸气通过柜室上部时，温度低的蒸气因比重的关系易移至下部，如在柜室底部开一个孔，将较重的蒸气或水引出，则有利于蒸气的流通。Kinyoun 将此设想应用到实际工作中。预真空需要一个装置形成负压，最简单的方法是用射流器。所谓射流器，就是一个适当形状的喷嘴，从中可喷射出几个大气压以上的蒸气。高速蒸气将周围的气体吸入气流并将之排出。高压蒸气灭菌器经过各种改革，终于在 1933 年由 Underwood 完成了今天的结构。Underwood 积极研究医院灭菌业务，并成为灭菌器材供应集中化的倡导人。

Zinsser 研究了干热灭菌，发现包装材料的隔热作用可使物品的局部温度较低，以致灭菌失败。1939 年，Vallery – Radot 重新评价了 Pasteur 的实验方法，建立了干热灭菌法。提出干热灭菌所需温度应不低于 150℃，作用 30 min 以上。他还进行了 160℃、180℃、200℃ 干热灭菌所需时间的研究。

化学消毒、灭菌法很早即有，例如熏蒸法的使用燃烧硫磺对现代人来说，也许是一件可笑的事情，而我们应该注意这事情是发生在公元前 1200 年左右的希腊 Mykene 文化时期，要看

到在当时人们就已有通过化学物质熏蒸以达到净化的想法。当时他们手头的化学物质种类不多，而硫黄与汞在欧洲和阿拉伯的炼金术中是常用原料。从这个意义上讲，这个努力应该得到高度评价。

古希腊和埃及已有肥皂或洗净剂。石炭酸的合成也比较早，最初用作腐肉脱臭剂。1860年，Kuchenmeister将之作为消毒剂使用，Lister继续了此项工作。漂白粉在1820年即已用于感染创伤治疗与饮水消毒，早于Semmelweis。1839年研制出碘酊，但当时对其效果还不太清楚。经过美国的南北战争，其消毒效果才为众人所知。1880年至1890年，相继出现奠定近代细菌学基础的业绩。在消毒与灭菌方面，Schimmelbusch与Fruehbringer探讨了甲醛的消毒效果。我们常用的甲醛是1867年Hoffmann发现的，其消毒效果是Blumm及Loen发现的。Buchner还发现使用10%甲醛溶液能杀死炭疽杆菌芽孢。乙醇的消毒效果发现很晚。虽然在日本也使用烧酒进行过创面消毒，但经科学探讨后认为乙醇无消毒效果。Reinicke对90%乙醇加以研究，发现当与水共存时有消毒作用。环六亚甲基胺是逆性皂（阳离子表面活性剂）的基本成分，使用很长时间。1920年，White研制出新药红汞。

1949年，美国的Phillips、Kaye、Smith等人研究了多种化学物质，比较其杀菌效果，发现了环氧乙烷。至于使用什么样的装置，以及浓度、温度、湿度、时间等问题是后来不断进行研究改革才发展到今天的水平。在此前，Domagk合成百浪多息，奠定了磺胺药发展的基础，进而又合成了季铵盐而奠定了阳离子表面活性剂发展的基础。现在常用于洗手的六氯酚（又称G-11）是1941年Gump研制成功的，为消毒药皂的主要成分。在此前后，抗生物质的研制亦得到迅速发展。1954年，Davies研制出洗必泰，现在已为众人所知。

1895年Roentgen发现X线，1898年居里夫妇发现镭的放射性。继此之后，许多研究表明电离辐射也适用于灭菌。1953年，Ethicon进行了辐射灭菌试验。虽然用的不是 $\gamma$ 射线，而是电子射线，但是为研究辐射灭菌方法开辟了道路。1960年，Wantage研究所在灭菌装置中使用了 $^{60}\text{Co}$ 。1966年，国际原子能协会（IAEA）制定了医疗器材辐射灭菌规则。目前，世界卫生组织和各国正在研究这个规则，以期产生一个国际辐射灭菌标准。

1938年，美国国家标准局（USNBS）发表的《大气尘埃染色试验》，其中所提标准对于今天洁净室及医院无菌室具有一定意义。1961年，美国空军研究所（USAFI）对空气中尘埃测定的规定比国家标准局更进了一步，明确了洁净室的概念。Whittfield为了得到更洁净的空间，采用了层流式通风，克服了以前湍流式空调的缺点。

1966年，洁净室技术被医院用于防止术后感染。将工业上去除微粒子的除尘技术用于无菌手术室，虽然目前还有许多方面处于实验阶段，但确实显著降低了术后感染率。

70年代，微波消毒技术在食品工业得到广泛应用。光化学杀菌与消毒作用得到深入研究。80年代，各种自动化技术应用于灭菌器的设计与建造，保证了灭菌效果的可靠性。同时，灭菌的化学与生物指示器材大量出现，并应用于常规监测中。90年代，低温等离子体灭菌技术得到推广与应用。邻苯二醛消毒液首先在美国推向市场。

## 第二节 消毒有关概念及专业名词

### 一、消毒与灭菌

消毒与灭菌虽然都指杀灭或清除传播媒介上的微生物而言，但却代表两个不同的概念。消毒是指杀灭或清除病原微生物，使之达到无害化。灭菌是指将所有微生物，不论是病原微生物或是其他微生物，全部杀灭或清除。消毒的保证水平为  $10^{-3}$ （指一件物品经消毒处理后仍然有微生物存活的机率），灭菌的保证水平为  $10^{-6}$ 。因此，消毒处理不一定都能达到灭菌要求，而灭菌一定可达到消毒目的。

杀灭人体内的微生物，应属于化学治疗范畴，一般不作为消毒措施。

### 二、消毒剂与灭菌剂

用于消毒的药物称为消毒剂。消毒剂不一定要求能杀灭所有的微生物，例如石炭酸、新洁尔灭等能杀灭细菌繁殖体但不能杀灭芽孢。用于灭菌的药物称为灭菌剂。灭菌剂必须具有能杀灭一切类型微生物的能力。由于细菌芽孢的抵抗力最强，所以一般都以能否杀灭芽孢作为灭菌剂的标准。环氧乙烷、过氧乙酸一类药物，既能杀灭各种繁殖体型的微生物，又能杀灭细菌芽孢，都是很好的灭菌剂。当然，灭菌剂也可作为消毒剂来使用。

### 三、抗菌剂与防腐剂(保存剂)

用于活组织(如皮肤、黏膜)防制微生物的药物叫做抗菌剂，它们与其他消毒或抑菌药物不同，除抗微生物能力外，还须具有刺激性小，没有毒性等特点。有人将这类药物又称为“防腐剂”。这种称法容易和用于防止有机物腐败的防腐剂相混淆。为此，本书将用于活组织消毒的有关药物称为“抗菌剂”；将用于有机物防腐的药物称为“防腐剂”或“保存剂”。

### 四、气体消毒剂与烟雾消毒剂

气体消毒剂是指可利用其气体进行熏蒸处理的消毒剂，其沸点一般较低。烟雾消毒剂是指将消毒剂与氧化剂、助燃剂或其他药物配成的复方，通过化学反应，产生烟雾以进行熏蒸消毒。

### 五、熏蒸消毒

熏蒸消毒是利用消毒药物的气体或烟雾，在密闭空间内进行熏蒸以达到消毒目的的一种方法，它既可用于处理污染的空气，亦可用于处理污染的表面。此法早有使用，但近年更加受到人们的重视，成为研究发展的一个重点。其优点是：①方法简便，节省人力；②可在缺水情况下消毒；③能同时处理大批物品；④不会浸湿消毒的物品。缺点是：①药物有的易燃易爆，有的有一定毒性；②消毒所需时间较长；③受温度、湿度影响明显；④费用较大。

### 六、强穿透性熏蒸消毒剂与弱穿透性熏蒸消毒剂

熏蒸消毒的药物，根据穿透能力可分为强穿透性与弱穿透性两大组。

强穿透性药物的气体,如环氧乙烷、环氧丙烷与溴甲烷,可深入孔隙与疏松物质的内部,甚至透过包装材料(布、纸),适用在密闭容器内对大批物品,尤其是包装好的物品进行消毒灭菌处理。这类药物因穿透力强,很难在室内保持恒定浓度,所以不适于进行房间内的熏蒸消毒。

弱穿透性药物,如过氧乙酸、甲醛、戊二醛、乙型丙内酯等气体与各型烟雾消毒剂,只能作用于物体表层,可用在房间内的熏蒸消毒。它亦可用在密闭容器内消毒小件物品,但因穿透力差,消毒物品间必须留有较大的空隙,并且不能使包装好的物品内部达到消毒或灭菌。

上述两组熏蒸消毒剂各具其独特性能,因此在消毒工作中都有一定的使用价值,难以完全互相取代。

## 七、杀灭作用,抑制作用与抗微生物作用

处理微生物,使之彻底死亡,称为杀灭作用。如仅使之停止生长与繁殖,一旦作用因素去除仍可复苏,则称为抑制作用。杀灭与抑制作用,统称为抗微生物作用。有的消毒剂在浓度较高或作用时间较长时,对微生物有杀灭作用,而浓度较低或作用时间短暂,仅具有抑制作用;有的则对细菌繁殖体有杀灭作用,而对芽孢却仅能起抑制作用。卫生防疫消毒中,要求的是“杀灭”病原微生物,不是“抑制”病原微生物。因此,在选择消毒剂以及决定使用浓度或作用时间时,必须加以注意。

## 八、消毒增效剂

有的药物本身没有或仅有微弱的杀灭微生物作用,但当与物理消毒法或消毒剂伍用时,可加强杀灭微生物的效果。这种药物称为消毒增效剂。例如,碳酸钠或肥皂可增进煮沸消毒的效果,表面活性剂可增进二氯异氰尿酸钠溶液的消毒效果等等。

## 九、预防性消毒与疫源地消毒

卫生防疫工作中的消毒,可分为预防性消毒与疫源地消毒。预防性消毒是指在未发现传染源的情况下,对有可能被病原微生物污染的物品、场所和人体等进行的消毒。例如,公共场所消毒、运输工具消毒、餐具消毒、饮水消毒、饭前便后洗手、粪便污水无害化处理和皮毛原料的消毒等等,都属于预防性消毒。这些措施应作为制度,不论是否确知被病原微生物污染,都应经常进行。疫源地消毒是指在有传染源(患者或带菌者)的情况下所进行的消毒。传染病医院对患者分泌物、排泄物、污染物品和病室等进行的消毒,以及卫生防疫站对病室进行的消毒,都属于这一类措施。

## 十、随时消毒与终末消毒

疫源地消毒可分为随时消毒与终末消毒。随时消毒是指为及时杀灭或清除由传染源排出的病原微生物而随时进行的消毒。终末消毒则是指在传染源住院隔离、病愈或死亡后,对其原居住地点的消毒。及时进行终末消毒,杀灭或清除传染源遗留下来的病原微生物,是消灭疫源地的一个重要措施。

### 第三节 消毒的方法

#### 一、物理消毒法

利用物理因子作用于病原微生物,将之杀灭或清除,叫做物理消毒法。物理因子按其在消毒中的作用,可分为以下五类。

##### (一)具有灭菌作用

主要有:热力、电离辐射、微波、红外线与激光等,可以达到灭菌水平。热力、电离辐射与微波效果较好,使用广泛,将有专门章节讨论。下面仅就红外线与激光的消毒应用作一简单介绍。

1.红外线为  $0.77 \sim 1\,000.00\ \mu\text{m}$  波长之电磁波。按波长的差别,大致可分为近红外线( $0.77 \sim 3.00\ \mu\text{m}$ ),中红外线( $3.00 \sim 30.00\ \mu\text{m}$ ),远红外线( $30.00 \sim 1000.00\ \mu\text{m}$ )三段。红外线有良好的热效应,热能直接由电磁波产生,不需介质传导,故升温快,有利于消毒。在一段红外线中,以远红外线最易被物品吸收,所以热效应也是最好的。但是,红外线的热效应只能在照到的表面产生,因此不易使一个物体前后左右均匀加热。根据此特点,红外线消毒只适用于导热较好,并且比较平坦的污染表面。为使物品受热均匀,可采用多面照射或旋转式单侧照射。

红外线光源愈强,热效应愈高。距光源愈远,热效应愈差。各种颜色表面对红外线的吸收率不同,吸收率愈高,温度效应愈好。黑色吸收率最高(87%),其他依次为:灰(75%)、绿(73%)、红(64%)、黄(50%)、白(46%)。

消毒用红外线烤箱,最高温度约可达  $200^{\circ}\text{C}$ ,较电热烤箱节电 50% 以上。为适应工业生产与特殊需要,还有自动输送式红外线烤箱与高真空红外线烤箱。前者可进行连续性消毒处理,后者可将消毒温度提高到  $280^{\circ}\text{C}$ ,以缩短作用时间。

2.激光 为激光器中受激发光物质经激发产生的光子通过谐振腔放大所形成的光束。从杀菌角度来看,其特点为:①能量高度集中;②指向性强。

激光对生物组织破坏的机理为:①热效应使细胞焦化;②冲击效应将细胞压缩变形以至破裂;③化学效应引起细胞分子化学键的断裂或生成游离基团。

对于激光杀菌作用的研究虽开始不久,但从其良好效果来看,是有发展前途的。已有关于手术刀、牙钻、玻璃瓶等灭菌试验的报告。激光与氧、超声波等均有协同杀菌作用。

##### (二)具有消毒作用

如紫外线与超声波等。利用这些因子,往往可杀灭大量微生物,但达到灭菌要求较难。紫外线的使用较广泛,将有专门章节介绍。下面仅就超声波对微生物的杀灭作用作一简单介绍。

超声波系振动频率大于  $20\ \text{kHz}$  的声波。超声波具有声波的一切特性。可以在固体、液体和气体中传播。传播时其强度随传播距离的增加而减弱。同时超声波还具有光的特性,具有反射、折射和衍射等现象。高频超声波也可以聚焦和定向发射。

超声波发生器主要有三种类型:机械式、磁致伸缩式、压电式。

超声波的作用原理主要是机械压强作用(包括辐射压强和超声压强)、产热效应、空化作用和化学作用。当超声波通过液体时,不断呈疏密相间的波动。稀疏时产生的负压可超过液体分子间的内聚力而形成空穴,密集时所产生的正压又使空穴破溃,形成巨大的压力。此种正负

相交的压力，冲击微生物可使之破碎死亡，冲击水或其他化合物分子可产生电离和自由基。自由基的化学活性较强，作用于微生物亦可使之致死。

超声波对杆菌的杀灭作用较球菌强，对细菌繁殖体和病毒作用较酵母菌及细菌芽孢强。一般说，作用时间愈长，杀菌效果愈好。菌液容量愈大，浓度愈高，效果愈差。菌液的深度最好浅于所用超声波波长之半，过深消毒效果降低。其输出功率愈大，消毒效果愈好。在一定范围内，频率愈高，杀菌作用愈强，但频率过高，不易产生空穴作用，效果反差。高温，有利于超声波的杀菌，而有机物则对微生物有保护作用。当与某些化学或其他物理因子合用时，可有协同杀菌作用。

### （三）具有自然净化作用

如冷却、冰冻、干燥等。它们杀灭微生物能力有限，多在自然净化中发挥作用。

冷却与冰冻是两个概念。冷却是降低温度，但不一定形成冰冻。微生物在冷却时，可大量死去，冷却愈快，死亡愈多，温度缓慢下降，很少有死亡发生。一旦温度稳定后，死亡即减少以至停止。在低温存留下来的微生物，新陈代谢降低，存活的时间延长，因此实验室又多用此以保存菌（毒）种。

冰冻除有冷却作用外。还有其他物理作用：①水结晶的挤压；②蛋白质絮凝与变性；③引起代谢损伤；④细胞膜渗透性改变。反复冰冻、融化、冰冻，可增加微生物的死亡。

干燥的致死作用在于：①使溶液中小量毒性物质浓缩；②抑制内源呼吸作用，干扰代谢。在空气中干燥比在真空中干燥破坏性更大。干燥时微生物的死亡多发生在第一个 100 min 以后死亡率即下降。皮肤上的绿脓杆菌干燥时易死亡，因除干燥以外还有酸的作用（皮肤分泌物为酸性，主要是油酸）。

### （四）具有除菌作用

如机械清除、通风与过滤除菌等。此类措施虽不能杀灭微生物，但可将它们从传播媒介上去除，同样可起消毒或灭菌作用。过滤除菌的使用，不论对液体或气体均较普遍，将有专门章节介绍。

机械清除法有一定的除菌作用。常用的有冲洗、擦抹、刷除等等。为加强除菌效果，常在清除操作中使用表面活性剂。机械清除物体表面微生物，可结合日常卫生清扫工作进行。清扫时，为防止微生物随尘土飞扬，以湿性清扫法为宜。

通风实际上也是对空气中的微生物进行稀释、清除。自然通风是一种最为简便、经济的空气消毒方法。室内空气受到污染，打开门窗通风，即使无风时，1~2 h 亦可达到无害化。若室内外温差较大，房间的通风条件较好，或有微风时，换气的还可适当缩短。

### （五）具有辅助作用

如真空、压力等，本身不能杀灭微生物，但可为杀灭、清除或抑制微生物创造有利条件。例如，真空可去除容器中的氧气，有利于抑制某些微生物的生长繁殖。真空亦可以加速压力蒸汽灭菌或气体消毒剂的杀菌作用。加压可提高水蒸汽的温度，增强其杀菌作用。

目前，我国消毒工作中，应用比较普遍的物理消毒方法是加热处理、紫外线照射与过滤除菌，特别是各式各样的加热处理消毒方法。

## 二、化学消毒法

利用化学药物杀灭病原微生物的方法，叫做化学消毒法。用于消毒的化学药物叫做化学

消毒剂,以植物制成的消毒药物则称为植物消毒剂。平时大量使用的多为化学消毒剂。

化学消毒剂从使用时的物理状态来分,有液体消毒剂、固体消毒剂与气体消毒剂三大类。气体消毒剂用于熏蒸消毒。烟熏消毒剂是利用化学消毒剂产生的烟雾进行熏蒸杀菌,性能与前者相类似,所以有时亦将之归类于气体消毒剂之中。气体消毒剂可分为强穿透性与弱穿透性两类。前者如环氧乙烷、溴甲烷等,可用于包装物品的消毒,后者如甲醛、过氧乙酸与一些烟雾消毒剂,多用于房间的消毒处理。两者各有长短,在有些场合下是不能取代的。

根据杀菌作用强弱,化学消毒剂可分为:①高效消毒剂,能杀灭各种细菌、真菌和病毒,包括细菌芽孢。其中可使物品达到灭菌要求的高效消毒剂又称灭菌剂。使用化学药物进行灭菌,一般多不需加温,故与其他不需加温处理的灭菌措施(如电离辐射)合称为冷灭菌。②中效消毒剂,能杀灭细菌繁殖体、结核杆菌、真菌和病毒,但不能杀灭细菌芽孢。③低效消毒剂,只能杀灭部分细菌繁殖体、真菌和病毒,不能杀死结核杆菌、细菌芽孢和抗力较强的真菌和病毒。

只能抑制微生物的生长而不能将之杀灭的药物称为抑菌剂。仅依靠抑菌作用,不能防止传染病散播。有的药物,杀菌作用属于低效组,但抑菌作用却可以很强,例如季铵盐类消毒剂(0.0001%度米芬还可抑制金黄色葡萄球菌生长)。

化学消毒剂还可从其化学成分来分类:①含氯消毒剂;②过氧化物类消毒剂;③醛类消毒剂;④杂环类气体消毒剂;⑤醇类消毒剂;⑥季铵盐类消毒剂;⑦酚类消毒剂;⑧其他类别等八类。此方面将有专门章节介绍,这里不再赘述。

刘育京教授认为,作为一个理想的化学消毒剂,应具备以下几个特点:(1)杀菌谱广;(2)有效浓度低;(3)作用速度快;(4)性能稳定;(5)易溶于水;(6)可在低温下使用;(7)不易受各种物理、化学因素影响;(8)对物品无腐蚀性;(9)无臭、无味、无色;(10)毒性低,消毒后无残留危害;(11)不易燃烧,使用安全;(12)价格低廉;(13)便于大量运输;(14)可大量生产供应。目前,化学消毒剂种类很多,除单药外,复方更多,但是没有一种能够完全符合上述要求的。因此,在使用中,只能根据药物的性质与工作中的特点来加以选择。

化学消毒的用药方法,可用消毒剂溶液浸泡、擦拭或喷洒,也可用其气体或烟雾进行熏蒸,还可直接用粉剂进行处理。最近提倡的气溶胶喷雾消毒法,既可达到喷洒的目的,又可产生熏蒸的作用,是一种节约药物提高效果的好方法,化学消毒用药方法的多样化,为各种对象消毒提供了有利条件。

### 三、生物消毒法

利用一些生物及其产生的物质来杀灭或清除病原微生物的方法叫做生物消毒法。在自然界,有的微生物在新陈代谢过程中,往往形成不利于其他微生物存活的物质或环境,并将其杀灭。例如,传统的污水净化可通过缺氧条件下厌氧微生物的生长来阻碍需氧微生物的存活;粪便、垃圾的发酵堆肥,可利用嗜热细菌繁殖时产生的热杀灭病原微生物。

除抗生素外,目前还发现大量的生物及其产物具有杀菌、消毒作用,如各种噬菌体对细菌的裂解作用、天然植物提取液(松树油、桉树油、麝香草油、柠檬果等)、蜂蜜、抑菌肽、杀菌蛋白、溶菌酶、核酸酶等。

70年代,美国弗吉尼亚大学的化学工程研究所进行了一系列用生物酶消毒细菌与病毒的研究。他们将可与病毒共价结合的核酸酶连接到玻璃和陶瓷支撑物上,对水和空气中的病毒进行消毒,结果发现效果甚佳,而且这种性质稳定的酶对气溶胶态的病毒的灭活作用,要比液

相态病毒的灭活作用更强,并在流感、疱疹 I 型、柯萨奇 A21 病毒的消毒研究中得到证实。他们还发现,与每个病毒共价结合的核酸酶是最有效和稳定的酶。该组研究人员报告说,用置于玻璃纤维滤膜上的溶菌酶对空气中的大肠杆菌和微球菌进行了成功的消毒,此成果还获得专利授权。

80 年代,美国化学研究发展工程中心的研究发现:一种从链球菌属获得的 **Mutanolysin**,不仅可溶解链球菌,还可溶解其他细菌,如炭疽杆菌、土拉杆菌和鼠疫杆菌等。将 **Mutanolysin** 与溶菌酶联合使用,对革兰阳性细菌的消毒效果很好,对革兰阴性细菌也在一定的条件下起作用,这种混合物虽可消毒真菌,但效果不太强。同时他们还发现,一种从分节孢子杆菌提出的裂解酶,在磷酸盐缓冲条件下,可通过裂解直链多聚糖的 1~3 连锁而溶解囊球菌和明显抑制白色念珠菌的生长。

我国上海复旦大学研究了溶葡萄球菌酶 (**lysostaphin**),发现该酶是一种含锌的金属蛋白酶,专一降解细胞壁的甘氨酸肽键,能裂解金黄色葡萄球菌等细胞壁具有甘氨酸肽键的细菌。并从基因克隆、发酵生产、分离纯化到初步应用,建立了一个完整的体系,最终由上海高科公司以 **FE** 复合酶产品推向国内市场。

2001 年,美国北卡罗来纳州立大学罗利分校生物学教授石家兴发现,一种可以分解鸡毛的酶,有可能被用来“消化”导致疯牛病和人类克雅氏症的毒蛋白。研究中发现,枯草杆菌分泌的一种角蛋白酶能够分解鸡毛,使鸡毛变成能被小鸡消化吸收和有助生长的饲料。由于鸡毛中所含角蛋白与导致疯牛病的毒蛋白同为  $\beta$  结构,石教授想到角蛋白酶也许可以对付疯牛病。他与荷兰一家疯牛病专业检测机构联合进行的试验表明,角蛋白酶确实能够破坏毒蛋白,使其丧失传染能力。

## 第四节 影响消毒效果的因素

在消毒过程中,不论是物理法、化学法或是生物法,它们的效果都受很多因素的影响。掌握并利用这些因素,可以提高消毒效果;反之,处理不当,则会导致消毒的失败。为此,工作中必须加以注意。影响消毒效果的主要因素有以下几项。

### 一、处理剂量

作为消毒处理的剂量,包含有两个因素,一是强度,二是时间。强度,在热力消毒中是指温度,在紫外线消毒中是指照射强度,在电离辐射消毒中是指剂量率,在化学消毒中是指药物浓度。时间,是指所使用处理方法对微生物作用的时间。一般,强度越高,微生物越易死亡;时间越长,微生物遭到杀灭的机率也越大。

强度与时间之间,互相是有关联的,这种关系可用速度常数或浓度系数来表示。强度的减弱可用延长时间来补偿,但是当强度减到一定限度后,即使再延长时间也无杀灭作用了。例如,热力消毒对于细菌繁殖体,使用的最低限,一般为 **56~60℃**,再低则作用迟缓,失去实用意义,到 **40℃** 左右即完全失去杀灭作用。又如,消毒药物的浓度降低至一定程度后,可能只有抑制作用或完全失去抗菌作用,即使延长时间亦不能再达到杀灭微生物的目的。同样,微生物的死亡和消毒作用的穿透都需要一定时间,任何消毒作用都不是瞬间能完成的。所以,时间的缩短也有一个极限。例如,目前使用的压力蒸汽灭菌方法,一般需时 **15 min** 以上(**121℃**),最快的



处理亦不得少于 4 min(预真空压力蒸汽灭菌器, 132℃)。化学消毒, 长的需要数小时以上(甲醛或环氧乙烷熏蒸), 短的也要作用数分钟。

消毒处理的剂量是杀灭微生物所需的基本条件。在实际消毒中, 必须明确处理所需的强度与时间, 并在操作中充分保证, 否则难以达到预期效果。

## 二、微生物污染程度

微生物污染程度越严重, 消毒就越困难, 原因是: ①需要的作用时间延长; ②消耗的药物(或能量)增加; ③微生物彼此重叠, 加强了机械保护作用; ④耐力强的个体随之增多。例如, 甲醛(8%)、异丙醇(67%)与六氯酚(0.5%)混合消毒液浸泡染有枯草杆菌芽孢的刀片时, 当每片刀片染有 10 万个芽孢时需作用 3 h, 染有 1 000 个芽孢时需作用 2 h, 染有 10 个芽孢时只需 30 min。对于污染严重的对象, 消毒处理的剂量要相应加大。在消毒的实际工作中, 规定的剂量一般都能使污染比较严重的物品(每毫升洗液含菌量在 10 万个左右)达到消毒要求, 并还留有一定的安全系数。除非污染特别严重, 否则按规定的剂量处理即可。

## 三、温度

除热力消毒完全依靠温度作用来杀灭微生物外, 其他各个消毒方法, 亦都受温度变化的影响。一般说, 无论在物理消毒或化学消毒中, 温度越高效果越好, 但也有少数例外。如电离辐射灭菌中, 较高温度有时反可加强细菌芽孢的耐受力, 但超过 80℃后, 耐受力又复减弱。臭氧消毒, 对无色杆菌所需剂量, 在 20℃时反较 0℃时多一倍以上; 对于真菌则要多 100 倍左右。

温度变化对消毒效果影响的程度, 随使用方法、药物以及微生物种类不同而异, 一般可用温度系数表示。有的情况下, 消毒处理本身就需要一定温度才行, 因此当温度降到极限以下, 即无法进行处理, 例如, 环氧乙烷气体熏蒸, 低于 10.7℃时, 药物本身即不能挥发成气体。紫外线照射, 灯管本身输出的强度亦随温度降低而减弱。有的灯管在 4℃时输出的强度只有 27℃时的 20% ~ 35%。

## 四、湿度

空气的相对湿度对熏蒸消毒影响显著。使用环氧乙烷或甲醛消毒都有一个最适相对湿度, 过高过低都会减低杀灭微生物的效果。直接喷洒消毒剂干粉处理地面时, 需要有较高的相对湿度使药物潮解才能充分发挥作用; 而紫外线照射, 相对湿度增高, 影响其穿透, 反而不利于消毒处理。

## 五、酸碱度

酸碱度的变化可严重影响消毒剂的作用。例如, 季铵盐类化合物在碱性溶液中作用较大, pH 3 时杀灭微生物所需剂量要较 pH 8 时大 10 倍左右; 酚类则在酸性溶液中效果较好, 三氯苯酚在 pH 6 时, 对伤寒杆菌的石炭酸系数为 10, 而在 pH 10 时则降为 1。又如 2%戊二醛水溶液作用于细菌芽孢, 当 pH 由 3 提高为 8 时, 杀灭作用逐步增强。但是次氯酸盐溶液, 当 pH 由 3 升至 8 时, 杀菌作用反被削弱。

此外, pH 降低(< 5)后, 可削弱微生物对热的耐受力。因此, 对酸性食品(酸菜、水果)热力灭菌所需的温度较之碱性食品(肉类)要低。

## 六、化学拮抗物质

自然情况下,微生物常与很多其他物质混在一起,这些物质往往会影响到消毒处理的效果。例如,蛋白质、油脂类有机物包围在微生物外面可妨碍各种消毒因素的穿透。在化学消毒中,有机物本身更可通过化学反应消耗一部分消毒剂。受有机物影响较大的有次氯酸盐、季铵盐类消毒剂、乙醇等。条件允许时,将污染物品清洗后进行消毒、灭菌,效果更好。

此外,对于化学消毒,还可有其他拮抗物质。例如季铵盐类消毒剂的作用可被肥皂或阴离子洗涤剂所中和;次氯酸盐的作用可被硫代硫酸盐中和;过氧乙酸的作用可被还原剂所中和。这些现象在消毒处理中都应避免发生。

## 七、穿透条件

物品被消毒时,消毒因素必须接触到微生物本身才能起杀灭作用。不同因素,穿透能力不同。例如,干热穿透能力就比湿热差,甲醛蒸气穿透能力比环氧乙烷差。电离辐射可穿透多种物质而作用到隐藏于物品深处的微生物,而紫外线只能作用于物体表面或浅层液体中的微生物。消毒中所需的穿透时间,往往比杀灭微生物时所需的时间长得多,最长的可达十几以至数十小时,例如用环氧乙烷消毒大量成捆的皮毛。

消毒时,除要保证有足够的穿透时间外,还需为消毒作用的穿透创造条件。例如,热力消毒时,物品不宜包扎太大、太紧;甲醛熏蒸时,应将衣物散开挂起;化学消毒粪便、痰液时,应将药物与之搅拌均匀等等。

## 八、表面张力

消毒液表面张力的降低有利于药物接触微生物而促进杀灭作用的进行。为增进消毒效果,一方面可选用表面张力低的溶剂配制消毒液,如用乙醇配制的碘酊就比用水配制的碘液表面张力低;另一方面可在消毒液中加入表面活性剂以降低溶液的表面张力,如含氯消毒剂中加入少许表面活性剂,氯代二甲苯酚溶液中加入少许饱和脂肪酸肥皂,杀灭作用都可有所提高。在加入表面活性剂时应注意选择,防止与消毒剂本身产生拮抗作用。此外,温度提高亦具有降低药液表面张力的作用。

# 第五节 消毒方法的选择

为使消毒工作能顺利进行并取得较好的效果,必须根据不同情况,选择适宜的方法。一般,在选择方法时,应考虑下面几个问题。

## 一、病原微生物的种类

卫生防疫消毒工作中遇到的病原微生物种类很多,它们对各种消毒处理的耐受性亦不一样。细菌芽孢对大多数消毒处理的耐受力比其他类型微生物强得多,只有使用较强的热力与辐射处理或灭菌剂处理才能取得较好的效果,所以一般都以它们作为最难消毒的代表。结核杆菌、真菌孢子、肠道病毒与肉毒杆菌毒素等,它们对有的消毒措施比较敏感,对有的则具有较强的耐受力。例如,结核杆菌对热力消毒很敏感,而对某些消毒剂的耐受力却较其他细菌繁殖体

强得多；真菌孢子对紫外线抗力很强，但却较易被电离辐射所杀灭；肠道病毒对过氧乙酸的耐受力与细菌繁殖体相近似，但季铵盐类消毒剂对之却无效；肉毒杆菌毒素较易被碱所破坏，但对酸的耐受力较一般细菌繁殖体要强得多。这一类对各种消毒措施耐受力相差较大的微生物，情况比较复杂，在选择方法与使用剂量上，应予以重视。至于其他细菌繁殖体与病毒，以及螺旋体、支原体、立克次体与衣原体等，它们对消毒处理的耐受力最差，常用方法一般都可收到较好的效果。

## 二、处理对象的性质

同样的消毒方法对不同性质的物品，效果往往不一样。例如，对垂直墙面的消毒，油漆的光滑表面，药物不易停留，使用冲洗或药物擦拭的方法效果较好；粉刷的粗糙表面，较易濡湿，以喷雾处理为好。使用环氧乙烷气体熏蒸消毒时，对易于吸收药物的布类、纸类，效果较好；对于不吸收环氧乙烷的表面，如金属等，则需时较长。

此外，还应考虑对处理对象的损害问题。例如，高压蒸气灭菌皮毛制品，环氧乙烷熏蒸赛璐璐制品，高浓度过氧乙酸或含氯消毒剂浸泡棉织品，用煤酚皂溶液多次长时间浸泡乳胶手套等等，都可使处理对象遭到不同程度的损坏。对于食品、餐具等，应注意不要使用有毒或具有恶臭的消毒剂处理。

## 三、消毒现场的特点

一方面应考虑当地所具备的条件，另一方面应考虑当地环境对消毒效果的影响。例如，野外地面消毒中，在水源丰富而方便的地区，喷洒消毒药液效果较好；但在缺水地区，则只能选用直接喷洒消毒药粉的方法。室内表面消毒，房屋密闭性好的，可使用熏蒸消毒法；密闭性差的只能使用液体消毒剂处理。对空气的消毒，通风条件较好而外界空气又清洁的地区，可以利用自然换气法；通风不良，污染空气长期滞留的建筑物内，则必须使用药物熏蒸或喷洒方法处理。又如，对空气的化学消毒，室内无人时，可使用刺激性较强的消毒剂处理，当室内有人时，只能选用消毒香一类刺激性较弱的消毒剂进行熏蒸。

使用消毒方法的安全问题亦是需要考虑的因素之一。例如，在人烟稠密的市区内，不宜使用大量具有刺激性的气体消毒剂，否则对周围居民健康影响大。在距火源很近（50 m 以内）的场所，不宜使用大量环氧乙烷气体消毒，否则易引起燃烧爆炸事故。对大量污水、粪便的化学处理，需考虑是否能引起公害。

## 四、卫生防疫的要求

不同情况下，疾病传播的机会不同，在防疫的要求上也不一样。例如，传染病流行中，对发病严重的疫区应集中使用较好的药物与器械，而对于发病较少，或外围地区，则可采取较为简易的消毒方法，以至进行一般的清洁卫生处理即可。在敌人进行生物战，喷洒生物战剂气溶胶，造成大面积污染时，对重要战略地区或人口集中处，应采取迅速有效的方法进行消毒处理；至于人迹罕到，或可以暂时不进入的地区，可采用封锁的方法留待自净。对于传染病院，因患者集中，污染严重，消毒量大且次数频繁，宜选用固定的设备与高效的方法；对于病家的随时消毒，因工作量较小，又多是依靠群众自己进行，应选用较为简便并易于推广的方法。水的消毒，日常用水经洁治后用常规氯化法消毒即可；作为饮用水，则在洁治后最好加以煮沸。一般人的

粪便可使用堆肥法处理,而肠道传染病患者的粪便则必须先使用药物消毒后再排出到下水道。

对大批物品进行灭菌时,应根据污染程度和所要求的灭菌度来选择处理的方法与剂量。

在确定消毒方法时,除上述几个方面外,还应结合当时当地的人力、物力等问题加以全面考虑,才能做出较好的安排。

## 第六节 消毒试验研究方法

消毒试验研究的方法很多,不同的国家和地区有其不同的分类方法。最常见的有下列四种。

### (一)按试验的目的分类

1.第一期试验 初步试验和筛选试验。测定一种消毒剂是否具有抗微生物作用的试验。如最小抑菌浓度(MIC)试验、基本杀菌试验等。基本杀菌试验,即在没有任何种类的有机干扰物质存在时,测定消毒剂是否具有杀菌作用,以及各稀释度和不同作用时间对测试微生物的杀灭效果。

2.第二期试验 实验室模拟试验。测定一种消毒剂在实验室模拟实际应用条件下是否具有抗微生物作用,并确定有效作用剂量的试验。又可分为两步进行,第一步,试管内模拟试验;第二步,现场模拟试验,如手的消毒实验。

3.第三期试验 现场试验。在实际应用中测定消毒剂的抗微生物作用效果。

### (二)按试验微生物分类

1.测定抗菌作用的试验 杀菌试验、杀芽孢试验、杀结核菌试验。

2.测定抗真菌作用的试验 杀真菌试验。

3.测定抗病毒作用的试验 杀病毒试验。

### (三)按照试验的结构分类

1.试管内试验 悬液试验、能量试验、载体试验。

2.实用试验 测定消毒剂对各种表面、仪器、织物、排泄物、手、皮肤等消毒效果的试验。

3 使用中的试验。

### (四)按照作用类型分类

可分为杀菌试验和抑菌试验。

此外,还可按照试验的性质分类,将消毒试验分为定性试验和定量试验。在欧洲共同体所有成员国,统一采用第一种分类方法。在美国和我国经常采用第二、第三、第四种分类方法。各种分类方法中,根据实验设计的不同,还有许多特有名称。如悬液试验方法中的酚系数测定法,又分为 Rideal - Walker 法和 AOAC 法。能量试验又称 Kelsey - Sykes 试验。

(张文福)

### 参考文献

- 1 消毒杀虫灭鼠手册编写组.消毒杀虫灭鼠手册.北京:人民卫生出版社,1980:1-11
- 2 刘育京,袁朝森主编.消毒学简明教程.北京:中国科技出版社,1989:1-18

- 3 富川佐太郎. 灭菌与消毒的发展历史. 消毒与灭菌, 1984;1:56 – 59
- 4 薛广波主编. 实用消毒学. 北京: 人民军医出版社, 1986;1 – 18
- 5 国家卫生部. 消毒技术规范(第一分册). 第 3 版. 1999;1 – 6
- 6 Block SS ed. Disinfection, sterilization and preservation. 4th edition. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991: 3 – 26
- 7 Morrissey RF, Phillips GB ed. Sterilization technology. New York: Van Nostrand Reinhold, 1993: 1 – 78
- 8 William AR, David JW. New disinfection and sterilization methods. Emerg Infect Dis, 2001;7:348 – 353

## 第二章 热力消毒与灭菌

利用热力灭活微生物防止疾病传播的处理是最古老的一种消毒方法，早在发现微生物以前，人们根据生活经验即在使用这种方法躲避疫病。战国时代著作《周礼·夏官》曾记载有“司灌，掌行火之政令，四时变国火，以救时疾。”即是说掌管用火的官吏，负责组织百姓用火烧燎防疫。明朝李时珍在《本草纲目》中更明确写有“天行瘟疫，取出病人衣物，于甑上蒸过，则一家不染。”在国外，基督教《圣经》中亦记载有用火焚毁患者衣物以防疫病传播之说。19世纪人们认识微生物后，杀菌防病更有了针对性，利用热力防止感染的方法和设备不断得到改进和发展，至今仍被认为是最方便、可靠，并且在物品上不残留有害物质的消毒与灭菌方法之一。

### 第一节 基本概念

#### 一、微生物对热的耐受力

微生物对热的耐受力随其种类而异。一般情况下，从热的种类来看，微生物对干热的耐受力较对湿热者为强；从微生物类型来看，细菌芽孢或真菌孢子型的微生物较繁殖体型者对热的耐受力为强。

##### （一）细菌繁殖体的耐受力

细菌繁殖体，包括结核杆菌，在  $65 \sim 100^{\circ}\text{C}$  热水中可较快被杀灭。一般认为对热耐受力最强的是粪肠球菌（*Enterococcus faecalis*），但 Brock 等（1969）报告，革兰阴性的水生栖热菌（*Thermus aquadicus*）可在  $70^{\circ}\text{C}$  温泉中生长繁殖。Pask - Hughes 等（1975）曾在医院热水供应系统中分离到耐热的非芽孢型细菌。Peel 等（1985）报告，经常可在  $35 \sim 43^{\circ}\text{C}$  供水管中分离出嗜肺军团菌（*Legionella pneumophila*）。

##### （二）病毒和真菌的耐受力

大多数病毒和真菌在  $65 \sim 100^{\circ}\text{C}$  湿热下，亦可被较快灭活。但对血液或组织中的乙型肝炎病毒（HBV）和人免疫缺陷病毒（HIV），仍以较长时间煮沸或压力蒸汽处理为妥。以 HIV 为例 Cuthertson 等（1987）报告，在沸水中数分钟即可将之灭活，但世界卫生组织（WHO），1988 年仍建议需煮沸 20 min。Colvin 等（1988）报告，在冷冻干燥浓缩凝血因子中的 HIV，用干热灭活，需在  $68 \sim 72^{\circ}\text{C}$  作用 72 h；对丙型肝炎（HCV）则需  $80^{\circ}\text{C}$  作用 72 h。Kimberlin 等（1983）报告，对脑组织中属于朊病毒（prion）的克雅氏病（Creutzfeldt - Jakob disease）病原体，进行预真空压力蒸汽灭菌，需经  $134^{\circ}\text{C}$  作用 18 min。

##### （三）细菌芽孢的耐受力

细菌芽孢在常见的微生物中对热的耐受力最强，但不及朊病毒。其耐受力随细菌种类而异，其中对湿热耐受力较弱者有炭疽杆菌（*Bacillus anthracis*）、E 型肉毒梭菌（*Clostridium botulinum* type E）、产气荚膜梭菌（*C. perfringens*）等芽孢，耐受力最强者为嗜热脂肪杆菌（*B. stearothermophilus*）芽孢。对干热耐受力最强的却不是嗜热脂肪杆菌芽孢，而是枯草杆菌黑

色变种(*B. subtilis var. niger*)芽孢。

细菌芽孢耐热机理的研究一直受到重视,但因各家试验结果不一,有的甚至相互矛盾,至今尚未能全部解决。日前,有以下一些主要观点:①根据芽孢成熟后折射率的变化,表明其含水量减少,从而推断耐热力的增强和代谢活动的下降可能与水含量减少有关。②芽孢对干热的耐受力较对湿热者为强,其水活性值( $a_w$ )愈低,所需  $D_{10}$  值愈高,认为对热的耐受力与芽孢内水活性值低有关。③细菌原不含吡啶二羧酸(dipicolinic acid, DPA),在形成芽孢后才产生大量该化合物,并占芽孢干重的 15% 以上,故认为耐热性与吡啶二羧酸的形成有关。④与芽孢壳有关,因去除芽孢壳后芽孢对热的耐受力亦消失。⑤与芽孢皮质(spore cortex)有关,因芽孢只有在皮质层形成 90% 以上时,才会产生较强的耐热性。⑥与芽孢核心(spore core)严重脱水有关,因核心含有主要的生命物质,诸如核酸、核糖体、酶、脂类等,芽孢所特有的 DPA 亦均在其中。正常存在于细胞质中的水分,在芽孢前期合成皮质或 DPA 时失去了 50%。核心严重脱水,所含成分紧缩,无自由水,仅有结合水,这种干涸状态,加强了对化学和物理作用因子的耐受力。以上虽然观点很多,但大多与水分丢失有关,这一点似乎是一致的。

## 二、湿热与干热的区别

湿热(moist heat)和干热(dry heat)是热力杀菌的两大作用因子。湿热与干热的区别在于灭菌处理时,加热环境和微生物细胞的湿度水平(moist level)有所不同。此处所谓“湿度水平”并非指含有的水量,而是指在气体或液体系统中所含的自由水(free water)的水平。自由水又称有效水(available water)。在空气或其他气体环境中的湿度水平,以相对湿度(relative humidity, RH)表达,即在一已知温度下,气体系统中水蒸气的含量与该温度水蒸气饱和程度的百分比值。相对湿度的范围介于 0% ~ 100% 之间。其计算公式如下:

$$RH = \frac{\text{水蒸气的实在含量}}{\text{该温度条件下应含水蒸气的最高值}} \times 100\%$$

在液体中的湿度水平称为水活性(water activity,  $a_w$ ),以溶液的蒸汽压力与纯水的蒸汽压力比值表达。水活性值  $\leq 1$ , 因溶液的蒸汽压力不会超过纯水的蒸汽压力。其计算公式如下:

$$a_w = \frac{\text{溶液中的蒸汽压力}}{\text{纯水的蒸汽压力}}$$

将  $a_w$  乘以 100, 相当于相对湿度值。按此,水活性若为 0.2、0.4、1.0, 各相当于 20%、40%、100% 的相对湿度。微生物细胞质为含大量有机物与无机物的浓溶液,活细胞内的水活性无法直接测量,但可设定其相当于微生物悬浮液体的水活性,或当时气体环境(空气或其他气体)的相对湿度。

“湿热”加热,在此指微生物内部与加热环境均处于湿度饱和状态的加热。此时,微生物与纯水或饱和蒸汽呈平衡状态。“干热”加热,则用于指加热环境中无水,或不足以达到湿度饱和状态下的加热,其湿度水平可以为 0,或刚刚低于饱和状态。

湿热与干热的消毒与灭菌方法,虽都是利用热的作用灭活微生物,但由于本身的性质与传导介质不一样,因此在消毒与灭菌中的特点亦有所不同(表 2-1)。

表 2-1 湿热与干热杀菌应用的比较

项 目	湿 热	干 热
导热介质	水或蒸汽	空气
对物品影响	濡湿	烤焦
适用对象	不畏湿与热的物品	不畏高热物品
作用温度	60 ~ 134℃	160 ~ 180℃
作用时间	3 ~ 60 min	1 ~ 5 h
杀菌能力	较强	较弱

### (一) 生长和形成芽孢的条件

在消毒与灭菌中,不仅各种微生物对热的耐受力不同,即使同样的菌(毒)种,若生长(或培养)和形成芽孢的条件不同,亦会影响到其效果。培养基不同,可使培养出的细菌耐热能力有相当大差别。同样,形成芽孢的温度变化亦可产生类似结果。嗜热菌(thermophils)和大多数嗜温菌(mesophils)在其生长温度上限时形成的芽孢,耐热能力最强,而梭状杆菌反倒在低于生长温度下限时形成的芽孢,耐热能力最强。

### (二) 温度

在热力杀菌中温度愈高,所需时间愈短。温度的影响一般用  $z$  值表示。 $z$  值是指使  $D_{10}$  值变化 10 倍时要求的温度变化(℃)。将所测定不同温度的  $D_{10}$  值作图,两者呈直线相关,由之可求得  $z$  值(图 2-1)。Molin(1982)测定的  $z$  值,湿热平均为 10℃(7 ~ 24℃),干热为 21℃(10 ~ 60℃)。此结果目前被广泛接受。 $z$  值愈低,表明温度对杀菌效果的影响愈大。

表 2-2 水活性对细菌芽孢耐热力的影响

水活性( $a_w$ )	$D_{10}$ 值(min)
0.1	59.5
0.2	73.5
0.4	88.7
0.6	67.4
0.8	36.0
0.9	10.9

(表中数据取自 Angelotti 等, 1986)

## 三、影响热力杀菌效果的因素

热力杀菌不论湿热或干热,与其他因子杀菌一样,均有不少因素会影响其效果。有的在杀菌处理前即需注意,例如细菌培养和形成芽孢的条件,物品的包装和摆放;有的则是在处理中的问题,例如温度、湿度和氢离子浓度等等。

### (三) 湿度

细菌原生质的水活性与其所悬浮溶液的水活性相当,如果悬浮在空气(或其他气体)中,则与该空气(或其他气体)的相对湿度相当。Murrell 等(1966)报告,由所测芽孢湿度水平与其耐热能力的关系曲线可看出, A、B 两种细菌芽孢, A 对热耐受力较差, B 的耐热力较高,当两者  $a_w$  值为 1.0 时,耐热强株 B 的  $D_{10}$  值远高于耐热力弱的 A 菌株。但当  $a_w$  值下降

时,其耐热能力均有上升,当  $a_w$  值到中等程度的 0.2 ~ 0.4 时,达到高峰。此时两者的耐热能力相差明显缩小(图 2-2)。 $a_w$  值继续下降,  $D_{10}$  值虽有所下降,但仍远高于湿度饱和( $a_w$  1.0)时者。Angelotti 等(1968)以枯草杆菌黑色变种芽孢测试,亦验证了上述  $a_w$  值变化与  $D_{10}$  值升降的关系(表 2-2) 此规律对生物指示器材菌株的选择和制备条件均有重要意义。同样,细菌繁殖体和酵母菌的  $a_w$  值对其耐热性的影响亦与芽孢相似。此结果对食品和其他  $a_w$  值较低物质的处理亦很重要。食品往往含有较多的糖或盐,可使  $a_w$  值明显降低。



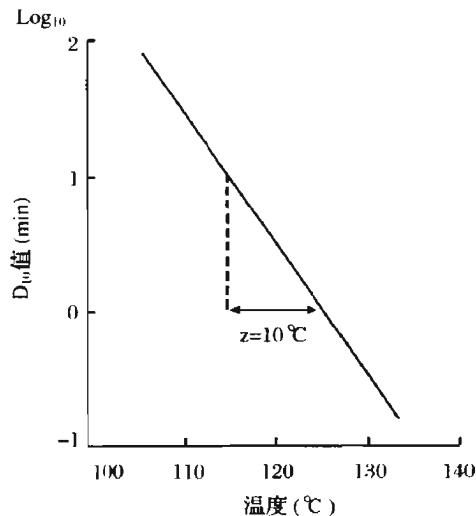


图 2-1 热力杀灭细菌芽孢中温度与作用时间的相关曲线

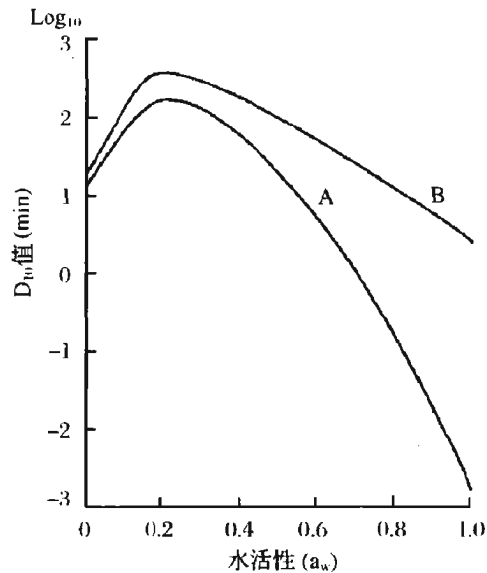


图 2-2 水活性对细菌芽孢耐热能力的影响  
A:对热较敏感菌株。B:对热耐受力强菌株

#### (四)氢离子浓度(pH)

细菌芽孢在 pH 7 时,对热有强耐受性,但在酸性介质中可被迅速杀灭。在罐头食品生产中,常按酸碱度将其分为非酸性食品( $\text{pH} > 4.5$ )和酸性食品( $\text{pH} \leq 4.5$ )。前者如肉类、蔬菜等,需以  $121^\circ\text{C}$  处理,并保证将肉毒杆菌芽孢数量减少至  $10^{-12}$ ;后者如番茄,以  $100^\circ\text{C}$  处理即可达到上述结果。

#### (五)穿透

为使热杀灭微生物,必须使热接触到微生物,因此如何使热穿透到物品中心或包装的内部是非常重要的。使用干热或压力蒸汽进行灭菌时,热空气或热蒸汽进入灭菌器柜室中,只在原有冷空气排出后才能彻底穿透接触到隐藏深处的微生物。为此,使热力迅速穿透,必须创造条件给冷空气以通顺的出路。同样,使蒸汽穿透到物品包裹或容器中时,亦必须使包裹或容器内部原有冷空气能够排出才能保证灭菌的成功。

与微生物混在一起的杂质,亦可影响热的穿透。例如凝固的血液、干结的痰和粪便均可阻挡热的穿透和直接接触微生物。油脂可影响蒸汽的穿透,因此凡士林和油纱布等不宜用压力蒸汽灭菌。亦有报告盐类晶体或福尔马林固定组织中的细菌芽孢,因热力难以穿透,经常规压力蒸汽灭菌后仍有存活。为此在热力灭菌前,应尽量将物品上的污物清洗干净,以利热直接作用于微生物。

#### (六)杂质

杂质的存在不仅可影响热的穿透,同时亦可影响微生物的湿度水平。例如,高浓度的糖或盐可降低悬浮液的湿度水平,从而影响到细菌和酵母菌的耐热能力。

La Rock(1975)报告,悬浮于无水油脂中细菌芽孢的热死亡曲线有一较长的肩形期,即加热后需待较长时间后芽孢才开始死亡;而在油脂中加入 0.02% 水溶液时,肩形期明显缩短,加入 0.1% 水溶液时,肩形期完全消失。该结果表明,纯油脂可加强细菌芽孢的耐热能力。水的加

入可降低芽孢的耐热能力，尚难用湿度水平解释。

## 五、 $F_0$ 值的计算

热力灭菌中，温度对微生物的杀伤，并非在达到规定的最高温度时才开始。实际上，温度升到一定水平后，即可对微生物有杀伤作用。为精确测定所用程序的相对灭菌能力（**relative sterilizing capacities**），可使用累计杀伤法（**method of integrated lethality, F**）的原理加以计算。

$F_0$  指在特定条件下热灭菌的  $F$  值，如湿热  $121^\circ\text{C}$ ， $z$  值为  $10^\circ\text{C}$  的  $F_0$  值，或干热  $160^\circ\text{C}$ ， $z$  值为  $21^\circ\text{C}$  的  $F_0$  值等等。 $F_0$  值可用公式计算，亦可用查“杀伤率表”（**Lethal Rate Table, Stumbo, 1973**）的方法获得。在计算前先测灭菌程序中每分钟温度的变化。测定时，用热电偶测温器探头插入最难达到灭菌部位物品中心，由升温至可对微生物产生伤害温度开始测量，到温度的最高峰，再下降至对微生物无害的温度时为止，每隔  $1\text{ min}$  测一次温度，并做记录，以备公式或查表计算。

湿热与干热灭菌均可使用公式计算法。湿热一般设定  $T_0 = 121^\circ\text{C}$ ， $z = 10^\circ\text{C}$ ；干热一般  $T_0 = 160^\circ\text{C}$ ， $z = 21^\circ\text{C}$ 。所用公式如下：

$$F = \Delta t \cdot \sum 10^{\frac{T - T_0}{z}}$$

$T$ ：实测温度， $T_0$ ：规定灭菌温度， $\Delta t$ ：测定温度的时间（ $\text{min}$ ）间隔。

查表法方法即以每隔  $1\text{ min}$  所测定的温度（即意味该温度作用  $1\text{ min}$ ）逐个查对“杀伤率表”将其转化为相当于规定灭菌温度的杀伤率（**lethal rates**），而后将所有数字相加即得。

欧美药典对要求无菌的药品除进行无菌检测试验外，还要求对灭菌工艺规定的  $F_0$  值进行验证。以压力蒸汽灭菌注射用药液， $F_0$  值应  $\geq 8$ 。我国对输液针剂亦有类似规定。

在灭菌中应注意，所规定的  $F_0$  值，可受物品耐热程度、容器大小、物品量多少等影响。新型灭菌器对  $F_0$  值可通过电子设备加以控制和记录。

## 六、热消毒与灭菌程序的设计

热死亡时间（**thermal death time**）为实验室中测定的以热力将某微生物样本全部杀灭所需的作用时间。热死亡时间是热力消毒与灭菌程序设计的基础，但在设计热力消毒与灭菌程序中，加热的时间不应只考虑热死亡时间，而应计算所需的全部时间，一般情况下处理所需的全部加热时间应包括以下各部分：

预热时间 + 排除冷空气时间 + 柜室升温时间 + 对物品的热穿透时间 + 热死亡时间 + 安全时间 + 降温时间。

上述程序中，预热时间指对消毒与灭菌器空柜室进行加热达到规定消毒或灭菌温度的时间，预热可增加柜室内干热的均匀度和防止蒸汽过多冷凝。排除冷空气时间为将柜内原有空气排出柜外，以加强热的穿透，对蒸汽灭菌尤为重要，应给予充分的时间。柜室升温时间指放入物品后将整个柜室加温至杀菌要求温度的时间。热穿透时间指干热或湿热穿透至物品中心使达杀菌要求温度的时间，由于其速度受多种因素影响，时间设定难度大，宜留较多余地。安全时间是为防止情况变化，或菌种耐受力差异，影响杀菌效果需要延长的加热时间，一般为热死亡时间的一半。在设计中，为简化，往往将热死亡时间与安全时间合在一起称为持续时间（**holding time**），即指物品中心达到规定温度后，保持该温度直至消毒或灭菌完成的时间。降温

时间指在完成消毒或灭菌停止加热后，柜内温度下降至可安全开门的时间（一般在达到 60℃ 时）。

其中，各种时间均较容易测到稳定的数值，设定后即变化不大，但热对物品穿透所需时间的确定很难,因其快慢常随物品性质、包装情况、蒸汽质量而变,并且变化较大,在下排气式压力蒸汽灭菌中有时可相差数倍。近年，预真空处理方法逐渐推广，将穿透时间减少到一两分钟，比较恒定，解决了不少这方面的困难，但在非预真空处理的消毒与灭菌法程序设定中仍应加以注意。设定的数值需通过试验加以认证。

## 第二节 干热消毒与灭菌

干热的特点是使用方便经济，可用于处理畏湿器材，销毁大量污染废弃物等。因其具有独到之处，在卫生防疫、工业生产、环境保护、实验室器材处理中广泛使用，有关技术与设备不断发展，为消毒与灭菌方法的主要组成之一。

### 一、干热对微生物的杀灭

干热通过使蛋白质氧化、变性、炭化和电解质浓缩中毒而使微生物死亡,但对微生物的灭活能力远不及湿热。湿热将嗜热脂肪杆菌芽孢全部杀灭仅需 121℃ 作用 15 ~ 20 min,而干热在 160℃ 时仍需 60 min 左右（图 2-3）。

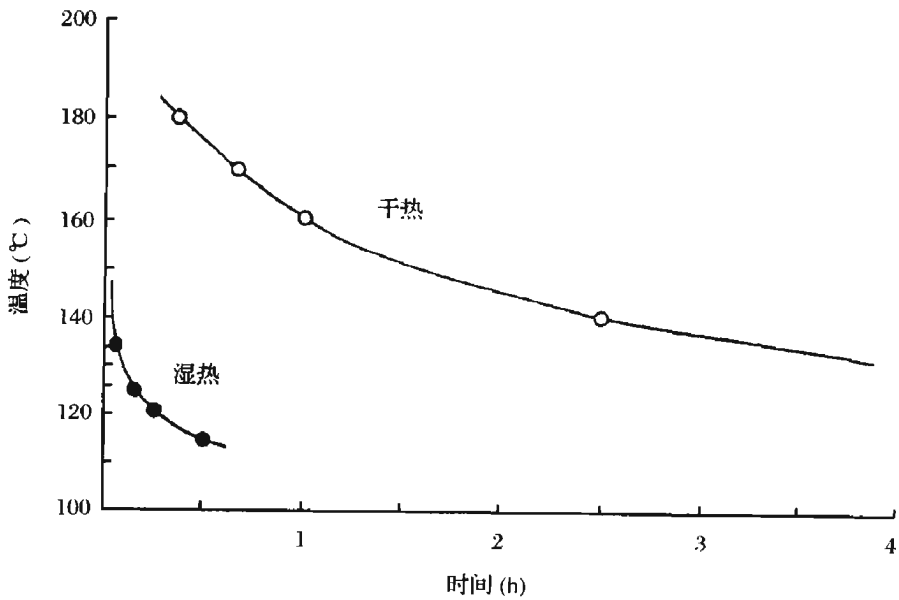


图 2-3 湿热与干热杀菌的比较

各类微生物在干热下的  $D_{10}$  值相差较大，以芽孢杆菌属细菌的芽孢为例，在干热( 160℃ )作用下的  $D_{10}$  值,高者可达 0.8 min ,低者仅为 0.03 min( 表 2-3 )。Bond 等(1973)曾报告,一株强耐受性芽孢杆菌芽孢在 125℃ 时的  $D_{10}$  值竟达 139 h。由于对干热  $D_{10}$  值测定试验中,微生物的

湿度水平幅度较宽(  $a_w$  值可由 0 到仅略低于 1.0),不像在湿热灭菌时的  $a_w$  值易于控制,因此有时同一菌种的不同报告结果亦可能相差较大。

枯草杆菌黑色变种芽孢对干热的耐受力高于嗜热脂肪杆菌芽孢, 且由  $D_{10}$  值测定结果来看,亦足以代表其他常见的细菌芽孢(表 2-3), 因此目前均以该芽孢作为干热灭菌的指示菌。干热对细菌芽孢的温度系数(temperature coefficients,  $z$  值)在高湿环境下为  $14^{\circ}\text{C}$  ,在干燥快速热气流下可达  $55^{\circ}\text{C}$  。一般情况,  $z$  值多介于  $15\sim 30^{\circ}\text{C}$  ,可被接受的平均值代表为  $21^{\circ}\text{C}$  。

二、干热消毒与灭菌的应用

干热可穿透固体、密封空腔,对金属制品锈蚀较少,可用于畏湿耐高热物品、湿热难以穿透物品,或废弃物品和垃圾等的消毒与灭菌。在医院中,常用于对金属、玻璃、陶瓷等制品,诸如:手术器械、精密刃器、针筒、空心针、试管、吸管等的灭菌。此外,亦可用于热稳定性粉剂治疗药物,以及非水液体类物质(沸点低者),如石蜡、凡士林、油纱布、眼药膏、硅润滑剂、注射用油剂与纯甘油(含水甘油可发生爆炸)等的灭菌。常用的方法有:热空气加热、红外线加热、传导加热、强光加热、烧灼、焚毁等。

表 2-3 芽孢杆菌芽孢对  $160^{\circ}\text{C}$  干热的敏感性

芽孢杆菌种类	菌 株	$D_{10}$ 值(min)	$z$ 值( $^{\circ}\text{C}$ )
蜡样杆菌( <i>B. cereus</i> )	NCIB 9373	0.03	22
凝结芽孢杆菌( <i>B. coagulans</i> )	NCIB 9365	0.18	31
巨大芽孢杆菌( <i>B. megaterium</i> )	NCIB 9376	0.06	21
多粘芽孢杆菌( <i>B. polymyxa</i> )	NCIB 8158	0.27	22
短小芽孢杆菌( <i>B. pumilus</i> )	NCTC 10337	0.23	25
嗜热脂肪杆菌( <i>B. stearothermophilus</i> )	ATCC 7953	0.08	19
枯草杆菌黑色变种( <i>B. subtilis var. niger</i> )	ATCC 9372	0.3 ~ 0.8	22

(表内资料取自 Alder 等, 1992)

(一)热空气加热

热空气加热灭菌,一般多在热空气烤箱中进行。烤箱为密闭式,先是用燃料加热(如煤油烤箱),继而使用了电加热(电热烤箱)法。烤箱中的热需由空气对流传导,升温速度慢,且不均匀。新型烤箱设有电动空气对流系统,加速了箱内温度的升高和平衡。有的还设有超过规定温度  $5^{\circ}\text{C}$  即自动断电的安全控制系统。近年更采取了微机控制和监测,使其进一步完善。对灭菌温度的选择,应根据物品性质和要求的灭菌速度而定,一般在  $160\sim 180^{\circ}\text{C}$  之间(表 2-4)。

表 2-4 干热灭菌温度与要求的持续时间

温度( $^{\circ}\text{C}$ )	持续时间(min)
150	150
160	120
170	60
180	30

热空气烤箱灭菌的处理程序如下:

①将未放物品前的箱室预热至灭菌规定温度→②放入拟灭菌物品→③加热至规定灭菌温度→④热穿透至物品中心→⑤持续时间→⑥停止加热,自然冷却至  $60^{\circ}\text{C}$  →⑦开柜取出物品。

上述程序中,柜室预热目的是减少物品加热时间,空柜加热速度快并容易达到平衡。省略此步,将物品放入后再加热虽亦可达到灭菌,但物品受热的时间将加长。

干热对物品的穿透速度随物品的性质和包装变化较大,因此摆放不宜过紧,包装切勿过大,最好是一次使用量包装。单个包装的注射器或其他小件器材热穿透时间需 15 min,而对罐装的玻璃吸管则需 4 h。对于粉剂或油脂类物品的穿透时间可参考表 2-5。油脂和粉剂物品层厚愈薄,热穿透愈快。将 112 g 滑石粉均匀平铺于玻璃平皿内(0.6 cm 厚),只需 60 min 即可达 160℃。凡士林纱布灭菌,在 1.2 cm 厚凡士林中加纱布,以干热 160℃灭菌,全部灭菌时间需 180 min。

表 2-5 热空气烤箱(160℃)中粉剂与油脂类物品的热穿透时间

物 品	瓶中装量(g)	穿透时间(min)
粉剂	28	80
	112	115
油脂	28	110
	112	165

(表内数据取自 Gardener, 1991)

为缩短灭菌时间,可使用电热真空烤箱。该烤箱预抽真空至 0.27 kPa(2 mm Hg),可缩短热穿透时间,使用较高温度亦不易使物品氧化,持续时间由之缩短。例如,加热至 280℃,持续时间仅需 15 min。

(二)红外线照射

红外线又称热射线,为 0.77~1 000 μm 的电磁波,有良好的热效应,特别在 1~1 000 μm 波段。该电磁波在照射处可直接转换为热能,不需经空气传导,加热较快。但是其热效应只能在照到的局部区域表面产生,因此不易使物体前后左右均匀加热。为改进,有多面照射式和单面旋转照射式烤箱,以使物品能得到均匀照射。红外线烤箱对物体表面加热虽较快,但热的穿透仍然得依靠物体本身逐渐传导,热的穿透时间与热空气烤箱相似。红外线照射的产热效应与照射距离和表面颜色有关,光源愈远热效应愈差(表 2-6),黑色表面热效应最高,白色最低(表 2-7)。在传送带连续照射装置上进行消毒与灭菌时,为使不同性质和大小物品受到同等剂量红外线照射,可利用不同颜色容器盛装加以调节。

表 2-6 红外线照射距离与温度效应关系

光源与表面距离(cm)	温度(℃)
20	175
50	125
100	55

表 2-7 不同颜色表面对红外线吸收情况

表面颜色	吸收率(%)
黑	87
灰	75
绿	73
红	64
黄	50
白	46

市售灭菌用红外线烤箱,有输出功率为 2 000 W ,最高工作温度为 200℃者,其耗电量可比同样性能的电热烤箱节省 50% 左右。我国卫生部颁发的《消毒技术规范》(第一分册)中规定市售红外线餐具消毒柜,应可在  $\geq 120^{\circ}\text{C}$  情况下持续 15 min。

在红外线照射环境下停留较久,可使眼睛疲劳和头痛,长期照射眼睛晶体可产生浑浊(热内障),甚至引起视网膜和脉络膜的永久性损伤。因此,工作人员应戴用能防红外线的护目镜。

(三)传导加热

将金属或玻璃等导热性能良好的小型器材与已加热至高温的热源直接接触,可迅速将热传导至整个物品。利用此原理可用热浴法、金属传导加热箱、或玻璃珠加热罐等进行消毒与灭菌处理。

1. 热浴法 用电热使容器内介质加温,可达到的温度随介质而异,最高可达 275℃(表 2-8)。将拟消毒或灭菌器材浸没于已加热的介质中迅速升温即可较快达到灭菌要求。

表 2-8 各种热浴介质与适用最高温度

热浴介质	适用最高温度(℃)
甘油	140 ~ 150
液体石蜡 <sup>(1)</sup>	220
菜油或棉子油 <sup>(2)</sup>	220
橄榄油 <sup>(2)</sup>	250 ~ 275

注: (1)温度过高易燃; (2)加 1%对苯二酚,可增加受热时的稳定性

2. 金属传导加热箱 外形似小型烤箱,电炉丝加热装置设于箱的底部,上覆以铝板为加热底盘。拟灭菌的单件物品直接置底盘上,多件小器材可放于金属小盘中再置底盘上加热。直接置底盘上的物品在 180℃条件下作用 20 min 即可,放于金属小盘内的物品所需持续时间较长,约需 30 min。

3 玻璃珠加热罐 由灭菌腔、加热器和控温装置 3 部分组成。灭菌腔用于装放拟灭菌物品,直径为 40 mm,高 55 mm,内装无铅小玻璃珠。加热器使用电加热,围绕在灭菌腔外。控温装置可使温度保持在 180 ~ 240℃。当小玻璃珠加热至上述温度(约需 25 min),将拟灭菌器械插入,5 ~ 10 min 后即可达灭菌要求。

(四)强光加热

本法利用可产生强光和高热的卤钨灯照射进行灭菌处理。李秀华等(1999)报告一种该类灭菌器,内腔为 50 cm × 50 cm × 20 cm(5 L),设有网架放置拟灭菌物品,网架上下各装 3 支 1 500 W 卤钨灯管(可产生红外线、紫外线和可见光)。灭菌时,关闭内腔,先下后上开灯 60 s,腔内温度可达 260℃。调节上方灯管离网架距离发现距离愈远,网架表面温度愈低(表 2-9)。使用时,照射 1 min,即可达灭菌要求。因灭菌时温度高,故只适用于金属或玻璃等耐热并导热快的物品,对橡胶、塑料、纱布等虽加热时间短暂,亦可导致损坏。

表 2-9 照射距离对卤钨灯加热效果的影响

上方灯管与网架距离(cm)	网架达到的温度(℃)	灭菌率(%)
12	290 ~ 300	100
15	260 ~ 266	100
18	232 ~ 240	100
21	212 ~ 220	98
24	170 ~ 180	20

注: 试验菌为枯草杆菌黑色变种芽孢。生物效果用染菌不锈钢片肉汤定性培养法测定。灭菌率为 50 次试验结果。

### （五）烧灼

烧灼直接用火焰加热，一般控制温度和时间，使能达到消毒或灭菌要求，但不损坏被处理物品。多用于微生物实验室接种时消毒周围空气和试管口与接种环等器材的消毒与灭菌。烧灼沾有菌液的接种环时，液滴炸裂，产生的气溶胶可引起实验室感染。为此，烧灼前应先将接种环在沾有消毒液并拧干的纱布块上将菌液吸干再进行烧灼，或直接在接种环烧灼防护罩中进行烧灼，亦可使用专门设计的接种环电热烧灼器。

有报告用于牙科髓腔扩孔钻快速灭菌的电热空气烧灼器，效果良好。但一般情况下用烧灼法灭菌外科手术器械，易使金属表面剥蚀损坏。插在注射器上的针头，不得在火焰上烧灼，一是有损针头表面光滑度，二是针头中所含的污染液体可被倒吸入注射器内，或干结在腔内造成堵塞。

金属或玻璃器械浸沾酒精，或将酒精倒入搪瓷盘中点燃，杀菌效果并不理想。由于燃烧的是酒精蒸气，火焰表面温度可很高，而拟消毒物品表面的温度上升慢，短时不一定能达到要求的温度 and 作用时间（当火焰处温度为  $205^{\circ}\text{C}$  时，物品的温度只有  $118^{\circ}\text{C}$ ），仍可能有菌存活，特别是细菌芽孢。用金黄色葡萄球菌污染金属器械进行试验，经上述方法加热处理后，仍有 15% 的器械有菌生存。

必要时，可用喷灯喷射火焰消毒小面积的污染地面或其他耐热的环境表面。此法在兽医防疫中使用较多。烧灼时，应用喷灯顺序扫描，以免遗漏。同一部位不宜喷烧过久，避开易燃物，注意防止火灾。

### （六）焚毁

焚毁是将污染物品等处理对象用火焰烧毁，变为无害的灰烬，多用于处理污染的医院或疫源地垃圾。如污染物品为少量可燃物（如纸、布等）可直接烧毁，大量污染物品则需在焚化炉内处理，一般使用煤气、天然气、柴油、汽油等助燃。

焚化炉的设计应考虑可使被处理对象焚为灰烬，并将排出有害废气减少到最低程度。为有效燃烧，一般设一级焚烧室和二级燃烧室两级燃烧程序。一级燃烧室温度约为  $800^{\circ}\text{C}$ ，二级燃烧室的温度应更高，约为  $1100^{\circ}\text{C}$ 。两个燃烧室需分别设有温度控制和记录装置，以保证在规定温度进行燃烧处理。对排出的废气应采用热氧化、冲洗、过滤等措施清除其中的酸性物质和其他有害物质。焚烧炉使用时应防止超量处理，否则可能发生燃烧不完全现象。曾有在焚烧残渍中发现细菌繁殖体和芽孢的报告。

医院生物垃圾焚烧场可造成大气污染，最好设在郊区，不宜在居民点或医院附近。从事焚烧的工作人员应穿戴防护面罩、防护服和手套。

## 第三节 湿热消毒与灭菌

在热力杀菌中湿热的能力最强，主要用于对耐热、耐湿物品的处理。效果可靠，使用方便，工业消毒与灭菌特别是食品工业中使用甚多，医院的无菌器材中心供应室往往将之作为灭菌的首选方法。对其机理、设备的研究和改进，进展亦较快。

表 2-10 蛋白质含水量与凝固温度的关系

卵清蛋白含水量(%)	凝固温度(℃)
50	56
25	74~80
18	80~90
6	145
0	160~170

表 2-11 微生物对湿热耐受力的分级

耐受力级别	微生物种类举例
最敏感级	非芽孢细菌(包括结核杆菌) 病毒(无生物物质保护) 霉菌与酵母菌(生长期)
中等敏感级	病毒(附有血液或组织) 霉菌孢子 D组链球菌(如粪肠球菌)
轻耐受级	炭疽杆菌芽孢 E型肉毒梭菌芽孢 产气荚膜梭菌芽孢
中耐受级	枯草杆菌芽孢 A型肉毒梭菌 破伤风梭菌
高耐受级	嗜热脂肪杆菌芽孢
极高耐受级	克雅氏病病原体(属朊病毒类)

(表内资料取自 Gardner等,1991)

表 2-12 嗜热脂肪杆菌芽孢在不同温度的热死亡时间

温度(℃)	热死亡时间(min)
115.6	42.6
119.4	17.7
121.1	12.0
122.8	8.1
132.2	0.9
135.0	0.5
140.6	0.13

表内资料取自 Young JH,1997)

## 一、湿热对微生物的杀灭

湿热可使菌体蛋白质变性、凝固,从而使微生物死亡。蛋白质的变形和凝固,需有水分子的存在,因此在热作用的局部环境中,湿度愈高,蛋白质的变形和凝固愈快,对微生物的杀灭效果亦愈好(表 2-10)。

湿热处理时,热的传导以水或蒸汽为介质。细菌繁殖体、病毒和真菌等对湿热均较敏感,一般在沸水(100℃)中的热死亡时间 $\leq 2$  min。细菌繁殖体(包括结核杆菌)在60℃的水中,经30 min处理即可达消毒要求。细菌芽孢对湿热的耐受力远强于繁殖型微生物。在细菌芽孢中最强的是嗜热脂肪杆菌芽孢。但最近发现克雅氏病病原体(属朊病毒类)对湿热的耐受力较嗜热脂肪杆菌芽孢还要强。

Gardner(1991)将微生物对湿热的耐受力分为6级(表 2-11)。虽然在病原微生物中朊病毒对湿热的耐受力最强,但因培养方法的普及、指示器材的制备、人间感染的重要性等等问题尚有待进一步研究、探讨和解决,所以目前仍以嗜热脂肪杆菌芽孢为湿热灭菌效果的指示菌。表 2-12 为嗜热脂肪杆菌芽孢在不同温度的死亡时间。

## 二、蒸汽的性能

### (一)饱和蒸汽

湿热消毒与灭菌使用的蒸汽必须是饱和的水蒸气。饱和蒸汽是指不含有其他气体的纯净水蒸气。图 2-4 显示了水蒸气的气相和液相临界线。饱和蒸汽温度和压力的交汇点应在临界线上,此时其蒸发和凝聚保持平衡状态,相对湿度为100%。海平面压力大气压力为101.3 kPa(相当于760 mmHg,或1 bar),在

该条件下,水的沸点为100℃,压力加大,沸点升高。

蒸汽只有在饱和状态下才能发挥良好的杀菌作用。饱和蒸汽遇冷可快速凝聚,释放出大量的热能,使物品温度上升,冷凝的同时,体积急剧收缩,还可产生局部负压,使随后的蒸汽穿透到物



品深处。饱和蒸汽的这种性能较之热空气要强得多。例如饱和蒸汽的比热为 1,即蒸汽每降低 1℃可释放 1 cal/g 热,当下降到临界点时还可迅速冷凝,瞬间释放出 540 cal/g 潜伏热,而空气的比热只有 0.24,每降低 1℃,只能释放出 0.24 cal/g 热,而在灭菌加热时温度的变化达不到其冷凝点,不会释放出冷凝热。此外,饱和蒸汽冷凝时体积可急剧缩小(1/1 600),所形成的负压极利于随后蒸汽对物品的穿透,而热空气在灭菌时温度虽亦下降但达不到冷凝程度,体积只能收缩 1/3 左右,无法形成如此强的负压。所以,饱和蒸汽对热的传导速度远较热空气为快(表 2-13)。

(二)超热蒸汽

当蒸汽温度升高,超过临界线以上(图 2-4),即成超热蒸汽。这时的蒸汽只有降到临界温度才可发生冷凝。冷凝放缓,不利于灭菌。这种现象在超热 5℃ 以上时即表现明显。蒸汽超热可导致物品加热不匀,纺织品与纸类物品焦化,橡胶制品快速老化。

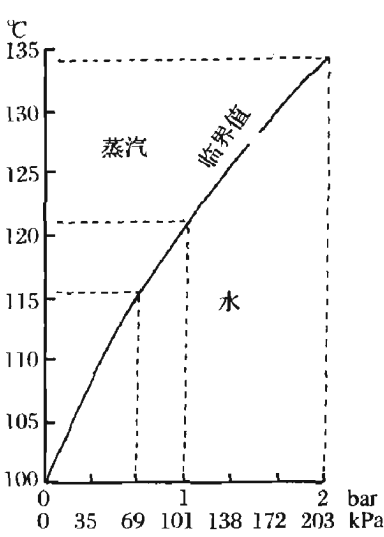


图 2-4 饱和蒸汽温度与压力的关系

表 2-13 用饱和蒸汽与热空气灭菌敷料包时热力穿透的比较

介质	温度(℃)	加热时间(h)	布层中心温度的平均值(℃)		
			20 层	40 层	100 层
饱和蒸汽	90 ~ 105	3	101	101	101
热空气	130 ~ 140	4	86	72	70

超热蒸汽的产生可因输气系统或柜室的压力明显下降,或夹套中温度超过柜室温度较高,或纺织品过于干燥。纺织品过于干燥产生超热蒸汽是因为过干的纺织品灭菌时需吸收较多水分,由之促使蒸汽冷凝为水,迅速放出大量潜伏热,使蒸汽超热。纺织品含水率为 0 的时候,可产生 9℃ 超热。

(三)湿蒸汽

蒸汽中含有较多细微雾粒(> 10%) 时,称为湿蒸汽。雾粒的存在主要因在加水过多的锅炉中表面水泡迸裂被快速蒸汽带出,或蒸汽通过较长管道冷凝而成。湿蒸汽不利于热的穿透,因雾粒可濡湿织物,形成气体流动的屏障,同时亦会增加灭菌后干燥处理的难度。为防止湿蒸汽进入灭菌器,应:①加强蒸汽发生器操作的管理;②尽量缩短蒸汽输送管道;③加强管道保暖;④在灭菌器前设汽水分离器。送入灭菌器内蒸汽的干燥度( dryness fraction )应为 0.9 ~ 1.05。干燥度的计算公式如下:

$$\text{干燥度} = \frac{\text{纯净饱和水蒸气重量}}{\text{进入蒸汽(包括所含水雾)的重量}}$$

(四)蒸汽中的化学杂质

平时为减少对蒸汽锅炉的损坏,多在水中加少量挥发性胺,如十八碳烷胺

(octadecylamine)、环己胺(cyclohexylamine)或吗啉(morpholine)等。使用此类化合物虽可减少蒸汽对碳钢的腐蚀,但在发生灭菌用蒸汽时不得使用。沉积在灭菌物品上的该类化合物,进入静脉注射液或婴儿食品中可对病人产生危害,进入组织培养基中亦不利于病毒的培养。其他混于蒸汽中的杂质如磷酸盐、碳酸钠、硫化物(除氧剂)以及锈蚀管道内的铁盐等,可使灭菌器材和包装染色。为去除这些杂质,可在蒸汽出口处加装滤器。

(五)蒸汽空气混合体

蒸汽混入空气,其压力与温度即不似图 2-4 所示的饱和蒸汽间的关系。此时压力表中所示压力值应扣除空气分压,其所能达到的温度亦会相应下降(表 2-14)。因此,进入灭菌器内蒸汽中混有的空气愈少愈好,而原在柜室中的空气亦需尽量排除。

三、湿热消毒与灭菌的应用

湿热与干热相比,其杀菌所需温度较低,对物品的穿透速度快,要求热持续时间短,因此是目前最好的消毒与灭菌方法。在医疗卫生、工业生产、家居生活中的使用亦极为普遍。常用方法有:压力蒸汽灭菌、煮沸消毒、流通蒸汽消毒、巴氏消毒、间歇灭菌、低热蒸汽消毒、湿热清洗消毒等。有关设备层出不穷,除杀菌方面的改进外,为适应各种需要,更开发出不少新型设备。微机技术的利用,更使达到了自动控制、自动记录和全过程观察监测的水平。

表 2-14 压力蒸汽灭菌器内空气排除程度与可达到温度的关系

压力表读数		空气排除不同程度时可以达到的温度(℃)		
(kPa)	(kg/cm <sup>2</sup> )	完全排除	排除 50%	未排除
64.72	0.66	115	105	90
101.01	1.03	121	112	100
134.36	1.37	126	118	109
207.91	2.12	135	128	121

注:表中数据为理论推算值

(一)压力蒸汽灭菌

蒸汽在高过大气压力情况下,可形成高温,从而增加杀菌能力和速度,可达到灭菌的要求,并成为目前使用最为普遍,效果最为可靠的一种方法。

1. 灭菌温度与作用时间 压力蒸汽灭菌温度与时间的选择随灭菌方式、物品性质、包装材料、要求灭菌过程长短而定。温度愈高,所需的持续时间愈短(表 2-15)。灭菌的整个加热时间,除持续时间外,还应加入预热时间、柜室增温时间、穿透时间等(见“基本操作程序”)。

表 2-15 压力蒸汽灭菌的温度与持续时间

温度(℃)	持续时间(min)
115	30
121	15~20
126	10
134	3

2. 操作基本程序 压力蒸汽灭菌操作程序基本可分为下排气式和预真空式两大类:

(1)下排气式压力蒸汽灭菌:夹层预热(121℃)→放入拟灭菌物品→通入蒸汽加热柜室(121℃)→热穿透至物品中心(121℃)→持续温度(121℃)至规定时间(热死亡时间+安全时间)→夹层加热使灭菌物品干燥(121℃)

→冷却(60℃)。

(2) 预真空式压力蒸汽灭菌：夹层预热 (132 ~ 134℃) → 放入拟灭菌物品 → 抽真空至 -98.64 kPa(20 mmHg) → 通入蒸汽保柜室加热 (132 ~ 134℃) → 热穿透至物品中心 (132 ~ 134℃) → 持续温度(132 ~ 134℃) 至规定时间 (热死亡时间 + 安全时间) → 夹层加热 (132 ~ 134℃), 柜室抽真空, 干燥灭菌物品 → 通入过滤空气使柜室冷却(60℃) 并恢复常压。

灭菌程序可随灭菌器类型、灭菌目的及其有无附加功能做相应改变, 但其基本程序应是一致的。

3. 压力蒸汽灭菌器的类型 压力蒸汽灭菌应在相应灭菌器中进行。灭菌器基本可分为：下排气式和预真空式两大类。小型灭菌器的结构简单, 有的可手提, 容积约 18 L, 重 10 kg 左右。医院使用的多为卧式 1 m<sup>3</sup> 容积的灭菌器。大型的容积可达数十立方米, 主要用于工业生产。为适应特殊需要, 还生产有特殊功能的灭菌器。例如, 喷淋速冷式灭菌器、检漏灭菌器、等温灭菌器、两重控压灭菌器等。

下排气式压力蒸汽灭菌器在 18 世纪后期即开始使用, 一直沿用至今。该灭菌器利用蒸汽比空气轻, 将空气由灭菌柜室下方排气口挤出, 从而使柜中充满饱和蒸汽, 并通过增加压力提高温度进行杀菌。当物品中心温度达到 121℃, 持续 15 ~ 20 min 可杀灭细菌芽孢, 达到灭菌要求。这种排除冷空气的方式很难彻底, 影响因素又多, 常常妨碍温度的提高和穿透, 灭菌效率亦较低。此后, 虽不断加以改进, 但万变不离其宗, 基本方式未变。这种情况延续至 20 世纪 60 年代, 由英国首先研制出预真空式灭菌器才取得突破。预真空式灭菌器经数十年的改进和开发, 现已得到普遍推广。

预真空式灭菌器主要的改进在于将排除冷空气的被动性变为主动性。即由被蒸汽从上至下推出, 变为由抽气泵抽出。用抽气泵抽出, 冷空气排除较彻底(98%), 从而使作用温度提高, 整个灭菌周期明显缩短(表 2-16)。此外, 柜室内氧气随之减少, 作用时间短, 即使作用温度提升至 132 ~ 134℃(4 min), 对物品的损坏亦较下排气式灭菌 121℃(20 min) 时为轻。

表 2-16 下排气压力蒸汽灭菌与预真空压力蒸汽灭菌所需时间的比较

项 目	所需时间(min)	
	下排气式压力蒸汽灭菌(121℃)	脉动真空压力蒸汽灭菌(132℃)
排气增压	20 ~ 25	6 ~ 8
蒸汽穿透	10 ~ 30	2
杀菌	15 ~ 20	4
干燥冷却	10 ~ 15	8 ~ 14
全灭菌周期	60 ~ 90	20 ~ 30

预真空压力蒸汽灭菌的优点明显, 但其不足之处是: ①灭菌器的结构较复杂, 价格贵; 一次抽真空至 -98.64 kPa(20 mmHg), 对抽气泵和柜室的密封要求很高, 也增加维修的工作量; ②可产生小装量效应 (small load effect), 即当物品装量过少, 残留气体可将小量物品包围形成屏障, 阻碍蒸汽穿透, 可使灭菌失败的现象; ③不得用于瓶装液体的灭菌, 因所抽负压较强, 可使瓶内液体溢出。

在一次抽真空的预真空法基础上, 进一步提出了脉动真空法, 该法可解决了上述存在的大

部分问题。所谓脉动真空法实际上即是多次抽真空法。灭菌时,先抽真空至  $-95.98\text{ kPa} \sim -93.31\text{ kPa}$  ( $40 \sim 60\text{ mmHg}$ ),送入蒸汽将压力上升至  $101\text{ kPa}$ ,而后再抽气至负压状态,如此反复抽送  $3 \sim 5$  次,即可相当与一次抽真空至  $-98.64\text{ kPa}$  时空气的排除程度。第一次抽真空时抽出的是柜内空气,以后反复抽出的是柜内空气和蒸汽的混合体。即使如此,每抽一次,柜内空气总又会有所减少。关于脉动真空的抽气方法有多种,有的先送蒸汽至一定压力后再抽真空,有的第一次抽真空较低,以后几次只抽到平压时为止。总而言之,其原则是一致的,即通过反复抽真空和送蒸汽,将柜室内空气不断减少直至要求程度。

脉动真空法虽然在抽真空上要多化一些时间,但对抽气泵和密封的要求较低,且可防止小装量效应的出现,效果更为可靠。为此,我国目前推广的主要是脉动真空式灭菌器。

此外,为适应各种需要,不断有具特殊功能的灭菌器出现。目前常见的有如下一些种类。

(1)瞬间灭菌器(**flash sterilizer**)。用于医疗工作中对急需的手术器械等进行快速灭菌。在手术或其他工作中往往会临时需要一些无菌的小型器材,使用平时常规灭菌器需要较长时间,无法满足要求。为解决此问题,建立了对耐热器械的瞬间灭菌法。该法将器材不进行包装,直接放于盛装器械的金属盘中加热灭菌。此法因器械不包装,无蒸汽穿透问题;灭菌物品量少,冷空气的排除亦较易。用下排气式方法处理,但作用温度  $132^{\circ}\text{C}$ ,持续时间  $3\text{min}$  即可。此类灭菌器的结构较简单,处理物品量小,为便于临时急用,多设计成可放于手术室或门诊室的小型台式装置。

(2)喷淋速冷式灭菌器。多用于制药工业灭菌大量瓶装液体。大量瓶装液体温度下降较慢,延迟了随后产品的灭菌。为加速降温时间,在灭菌完成后用温度较低的水喷淋大输液瓶使能较快降温。

(3)检漏灭菌器。用于安瓿灭菌快速检漏。当安瓿装药品在灭菌器内灭菌后,立即通入染色水将其淹没。待温度下降,安瓿内水液收缩形成负压,若有破裂,外面的染色水即可透入,从而能加快破裂安瓿的检出。

(4)等温灭菌器(**isothermal sterilizer**),为单层压力蒸汽灭菌器,作用温度随需要可控制在  $70 \sim 132^{\circ}\text{C}$ 。可用于不同温度的消毒或灭菌处理,亦可用于溶液蒸发浓缩。制药工业使用较多。

(5)两重控压灭菌器(**dual-control autoclave**)。用于对封装软管内水质胶冻或油膏的灭菌。为防胶管内物品膨胀破裂,当加压达规定灭菌温度,如  $105^{\circ}\text{C}$  时,通入热空气加压至  $101\text{ kPa}$ ,使管内外压力平衡,防止破裂。

(6)旋转式灭菌器(**rotatory autoclave**)。用于对悬液、乳液等易沉淀液体,或热敏感类液体的灭菌,可减少液体的变质。制药和食品工业使用较多。

#### 4. 使用注意事项

(1)做好灭菌前的准备。灭菌前应先阅读上一班的工作记录,发现和解决遗留的问题。检查灭菌器的状态是否正常,重要附件是否完好,必要时应校对仪表的准确性,特别是温度计和压力计。正确安排未灭菌物品与已灭菌物品的摆放位置,勿使相混或造成再污染。

(2)保证蒸汽的质量。注意进入柜室蒸汽是否呈饱和状态,操作中防止使蒸汽超热,或含有过多的水雾和空气(见“蒸汽的性能”段)。

(3)控制加热速度。过慢可延迟升温时间,过快可缩短物品在灭菌温度下的受热时间。例如,灭菌时,规定灭菌时间(包括热穿透时间 + 持续时间)为  $30\text{ min}$ ,并由柜室温度表达达到规定

的灭菌温度(121℃)时起算。如果送入蒸汽速度过快,设经 5 min 柜室即达 121℃,此时即应起算灭菌时间,但物品包的加热时间不长,热的穿透需要相对多一些时间,经 20 min 其中心才达 121℃。如此,剩下的持续时间只有 10 min(30 min - 20 min),难以达到灭菌要求。如加热的速度正常,20 min 时柜室到达 121℃并起算灭菌时间,这时物品陆续加热时间已久,再过 10 min 中心即达 121℃。此时,剩下的持续时间可有 20 min(30 min - 10 min),比前者多 10 min 足够达到灭菌要求。此点虽然只是计算方法问题,但热穿透与加热速度并不一定呈正比例增长却是需要引起注意的。所以加热应控制在一适当的速度。各个灭菌器对各类灭菌处理的加热适当速度不同,一般可根据经验总结,必要时亦可用化学或生物指示器材进行试验测定。

(4)尽量排除柜室内的空气。要为排除冷空气创造良好条件。例如,防止蒸汽送入速度过快,避免在柜室内形成湍流影响空气的排出;给排气以充裕的时间;合理包装和放置物品为空气排出留有通道。空气排出的程度是否合乎要求,可使用阻气阀控制。阻气阀有一热胀冷缩的金属内心,当排出气体主要为蒸汽,并且温度已达 121℃时,金属内心自动膨胀将出气口堵塞。此外亦可用温度标示、气泡试验测定,或根据经验肉眼观察排出气体是否已全为水蒸气。

(5)合理做好物品的包装和摆放。对下排气式压力蒸汽灭菌特别重要。柜室内放置物品总量不应超过柜室容量的 85%,否则可影响蒸汽的穿透。物品包装愈小愈有利于蒸汽的穿透。空瓶瓶口应横放,金属盘碗与纺织品应竖放,物品包互相间需留有空隙。物品包最好用铁丝筐盛装,既利于保持物品的竖放,当摞在一起灭菌时又自然会在上下左右留出气体进出的通道。物品包装宜使用通透蒸汽的布或耐湿的纸包装,不得使用有盖密封的金属、陶瓷、玻璃和耐热塑料容器。必需使用不透气容器时,容器的上下应开有小孔,以利蒸汽与空气流通。

(6)正确认识压力和温度的关系。操作压力蒸汽灭菌器时,只认压力不顾温度是不对的。灭菌器柜室除设压力计外,还应有温度计。在压力蒸汽灭菌中,压力本身是没有杀菌能力的。在此只是表示温度的一种间接指标。压力与温度的关系在正常情况下是恒定的,可以用来作为表示温度的间接指标。但当蒸汽中混有空气时,按压力计读值推算的温度会相应偏高。不注意到这一点,可因误导造成灭菌的失败。此外,在排气口应安装有温度计,以能用所显示的温度来判断是否停止排气,或开始计算灭菌时间。设在柜顶的温度计与排气口温度计相比,读值一般亦偏高,无法代替。

(7)认真落实监测工作。监测工作必须有正式记录,最好根据本部门情况设计专门的表格,以便填写。目前已生产有多种化学和生物指示器材供使用。近年推广的程序监测为大规模灭菌处理提供了快速、方便的方法(见第二十一章)。

(8)坚持设备的定期检查和维修。应使设备保持正常工作状态,特别是预真空类压力蒸汽灭菌器。未通过蒸汽穿透测试(B-D 试验)的预真空压力蒸汽灭菌器,未检修并验证合格,不得使用。

(9)防止再污染。灭菌物品包宜使用化学指示胶带,既可固定包装,又可籍其颜色变化区分未灭菌与已灭菌物品。回收污染物品和发放已灭菌物品的时间应错开,并且不得使用同一推车。推车用后应立即进行消毒处理。使用铁丝筐装运已灭菌物品,避免手的直接接触,可减少再污染的机会。

## (二)煮沸

煮沸消毒法为将物品放于水中加热至沸点的消毒方法。其热力靠水的对流,温度一般不超过 100℃。对繁殖体型微生物作用 5~10 min 可将其灭活,对芽孢则需数十分钟以至数小

时，故多不用作灭菌。煮沸时，应将物品完全浸没水中。在水中加少许增效剂，如肥皂(0.5%)、碳酸钠(1%)、磷酸钠(1%)等,可提高效果。由于水的沸点随海拔而异(表 2-17)，在高原上使用此法应适当延长时间。

表 2-17 不同海拔高度水的沸点

海拔高度(m)	水的沸点(℃)
0	100.0
500	98.3
1 500	95.1
2 000	93.4
3 000	90.2

(三)流通蒸汽消毒

流通蒸汽是指未加压的蒸汽,温度与水的沸点相同或略高。流通蒸汽对物品的穿透,因冷凝放出潜伏热和形成局部负压，较水为快。用流通蒸汽对污染衣物消毒防病,我国古代即已使用,目前仍广泛用于家居,或集体食堂、餐馆的餐具消毒,或食品工厂原料输送管道和大

容器的消毒。消毒用设备，最简单的是用蒸笼进行，亦有专用的中、小型消毒器和大型床垫被褥消毒柜。中、小型消毒器由电热将水蒸发形成蒸汽，用于消毒小件物品，有良好的隔热罩，消毒室内设有网状隔层放置拟消毒物品，底端设冷空气排出口。凝聚的水可回流至蒸汽发生器中循环使用。消毒时间由水沸腾开始计算，应包括热穿透时间。碗碟与纺织物品应竖状排列，以利冷空气的排出。包装不宜过大过紧，能吸收大量水的衣物勿浸湿放入，否则可阻挡蒸汽的穿透。床垫和被褥消毒柜可用于大件物品的消毒，与低温蒸汽消毒器相比，因不能形成负压，蒸汽穿透效果差,作用时间长,但设备简单,不要求耐压,成本较低。

(四)巴氏消毒

巴氏消毒(Pasteurization),由法国医学家巴斯德(Pasteur)发明，故以其命名之。原用于酒类处理,为不损坏其中有效成分,设定加热 60℃,作用 30min。随后，大量用于牛奶消毒以杀灭包括牛结核杆菌和其他繁殖体型微生物，采取的温度为 62.8~65.6℃,作用 30 min。巴氏消毒的缺点是所需作用时间过长，难以满足工业生产消毒的需要。经研究，提高温度，缩短时间可获同样效果。目前，牛奶消毒多改用 72℃作用 15 s 以上。对酒类,因含酒精和酸,可以用 45~56℃作用 15 min。小型处理可在水浴中进行，以能保持要求的温度。巴氏消毒不能杀灭大多数的细菌芽孢。

(五)间歇灭菌

间歇灭菌(tyndallization)用于畏热液体和物品的灭菌,由英国人 Tyndall 发明,故以其命名之。其原理是利用间歇加热的方式，将复苏芽孢分批杀灭。具体方法是根据物品耐热能力，加热至 80~100℃,持续 30~60 min，将现有的繁殖体型微生物杀灭,次日同样处理,以将在常温下复苏芽孢形成的繁殖体继续杀灭。如此连续 3 日，可将污染的微生物全部杀灭。此法可在 100℃以下的温度中达到灭菌要求。此法操作繁琐，取代的方法较多，已少用。

(六)低温蒸汽消毒

低温蒸汽消毒器(low-temperature steam disinfectant)原为消毒羊毛毯而设计。其原理是在低于大气压力情况下通入饱和蒸汽，根据蒸汽临界值要求(图 2-4),使温度维持在 73~80℃(必要时可升温至 105℃),对物品进行消毒。使用此低温蒸汽,对可耐受 80℃以下温度的物品无损害，并且蒸汽在相应负压下仍可冷凝释出潜伏热，杀菌效果较同样温度的水为好。被处理的物品包装或不包装均可。该法可用于医院消毒膀胱窥镜、塑料制品、导管、面罩、麻醉器材和

羊毛毯等。被处理的物品打包或不打包均可。抽真空在本消毒方法中具有重要意义,因为关系到能否形成要求温度,加速蒸汽的穿透和消毒后物品的干燥。此法虽仅能杀灭繁殖体型微生物,但使用方便、经济,能满足绝大多数畏热医疗器材消毒的要求,受到医院的重视。英国已颁布该方法操作和使用的国家标准(BS 3970 Part 5, 1990)。该消毒方法的操作程序如下:

①柜室预热,防止产生冷凝水→②抽除柜室内空气( $-53.99\text{ kPa}$ )→③检查空气出口处漏气与否(压力上升速度 $\leq 5\text{ mba/min}$ ),防止空气倒流回柜室→④送入蒸汽至物品内部温度达到 $73\sim 80^{\circ}\text{C}$ →⑤持续该温度 $10\text{ min}$ 以上→抽除蒸汽至真空使物品干燥→⑥送入经过滤的空气使柜室恢复常压。

#### (七)湿热清洗消毒

医院中对污染的可反复使用器材处理,是先消毒再洗涤,还是先洗涤再消毒,常有争议。前者程序有利于预防感染,但残留污物可减弱消毒效果,后者有利消毒,但可能造成洗涤人员感染和病原微生物的扩散。本方法发挥湿热兼有去污和杀菌的特点,从而将此矛盾顺利解决。本方法处理基本程序如下:

① $30^{\circ}\text{C}$ 水(或蒸汽)冲洗→②升温至 $60^{\circ}\text{C}$ 并注入洗涤剂加强清洗→③蒸汽加热至 $80^{\circ}\text{C}$ →④持续保持温度进行消毒→⑤温水喷淋降低物品温度→⑥开盖使物品自然干燥。

清洗消毒设备有3大类:①清洗消毒器(washer-disinfector),由旋转喷头喷出水的射流对柜内物品进行冲洗,多用于手术器材、导管类、麻醉器材、实验室检验器材、治疗器材等。处理的水温多在 $80\sim 90^{\circ}\text{C}$ 。②清洗灭菌器(washer-sterilizer),清洗方式和对象与清洗消毒器相同,但清洗后用 $132\sim 140^{\circ}\text{C}$ 压力蒸汽灭菌。处理后的器材,不能直接用于病人,必须经过整理、维修、包装,经再次消毒或灭菌后才可在临床使用。③冲洗消毒器(flusher-disinfector),以漩涡水流方式清洗,虹吸法排水。消毒时,水温 $70^{\circ}\text{C}$ 时持续时间需 $3\text{ min}$ , $80^{\circ}\text{C}$ 时只需 $1\text{ min}$ 。多用于病人便器、盆、桶等护理用具。被处理后的用具,自然晾干即可使用。

(刘育京)

#### 参考文献

- 1 张安玉.第十三章消毒.见:耿贯一主编.流行病学(上册).北京:人民卫生出版社,1979:281-307
- 2 仲肇明,朱勤. $F_0$ 的计算.消毒与灭菌,1989;6:229
- 3 消毒杀虫灭鼠手册编写组.消毒杀虫灭鼠手册.北京:人民卫生出版社,1979:12-33
- 4 李秀华,王朝辉,黄庆湖,等.卤钨灯热源灭菌装置的研究.中国消毒学杂志,1999;16:232
- 5 顾德鸿.热力消毒.见:刘育京主编.中国医学百科全书:消毒杀虫灭鼠.上海:上海科学技术出版社,1988:2-4
- 6 Gardner JF, Peel MM. Introduction to sterilization, disinfection and infection control. 2nd ed. Melbourne: Churchill Livingstone, 1991
- 7 Alder VG, Molin G, Allwood MC, et al. Heat Sterilization. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. London: Blackwell Scientific Publications, 1992:483-527
- 8 Young JH. Steam sterilization: Scientific principles. In: Relchelt M, Young JH. Sterilization technology for the health facilities. 2 ed. Gaithersburg, Maryland: An Aspan Publication, 1997:124-133

# 第三章 电离辐射消毒与灭菌

发现电离辐射能杀灭微生物已有百年历史，但其实际应用却是始自 1956 年美国 Ethicon 公司应用电子直线加速器对外科缝线的灭菌成功。之后，电离辐射灭菌技术迅速发展。据报道，到 1988 年底，全世界共有工业规模辐照装置 150 多座，装源量超过  $5 \times 10^{18}$  Bq。这些装置约有 80% 用于一次使用性医疗用品的灭菌处理，而用辐照灭菌的该类用品也已达灭菌总量的 35% ~ 50%。美国、加拿大等国每年辐照消毒的医疗用品已为一次性使用医疗用品的 80%。

1979 年陕西第一毛纺厂建成了我国第一个<sup>60</sup>钴  $\gamma$  射线消毒羊毛的车间。1980 年代开始，我国对医疗用品的辐照消毒与灭菌进行了大量研究，到 1989 年，全国已有大小钴源装置 150 多座，总装源量已达  $1.162 \times 10^{17}$  Bq。

维也纳医疗用品电离辐射灭菌国际会议上有关专家预言的“80 年代，医疗用品的辐照灭菌将成为主要的灭菌方法”看来已成为现实。

## 第一节 电离辐射的优点

电离辐射消毒与灭菌指利用放射性同位素<sup>60</sup>钴或<sup>137</sup>铯发生的  $\gamma$  射线和电子加速器产生的高能电子束或 X 射线进行杀菌。它具有许多独特的优点：①不使物品升温。特别适用于忌热物品的消毒，除某些塑料、活细胞及其制剂外，大多数医药制品都可用它进行消毒、灭菌；②穿透力强。射线可以穿透到达被照物品的各个部位，不受物品包装、形态的限制，因此可用密封包装，长期保存，随时取用；③被照物品不会产生感生放射性，辐照后无残留毒性；④方法简便。消毒时无需控制多种因素；⑤节省人力、节约能源。尤其适于连续性生产线使用。由表 3-1 可见，电离辐射灭菌具有压力蒸汽灭菌和环氧乙烷灭菌所不具备的许多优点。

表 3-1 辐照与热力及环氧乙烷灭菌方法的比较

项 目	压力蒸气	环氧乙烷	电离辐射
温度	重要	重要	不重要
湿度	重要	重要	不重要
压力	重要	需要	不需要
预真空	需要	需要	不需要
灭菌后处理	干燥	排除余药	不需要
物品品种	单一	单一	可混杂
包装严密性	不可严密	可严密	可严密
包装耐热性	需要	不需要	不需要



## 第二节 电离辐射对微生物的杀灭作用

电离辐射对各种微生物都有杀灭作用。一般,革兰阴性菌比革兰阳性菌对电离辐射敏感;细菌芽孢比繁殖体抗力强;真菌中对电离辐射抗力最强者,只相当于细菌芽孢中的中等抗力者;病毒对电离辐射的抗力,一般都比细菌强,在活组织中的病毒抗力最强(表 3-2)。自然界也存在某些对电离辐射抗力特强的细菌繁殖体,如耐辐射小球菌、嗜辐射小球菌和辐射水解蛋白小球菌等,但均为非致病菌。

表 3-2 电离辐射对微生物杀灭 90% 的剂量

微生物名称	D <sub>10</sub> 值( kGy)	微生物名称	D <sub>10</sub> 值( kGy)
<b>RNA 病毒</b>		<b>需氧芽孢菌</b>	
柯萨奇病毒	0.8~5.5	枯草杆菌芽孢	1.7~2.5
埃可病毒	1.1~6.8	嗜热杆菌芽孢	2.1
脊髓灰质炎病毒	0.7~6.5	短小杆菌芽孢	2.6~3.3
口蹄疫病毒	6.2	<b>革兰阳性菌</b>	
圣路易马脑炎病毒	5.5	藤黄八叠球菌	0.89
委马病毒	4.0	肺炎双球菌	0.52
西马病毒	4.5	化脓性链球菌	0.32
风疹病毒	4.4~6.7	金黄色葡萄球菌	0.18
新城鸡瘟病毒	4.9~5.6	<b>革兰阴性菌</b>	
呼肠孤病毒	4.1~4.9	鼠伤寒杆菌	0.2~1.3
流感病毒	0.5~5.6	副伤寒杆菌	0.19
<b>DNA 病毒</b>		肺炎杆菌	0.22~0.24
多瘤病毒	0.7~52.0	大肠杆菌	0.0085
腺病毒	3.8~6.1	绿脓杆菌	0.0025
单纯疱疹病毒	3.9~4.1	<b>酵母</b>	
牛痘病毒	0.9~5.3	酿酒酵母	0.5
<b>厌氧芽孢菌</b>		白色球拟酵母	0.4
肉毒杆菌芽孢	1.3~3.4	<b>霉菌</b>	
破伤风杆菌芽孢	2.2~3.4	黑曲霉	0.47
魏氏杆菌芽孢	1.2~2.7	特异青霉	0.2

### 一、电离辐射消毒灭菌用单位

电离辐射消毒与灭菌中常用的单位是戈瑞(Gray, Gy)。1 戈瑞等于每千克物质吸收 1 焦耳的能量,即  $1 \text{ Gy} = 1 \text{ J/kg}$ 。过去常用单位为拉德(rad),  $100 \text{ rad} = 1 \text{ Gy}$ 。

### 二、灭菌和消毒剂量及无菌保证水平

辐照灭菌因影响因素较少,控制辐照剂量即较易保证灭菌效果,因此确定合理的辐照剂量十分重要。确定灭菌剂量的方法较多,如 25 kGy 法,公式法,AAMI(美国医疗器械协会)法以及

在此基础上改良的单批验证法, Darbord 法等。

25 kGy 法系根据实验经验,固定以 25 kGy 为设定灭菌剂量。至今,许多国家仍沿用此法。但随着辐照灭菌的广泛应用,灭菌物品种类的不断增多,这种单一的灭菌剂量似已难完全满足需要。

公式法,又称参考菌  $D_{10}$  值法。系根据单一菌种的辐射抗力,同时测出污染菌量,代入公式  $SD = D_{10} \log N_0 / SAL$ , 求出灭菌剂量。因其简便,目前仍为多数国家所采用。

AAMI 计算法,为美国医疗器械协会建议的方法。其中 AAMIB1 法系根据初始污染菌的有关数据确定灭菌剂量; AAMIB2 法系利用剂量递增实验中的阳性结果确定外推系数而确定灭菌剂量。AAMI 方法被公认为科学、可靠,已为国际原子能机构 (IAEA) 认可并推荐,1991 年修改后的 AAMI 法已成为美国国家标准,并在国际标准组织 (ISO) 制定的标准(草案)中,将 AAMI 的方法 1 与方法 2 作为主要方法列于附录中。但由于应用该方法要求条件高,工作量大,手续繁琐,目前一些国家仅部分试用。我国有人经实验验证,以初始污染菌数的最大值、最抗辐射菌的  $D_{10}$  值和所要求达到的无菌保证水平,按公式法计算出的灭菌剂量与 AAMIB1 法的确定值十分接近。

无菌保证水平 (sterility assurance level, SAL) 指一件物品经灭菌处理后允许长菌的机率。目前,国际上多数国家对辐射灭菌的医疗产品无菌保证水平均要求  $10^{-6}$ , 灭菌剂量规定为 25 kGy, 北欧国家则要求 35 ~ 45 kGy。近年来,由于“文明生产”,医疗产品上初始污染菌量很低,因而有的国家已采用 20 kGy 灭菌剂量。

我国由国家技术监督局与国家卫生部于 1996 年联合发布的《医疗卫生用品辐射灭菌消毒质量控制标准》(GB 16383 - 1996) 中对灭菌和消毒质量及无菌保证水平的规定是:

灭菌剂量根据以下公式确定:

$$SD = k D_{10} \log \frac{N_0}{SAL}$$

式中:SD 为灭菌剂量;  $N_0$  为待灭菌物品初始污染菌数; SAL 为待灭菌物品要求达到的无菌保证水平; k 为安全系数,根据我国情况,规定为  $k = 1.4$  (国际上定为 1.3 ~ 1.5)。

同时规定,医疗用品的无菌保证水平要求达到  $10^{-6}$ , 最小灭菌剂量不得小于 20 kGy, 卫生用品的消毒,其无菌保证水平要求达到  $10^{-3}$ , 最小消毒剂量不得小于 12 kGy。

对初始污染菌量的要求,在国家标准《一次性使用医疗用品卫生标准》(GB15979 - 1995) 中规定: 管道类内腔  $\leq 10$  cfu/件次、外部  $\leq 100$  cfu/件次; 非管道类  $\leq 100$  cfu/件次; 敷料类  $\leq 100$  cfu/g; 消毒产品  $\leq 1000$  cfu/件次或重量 (g)。

### 三、电离辐射灭菌生物指示菌

欧美等国多用短小芽孢杆菌 E601 作指示菌,但北欧国家则多用粪链球菌 AS - 1、圆形芽孢杆菌噬菌体作指示菌。我国在国标 (GB 16383 - 1996) 中规定以短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) E601 (ATCC 27142) 为指示菌,菌片的染菌量按回收菌数计应为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/片。但目前尚无辐照灭菌用标准生物指示剂生产。

### 四、电离辐射灭菌的杀菌机理

$\gamma$ 射线的频率可高达  $3 \times 10^{18} \sim 3 \times 10^{21}$  Hz, 即每秒钟可改变电磁场方向  $3 \times 10^{18} \sim 3 \times 10^{21}$

次。一般，有极分子取向极化所需时间为千分之一秒，电子位移极化所需时间最少亦需千万亿分之一秒，因而在  $\gamma$  射线交变电磁场中，当分子、原子、离子及电子尚未达到极化时，电磁场的方向已改变了，所以它们并不随电磁场方向改变而振动，因而被照物品不致发热。

使大多数分子电离所需的能量仅为  $10 \sim 12 \text{ eV}$ ，使大多数物质的化学键断开所需的能量仅为  $1.57 \sim 6.30 \text{ eV}$ ，而  $\gamma$  射线的光子能量可高达  $1.1732 \text{ MeV}$ ，因此， $\gamma$  射线能使物质分子电离和断键。

辐照杀菌的机理可分为直接作用和间接作用。

直接作用指射线直接破坏微生物的核酸、蛋白质和酶等生命攸关的物质。间接作用指射线作用于微生物时，其中的水分子等辐解产生自由基，自由基再作用于生命物质而使微生物死亡。在辐照杀菌中间接作用多占主要地位。

**1. 直接作用** 当微生物受到  $\gamma$  射线照射时，接受光子能量的电子即由低能级壳层跃到高能级壳层，使原子呈激发状态，而当激发能高于分子电离电位时，则分子发生电离。分子激发能又可转化为化学键振动能，当振动能超过键能时，则激发态分子的共价键断裂，而生成自由基；化学键振动能既可使键能较高的共价键断开，更可使键能较低的氢键、疏水键和范德华力等键断开而直接破坏微生物的分子结构。

**2. 间接作用** 当水分子受到  $\gamma$  射线照射时，经一系列反应可生成氢自由基 ( $\text{H}\cdot$ )、羟自由基 ( $\text{OH}\cdot$ )、过氧自由基 ( $\text{HO}_2\cdot$ )、水合质子 ( $\text{H}_3\text{O}^+$ )、水合电子 ( $\text{e}^-_{\text{aq}}$ ) 等。其中  $\text{OH}\cdot$  为强氧化剂， $\text{e}^-_{\text{aq}}$  为强还原剂，DNA 的破坏约 50% 为这两种自由基的作用。 $\text{OH}\cdot$  极易使氨基酸（特别是直链氨基酸）氧化， $\text{e}^-_{\text{aq}}$  则极易为生物分子俘获，生成阴离子自由基并再分解，如胱氨酸的二硫键俘获  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  后形成二硫化物阴离子自由基，随即分解，二硫键断裂，即引起蛋白质分子的结构改变。如  $\text{e}^-_{\text{aq}}$  为半胱氨酸俘获，则可导致  $-\text{SH}$  基丢失，而  $-\text{SH}$  基为许多酶的活性中心，丢失  $-\text{SH}$  基则酶失去活性。 $\text{e}^-_{\text{aq}}$  还可使直链氨基酸分解脱氨基，也是蛋白质和酶失活的重要原因。

### 第三节 影响电离辐射杀菌效果的因素

电离辐射灭菌虽不似压力蒸汽或环氧乙烷灭菌那样需控制多种因素，但其杀菌效果也受到一些因素的影响，特别受到重视的是待灭菌物品的初始污染菌量及污染菌对辐射的抗力。

#### 一、微生物种类和初始污染菌量

待灭菌物品上污染菌的辐射抗性及菌量均为决定灭菌剂量的重要依据。各种微生物对电离辐射的抗力不同，甚至同种不同型的微生物对电离辐射的抗力也不同（表 3-3）；同一菌型，处于生长静止期则比生长期抗力强。初始污染菌量愈高，所需灭菌剂量愈大，因而尽量降低物品初始污染菌量，可获得更为理想的辐照灭菌效果。据报道，用短小芽孢杆菌的试验证明，当初始污染菌量为  $4 \times 10^9 \text{ cfu/ml}$  时，经  $12.0 \text{ kGy}$  照射，残留菌数为  $51 \text{ cfu/ml}$ ，而初始污染菌量为  $4 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$  时，则残留菌数仅  $3 \text{ cfu/ml}$ ，当初始污染菌量降到  $4 \times 10^5 \text{ cfu/ml}$  时，则已无残留活菌存在。另一用短小芽孢杆菌 E601 的实验也证明，所用菌量不同，所得  $D_{10}$  值也不同，菌量为  $1.4 \times 10^7 \text{ cfu/ml}$  时， $D_{10}$  值为 1.72，菌量为  $8.4 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$  时， $D_{10}$  值为 1.56，菌量为  $2.4 \times 10^4 \text{ cfu/ml}$  时， $D_{10}$  值为 1.34。

表 3-3 不同型细菌对电离辐射的抗力

肉毒杆菌芽孢(型)	D <sub>10</sub> 值(kGy,水中)	沙门氏菌(型)	D <sub>10</sub> 值(kGy,水中)
A	1.4	曼哈顿	0.018
B	1.1	海德尔堡	0.013
D	2.2	鼠伤寒	0.060
E	1.6	奥兰堡	0.056
F	2.5	森夫顿堡	0.051

## 二、氧气和含水量

氧和水分的存在能加强辐照的杀菌作用。有氧时,  $H\cdot$  可与氧产生有强氧化作用的  $HO_2\cdot$  和  $H_2O_2$ , 比无氧照射时对细菌繁殖体的杀灭作用强 2.5~4.5 倍, 对芽孢的杀灭作用可高 2~3 倍。在无氧条件下, 厌氧芽孢的灭菌剂量约为需氧芽孢的 10~12 倍。有人用 25 kGy 剂量照射干燥短小芽孢杆菌, 在有氧条件下其灭活指数为  $10^{15}$ , 而在无氧条件下仅为  $10^7$ 。

微生物处于干燥状态比潮湿状态条件下所需剂量大。因干燥状态下的微生物常被介质包被受到保护, 在相同条件下, 干燥 24 h 的细菌所需灭菌剂量约为未经干燥者的 3 倍。

## 三、介质和 pH 值

微生物所依附的介质对其所需灭菌剂量也有较大影响。辐照时所产生的自由基, 不仅与微生物起作用, 同时也与介质起作用, 因此, 介质成分越复杂, 所需剂量也越大。同一病毒混悬在蒸馏水中和在伊格尔培养液中比较, 所需剂量可相差 3 倍以上(表 3-4)。

表 3-4 病毒在不同介质中失活所需电离辐射剂量

病 毒	不同介质中所需剂量(D <sub>10</sub> , kGy)	
	水	伊格尔液-2%牛血清
柯萨奇病毒	0.8~2.1	3.4~5.5
埃可病毒	1.1~2.1	3.7~6.8
脊髓灰质炎病毒	0.7~2.4	3.8~6.5
流感病毒	0.6~2.5	4.3~5.6

微生物所在环境的 pH 值对灭菌效果也有一定影响。在酸性环境中, 微生物对电离辐射更敏感。

## 四、其他

温度、致敏剂和保护剂等对辐照灭菌效果也有一定影响。热与电离辐射有协同杀菌作用, 菌液被冰冻能显著降低杀菌效果。氨基酸, 蛋白质及其他细胞成分, 含硫氨基的化合物如谷胱甘肽、硫脲等以及其他还原剂的存在, 都可对微生物起到保护作用。亚硝基盐及一些羟基化合物如甲醇、乙醇、甘油等, 也可使辐照杀菌效果降低。而有的物质如氨基苯酚、碘乙酰胺、卤化

物、维生素 K 等则可加强其杀菌效果。

## 第四节 电离辐射杀菌的应用

电离辐射杀菌由于其固有的许多优点，发展很快，已在世界范围广泛应用。我国也十分重视辐照杀菌技术的应用，目前，全国已建立了 10 多个辐照中心，拥有装源量在 10 万居里以上辐照装置的单位近 30 个，开展了对医疗卫生用品的辐照消毒与灭菌；并有了相应的《医疗卫生用品辐照灭菌消毒质量控制标准》等国家标准，国家卫生部还编制了《医疗用品辐射灭菌消毒指南》等给予具体指导；对辐照杀菌技术的研究和使用范围也日益扩展，除对医疗卫生用品和食品的处理外，尚可见到对化妆品、日常生活用品、动物饲料及污水处理等的报道。

### 一、电离辐射杀菌装置

用作辐射杀菌的  $\gamma$  射线装置包括：放射源、源贮藏井、升降器、消毒物品传送系统、防护掩体及控制系统等。放射源一般使用<sup>60</sup>钴，多根钴棒平行排列装于不锈钢罐中，不用时贮于贮藏井中。被照物品由传送带送至照射区，并根据需要变换位置。

用以产生高能电子束的电子加速器是将电子不断加速以获得较大能量的装置，通常由电子枪、加速聚集系统和控制系统组成。常用的有静电加速器和直线加速器。静电加速器的能量在 1 ~ 20 MeV。该类加速器易调节，较稳定，但结构较复杂，速流小。直线加速器则使电子在微波导管提高能量，微波导管愈长，输入微波功率愈高，电子获得的能量也愈大。每米加速管可达 6 ~ 12 MeV。通常发生的是脉冲电子流，能在短暂时间内产生极高能量。

有报道证明用电子束与用  $\gamma$  射线的灭菌效果基本一致。

$\gamma$  射线和电子束的穿透深度参见表 3-5。

表 3-5  $\gamma$  射线与电子束的穿透深度

射 线	有效穿透深度(cm)	
	单面照射	双面照射
$\gamma$ 射线( <sup>60</sup> 钴)	10.2	40.6
电子束		
1 MeV	<0.3	<0.8
5 MeV	1.8	4.3
10 MeV	3.8	8.6

### 二、医疗卫生用品的辐照杀菌

大多数医疗卫生用品均可用辐照进行消毒与灭菌，尤其适用于一次性应用的医疗卫生用品、密封包装后需长期储存的器材、精密器械和仪器以及移植、埋植的组织和人工器官的灭菌处理。如高分子聚合物制作的生物医学制品人造组织、神经康复材料、整形外科材料、心脏瓣膜及输血、输液器、注射器等；手术器械、缝线、敷料、各种导管以及节育用品等。

西药原料及制剂，中药材及中成药也可应用辐照杀菌。一般，固体状态(粉剂、片剂)的药

物比液态药物对辐照稳定。如有人对 33 种热敏性抗生素用 25 kGy 剂量照射,固态时其中 31 种药效不变,其余 2 种只略有降低,而液态时则全部药效明显降低,其中 2 种完全失效。含硫化物如甲硫氨酸、胱氨酸等干粉时经 25 ~ 30 kGy 辐照基本不变,但其水溶液经照射后则大量分解。大多数皮质酮对辐照稳定,但胰酶制剂粉剂经 0.5 ~ 8 kGy 照射时其活性降低 50% ~ 95%。油膏制剂大多稳定。医用滑石粉照射后无变化。无热原注射用水采用辐照灭菌比较理想,可将玻璃瓶改为塑料袋装,既不易破损,又可减小体积,且不用担心水中混进玻璃微屑。我国的一些出口畅销药如乌鸡白凤丸等用此法灭菌,效果良好。有的由 40 多味药组成的中药,含菌量高达每克数十万,经辐照处理后均达到国家标准,有效成分不变。

### 三、食品的辐照杀菌

食品辐照杀菌的应用日益广泛,已成为保藏食品的重要方法之一。粮谷、果蔬、肉、蛋、奶、水产品、调味品及各种罐头等均可用辐照处理以延长保存期。如鲜猪肉辐照后在常温下可存放 2 个月,37℃也可存放 7 d。鲜蛋照射后夏天放 1 个月后好蛋率仍有 91%,比未照射的对照组提高 16%。鲜鱼经 10 kGy 照射后,贮存期由 2 周(0~3℃)延长至 30 d。哈密瓜辐照后贮存 5 个多月好果率仍达 88%,比对照组提高 55%。库尔勒香梨照射后贮存 8 个月,好果率达 97%,而未经照射的对照组有 20%~30% 腐烂。

对辐照食品的安全问题,联合国辐照食品卫生安全专家委员会曾于 1980 年宣布,任何食品经高达 10 kGy 剂量辐照,亦不会引起毒性危害,不需再作毒性试验。这一结论已得到世界食品法规委员会的批准。

近年来,已有几十个国家对近百种辐照食品批准投放市场。我国从 1950 年代开始食品辐照保藏的研究,目前也已有大米、马铃薯、洋葱、大蒜、蘑菇、花生仁、香肠等多种辐照食品被批准投放市场。

### 四、辐照杀菌在其他方面的应用

用电离辐射法处理污水,不仅杀菌效果稳定,能加速有机物降解,而且由于带电颗粒增加,还可促进絮凝沉淀。当照射剂量为 0.7 kGy 时,即可杀灭污水中微生物 90%,1.5 kGy 可杀灭 99%,10 kGy 以上则可完全灭菌。为提高对污水的处理效果,亦可将电离辐射与其他杀菌因子协同处理,如 34 Gy 与 0.35 mg/L 氯协同处理污水,可使水中大肠杆菌( $10^8$  cfu/100 ml)全部被杀灭。国外一些城市已建有专门处理污水或污泥的工厂。

有人采用<sup>60</sup>钴灭菌微量细胞培养板(25 kGy 剂量),获得很好效果,不仅灭菌彻底,保存期长,对微板质量无损,对细胞培养、病毒分离与鉴定以及融合杂交瘤细胞等均无任何影响,微板还可反复利用。

### 五、辐照物品材质的选用

电离辐射多用于一次性使用的医疗卫生用塑料制品的灭菌,但电离辐射对高分子聚合物可引起交联、双键形成或降解,高剂量照射可使其完全丧失机械强度,如聚烯烃类塑料可脆化,聚四氟乙烯可碎成粉末,聚异丁烯可变粘,橡胶可硬裂,但常用塑料在常规灭菌剂量下较为稳定,聚苯乙烯、聚乙烯和尼龙制品几乎没有影响。但一次性使用注射器的制作原料聚丙烯容易变脆,目前,我国已研制出耐辐射聚丙烯并已投产。

在灭菌剂量范围内,以下材料对辐射稳定:丙烯腈-丁二烯共聚物、苯乙烯(ABS)、聚苯乙烯、聚苯乙烯-丙烯腈(SAN)、聚乙烯(任何密度)、聚酰胺、聚氯乙烯、聚酰亚胺(尼龙)、聚胺酯、硫化聚次苯基(硫化聚苯撑)、聚酯、聚乙烯-醋酸乙烯基、聚乙烯-丙烯酸、酚醛塑料、环氧树脂、天然橡胶(橡胶、树乳)、硅树脂、多数合成橡胶(除丁基橡胶或聚丙烯酸)。

## 六、辐射剂量测量

辐射剂量测量体系有:①丙氨酸/电子自旋共振波谱法;②硫酸铈-硫酸亚铈/电位测定法;③辐射变色染料膜/光谱法;④乙醇氯苯体系/振动计法。

当前较广泛应用的剂量计使用:①有机玻璃(红色、橙色、透明,剂量范围1~50 kGy);②醋酸纤维(20~200 kGy);③乙醇氯苯(1~100 kGy);④氨基酸、糖的晶溶发光(2~10 kGy);⑤丙氨酸(0.1~0.5 MGy)。欧洲许多实验室采用红色有机玻璃作为常规剂量计。标识是否已经过辐照处理的“go-no go”指示片也已有生产。目前我国生产的剂量膜、片性能尚不够稳定,正在进一步改进、完善。

## 第五节 辐照杀菌处理的注意事项

### 一、安全

人的吸收剂量达1~2 Gy即可引起轻度急性放射病,若靠近放射源,则数秒钟即可致死。电离辐射灭菌所用剂量比人的致死剂量大千万倍,因此需特别注意防护,严格执行操作规程。据报道,1982年9月,在挪威一家电离辐射灭菌工厂( $\gamma$ 射线)发生一起事故,一名64岁男子受到大剂量照射,出现急性放射病症状,虽经抢救,仍于照后第13天死亡,测其全血平均吸收剂量为 $(2.25 \pm 2)$  Gy。

30 cm 铅板 150 cm 混凝土或 5 cm 深的水都可阻挡放射源对人的危害。

### 二、辐照对物品品质的影响

电离辐射可使血液溶血,普通玻璃变黄,有的药品如蛋白酶水溶液、胰岛素溶液等,照射后几乎90%以上被破坏,故不宜用此法灭菌。

电离辐射可使棉纤维解聚而降低其抗张强度,一般一次灭菌可使降低10%~20%;对丝质缝线损坏较轻,抗张强度一般降低<10%;辐照也可使纤维脱色或变黄。

电离辐射亦可使食物变色变味,有的蔬菜、水果香味丧失,有的营养成分丧失。

(本文曾参阅涂瀛教授、周瑞英教授、阎傲霜教授的有关论著,谨致谢意。)

(李荣芬)

## 第四章 紫外线消毒

紫外线(ultraviolet rays, UV)是德国科学家里特(Ritter)在1801年发现的,距今已有200年历史。随着研究者们对UV研究和认识的不断深入,UV光化反应效应的应用范围得到不断扩展,其中UV的消毒作用已在医药卫生、日常生活、生物制药和食品工业等领域得到广泛应用。长期的实践表明,UV照射是一种方便、经济而又有效的消毒方法。

### 第一节 紫外线的特征及杀菌作用

#### 一、UV的性质

UV是较紫光波长为短的电磁波,位于X线和可见光之间,波长为100~380 nm(见表4-1),频率 $7.9 \times 10^{14} \text{ Hz} \sim 3 \times 10^{16} \text{ Hz}$ ,能量3.26~12.4 eV,主要来源于太阳、热物体、激发气体。为便于探讨UV的生物学效应,光生物学按波长将其分为400~320 nm(UVA)、320~290 nm(UVB)、290~190 nm(UVC)三段。分别称为长(近)波UV、中波UV和短(远)波UV。100~190 nm的UV很容易被水和空气吸收,因此它只能在真空和氮气中传播,被称为真空紫外线(vacuum ultraviolet),由于需要特殊的真空设备,其实际应用的机会非常少。

表 4-1 电磁波的波段划分

电磁波名称	波 长
无线电波	$10^{-2} \sim 10^3 \text{ m}$
微波	1 mm ~ 1 m
红外线	$800 \sim 10^6 \text{ nm}$
可见光	380 ~ 800 nm
紫外线:A波	320 ~ 400 nm
B波	320 ~ 290 nm
C波	290 ~ 190 nm
真空紫外线	100 ~ 190 nm
X线	0.01 ~ 100 nm
γ射线	< 0.01 nm

在UV的电磁波段内,UVA和UVB的光量子能量相对较低,单独照射时对单细胞生物的灭活作用明显弱于UVC,一般需要结合光敏剂的协同作用,以增加其生物效应。UVC属非电离辐射,不能引起物质分子的电离,只能使原子、分子振动或电子能级的状态改变(图4-1)。但UVC对单细胞生物的杀伤作用强,其240~280 nm段是最佳杀菌波,其中253.7 nm的UV杀菌能力最强,因此被设计为消毒用灯源的波长。



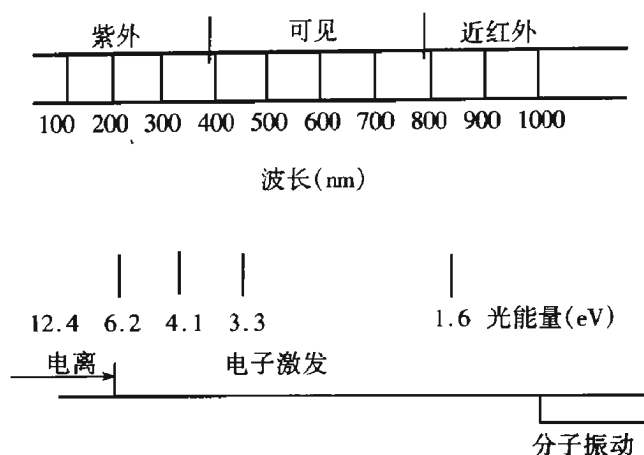


图 4-1 电磁辐射波及其物理性质

在电磁辐射的范畴中,UV<sub>C</sub>属低能量辐射,穿透力弱,其光量子不能透过普通玻璃,对纸、有机玻璃和一般透明塑料薄膜的透过率很低,但石英玻璃对UV<sub>C</sub>的透过率可达到70%~80%以上,聚氟亚乙烯树脂薄膜、乙烯共聚脂膜可分别透过UV<sub>C</sub>60%和40%左右。UV可在空气中呈直线传播,在水中的传播距离有限,在纯净的水溶液中一般可穿透水质2 cm。

UV遵守光的反射和聚焦定律,入射光线可在两种媒质界面处产生射线,也可在进入第二种媒质时发生折射,氧化镁、抛光铝、白漆、白瓷砖的反射率分别是80%~93%,60%~90%,46%,4.7%。

## 二、UV 灯源

太阳能发射各波段的UV光量子,但由于大气层的吸收,达到地面的射线中只有UVA和UVB部分,因此,阳光的照射不能达到高效的杀菌效果。在实际应用中,人们主要采用人工制造的UV灯源。UV灯的制作主要是根据金属蒸气的放电原理,其形状和功能多样,但根据其设计原理,目前主要分为两大类,即低压汞灯和高压汞灯。

### (一) 低压汞灯

1. 热阴极低压汞灯 用钨制成双螺旋灯丝,涂上碳酸盐混合物(碳酸钙、碳酸钡、碳酸锶),通电后,发热的电极使碳酸盐混合物分解,产生相应的氧化物,并发射电子,电子轰击灯管内的汞蒸气原子,使其激发,产生UV。这种灯的主要辐射波长集中在253.7 nm(占95%以上),同时也含有少量184.9~579 nm的不等波长。UV灯管一般采用石英玻璃材料,以利于UV的穿透,保证照射的强度。灯管内部的汞蒸气压力属低压,一般维持在8~13 Pa。目前,市售的UV灯形状多样,根据实际需要设计有直管型、H型、U型、三角型和盘香型等,功率有30 W,20 W,15 W,8 W,4 W等,使用寿命在3 000 h左右。根据我国国家标准,常规消毒用UV灯的照射强度在距UV灯100 cm处不低于100 μW/cm<sup>2</sup>。热阴极低压汞灯是目前应用最为广泛的一种UV灯。

近年来,在热阴极低压汞灯的制作基础上,推出一种脉冲UV灯,这种灯主要发射UV<sub>C</sub>段的电磁波,并伴有光脉冲功能。除UV<sub>C</sub>的杀菌作用外,光脉冲导致细胞反复的热、冷应激,使

细胞破裂，从而能显著增加杀菌效果。

由于 184.9 nm 的 UV 能电离空气中的氧分子，产生臭氧( $O_3$ )，因此普通 UV 灯在照射过程中将有一些臭氧产生，但臭氧的浓度与 UV 实际照射强度无关。根据臭氧的发生原理，现在已有低臭氧 UV 灯生产，其方法是，在灯管的石英玻璃中加入微量的氧化钛和氧化铝成分，使 184.9 nm 的 UV 被灯管壁吸收，以降低  $O_3$  的产量。对此，也有人设计出在产生大量 253.7 nm 电磁波的同时，又产生大量 184.9 nm 电磁波的灯源，使照射后  $O_3$  浓度增加到一定程度，能与 UV 光子联合作用于微生物，以增加消毒效果。

2. 冷阴极汞灯 用镍制成电极，在石英灯管中充入汞和氩气，然后经强电场作用，电极发射电子，轰击管内的汞原子，使其激发产生 UV。这种灯源发射的电磁波中 60% 以上波长为 253.7 nm。

## (二) 高压汞灯

高压汞灯灯管内的汞蒸气压可达数个大气压，输出功率可达 500~1 000 W 或更高，这种灯源发射的电磁波长范围较宽，UVC 段含量的比例较少，能量部分被消耗在非杀菌波段上，但其输出的 UVC 总强度大。这种灯一般在水消毒中应用。

## 三、UVC 对微生物的杀灭作用

### (一) UVC 对微生物的杀灭效果

UVC 可杀灭多种微生物，包括细菌、真菌、病毒、立克次体、螺旋体、原虫、藻类等，但是，不同种类的微生物对 UV 照射的敏感性不同，灭活剂量相差可达数倍到 100 倍左右(见表 4-2)。根据微生物对 UVC 的抗力大小，从强到弱，可大致排序为真菌孢子、细菌芽孢、非脂质色膜病毒、脂质色膜病毒、细菌繁殖体。研究还证实，即使是同一种微生物，不同菌株对 UV 致死的敏感性差别也极大，如同样是大肠杆菌，其敏感株(Bs-1)因 DNA 修复系统缺陷，不到  $10^{-3} J/cm^2$  的(约  $1\ 000 \mu W \cdot s/cm^2$ ) UVC 就可杀灭其 99.9%，而要达到相同杀灭水平，野生株(B)所需剂量要大于  $3 \times 10^{-3} J/cm^2$  (约  $3\ 000 \mu W \cdot s/cm^2$ )，抗性株(B/r)则要求  $1.2 \times 10^{-2} J/cm^2$  约  $12\ 000 \mu W \cdot s/cm^2$ 。此外，细菌的各种生长状态对 UV 照射的敏感性也各不相同，对数增长期细菌对 UV 敏感，进入静止期后抗性明显增强。

### (二) UV 杀菌的动力学

根据微生物对 UV 照射的敏感性不同，UV 照射强度、剂量的变化，以及被照射微生物群体中微生物种类的不同等情况的观察发现，UV 杀菌的动力学呈现多种表现形式，可概括为三种，即一次攻击，一个靶存活曲线；肩型存活曲线；向上凹面的存活曲线。

1. 一次攻击，一个靶存活曲线(One-hit, one-target survival curve) 当一次攻击能灭活一个生物单位，微生物个体对 UV 的敏感性相同，UV 照射注量(fluence)对微生物个体的照射分布随机时，微生物生存曲线可用“一次攻击一个靶”函数公式来表示。

$$S/S_0 = e^{-cF} \text{ 或 } \ln(S/S_0) = -cF$$

式中， $S_0$  是照射剂量为 0 时(照射前)的微生物数， $S$  为照射后存活微生物数， $F$  为注量， $e$  为自然对数之底。 $c$  是一个常数，代表在特定条件下，微生物对紫外线的敏感度。如果用存活比例( $S/S_0$ )的自然对数，对应于 UV 注量( $F$ )作图，则此存活曲线为一条直线，其斜率为  $-c$ 。导致  $e^{-1}$  (36.8%) 微生物存活的注量称为平均致死注量，此时， $cF = 1$  (微生物每个个体接受一次

打击), $c$ 是平均致死注量的倒数。确切的“一次攻击一个靶”存活曲线一般在敏感菌株见到,如伤寒沙门氏菌,大肠杆菌 Bs-1 株,大肠杆菌 K12AB2480  $uvr - rec -$  株,单股 DNA 和 RNA 病毒。

表 4-2 灭活不同微生物所需的 UV 照射剂量

微生物种类	UV 照射剂量( $\mu W \cdot s/cm^2$ )
大肠杆菌( <i>Escherichia coli</i> )	3 900
腐生葡萄球菌( <i>Staphylococcus saprophyticus</i> )	4 000
金黄色葡萄球菌( <i>Staphylococcus aureus</i> )	6 000
炭疽杆菌( <i>Bacillus anthracis</i> )	8 700
副伤寒杆菌( <i>B. paratyphosus</i> )	6 100
枯草杆菌( <i>B. subtilis</i> )	11 000
枯草杆菌芽孢( <i>B. subtilis spores</i> )	22 000
破伤风梭状芽孢( <i>Clostridium tetani</i> )	22 000
霍乱弧菌( <i>Vibrio cholerae</i> )	6 500
绿色链球菌( <i>Streptococcus viridans</i> )	3 800
溶血性链球菌( <i>Streptococcus hemolyticus</i> )	5 500
白喉杆菌( <i>Corynebacterium diphtheriae</i> )	6 500
伤寒埃伯特杆菌( <i>Eberthella typhosa</i> )	4 100
螺旋体( <i>Keptosira</i> )	6 000
结核分支杆菌( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )	10 000
铜绿假单胞菌( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	10 500
鼠伤寒沙门氏菌( <i>Salmonella typhimurium</i> )	15 200
伤寒沙门氏菌( <i>Salmonella typhosa</i> )	4 000
藤黄八叠球菌( <i>Sarcina lutea</i> )	26 000
小球藻( <i>Chlorella</i> )	22 000
草履虫( <i>Paramecium</i> )	200 000
噬菌体 $T_3$ (bacteriophage $T_3$ )	6 600
流感病毒 Influenza virus	6 600
脊髓灰质炎病毒(Polio virus)	6 600
烟草花叶病病毒 tobacco mosaic virus)	440 000
甲肝病毒( hepatitis A virus)	8 000
黄曲霉菌( <i>Aspergillus flavus</i> )	99 000
灰绿曲霉( <i>Aspergillus glaucus</i> )	88 000
扩展青霉菌 <i>Penicillium expansum</i> )	22 000
黑根霉( <i>Rhizopus nigricans</i> )	220 000

2.肩型存活曲线(shouldered survial curve)即曲线最初平缓,然后呈指数式下降。函数公式为:

$$S/S_0 = ne^{-cf}$$

当微生物需要一次以上的打击才能灭活时(此时,一般个体微生物具有多个靶,每个靶必须接受一次 UV 攻击才能灭活),UV 照射的效率随注量的增加而增加,直到达到最终值。在开始,由于接受几次 $n > 1$ )打击的个体很少,存活比例较高,累积攻击达到  $n$  次时很多个体灭活,

存活曲线逐渐变陡，最后达到单次攻击曲线的斜率。一般抗性株，如大肠杆菌 B/r,大肠杆菌 K12AB1157uvr<sup>+</sup> + rec<sup>+</sup> ,金黄色葡萄球菌等可见此类杀菌动力曲线。

3. 向上凹面的存活曲线 当微生物群体中存在对 UV 抗性不同的两种或多种个体类型，可呈现两组分和多组分曲线。

(1)两组分曲线:函数公式为  $S/S_0 = f_1 e_1^{-cF} + f_2 e_2^{-cF}$

由于存在两种不同的个体,  $f_1, f_2$ , 虽然符合一次攻击的动力学,但其各自存活率不同,综合效应呈现凹型存活曲线。

(2)多组分曲线:当多种抗性不同的微生物构成群体,各个体灭活服从一次攻击动力学时,其总的存活率可用积分式表示:

$$S/S_0 = \int_{C_{min}}^{C_{max}} W(c) e^{-cF} \cdot dc$$

### (三)UV 杀菌的影响因素

UV 杀菌的效果受到多种因素的影响,研究和探讨这些因素将有利于保证和提高 UV 消毒的质量。归纳起来 UV 杀菌的影响因素主要涉及影响 UV 的照射强度、照射剂量和微生物方面的因素。

1. 电压 电压明显影响紫外线光源的照射强度,在相同光源和条件下,电压越低照射强度也越低,照射强度与电压呈直线相关。

2. 距离 照射强度与照射距离呈负相关关系,呈指数曲线,在一定范围内,照射距离的缩短将明显增加照射强度,相反,则将降低照射强度。

3. 温度 环境温度一方面可影响光源的照射强度。在 40℃ 时,光源输出 UV 的强度最高,温度越低,输出越低,在 4℃ 时由于输出的 UV 强度比室温时降低 1/3,杀菌效果下降了 65% ~ 80%;但当温度超过 40℃ 时,UV 电磁波被灯源回吸收的程度增加,实际输出减少,照射强度亦将降低;另一方面,低温可增加微生物对 UV 的敏感性,如在 -79℃ 时芽孢对 UV 的抗力与 22℃ 时,下降 1/2.5 倍,繁殖体下降到 1/5 ~ 1/8 倍。因此,在实际应用中一般推荐选用 20℃ 左右的环境温度进行 UV 照射。

4. 相对湿度 40% ~ 60% 以下的相对湿度有利于 UV 对空气的消毒,湿度增加空气中的水滴对 UV 的阻挡(遮挡或吸收),将降低 UV 的杀菌效果。

5. 照射时间 UV 的消毒效果与照射剂量呈指数关系,

$$N/N_0 = e^{-Kt}$$

$N_0$  为照射前菌数,  $N$  为照射后菌数,  $t$  为照射时间,  $I$  为照射强度,  $K$  为常数。从指数曲线公式可见,一定程度的杀灭率要求一定的照射剂量,即在一定 UV 照射强度时要保证足够的照射时间。

从理论上讲,照射剂量越高,杀灭效果越好;高强度短时间或低强度长时间均能达到相同的杀菌效果。但实验测定表明,超高强度的 UV 照射可降低致死剂量,而过低的照射强度在延长照射时间后杀菌效果却不理想。

6 有机物保护 有机物明显影响 UV 消毒的效果,一方面是其包裹微生物不利于 UV 的穿透,另一方面有机物对 UV 的吸收,降低了 UV 强度,使杀菌效果降低。

7 微生物的敏感度 不同微生物对紫外线的抵抗力水平不同,根据抗力的程度不同,一般可将微生物分为三类:高抗力(耐辐射微球菌、枯草杆菌芽孢、藤黄八叠球菌、真菌),中度抗力

(球状微球菌、鼠伤寒沙门氏菌、酵母菌、乳链球菌、铜绿假单胞菌),低抗性(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、普通变形杆菌、牛痘病毒、啤酒酵母菌、噬菌体  $T_3$ )。UV 对抗力小的微生物灭活效果好,相反则灭活效果差,因此,进行消毒时,应当科学选用合适的 UV 照射强度和注量。

8. 微生物数量 被照射物品上微生物含量越多,杀灭效果越差。

除以上八种因素外,保护因子,干扰因子,屏障物质的存在,培养基成分、浓度、pH 等都将不同程度影响 UV 的杀菌效果。

## 第二节 UV 的杀菌机理

### 一、UVC 的杀菌机理

在 UVC 照射下,生物细胞中的原子、分子发生振动,电子激发,电子能级状态改变,同时,细胞分子和周围的水分子也被激发,产生一系列光谱吸收产物和氧化自由基。这些分子水平的变化一方面导致生物细胞内核酸突变,如核酸断链、交联,嘧啶二聚体与嘧啶水化产物等形成,使核酸复制、转录封锁及蛋白质的合成受到障碍。另一方面,不同氧化自由基如  $\text{OH}^\cdot$ 、 $\text{O}^\cdot$  等也可引起细胞核酸和氨基酸的氧化,导致相关结构和功能损伤和障碍,甚至导致细胞的死亡。

研究发现,单细胞内有多个 UVC 作用靶,包括核酸、蛋白质(酶)和脂质膜,在这些作用靶中,核酸对 UV 的敏感度远远高于细胞的蛋白质(酶)和膜,如经中等剂量的 UVC( $48\,000\,\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ )照射后,大肠杆菌存活数和生长能力显著降低,但细胞内脱氢酶、胞膜内  $\beta$ -D-半乳糖酶的活性无变化,膜电位无改变,膜结构完整;而接受更高剂量 UVC 照射时,以上所有指标均发生变化。

早在 1928 年 Gates 就发现杀菌的 UV 波段与核酸对 UV 的吸收波段相一致。以后 Ham 等的观察结果进一步说明,不同波长的辐射对细菌的致死率平行于核酸碱基的吸收光谱,因此,研究者们认为 UVC 对细菌的致死作用主要是 UVC 对核酸的损伤所致,相关的机理研究得到不断深入。

#### (一)DNA 损伤

细胞经 UVC 照射后,DNA 吸收光量子,其结构中的某些分子和原子处于激发状态,激发状态的 DNA 分子和原子可通过结构键的断裂和共价交联产生一系列 DNA 的光产物。其中包括嘧啶二聚体,胸腺嘧啶-胞嘧啶光产物(TC(6-4)产物),5-胸腺嘧啶基-5,6-二氢胸腺嘧啶(TDHT),嘧啶水化物,DNA-蛋白交联产物,DNA-DNA 交联产物,DNA 单、双断链等。

1. 嘧啶二聚体 DNA 嘧啶碱基上的 5、6 双键对 UVC 有强烈的吸收现象。当能量被吸收后,一个链上(有的可不在一条链上),由两个相邻的嘧啶碱基通过 5 和 6 位碳原子相互连接起来,形成一四碳环(环丁烷环),即 5,6 环丁烷双嘧啶(见图 4-2),又称嘧啶二聚体(pyrimidine dimer)二聚体形成后,由于失去了强烈吸收 UV 的嘧啶碱基上的 5、6 双键,DNA 对 UVC 的吸收特征明显消失,此时,由于二聚体的交联结构出现(特别是双链间的交联结构),DNA 结构变异,功能发生障碍,导致细胞的生长和生存障碍。

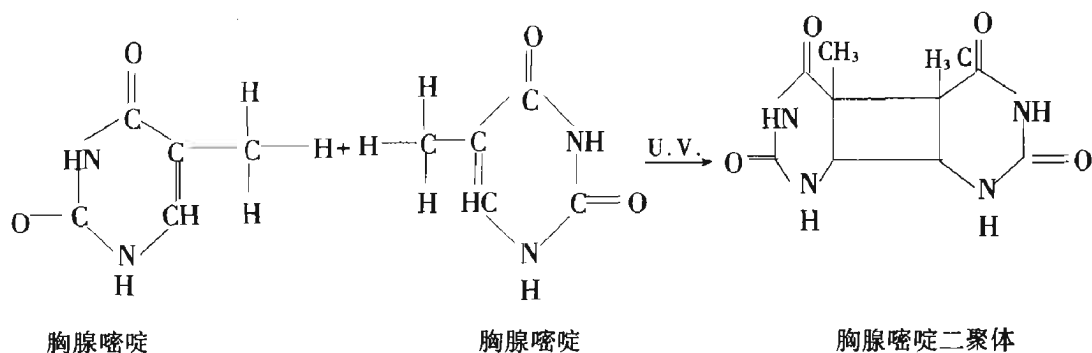


图 4-2 胸腺嘧啶二聚体的形成

核酸碱基的种类对 UV 的敏感性是有差异的,从高至低的顺序为:胸腺嘧啶、胞嘧啶、腺嘌呤、鸟嘌呤。UVC 照射后,二聚体的组成比较复杂,但主要是嘧啶二聚体,包括胸腺嘧啶与胸腺嘧啶二聚体(T-T),胸腺嘧啶与胞嘧啶二聚体(T-C),胞嘧啶与胞嘧啶二聚体(C-C)。

研究显示,DNA 组成碱基的成分,UV 照射时的环境温度,UV 波段变化和照射剂量的变化等因素均将影响嘧啶二聚体的成分和产量。如大肠杆菌经波长为 254 nm 的 UV 照射后,二聚体以 T-T 为主,经波长为 300 nm 的 UV 照射后,二聚体则以 C-T 为主;在高剂量 UV 照射下,嘧啶二聚体产量较高,但在较低剂量时,RNA 和 TC(6-4) 光产物占主要成分;在冷冻条件下,细菌繁殖体内生成的环丁烷嘧啶二聚体减少,而 TDHT 产物增加。

**2. TC(6-4) 光产物** TC(6-4) 光产物是通过相近的两个嘧啶碱基的 6 和 4 位碳原子交联而成,最易发生在胸腺嘧啶(T)和胞嘧啶(C)之间,其次在 C 与 C, T 与 T 之间。在一般条件下,此产物产量较低,是环丁烷嘧啶二聚体的 1/10,但在低剂量 UV 照射下(如  $1\,000 \sim 5\,000\ \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ),TC(6-4) 光产物的产量则超过嘧啶二聚体。由于其在低剂量 UV 照射下产量的相对丰富,被认为是 UV 引起的最主要的前突变产物,可作为 UV 早期致损伤的测定指标。

**3.5- 胸腺嘧啶基-5,6-二氢胸腺嘧啶(TDHT)** 细菌芽孢经高剂量 UVC( $2 \times 10^6\ \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ )照射后,30% 的胸腺嘧啶转化为一种“孢子光产物”,即 TDHT。TDHT 是芽孢的重要光产物之一,在芽孢发芽时,TDHT 产量降低,而嘧啶二聚体产量增加。在 TDHT 的结构中,它的两个胸腺嘧啶碱基中的一个杂环上仍然保留着 5,6 双键,因此对 265 nm 波段的 UV 仍然具有很强的吸收能力。TDHT 从分子结构、光化学反应特征到损伤修复机理均明显不同于嘧啶二聚体。但值得探讨的是在冷冻的条件下细菌繁殖体经 UV 照射后也有大量的 TDHT 产生,那么 TDHT 产物的出现是与 DNA 所处的条件有关还是与 DNA 抗性有关,这是值得深入研究的问题。

**4 嘌呤的光化反应** 嘌呤碱的破坏少于嘧啶碱,约为 10 倍,所以一般认为嘌呤的光化学在生物学上的重要性不大。但研究者们认为嘌呤吸收 UV 的能量一部分可传递给嘧啶碱和糖-磷酸主链,从而起到间接损伤 DNA 的作用。

**5. DNA 断链** 经 UVC 直接引起的 DNA 单链和双链断裂的产物并不多。在修复损伤过程中,DNA 在酶的作用下迅速断裂,形成许多单链断裂物,因此,单链的断裂产物可以认为大多数是细菌修复阶段的必需产物。虽然单、双链断裂的产物不多,而且在一定条件下都有可能分别通过连接酶和重组等过程修复和重接,但在光化学中,DNA 断链仍然被认为是细胞损伤的

重要指标。

6. DNA 交联产物在 UVC 照射过程中,不可提取的 DNA 随光量子注量的增加而增加,此现象是由于碱基与蛋白质氨基酸残基之间形成了共价键,DNA 与蛋白质发生交联所致。另外,细胞 DNA 在干燥状态下或在密集堆积时,经 UVC 照射后也可形成 DNA - DNA 交联。DNA 交联产物多发生在抗辐射菌中(如微球菌),而且经高剂量 UVC 照射后,浓度更高。

DNA 交联产物形成后对 DNA 复制干扰最大,但这些损伤只在高剂量 UVC 照射下产生,所以只在有一定抗辐射的细胞中才有重要的生物学意义。

### (二) RNA 的光化学

RNA 的光化学反应研究报道较少,因为其损伤所致的生物效应比 DNA 要小得多,但初步的观察认为, RNA 的光化学反应和光产物与 DNA 相似,而且,形成的水化物更多一些。从理论上讲,在以 DNA 为核酸的微生物中,细胞内 RNA 的拷贝比 DNA 多,其损伤所致的生物效应肯定是较为迟钝的,但对于以 RNA 为唯一遗传物质的微生物, RNA 的光化学反应也必将引起敏感的生物效应。

有研究显示,240 nm UV 对细胞中小 RNA 分子( small nuclear RNAs)的生物合成的影响非常敏感,照射后 RNA 可呈现立即生物合成抑制和照射后晚期抑制两种效应。其中,立即抑制效应要求的 UV 照射剂量高( 87 000 mW·s/cm<sup>2</sup>),对 RNA 合成的抑制强,而晚期抑制效应要求的照射剂量低( 3 600 mW·s/cm<sup>2</sup>),抑制效应较弱。

根据以上的介绍,我们已经说明,不能单纯地说细胞核酸上哪一种光产物是最重要的,因为实际结果取决于实验条件和不同的受照射细胞。但有一点是肯定的,核酸是 UVC 的主要作用靶点。

### (三) 蛋白质和氨基酸的光化反应

脂肪族的氨基酸在 UV 的照射下不引起光化学反应,但芳香族氨基酸对 240 nm 以上的 UV 有很强的吸收。吸收 UVC 光子后,直链氨基酸俘获水合电子而分解脱氨基,水合电子也可被半胱氨酸俘获,导致 S - C 键氧化断裂而失去巯基。研究发现,在较高剂量的 UVC 照射后,细胞酶的活性一般大多数呈现下降的趋势,被认为是由于氨基酸残基结构改变,特别是重要氨基酸如胱氨酸残基被破坏,导致维持酶活性中心空间完整性的氢键破坏所致。

一般认为,蛋白质和酶的功能变化是 UV 损伤的晚期生物效应,不能作为 UV 损伤的敏感指标。如经 48 000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  UV 照射后,大肠杆菌存活数和生长能力均发生显著降低,但细胞内脱氢酶、膜内  $\beta$  - D - 半乳糖酶活性却无变化。我们的研究也发现,在照射强度为 200  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  时,360 000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  UVC 照射才使大肠杆菌中过氧化物酶和琥珀酸脱氢酶活性出现明显的降低现象,而在相同条件下,在照射强度为 50  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  时,经 15 000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  UVC 照射后,T - T 产物可达到 0.21%,细菌灭活也可达到 1 个以上对数级。

### (四) 细胞膜的改变

细胞膜内含丰富的蛋白质,许多重要物质的合成均在这里进行。膜损伤也是 UV 照射的晚期生物效应。我们的观察发现,经高剂量 360 000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$  UVC 照射后,电镜下可见大肠杆菌胞膜和胞壁的间隙增宽,膜光滑度降低;而低剂量照射时(3 000  $\mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ),细胞的形态无任何变化。但值得注意的是,低剂量 UV 照射的细胞膜通透性可明显增加,使细菌对亚致死剂量的化学剂发生致死效应。

### (五) DNA 损伤修复

细菌被 UVC 照射后,再经暗处保存或经可见光的照射,有的细菌有明显的复活现象,这是细菌 DNA 修复所产生的效应。根据至日前的研究结果,可将 DNA 的修复分为以下 4 种。

1. 光复活(原位修复) 350 ~ 600 nm 波长的光照射可引起细胞的复活,此种修复是通过酶促机制实现的。在光复活酶 (photoreactivating lightdependent enzyme) 的作用下,嘧啶二聚体在可见光下原位裂解,恢复成两个嘧啶单体,使损伤自发地衰减(图 4-3)。光复活的强度与光照射剂量有关,如照射的强度、距离和照射次数都将影响细菌存活数量。

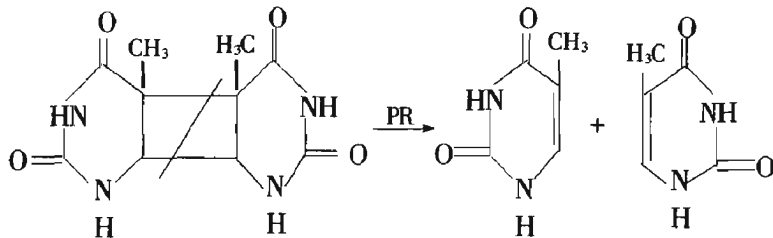


图 4-3 光修复示意图

UVC 所引起的 DNA 损伤 70% 可由此途径修复,但光复活的发生是有一定前提条件的,当损伤达到一定程度后,修复就难以进行。

我们的研究显示,在经高注量的 UVC 照射后,大肠杆菌产生的光复活率显著低于较低注量的 UVC 照射后的光复活率,如当照射剂量为  $2\,000 \sim 12\,000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$  时,光复活率可达  $3.58\% \sim 24.03\%$ ,但当照射剂量为  $60\,000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$  以上时,光复活现象消失,这一现象也被 Senka Dzidic 等证实。其原因可能是在低强度 UV 照射时,细胞 SOS 网络系统处于“初级诱导”,此状态下,只有一个基因集子被激活,只有修复而没有诱变伴随发生,而且,此时光复活酶的合成能力和活性也有所增强;高注量照射时,SOS 网络所有基因充分表达,除 DNA 修复外,还有突变发生,且频率较高。此外,高注量的 UV 照射对光复活酶的活性也有所影响,从而导致了光修复的障碍。

光修复能力与微生物抗 UV 效应相关,如在冷冻状态下,由于光复活酶活性降低或丧失,光复活失效,细胞对 UV 的敏感度即明显增加。

phr 是光复活缺陷突变型基因,phr- 突变体因为缺乏光复活酶,缺乏光复活能力,此类微生物对 UV 非常敏感。

2. 暗修复(切除修复)此修复途径不需光照射,由核酸内切酶、外切酶、聚合酶、连接酶共同完成损伤切除、以未损伤的物质替代、建立正常结构和序列的整个程序。暗修复明显引起 DNA 突变,可能是错误修复的结果。

在聚合酶丰富存在的条件下,此途径可在缓冲液中进行,相反,则需完善的生长培养基和若干基因产物。

uvr- 基因是紫外线修复缺陷型基因,突变体 uvrA 和 uvrB 缺乏核酸内切酶,因此不能进行暗修复,对 UV 的杀伤敏感,但对电离辐射不增加敏感性。

polA- 基因是聚合酶 A 缺陷型基因,突变体缺乏 DNA 聚合酶 I 的活性,对 UV 照射的敏感



性明显增加(10倍),同时对电离辐射的敏感度也有增加(3倍)。

*uvr* - 和 *pol* - 突变体因缺乏暗修复所需的内切酶和聚合酶,显示出对 UV 的高度敏感性。

3.复制后修复(重组修复)在突变区域较大或切除修复酶系出现障碍时,重组修复即发挥作用。在此途径中,损伤可继续保持,但在复制时可以暂时绕过或忽视这种损伤而进行复制。复制时,母链的损伤部位失去了模板作用,复制出的子链出现缺口,另一条完好的母链与缺口部分进行交换(crossover)(重组),填补缺口。此时完好的母链出现缺口,但可通过 DNA 聚合酶 I 和 DNA 连接酶按其子链为模板进行修复。

*recA* 突变体丧失了交叉作用的功能,因此不能进行重组修复。*uvr* - 和 *recA* - 双突变株对 UV 最敏感,因为其缺乏暗修复和重组修复机制。

4.SOS 修复(诱导性修复) SOS 修复属于一种错误倾向性修复。在对大肠杆菌的研究中发现,被 UVC 照射的菌中 *recA* 蛋白大量出现,其结果是使 *uvrABC* 主导的切除酶对受损 DNA 不敏感,残留的 DNA 损伤发生了一系列诱导性突变,当突变达到一定程度时,细菌存活率明显降低。这一途径的进行依赖于 *umuD*(+) *C*(+) 基因的启动及其产物生成。

微生物经 DNA 的修复后存活,将导致抗性出现,随之而来的是抗力强的细菌被筛选出来,使敏感菌株丧失。如在厌氧条件下,脆弱杆菌经 UV 照射后,存活的细菌胞内有多种新型蛋白生成,此时,细菌除对 UV 产生抗性外,对热力的抗性也增加了。

## 二、UVA 的杀菌机理

UVA 的光量子能量明显弱于 UVC,它必须要与光敏剂协同作用,使产生一系列光敏反应,才能达到有效的灭活微生物的效果。

光敏反应是指光敏剂成分与光发生反应的过程。光敏剂在其基态(ground state)时即作为一种色素(chromophore,又称发色团或光吸收剂),吸收光能后,光敏剂即处于高能水平的电子激发状态,此时它与核酸、蛋白质及脂质等的特定部位结合,形成光加成物,还可将自身能量转移到重要分子基团,导致细胞结构破坏,活性消失。

补骨脂素(psoralen, PS)类衍生物是 UVA 特异的一类光敏剂,PS 的大多数生物效应来源于其光敏反应,虽然反应复杂,但基本上可将其分为两大类,即有氧光敏反应和无氧光敏反应。其中无氧光敏反应在 PS 的生物反应中占相当重要的地位。

### (一)无氧光敏反应

在无氧状态下,PS 能被 300~400 nm 的光激发而形成不稳定(三态)分子。在黑暗中,某些 PS 衍生物,如氨基-三甲基补骨脂素(4'-aminomethyl-4,5',8-trimethylpsoralen AMT)还能被某些酶介导的氧化反应或脂质过氧化的产物所激发而成为三态分子。由于三态分子的能量高于 DNA 的碱基,所以三态能量的转移可导致激发的 PS 与 DNA 发生反应,引起如 UVC 照射所致的 DNA 损伤。即 PS 在暗处通过碱基间内插与核酸形成可逆性连接。在 UVA 短时间内照射下,PS 分子的两个光反应点可与 DNA 双链中 5'-TpA-3'序列中的胸腺嘧啶碱基发生交联,被激发的 PS 通过吡喃酮端的 3,4 双键与 T 形成环丁烷单产物,此单体在进一步吸收一光子后,可通过呋喃端的 4',5'-双键与互补链中的胸腺嘧啶碱基交联,形成环丁烷胸腺嘧啶二聚体(cyclobutane pyrimidine dimers),此光产物能阻止核酸双链的分离,阻止了核酸的复制和转录,对生物体具有致死性。

同 UVC 的 DNA 损伤相同,形成的环丁烷胸腺嘧啶二聚体也可通过切除修复和重组修复

予以去除，其中切除修复为主要途径。

## (二) 有氧光敏反应

在这一类反应中，氧被称为光动力，一般情况下通过两种方式参与光敏反应。

1. 超氧阴离子自由基( **superoxide anion radical**,  $O_2^{\cdot -}$  ) 三态的 ( $^3S$ ) 光敏剂通过电子或氢的转移与附近分子发生初级反应( **primary reaction** ), 产生半还原光敏剂、硫氧化自由基(  $S^{\cdot -}$  ) 或巯基自由基(  $SH^{\cdot}$  ) 和其他半氧化物质。这些自由基具有活跃的化学反应性，在多数情况下，物质分子的这些基团与氧反应产生不同类型的氧化产物，如过氧化物。过氧化物可进一步反应，激发自由基的自动氧化程序。其中，半还原光敏剂能与基态氧 ( $^3O_2$  ) 产生基态光敏剂和  $O_2^{\cdot -}$  。过氧化物也可以通过从  $^3S$  光敏剂转移一个电子给氧而获得  $O_2^{\cdot -}$  , 但此途径产生效率相对较低。

在超氧化物歧化酶( **SOD** ) 的作用下,  $O_2^{\cdot -}$  可与生物分子反应或进一步歧化( **dismutation** ), 产生过氧化氢(  $H_2O_2$  ) 。

在高浓度反应物质和低氧浓度情况下，由于在光照射之前光敏剂与反应物已形成非共价连接复合物, 反应剂之间非常接近, 将增加  $O_2^{\cdot -}$  型光敏反应的可能。

2. 单态氧( **single state of oxygen**,  $^1O_2$  ) 当含氧丰富时，氧和反应物质将竞争与  $^3S$  光敏剂反应。  $^3S$  光敏剂与  $^3O_2$  通过能量转移产生基态光敏剂和  $^1O_2$  。由于光敏剂和  $^3O_2$  均为三态分子, 它们之间的反应效率很高。

$^1O_2$  能以短、长两种激发单态形式存在，其中长寿命形式的激发单态氧具有过剩能量( **23 kcal/mol** ) ，是光化反应中的主要形式。它在水中的寿命是 **4  $\mu s$**  , 但是在有生物分子存在时其寿命相对较短。

$O_2^{\cdot -}$  和  $^1O_2$  与有机复合物反应时, 其电子旋转活跃, 比  $^3O_2$  更具电子亲和性，能与电子丰富区的生物分子快速反应, 产生氧化产物, 如与不饱和烃( 不饱和脂肪酸或胆固醇 ) 等位氢原子反应, 产生过氧化氢; 与二烯系统中的杂环类( 如组氨酸 ) 产生内过氧化物( **endoperoxides** ) ; 与有机硫( 如蛋氨酸 ) 反应形成相应的硫化物。此外, 单态氧还能引起核酸的氧化损伤, 使产生大量 **8-OH-脱氧鸟苷 (8-OHdG)** 光产物。

## 第三节 紫外线消毒的应用

### 一、空气消毒

**UV** 对空气的消毒是非常有效的, 由空气传播的疾病病原体如麻疹病毒、流感病毒、脊髓灰质炎病毒、结核杆菌等均能被 **UV** 灭活。由于 **UV** 灯制作技术的发展, **UV** 照射的简单、方便、廉价, 使这种方法在实际生活中已广泛应用。在医院病房、手术室、透析室、换药室、产房、婴儿室、隔离室、工厂的无菌车间、科研实验室等均普遍采用 **UV** 进行空气消毒。据测定, 经 **UV** 照射的空气, 其中微生物可减少 **50% ~ 70%** , 甚至达 **90%** 以上。

市售 **UV** 灯的强度和样式很多, 根据空气消毒的实际需要可分别采用侧壁固定式、悬挂固定式、移动式等装置, 还可根据中央空调通风管道的具体情况设计一定强度的 **H** 型、**U** 型 **UV** 灯, 将其固定在管道内进行空气消毒。

一般在无人状态下要求的 **UV** 照射强度是 **2 ~ 2.5 W/m<sup>2</sup>** , 照射时间 **1 h** 以上。有人在场时,

应加强对人的保护,照射强度小于  $1 \text{ W/m}^2$ ,每 2 h 间隔 1 h 或 40 min 间隔 1 h。

空气消毒时,许多环境因素将影响消毒效果,如空气的湿度和尘埃能吸收 UV,从而降低杀菌率,如空气尘粒为  $800 \sim 900$  个/ $\text{cm}^3$  时,杀菌效率将降低 20% ~ 30%。因此在湿度较高和尘粒较多时应当适量增加 UV 的照射强度和剂量。

## 二、物品表面消毒

用 UV 进行表面消毒多见于实验室、医院和食品工厂。UV 对污染的物体表面进行照射可达到有效的消毒效果,但前提是必须直接进行照射,因为 UV 的穿透力有限。

用 UV 进行表面消毒时,要求灯管距离污染表面不超过 1 m,30 W UV 灯照射时,照射时间不应短于 30 min,灯管周围 1.5 ~ 2.0 m 为消毒有效区。

表面物质的光洁度和性质对 UV 杀菌效果的影响很大,如铝、玻璃表面的照射杀菌效果好,木制品、橡胶、纸等的照射杀菌效果较差。因此,实际操作时应根据具体的消毒物品和条件,进行照射剂量的调整。

## 三、水消毒

水传病原体 and 消毒方式所带来的问题是目前世界范围的公共卫生问题。经水传播的病原体如细菌性痢疾杆菌、伤寒杆菌、致病性大肠杆菌、霍乱弧菌、隐孢子虫、甲肝病毒、轮状病毒、以及各种寄生虫等,种类繁多,极大地影响人们的健康,水的消毒处理是保证应用水质量的关键步骤之一。

氯消毒一直是许多国家和地区水消毒的选用方法,但近年来有关氯化物与水中有机物的反应衍生物的致突变和致癌变问题已引起关注,而国内外的研究者们均认为 UV 消毒方法是解决水的卫生问题的可行性方法。

UV 水消毒的应用领域广泛,包括饮用水、食品工业用水、鱼塘、草地用水、地表水、循环水、污水、再利用水等方面。其显著的特点是:(1)能有效灭活大多数的病原体。(2)消毒反应过程是物理反应,无毒性、蓄积毒性和腐蚀作用,消毒后的水对人体和水生物无害。(3)操作简便,所需的场地比其他化学方法小。(4)消毒所需时间短(20 ~ 30 s,指高强度 UV 库系统)。

我国目前常见的 UV 水消毒装置属小型处理系统,不能大面积使用。主要包括直流式紫外线消毒器和套管式紫外线消毒器,出水量分别为 2 000 L/h, 150 L/h,经处理后,水中微生物可达到 4 个对数级以上的灭活,其规范化和标准化还有待完善。

近年来,世界上许多发达国家和地区对 UV 水消毒系统进行了深入的研究和大规模的应用,由于在 UV 灯源制作中突破了相关的技术,意大利、澳大利亚、德国等国家已能生产出高强度( $40\,000 \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ ),长寿命(14 000 h)的自动化 UV 水消毒装置。这些 UV 消毒系统主要由高强度 UV 灯组成的 UV 库、水流反应器、自动检测系统、自动清洁系统等部分组成。水流可以与灯管成直角或平行的方向流过,每日输出水量可达 82 ~ 110 百万加仑(约 370 000 ~ 500 000 吨)根据反应器外型的不同,UV 水消毒系统一般分为接触型和非接触型两类,接触型是在汞灯外面封有石英罩,以减少水引起的降温作用(见图 4-4)。非接触型是将 UV 灯悬挂于透明的水道管外,照射流经的水流。

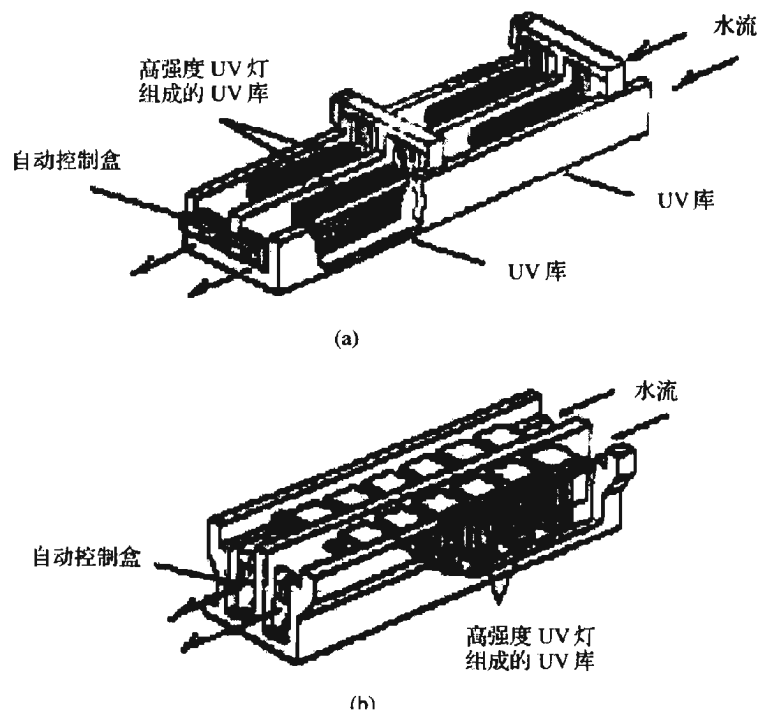


图 4-4 水的 UV 消毒系统（接触型）

不同微生物对 UV 的敏感度不同，而且，不同细菌的修复能力也不同。因此，UV 水消毒的有效性与 UV 有效照射剂量问题近年来备受关注。研究表明，当 UV 注量在  $300 \text{ J/m}^2$  ( $30\,000 \mu\text{W}\cdot\text{s/cm}^2$ ) 时，水中微生物的光复活现象完全消失，而低于此注量时，有不同程度的复活率产生。因此德国和澳大利亚所设定的 UV 系统最低强度标准为  $400 \text{ J/m}^2$  被认为是有安全性的，而其他国家推荐的较低标准有待修改。

UV 消毒水的前景是广阔的，但也存在一些不足之处，其主要缺点是：(1) 低剂量（低强度）UV 照射时消毒效果差，并有光复活现象发生。(2) 经济成本高于含氯制剂消毒（但如果进行脱氯处理时则两者相当）。(3) UV 管需要一定的维护、去污。(4) 水中的混杂、悬浮物将一定程度影响杀菌效果，此时，低强度 UV 灯不利于有效杀菌。

#### 四、血液制品中病毒的灭活

UV 及其与光敏剂的协同作用对病毒感染性的灭活虽已很明确，但对血液制品的消毒则一直处于探索性研究中。单用 UV 处理血液制品的方法已有较长历史，在第二次世界大战后的一段时间里曾将其列入血液制品规定的净化程序之中，但随后考虑到 UV 对其中蛋白质及细胞成分生物活性的损害，而将本法放弃。近年来，由于 UV 光源波谱纯度的提高和血液成分检测技术的发展，发现使用 UV 消毒血液制品时，灭活病毒效果好，对抗力较强的无脂质包膜和耐热病毒仍然有效，同时对血液成分活性的破坏也比较轻微，故又重新受到重视。

##### （一）单纯 UVC 照射

Hart 用 UVB 和 UVC 分别作用于血浆球蛋白和白蛋白溶液中的单链 RNA 病毒和双链 DNA

病毒,其中包括无脂质包膜病毒(脊髓灰质炎病毒)、抗酸病毒(T4噬菌体)、抗干热病毒(牛痘病毒、T4噬菌体)等,灭活试验的结果显示,UVC在照射剂量为 $5\,000\text{ J/m}^2$ 时能使牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒、单纯疱疹病毒、赛姆利基森林病毒(Semliki forest virus)、噬菌体T4的滴度分别下降6.6,6.4,5.4,3.4和3.3个对数级。要达到与UVC相同的效果,UVB照射剂量需增加至 $21\,000\text{ J/m}^2$ 。

UVC对病毒的灭活明显依赖于其照射剂量,但当UVC注量达到一定程度时,灭活病毒的效应不再增加,而血液制品成分的活性则开始明显受到损害。因此,研究者普遍认为,UVC强度达到一定程度时只能采用其他措施(如采用协同因子)来加强对血液制品的消毒效果,而不能继续增加UVC注量。

### (二)UVA与光敏剂协同作用

PS在UVA的照射下可较高度特异与核酸结合,形成PS-DNA加成物,并与蛋白质和不饱和脂肪酸形成交联或共价加成物。有的PS在UV照射时,还可产生单态氧,增加对病毒的灭活作用。至今,已报告可被PS+UVA灭活的血液制品中的病毒有艾滋病病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、疱疹性口炎病毒(vesicular stomatitis virus, VSV)、Φ6病毒、鸭乙肝病毒、fd噬菌体和R17噬菌体等。

PS主要有3种衍生物,即甲氧补骨脂素(8-methoxypsoralen, 8-MOP)、三甲基补骨脂素(4,5,8-trimethylpsoralen, TMP)、氮甲基-三甲基补骨脂素盐酸盐(4-aminomethyl-4,5,8-trimethylpsoralen hydrochloride, AMT)。根据PSR衍生物和病毒种类的不同,消毒所用光敏剂剂量、UV剂量及作用时间均不相等。如AMT的用量一般为 $20\sim 40\text{ }\mu\text{g/ml}$ ,8-MOP为 $300\text{ }\mu\text{g/ml}$ ,TMP为 $0.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 。

近年来,相继报道了几种新的PS衍生物,因其化学结构的改良,这些新型PS衍生物可选择性作用于病毒,光生物效应强,且所产生的自由基少,致突变性弱,能更好保持血液成分的活性。如Yerram将一新的溴化补骨脂素(PS-Br)用于血浆、红细胞、血小板中病毒的灭活研究,结果表明对λ噬菌体和R17噬菌体的灭活高于6 log时,红细胞、血小板和血浆中第八因子(FVIII)的形态和功能无明显变化。

动物试验表明,UV+PS为致突变和致癌剂。虽然UV+PSR对血制品的处理过程均在体外进行,但所残留PS的致突变与致癌的可能也给此方法的安全性带来阴影,光敏剂的去除及其结构改良方法研究将有利于克服此缺陷。

### (三)UV与β-丙内酯的协同作用

UV与β-丙内酯的联用也有良好的病毒灭活作用。动物感染实验显示,UV与β-丙内酯协同能完全消除血浆中乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒的感染性,国外已有一些生物制品公司选用此法消毒凝血酶原复合物和免疫球蛋白制剂。β-丙内酯能直接与病毒核酸结合而形成复合物,对蛋白质影响很小,有望作为有前景的灭血液制品中病毒的方法。但近年来有关其致癌与致畸性问题尚有争议,因此,其进一步的开发应用受到阻碍。

血液制品消毒是一个相对复杂的处理过程,主要是在要求有效灭活病毒的同时,还要最大程度地保存血液制品的有效成分。目前光化学方法被普遍认为是最优选择方法,近年来相关的研究报道很多,取得的进展也很大,在不同光敏剂和光保护剂(quencher)的交替选择应用下,有效的血液制品消毒方法的建立已指日可待。

## 五、UV 消毒应用的注意事项

1. UV 的杀菌效果主要由其照射注量和强度决定, 而随着照射时间的增加, UV 灯的照射强度是逐渐衰减的, 因此定期测定 UV 灯的照射强度将有利于控制杀菌质量。UV 强度的测定方法主要有: (1) UV 强度测定仪; (2) UV 强度测定试纸; (3) 平皿培养对比法: 取 10 个无菌平板放置于室内空气中 10 min, 其中 5 个再置检测 UV 灯下(10~20 cm 距离)照射 5 min 另一组做对照, 37℃培养 24 h, 计数菌落, UV 灯达到 90% 的杀菌率为合格。

2. UV 穿透力弱, 灯管上的灰尘和油垢均妨碍其穿透, 故需经常擦洗, 如用酒精棉球擦拭。

3. UV 直接照射可引起人眼结膜炎和皮肤红斑, 所以应避免人的直接照射, 必要时可戴防护镜和穿防护衣进行保护。照射时形成的臭氧对眼睛也有刺激作用, 浓度超过 5~10 ppm 时可引起人体脉搏加速、疲倦、头痛等症状, 长时间吸入可引起呼吸道炎症, 因此 UV 照射时人员不宜长期停留, 有条件时可采用低臭氧灯。

4. UV 杀菌的影响因素多, 实际进行消毒照射时, UV 的照射剂量和强度应根据具体情况设定和测定, 不能完全依赖于理论。

(熊鸿燕)

## 参考文献

- 1 Block SS, ed. Disinfection, sterilization, and preservation. 4th ed. Philadelphia: Lea and Febiger, 1991
- 2 薛广波, 主编. 灭菌消毒防腐保藏. 北京: 人民卫生出版社, 1993
- 3 熊鸿燕, 涂瀛. 紫外线对大肠杆菌杀灭机理的初步研究. 中国消毒学杂志, 1991, 8(2): 76
- 4 Ben-Hur E, Horowitz B. Advances in photochemical approaches for blood sterilization. Photochem Photobiol, 1995, 62: 383
- 5 熊鸿燕. 紫外线对血液制品中病毒灭活研究进展. 中国消毒学杂志, 1997, 14(3): 160
- 6 Sommer R, Lhotsky M, Haider T, et al. UV inactivation, liquid-holding recovery, and photoreactivation of *Escherichia coli* O157 and other pathogenic *Escherichia coli* strains in water. J Food Prot, 2000, 63(8): 1015
- 7 Bukhari Z, Hargy TM, Bolton JR, et al. Medium-pressure UV light for oocyst inactivation. J Am Water Works Assoc, 1999, 91(3): 86
- 8 Sutton M D, Smith B T, Godoy V G, et al. The SOS response: recent insights into *umuDC*-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance. Annu Rev Genet, 2000, 34: 479
- 9 Alam Z B, Otaki M, Furumai H, et al. Direct and indirect inactivation of *Microcystis aeruginosa* by UV-radiation. Water Res, 2001, 35(4): 1008
- 10 Wekhof A. Disinfection with flash lamps. PDA J Pharm Sci Technol, 2000, 54(3): 264
- 11 Fiksdal L, Tryland I. Effect of u.v. light irradiation, starvation and heat on *Escherichia coli* beta-D-galactosidase activity and other potential viability parameters. J Appl Microbiol, 1999, 87(1): 62
- 12 Rowan N J, MacGregor S J, Anderson J G, et al. Pulsed-light inactivation of food-related microorganisms. Appl Environ Microbiol, 1999, 65(3): 1312
- 13 Rames J, Chaloupecky V, Sojkova N, et al. An attempt to demonstrate the increased resistance of selected bacterial strains during repeated exposure to UV radiation at 254 nm. Cent Eur J Public Health, 1997, 5(1): 30
- 14 Lin L, Londe H, Janda J M, et al. Photochemical inactivation of pathogenic bacteria in human platelet concentrates.

Blood, 1994, 83(9):2698

- 15 Ohnaka T. Health effects of ultraviolet radiation. *Ann Physiol Anthropol*, 1993, 12(1):1
- 16 Lorenzo - Lorenzo M J, Ares - Mazas M E, Villacorta - Martinez - de - Maturana I , *et al* . Effect of ultraviolet disinfection of drinking water on the viability of *Cryptosporidium Parvum* oocysts. *J Parasitol*, 1993, 79(1):67
- 17 陈庭仁,主编.紫外线治疗学.重庆:科学技术文献出版社, 1988:1 - 14

# 第五章 微波消毒

微波通常用于电视、广播、通讯技术中，在这些领域里微波作为一种信息或信息的载体。早在 20 世纪 30 年代发现微波对微生物有杀灭作用。40 年代证明用 28 MHz 的高频电场对啤酒进行巴斯德消毒( pasteurization )获得成功,于是导致高频介质加热消毒方法的兴起。在 1945 年发现微波也有使介质温度升高的特性，由于微波加热比高频加热速度快，所以更引人关注。70 年代以来,微波消毒研究逐渐深入,经过数十年的研究和发展,目前微波消毒技术已逐渐成为一种新型的物理技术。

## 第一节 微波的基本概念

### 一、概 念

微波属于非电离辐射，所谓微波是一种波长为 0.001 mm ~ 1 m,频率为 300 ~ 300 000 MHz 的电磁波。由于其频率较高，所以又称超高频电磁波。凡是低于 300 MHz 即通常所说无线电波，包括长波、中波、短波和超短波,凡在 300 000 MHz 以上的电磁波则属于可见光或红外线等。根据电磁波的波长公式  $\lambda = V/f$ ,式中: V 为电磁波传播速度,在空气媒质中为  $3 \times 10^8$  m/s;f 为频率。

对应于 300 MHz 至 300 000 MHz 的微波频率范围的微波波长范围为 1 mm 至 1 m。微波一般按其波长可分为 3 个波段:分米波、厘米波、毫米波。

关于微波加热,各国有专用波段(频率),主要考虑到便于微波器件和设备标准化,以及避免使用频率太多造成对雷达和微波通讯的干扰。国际上公认工业加热用的微波频率有  $18\,000 \pm 150$  MHz、 $10\,600 \pm 100$  MHz、 $585 \pm 75$  MHz、 $2\,450 \pm 50$  MHz、 $915 \pm 25$  MHz 。比这些频率更低的电磁波有  $13.56$  MHz  $\pm 6.78$  kHz、 $27.12$  MHz  $\pm 16.0$  kHz、 $40.68 \pm 20$  kHz 。曾用作加热的特称为高频介质加热。目前消毒中常用的频率为  $915 \pm 25$  MHz 及  $2\,450 \pm 50$  MHz，其波长均属于分米波波段(表 5-1)。

表 5-1 微波加热专用频段

频率(MHz)	波 段	中心波长(m)
890 ~ 940	L	0.330
2 450 ~ 2 500	S	0.122
5 723 ~ 5 875	C	0.052
22 000 ~ 22 250	K	0.008

消毒上常用的  $915 \pm 25$  MHz 与  $2\,450 \pm 50$  MHz，两种频率的微波不同之处见表 5-2。

微波最早用于加热与干燥，自发现其具有杀菌效能以后，逐渐用于消毒与灭菌。目前微波用于工业干燥及食品加工、消毒较多，在医院医疗、护理及卫生防疫上消毒、灭菌方面的应用已



有新的发展。

表 5-2 消毒上常用的两种频率的微波比较

项 目	915 ± 25 MHz	2 450 ± 50 MHz
单管输出功率	最大 30 kW	最大 10 kW
工频 - 微波转换效率	70% ~ 80%	50% ~ 60%
穿透深度	大	小
炉体尺寸	大	小

## 二、微波加热的基本关系式

### (一)功率计算

在设计微波加热时,首先要对所需的微波功率大小作出估计。可用以下简单方法进行估算。

#### 1. 加热物体所耗用的微波功率

$$P = \frac{\Delta TCW}{860t} (\text{kW})$$

式中,  $\Delta T$  — 被加热物料的温升(℃);

$C$  — 物料的比热( kcal/kg·℃);

$W$  — 物料重量( kg);

$t$  — 微波作用时间( h)

#### 2. 物料加热到干燥所耗用微波功率可见下式

$$P = \frac{\Delta TCW + QW}{860t} (\text{kW})$$

式中,  $Q$  — 液体蒸发潜热,或汽化热(水为 540 kcal/kg)

$W$  — 每小时要求蒸发的液体的重量

在以上的估算中没有考虑热损耗和传输系统中的微波损耗。因此实际需要的微波功率比上式的  $P$  值要大一些,这些损耗要根据具体情况来定。为便于计算,列换算表如下表 5-3。

表 5-3 单位换算表

单 位	转换为	乘 法	相反转换,乘以
卡(cal)/g	B.T.U./英磅	1.8	5/9
℃	°F	$1.8 \times \text{℃} + 32$	$5/9(\text{°F} - 32)$
B.T.U.	卡(Cal)	252	$3.968 \times 10^{-3}$
kW	B.T.U./h	3 413	$2.93 \times 10^{-4}$
W	B.T.U./min	0.05638	17.58
W	卡(Cal)/s	0.2389	4.185
M	英尺	3.281	0.3048
kg	英磅	2.205	0.4536

注: B.T.U. (British thermal unit) 是英制热量单位,是使 1 英磅水上升华氏 1 度所需要的热量

1 B.T.U. = 1054.8 J = 0.252 kg·cal

## (二) 被加热物质在微波场吸收的功率

由于物质的不同,微波场的频率不同,物质所吸收的功率也随之改变,其吸收的功率按下式表示。

$$P = 1/1.8 f E^2 \epsilon_r \operatorname{tg} \delta \times 10^{-12} (\text{W/cm}^3)$$

式中:  $f$ —微波频率( Hz );

$E$ —电场强度( V/cm );

$\operatorname{tg} \delta$ —介质的损耗系数;

$\epsilon_r$ —物质的介质常数。

电场强度在实际上是不能通过测量方法得到的,但可以粗略折算。

例如:在矩形波导中,其阻抗为  $377 \Omega$ ,若微波功率为  $P(\text{W})$ ,波导窄边尺寸为  $b(\text{cm})$ ,则电场强度的计算见下式:

$$E = \frac{P \times 377}{b} (\text{V/cm})$$

被加热物质的温升的计算,见下式

$$\Delta T = \frac{8 \times 10^{-12} f E^2 \operatorname{tg} \delta \epsilon_r}{dc} (\text{°C/min})$$

式中:  $f$ —微波频率( Hz );

$E$ —电场强度( V/cm );

$\operatorname{tg} \delta$ —介质的损耗系数;

$\epsilon_r$ —物质的介质常数;

$d$ —物料的密度(  $\text{g/cm}^3$  );

$c$ —比热(  $\text{cal/g} \cdot \text{°C}$  )。

## (三) 微波对加热物质的穿透深度

所谓穿透深度是当电磁波从物质表面进入物质内部时,能量不断被吸收并转化为热能,场强和功率不断地衰减,这种电磁波穿透到介质内部的能力称为穿透深度。其定义可由三个计算公式表示。

$$1. D = \frac{\lambda_0}{\pi \sqrt{\epsilon_r \operatorname{tg} \delta}}$$

式中:  $D$  为场强的穿透深度,表示场强减弱到表面处的 36.8% (即  $1/e$ ) 的距离。

$$2. D_p = \frac{\lambda_0}{2\pi \sqrt{\epsilon_r \operatorname{tg} \delta_e}}$$

式中:  $D_p$  为功率的穿透深度,表示功率减弱到表面处的 36.8% 的距离。

$$3. D_{1/2} = \frac{3\lambda}{8.686\pi \sqrt{\epsilon_r \operatorname{tg} \delta}}$$

式中,  $D_{1/2}$  为半功率穿透深度,表示功率减弱到表面处的 1/2 的距离

从上面三式可知,被加热的介质材料在其损耗系数不变时,穿透深度与波长是同一个数量级。

## 第二节 微波消毒设备

微波加热器的类型和设计是多种多样的。主要是微波加热器本身所体现的意义来说，它是一个微波场和物质相互作用的空间。由于被加热的物品是各种各样的，所以微波加热的类型不同，按工作的特性，大致可分为箱型、腔型、波导型、辐射型和慢波型（表面波型）。这些类型各有其特点和应用范围，必须根据微波加热的物品及他们加热的要求来选择使用，各种加热器的特点见表 5-4。

表 5-4 各种类型加热器的基本特点

加热器类型	微波功率在加热器内分布情况	功率密度	适用加热的物品	对磁控管负载	适用加热方式
箱式	分散	弱	大件(块状)	差	分批/连续
腔型	集中	强	线状	差	连续
波导型	集中	强	粉状或薄片状	好	连续
辐射型	集中	强	块状、颗粒状	较好	分批/连续
慢波型	集中	强	片状、薄片状	较好	连续

微波加热设备主要由直流电源、微波管、连接波导、加热器、控制器及冷却系统等组成。消毒灭菌用的微波加热器，通常为驻波场谐振腔加热器。驻波是由两个振幅相同的相干波在同一直线上沿相反方向引进时叠加而成的波。由驻波构成的波场称为驻波场。谐振腔相当于声学中的共鸣箱。当输入微波的频率等于谐振腔的频率，腔内即激起强烈振荡。利用谐振腔内驻波加热的微波装置叫驻波场谐振腔加热器。

微波消毒设备根据箱体结构可分为箱式和传送带式。工业上大量连续生产，可用传送带式(图 5-1)。

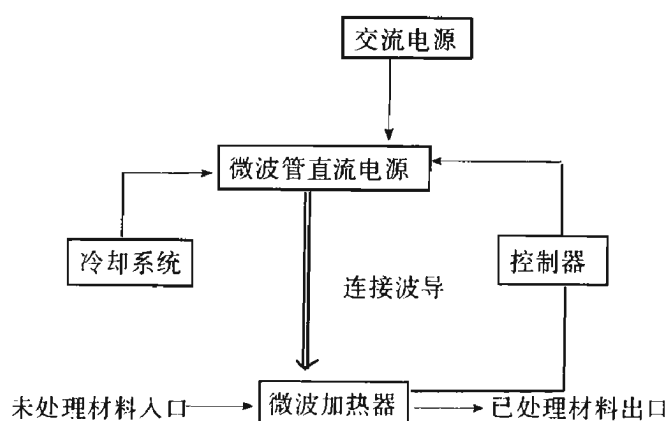


图 5-1 传送带式微波加热设备示意图

小批量消毒灭菌实验室可用箱式(图 5-2)。

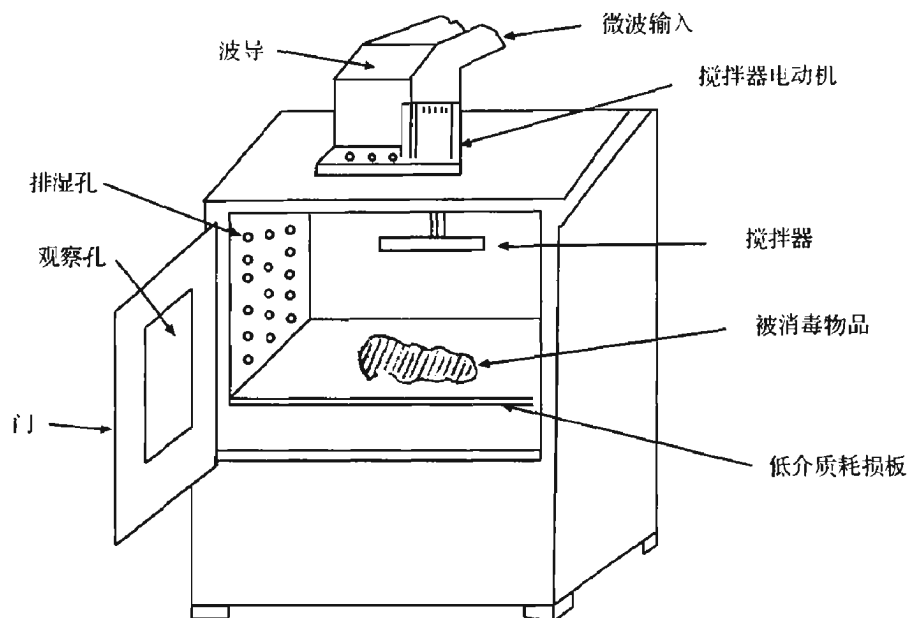


图 5-2 单次处理谐振腔式微波加热箱消毒器示意图

消毒灭菌用微波设备通常为驻波场振腔加热器,主要由磁控管、波导、腔体、反射板和混匀器组成。

微波消毒、灭菌技术是在微波加热干燥技术基础上发展起来的。对医院用品的微波消毒、灭菌设备方面的研究较晚,国外尚未见微波消毒的专用设备投放市场。我国从 20 世纪 80 年代开始研究微波专用设备,于 90 年代已投放市场的系列产品如 WXD-650 型微波快速灭菌器及 WBY-1 型微波牙钻消毒器以及已经制成功而未投放市场的 WBM-4A 型微波灭菌器等。下面简介如下。

### 一、WXD-650 型微波快速灭菌器

微波快速灭菌器是专门为医院手术室、口腔科及其他科室急性性医疗器械快速灭菌而研制的。设计形式为箱式。其特点为体积小、重量轻、操作方便，可应急处理物品。

主要技术指标:外形尺寸为 530 mm×417 mm×344 mm ;灭菌腔容积为 330 mm×360 mm×228 mm;工作频率为  $2\,450\pm50$  MHz、输出功率为 650 W

经试验证明,用  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ ,功率为  $650\text{ W}$ ,与  $0.5\%$  氯己啶消毒剂协同,作用  $5\text{ min}$ ,可使聚丙烯塑料密封包内物品及在塑料盒内的小型医疗器械达到灭菌

## 二、WBY-1 型微波牙钻消毒器

微波牙钻消毒器是专门用于医院口腔科牙钻手机消毒的微波牙钻消毒器，解决了一般消毒方法不能消毒牙钻手机蜗轮机及机内芯的难题

该牙钻消毒器为一长方体形状，其外形尺寸为 250 mm × 185 mm × 385 mm，内置一个圆柱形微波腔，为专用的消毒管如图 5-3 所示。

该消毒器的工作频率为  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  ;微波功率为  $200\text{ W}$  ;其重量为  $10\text{ kg}$  。电源:单相  $220 \pm 22\text{ V}$  ,  $50\text{ Hz}$  ,  $3\text{ A}$  ;微波泄漏  $\leq 38\text{ }\mu\text{W}/\text{cm}^2$  ;消毒时间:  $1\text{ min}$  。

### 三、WBM-4A 型微波灭菌器

WBM-4A 型微波灭菌器是军事医学科学院与电子工业部 4404 厂协作共同研制。主要解决平时应急情况下医院手术室内敷料包、器械包的快速灭菌。

该消毒器为长方形,外形尺寸为  $980\text{ mm} \times 580\text{ mm} \times 629\text{ mm}$  ,内腔为  $570\text{ mm} \times 540\text{ mm} \times 420\text{ mm}$  。微波频率为  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  ,输出功率为  $2\,000 \pm 200\text{ W}$  ,重量为  $90\text{ kg}$  。

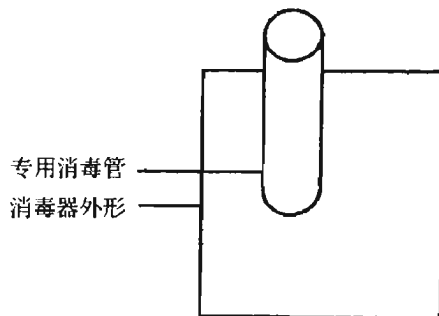


图 5-3 WBY-1 型微波牙钻消毒器示意图

### 四、WX-1 型微波消毒柜

该消毒柜专用于餐具及饮具的消毒,以及冰糕、冰棍及包装纸的消毒,照射  $20\text{ min}$  达消毒卫生标准要求。

WX-1 型微波消毒柜其使用微波频率为  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  ,柜容积为  $480\text{ mm} \times 520\text{ mm} \times 640\text{ mm}$  。

## 第三节 微波杀菌机理

微波杀菌作用快速、杀菌谱广、能耗低,而这种快速而又无选择性的杀菌作用正是微波特殊作用机制所致。近年来,微波杀菌机理引起消毒学家们的广泛兴趣,尽管如此,对微波杀菌机理尚无统一认识,有些规律有待进一步探讨。目前,研究评论较多的有以下几种观点。

### 一、热效应作用观点

物质分子特别是生物分子或水分子受到微波照射时,分子内部会产生激烈的运动,使分子两端带不同电荷形成偶极子。这种偶极子在交变电场中高速运动引起互相磨擦,从而使电磁能转变成热能,使被照射的物体迅速升温,致使生物体死亡。研究发现,微波杀菌作用是伴随温度升高而加强。若在微波场中阻止物体升温,如在菌液中加入冰块或加入其他冷却剂,则微波即显不出杀菌作用。杨华明等用微波快速灭菌器试验证实,处于布包的表面层细菌较难杀灭,因表层散热快;在布包外加密封包装可使表层与内层细菌达到同时杀灭,因为密封包装可防止热扩散。

### 二、非热效应杀菌作用

据李荣芬等研究发现,微波加热与普通加热在相同的温度和时间所获的杀灭效果不同。试验证明,微波照射  $1.5\text{ min}$  ,升温  $92^\circ\text{C}$  可杀灭枯草杆菌芽孢;而普通加热升温至  $100^\circ\text{C}$  ,作用  $15\text{ min}$  方可达到相同效果。进一步的研究证明,用  $650\text{ W}$  微波灭菌器照射  $150\text{ s}$  ,升温至  $71^\circ\text{C}$  ,

并持续作用 150 s,对枯草杆菌黑色变种芽孢只能杀灭 24.9%。上述结果充分证明,微波照射与普通加热比较,在相同温度与时间内,前者杀菌能力明显强于后者。由此完全可以认为,微波杀菌确实存在非热效应。

### 三、综合效应的杀菌作用

经过分析研究结果发现,单纯热效应或非热效应都不能解释微波的杀菌特性。微波快速广谱杀菌作用是复杂的综合因素作用的结果。

认为只存在热效应或非热效应观点的差异主要是各自实验方法都存在一定的不足。热效应观点主要是基于在试验中阻止负载升温如加冰块或其他吸收物质,但这种方法却忽视了这些吸热物质本身是吸收微波能有损介质,使本应达到杀菌剂量的微波能被消耗,从而影响了杀菌作用。另外一个试验是将细菌干燥脱水使其不能产生热效应。但干燥物质不吸收或很少吸收微波能,这样什么效应都不存在。所以,上述试验结果否认非热效应存在的根据不充分。

非热效应观点所依赖的试验是将普通加热与微波加热进行比较,得出结论是微波杀菌为非热效应作用的结果。这种结论忽视了微波热效应是分子内部摩擦产热这一事实。微波那种不可思议的快速穿透能力和微波直接作用到分子内部,使水分子以 24.5 亿次/s 速度振动摩擦高效率产热,无需传导,这种热效应是普通加热无法比拟的。普通加热传导的物体由外到里逐步加热缓慢升温,如此延长了作用时间。所以,以此否认热效应的存在论据亦不充分。

正确认识微波杀菌机理,应从如下几方面解释:①微波快速穿透作用和直接使分子内部摩擦产热显示出良好的热效应作用。灭菌物品采用隔热扩散密封包装有助于包内热量积累充分发挥热效应。②微波的场效应,生物体处于微波场中时,细胞受到冲击和震荡,破坏细胞外层结构,使细胞通透性增加,破坏了细胞内外物质平衡。电镜下可见到细胞肿胀,进而出现细胞质崩解融合致细胞死亡。③量子效应,微波场中量子效应波主要是激发水分子产生  $H_2O_2$  和其他自由基,形成细胞毒作用。这种作用可使细胞内各种蛋白、酶、核酸等受到破坏。另外,光子可以增加分子动能,促进热反应。④微波以外的因素,在充分保证微波能量和作用时间的条件下,灭菌物品的包装、合适的含水量、负载量以及物品的性质等都是改变微波杀菌的重要因素。

综上所述,微波杀菌是以热效应为主,非热效应为辅,掌握和控制微波消毒、灭菌操作条件的参数等一系列综合因素的作用结果。这是微波杀菌机理完整的科学表述。

## 第四节 微波的杀菌作用

微波照射具有良好的杀菌作用。微波杀菌谱广,可杀灭各种微生物(细菌繁殖体、细菌芽孢、真菌、病毒等)。现将有关微波的杀菌特点、杀菌作用、规律及动力学介绍于下

### 一、微波消毒特点

1.节能:微波加热具有独到之处。其他加热方式都是先加热物体表面,然后热量由表面传到内部;而用微波则可对物体内部直接加热,加热均匀,无能量损失,能量高,对物品处理时,穿透性强,瞬时即可穿透到物体内部。

2.选择性作用:微波对不同性质的材料作用不同,对有损耗介质材料可直接进行消毒,对无损耗介质可借助有损耗介质进行消毒,还可以利用穿透微波而又无损耗的材料作为灭菌包

装。对消毒物品可先包装处理，可使用自动控制。

3. 作用温度低,热损失较慢,微波与普通加热若产生等量的热效应,其作用到物体上的温度要明显低于普通加热。普通加热杀菌所需温度在 120℃ 以上作用 20 min;而微波杀菌升温只在 70~105℃,作用 1.5~5 min。

4. 作用快速:电磁波能量转换过程速度极快,可在 10<sup>-9</sup>s之内完成。在杀菌速度上比其他杀菌因子快速。

5. 对生物体作用无选择性:微波用于干燥或消毒对所有生物体的作用相同而无选择性,其杀菌谱广,可杀灭各种微生物和原虫等。

6. 微波消毒物品后无毒性,无残留物,损坏轻。微波消毒所需工作环境与占地面积小,对周围环境不致形成高温,清洁卫生。

7. 对食品杀菌加工,不破坏其中维生素。杀菌、除臭效果好。

二、微波杀菌效果

微波杀菌谱广,可杀灭各种微生物,早在 40 年代即有人用于酒的消毒,以 9 种菌株进行试验表明,只需照射 1 min 即可将之全部杀灭(表 5-5)。

表 5-5 微波照射对细菌杀灭效果

微生物	不同照射时间(s)下每毫升菌液内微生物存活对数值				
	0	15	20	45	60
枯草杆菌	7.2	7.0	5.3	0	0
肺炎杆菌	9.0	7.7	7.7	0	0
粘质沙雷氏菌	9.2	8.1	6.6	0	0
大肠杆菌	9.0	8.8	5.5	5.6	0
绿脓杆菌	8.9	6.8	6.2	0	0
肠球菌	8.4	8.3	4.5	0	0
金黄色葡萄球菌	8.7	7.4	3.8	0	0
表皮葡萄球菌	8.6	6.6	6.6	0	0

在国外早有研究发现,微波照射 1 min 可杀灭玻璃安瓿中各种细菌繁殖体,包括真菌,但对巨大杆菌芽孢照射 2 min,其杀灭率可达 99.90%。据 Kohrer 研究证明,对污染有细菌、真菌、脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒 J 型的假牙、牙托、牙钻,用 600 W 微波照射 5 min,可将污染微生物全部杀灭。照射 8 min 可杀灭芽孢。照射 3 min 可将 HBsAg 抗原性全部破坏。

杨华明等研究证明,采用 WXD-650 型快速灭菌器,经过 5~15 min 照射可将金属表面上及其他物体表面上细菌芽孢全部杀灭。同时发现,类炭疽杆菌芽孢、炭疽杆菌芽孢、蜡状杆菌芽孢、嗜热脂肪杆菌芽孢和枯草杆菌黑色变种芽孢等对微波的抗力较强。微波照射 5 min 之内可完全灭活乙型肝炎病毒、艾滋病病毒和其他病毒微波对各种微生物的杀灭作用详见表 5-6。

表 5-6 微波对不同微生物的杀灭作用

微生物名称	杀灭不同介质内微生物所需时间(min)		
	试验载体上	物体表面	液体内
葡萄球菌	1~2	8	1~2
大肠杆菌	1~2	8	1~2
白色念珠菌	1~3	...	1~3
细菌芽孢	5~15	5~20	3~10

另外,徐庆报道,采用三乐牌家用微波炉(WL700P-1型),其频率为  $2\,450 \pm 50$  MHz,输出功率为 700 W,在试验滤纸上污染不同微生物,经微波照射 1 min 使细菌繁殖体(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌)杀灭率达 99.87% 以上,鼠伤寒沙门氏菌、痢疾杆菌杀灭率可达 99.99% 以上,照射 2.5 min 可全部杀灭。微波照射 20 min 可使枯草杆菌黑色变种芽孢、嗜热脂肪杆菌芽孢杀灭,对 HBsAg 照射 3 min 可全部破坏其抗原性。

### 三、微波杀菌作用规律

#### (一)微波杀菌 D 值

D 值既是消毒学一个基础理论指标,也是消毒应用中的重要参数。对很多物理化学灭菌因子的 D 值都有比较系统的研究,而微波作为一种新的物理灭菌技术,其 D 值对于消毒灭菌亦具有重要意义。杨华明以微波快速灭菌器为模型,比较系统地测定了微波杀菌 D 值。在棉布包装条件下,微波对金属载体上不同细菌杀菌 D 值分别是:①葡萄球菌、大肠杆菌、绿杆菌为 0.30~0.33 min,白色念珠菌为 0.34 min,嗜热脂肪杆菌芽孢为 1.08 min,枯草杆菌黑色变种芽孢为 0.71~1.80 min。②微波对玻璃、棉布、金属等不同表面上的枯草杆菌黑色变种芽孢杀菌 D 值为 1.63~1.80 min。③液体中枯草杆菌黑色变种芽孢杀菌 D 值为 1.57~1.64 min。

研究结果还证明,微波杀菌 D 值随不同因素变化而异,输出功率增加,杀菌 D 值变小,负载量增加,杀菌 D 值变大,所以只有在使用条件不变情况下,D 值才能相对稳定。表 5-7 列出微波快速灭菌器在输出功率 650 W 时,测得于 400 g 吸收负载包中污染在金属载体上不同菌种的 D 值。

表 5-7 微波杀灭不同微生物的 D 值

细菌种类	回归方程	相关系数	D 值(min)
金黄色葡萄球菌	$Y = 5.7730 - 3.0419$	-0.9696	0.33
铜绿假单胞菌	$Y = 5.6448 - 3.3143$	-0.9538	0.30
大肠埃希氏菌	$Y = 5.7786 - 3.0370$	-0.9769	0.33
白色念珠菌	$Y = 5.4903 - 2.9050$	-0.9612	0.34
嗜热脂肪杆菌芽孢	$Y = 5.9430 - 0.9721$	-0.9249	1.03
枯草杆菌黑色变种芽孢	$Y = 5.4290 - 0.5549$	-0.9516	1.80



## (二)微波杀菌动力学特征

消毒灭菌动力学是从量的概念上研究消毒灭菌过程中微生物死亡规律。借助消毒动力学规律可以指导消毒灭菌方法的改进和完善,以及对消毒因子作用能力的预测。

经研究发现,消毒灭菌过程中任何时间点对微生物的杀灭速度与原存活菌数都有一定比例关系,按照此规律,以微生物存活数的对数与作用时间点可以绘制出一条微生物存活曲线。有学者把消毒动力学曲线分为五类:①第一动力学曲线即直线型,反映微生物经一次作用直接死亡;②初凸型曲线,反映抗性微生物变成敏感之后死亡;③初凹型曲线,说明菌群中有部分敏感菌变成抗性菌再被杀死;④折线型曲线,说明菌群中有敏感菌也有抗性菌,因此死亡速度不同;⑤S型曲线,微生物分二步死亡。

化学消毒剂和热力杀菌动力学均为直线型即第一动力学特征。微波消毒技术虽然在一些消毒学专著中被列入干热灭菌类,亦有学者认为微波杀菌动力学完全服从第一动力学特征,而杨华明研究证明,微波杀菌规律与普通热杀菌规律不完全相同。这是因为微波杀菌可变因素多,微波场中任何条件的改变都可使细菌死亡规律发生改变。所以,微波杀菌动力学规律随微波场中各因素变化而改变。现以微波快速灭菌器测得的结果来说明这种变化规律。

1.在消毒规定的条件下,细菌繁殖体与细菌芽孢的存活曲线服从第一动力学规律(图 5-4)。

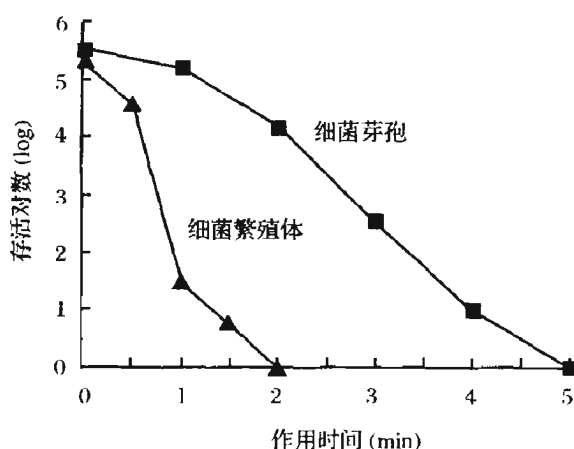


图 5-4 细菌在微波场中存活曲线

另外试验还发现嗜热脂肪杆菌芽孢存活曲线初速度滞后,枯草杆菌黑色变种芽孢曲线有拖尾现象。这种曲线形态反映了这两种细菌芽孢热抗力特征,微波照射初始负载含湿高,嗜热芽孢显出抗湿热特性;随照射时间延长水分减少,枯草杆菌黑色变种芽孢显出抗干热特性。

2.负载量增加导致枯草杆菌黑色变种芽孢存活曲线改变,在输出功率等条件不变的情况下,微波场中负载量增加可以改变细菌存活曲线(图 5-5)。

图 5-5 的曲线形态说明,随负载量增加,枯草杆菌黑色变种芽孢存活曲线由直线型向初凸型变化,曲线有一个肩区并逐渐加宽。这种现象可能是负载量增加,使得负载吸收微波能量密度降低,能量聚集速度减慢,造成杀菌初速度变慢。当然其他因素发生改变亦可改变微波杀菌动力学特征。

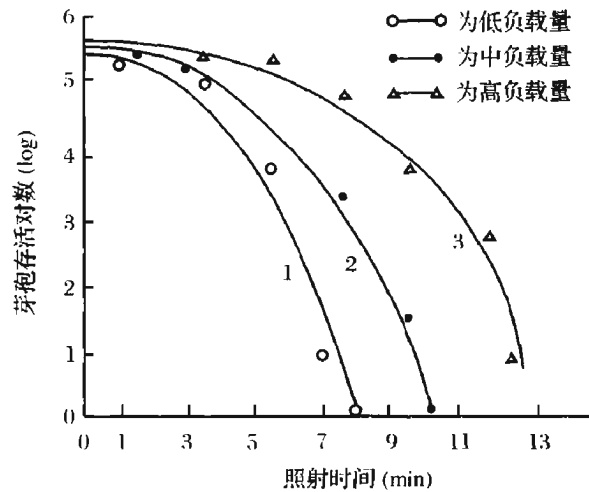


图 5-5 随负载量增加细菌芽孢在微波场中死亡曲线

## 第五节 影响微波杀菌的因素

微波的快速杀菌是综合因素作用的结果,由于微波本身的固有特性,其杀菌作用的可变因素多,认识和控制影响微波杀菌的因素是确保杀菌效果的关键。

根据有关资料报道的微波杀菌因素研究结果表明,影响微波效果的主要因素可分为二类:第一类是微波本身固有特性的影响,如微波频率、波长、输出功率、微波照射时间、微电场均匀性;第二类是被消毒物品因素,如物品性质、温度、负载量、灭菌包装材料、含湿量、物体大小、协同剂等影响。

### 一、微波本身的物理特性

#### (一) 微波的波长与频率影响

在微波消毒中对不同物品对象应选择合适频率。微波用于消毒时,其消毒效果受到磁控管输出功率大小和频率高低的影响。一般讲,微波频率高(如  $2450 \pm 50$  MHz),分子在单位时间内改变方向或转动次数多,互相碰撞、摩擦增多,因而物体升温快、消毒时间短、杀菌作用强,但穿透力差,故只适于处理小件或者厚度不大的物品;微波频率低(如  $915 \pm 25$  MHz),加热速度慢、消毒时间长,但穿透深度大,故可处理大件物品。

微波的频率愈小,波长愈长,穿透物品愈深。微波穿透物品深度的公式为:

$$D = \frac{\lambda}{\pi \sqrt{E_r \lg \delta}}$$

D 为穿透深度,  $\lambda$  为波长,  $E_r$  为介电常数,  $\lg \delta$  为介质的损耗系数。

#### (二) 输出功率与照射时间的影响

微波杀菌效果与磁控管输出功率大、小和消毒物品暴露时间长短有关。

在一定条件下,微波输出功率越大,作用介质的电场强,分子运动剧烈,加热速度快,物品升温速度越快,杀菌作用越强消毒物品接受的能量与功率和时间呈正相关。如  $2450 \pm 50$  MHz,照射 5 ml 菌液,作用 10 s,当输出功率为 540 W 时,只能杀灭大肠杆菌,不能杀灭枯草杆菌芽孢;当输出功率加大为 850 W 时,则可将枯草杆菌芽孢杀灭。又如  $915 \pm 25$  MHz 微波,照射 500 ml 菌液时,作用 2 min,当输出功率为 1500 W 时,未能杀灭大肠杆菌;增加至 2800 W 时,不仅大肠杆菌,还可将枯草杆菌芽孢全部杀灭。上述结果说明,功率大,频率高,时间长,能量大,效果好。因此,在微波消毒时,应注意功率与消毒物品相匹配。对小量物品使用过高功率,既浪费能量,又易损坏磁控管。只有综合考虑频率、功率、时间三者关系,才能达到满意消毒效果。

### (三)微波场强均匀性的影响

微波炉中都有冷点位置,在这个位置的物品不能接受像其余位置的微波辐射。这主要是由于微波炉谐振腔内由于设计制造上的原因,存在能量的死角。在灭菌时出现加热不均匀,存在所谓“冷点”(在“冷点”微生物可能存活,灭菌效果的可重复性不好)。Douglas(1990)在消毒导管的实验中,将带菌物品均匀地放入微波炉中内,并对 A、B、C、D、E、F 位置进行编号,消毒后发现 A 点位置的物品未达到消毒,在 F 点位置的导管有时消毒,有时未达到消毒要求,而避开这两点位置时,每次消毒的导管均达消毒要求。为此,在使用微波炉消毒物品时,应避开“冷点”,使被消毒物品达到消毒要求。

### (四)电压的影响

微波的功能受制于电源电压,电压正常波动( $\pm 5\%$ )不会改变微波功率。如在测定 220 V 与 200 V 下降 10% 时的杀菌试验中,将敷料包上、中、下三层摆放布制菌片,证明电压下降 20 V 时,杀菌效果未发现下降。为此,在微波照射时保证一定电压,才使消毒效果不受影响。当电压下降 10% 以上,将会对灭菌效果产生影响,因此,适当延长时间,才能保证微波杀菌效果。

## 二、被消毒物品的因素

### (一)物品的性质

各种不同物品对微波的吸收能力有所不同,对微波吸收的多少可影响消毒效果,因此一般根据物品的性质,分为三类:

1.吸收介质 微波在物品中传播时会明显地被吸收而产生热的介质,称为吸收介质。介电常数和介质损耗大者,吸收效能好,如水、肉类和含水量高的物品,均是强吸收介质。

2.良导体类 不吸收微波。如钢、黄铜、银、铁、不锈钢等金属能引起反射而不吸收微波。

3.绝缘体类 很少吸收介质,称为微波的良介质。例如:石英、陶瓷、玻璃、聚氯乙烯等塑料制品,微波大部分能透过、小部分反射

上述第二类材料制成物品用微波照射不易达到消毒但如果将物品用布包装后放在含水或水蒸气环境中,借水分子吸收微波,使温度升高,可达消毒要求。第三类材料可透过大部分微波,故多用于物品照射时的包装。水的介电常数为 80,介质损耗加 0.2;冰的则分别为 3.2 与 0.001,前者远高于后者消毒冰冻物品时,如不将融化的水随时排走,则热量主要被冰所吸收,冰得不到加热。

材料中的水分若紧密束缚在材料的分子结构中,则不能似液体那样易受到外界电场作用而运动,热效应受到限制。结晶硫酸铜中结晶水,在微波场下亦很难加热。但含 10 个结晶水

的碳酸钠及 5 个结晶水的醋酸钠，由于材料本身介质损耗大，在微波场中仍能吸收能量而发热。当其结晶水一旦析出，就大量吸收微波，并迅速蒸发。

## （二）负载量的影响

负载通常指消毒物品。负载量的变化可影响杀菌效果。研究证实，以负载实验结果为例，其他条件不变，微波灭菌器内随水量增加，微波杀菌速度明显减慢，水量由 200 g 增加到 1 000 g，杀菌速率降低一半以上。如微波灭菌器频率为  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ ，功率为 3 kW 以不同重量的敷料包为负载，分别在微波灭菌器的上、中、下层摆放布制菌片，照射 13 min 后，测定细菌芽孢杀灭率分别为 99.96%、99.97% 和 94.92%。结果表明，敷料包重量达 6.0 kg 以上时细菌芽孢杀灭率明显下降。

## （三）灭菌材料含湿率的影响

水是最好的吸收微波材料，吸收微波是微波杀菌的必要条件，所以灭菌物品含水率对灭菌效果影响明显。含湿率影响具有三层意义：（1）不含水分的材料难以用微波灭菌，这已被大量试验研究证明。细菌芽孢经过脱水处理后微波照射很难将其杀灭。处于干燥状态的大肠杆菌比液体中的细菌芽孢对微波抗力还强。（2）含湿率可因微波输出功率大小和照射时间长短而最佳范围不同。国内报道：如用 WXD-650 型微波快速灭菌器，微波频率为  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ ，输出功率为 650 W 下，照射 10 min，用 200 g 吸湿载体，其含湿率可在 30% ~ 50% 范围。（3）含湿量过高使灭菌效果下降。一般情况下，在其他条件不变时，含湿量过大后即负载量过大，使能量分布密度降低，从而使微波杀菌效果降低。

## （四）包装方法对杀菌效果的影响

微波杀菌对包装材料的依赖是任何其他灭菌方法所不具有的特性之一。灭菌物品的包装材料不仅需要能毫无阻留地透过微波和防止微生物的透入，而且要防止热量扩散。研究证明，棉布包表面污染的细菌要比包中心部位污染菌难以杀灭，杀菌速度相差 4 倍。若用不透气的塑料膜把棉布包再进行密封包装，可完全消除内层和表层的差别，达到内外灭菌效果一致。这种现象可能是因为密封隔热包装，可防止热扩散，充分发挥热效应的作用，明显改善包内外灭菌的均匀性。

## （五）温度

物品本身温度对杀菌作用有影响，温度低，达到杀菌温度所需热量多，因而消耗微波能量高，照射时间长。

## （六）物品厚度与容量

物品的厚度与消毒效果关系取决于微波对该物品的穿透深度。穿透深度的含义是：电场强度或者功率减少到表面处的 36.8% 的距离。需要对物品内部进行消毒时，其厚度一般不应大于微波对物品的穿透深度。如微波加热消毒腔能对被消毒物品进行多方向照射，厚度也不应超过穿透深度的 2 倍，对于液体物质，因流动性好，热传导快，厚度可适当增加，在厚度适当的条件下，物品越多，需要照射时间长，才能达到消毒要求。例如：将蜡状杆菌芽孢菌片置于含水率为 30% 棉布包内第 6、34、61 层中，用  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  频率、输出功率为 3 kW 的微波照射 2 min，其杀灭率分别为 99.06%、98.08% 及 91.57%，说明微波杀菌作用随穿透物品的厚度增加而降低。

## （七）协同剂的影响

微波作为一种物理因子，它可与多种化合物起到协同杀菌作用，一般根据微波杀菌要求，

借助于协同剂则明显提高杀菌效果。

20 世纪 90 年代以来, 国内有关微波与化合物协同杀菌效果研究报道较多, 某些化合物本身或微波在低温下, 并不显示出明显杀灭细菌芽孢的能力, 有的消毒剂有抑菌作用, 单用微波消毒杀菌效果差, 但两者在协同条件下, 显示较好的杀灭细菌繁殖体和细菌芽孢、病毒、真菌等能力。实验室和临床试验证明, 采用微波与氯己定协同作用, 在一定量负载条件下可作为手术室医疗器械快速灭菌之用。另外, 微波牙钻消毒器采用微波与苯扎溴铵复合消毒剂协同作用, 只需微波照射 1 min 可将乙型肝炎病毒表面抗原性完全破坏, 同时可杀灭细菌繁殖体、细菌芽孢、艾滋病病毒等, 且无毒、无刺激作用, 具有良好实用价值。有的研究者报道, 单用 0.5% 柠檬酸对枯草杆菌黑色变种芽孢作用 1.5 min, 杀灭率为 5.36%, 如与频率为  $2\,450 \pm 50$  MHz、输出功率为 650 W 的微波协同, 作用 3 min, 可将枯草杆菌黑色变种芽孢全部杀灭。详见表 5-8。

表 5-8 微波与各化合物协同杀灭细菌芽孢效果

化合物名称	浓度(%)	对细菌芽孢杀灭率(%)	
		单用	协同作用
碘伏	0.01	53.31	100.00
过氧化氢	1.00	22.58	100.00
氯己定	1.00	4.01	99.98
戊二醛	0.30	13.67	100.00
苯甲酸	0.05	7.16	99.91
山梨酸	0.05	10.31	99.91
苯扎溴铵*	0.50	-	99.89
微波	280 W	37.91	-

\* 微波输出功率为 350 W, 其他各化合物均为与微波协同作用结果

### 第六节 微波消毒的应用

微波消毒是物理消毒方法之一, 自人们发现其具有杀菌效能, 其消毒应用范围随之扩大, 特别是在食品工业领域得到推广应用。近年来, 国内外学者进行大量研究, 微波消毒在食品消毒与灭菌、医院医疗药品和医疗器械的快速灭菌等方面应用较多。现将微波消毒应用情况简介于下。

#### 一、食品的消毒与灭菌

##### (一) 微波处理食品的特点

微波处理食品, 杀菌快速, 加热均匀, 穿透力强, 杀菌、防霉效果可靠, 微波对食品的基本成分破坏轻(蛋白质、碳水化合物、脂肪), 对维生素 C 有一定破坏作用, 但与常规方法如加热、干燥、冷冻、添加防腐剂相比是较小。保留良好的口感和自然风味。节约能源, 减少环境污染, 减轻劳动力, 提高生产的自动化水平, 微波处理的食品其保藏期长。

##### (二) 应用范围

1. 面包、蛋糕、蛋卷等防霉 面包一般保存期为 5 d, 但包装后用  $2\,450 \pm 50$  MHz 微波照射

2 min(65℃),保存 21 d, 仍呈新鲜状态。对污染大肠杆菌夹心面包的试验结果,微波照射 75 s 达灭菌要求。蛋卷、蛋糕照射 1 min,10 d 未发霉,而对照组 4 d 即发霉。

2.豆制品灭菌用 ER-692 型微波炉(2 450 ± 50 MHz)微波照射小包装豆腐,在 95℃时,照射 75 s 可达灭菌,在 4.5℃下贮藏 32 d,对豆腐质量无影响;对市售豆腐皮,用微波照射 5 min,可达消毒卫生标准,保存 3 个月不发霉。

3.红小豆饭、菜类、海产品处理 红小豆饭、菜类用 2 450 ± 50 MHz、650 W 微波照射 3 ~ 5 min 可达灭菌;软包装海味食品、生海杂鱼、墨斗鱼、原汁鲜贝肉 100 g 在 650 W 下作用 5 min,或 500 W 作用 7 min 可达灭菌目的。

江连洲报道将细菌总数为  $3.2 \times 10^6$  cfu/g 的塑料袋装咖喱牛肉置微波炉中照射 40 min,菌量减少  $4.3 \times 10^2$  cfu/g。

4.液体饮料食品消毒灭菌 微波照射瓶装桔子汁、奶油,用 2 450 ± 50 MHz 微波,输出功率 5 kW,照射 180 s,对自然菌的杀灭率达 99.08%。用微波照射牛奶,在 70 ~ 75℃处理 15 s 即可杀灭其中致病菌,杀灭率达 99.99% ~ 100%,且较好保持牛奶风味。这种消毒具有清洁、快速、对质量无影响、费用低等优点。喝生水易生病,如用玻璃杯盛 400 ml 白米水,用 650 W 微波照射 3 ~ 4 min 即可饮用。

5.酱油消毒 夏天散装的酱油细菌污染严重,拌凉菜吃后易生病。如将 1 000 ml 酱油置于 5 000 ml 烧杯中,用 2 450 ± 50 MHz 频率、650 W 功率的微波照射 10 min,即达卫生消毒合格标准。

二、对医院医疗药品灭菌

微波可用以对维生素,安痛定与卡那霉素等安瓿针剂灭菌(表 5-9)。

表 5-9 微波(2 450 MHz)照射杀菌效果

物 品	微生物	输出功率(kW)	照射时间(s)	杀菌率(%)
瓶装糖水桔汁	自然菌	1.0	140	100.00
中药全鹿丸	自然菌	12.0	107	99.80
中药止咳化痰丸	自然菌	10.0	800	99.90
安瓿注射液	枯草杆菌黑色变种芽孢	4.0	20	100.00

Sasaki 报道了一种安瓿装药液微波灭菌器(MWS-293 型),其微波频率为 2 450 ± 50 MHz,最大功率为 5 kW,其特点是处理温度高达 150℃,灭菌时间短。试验证明,由于灭菌速度快,可用于一些不能用压力蒸汽灭菌的液体的灭菌处理。用该灭菌器一次可处理 25 000 余只玻璃安瓿。每只安瓿装 1 ml 液体;液体内接种约  $5 \times 10^6$  cfu/ml 嗜热脂肪杆菌(ATCC 7953)芽孢,在 134 ~ 150℃条件下,在短时间内全部杀灭。

国内有关资料报道,用 915 ± 25 MHz,280 W 微波对 500 ml 玻璃或聚丙烯瓶装 500 ml 注射葡萄糖液照射 120 ~ 150 s,不仅可灭菌,并可清除热原。

### 三、医院医疗器材灭菌

#### (一)应急器材的快速灭菌

在医院平时手术室和门诊抢救病人过程中经常有器材短缺或损坏,在急需使用时,对少量急用器材,用  $98\text{ W}$  功率、 $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  微波炉照射医用插管、导管  $5 \sim 7\text{ min}$  即可。可用 **WXD-650 A** 型微波快速灭菌器  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ 、 $650\text{ W}$  微波和  $0.5\%$  氯己定协同作用  $5\text{ min}$  达灭菌,并可在手术台边进行灭菌。通常,微波不能处理金属物品,但金属器械以湿布包裹后,用  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ 、 $3.0\text{ kW}$  功率微波照射  $5\text{ min}$  可达灭菌。

#### (二)畏热器材灭菌

某些不耐高温的医疗器材,用环氧乙烷(ETO)气体灭菌不仅时间长,而且有残留毒性。用微波灭菌,既快又不损坏器材。

如医院中由高分子整合材料制成的各种导管、手套及各种人工器官及手术缝线、刀片等,均可用微波快速灭菌器进行处理,  $5\text{ min}$  达灭菌。Douglos将导管用布包装,经  $650\text{ W}$  微波照射  $12\text{ min}$ ,全部达灭菌要求。

对污染严重的麻醉装置,用  $720\text{ W}$  功率的微波照射  $4\text{ min}$ ,可杀灭细菌和病毒(肝炎病毒、疱疹病毒、副流感病毒、鼻病毒等)。

#### (三)口腔科器材灭菌

口腔科器材周转快,污染严重,是乙型肝炎、艾滋病等血液传播性疾病的重要传播媒介。用微波消毒是一种较好的方法,处理后器材上不会残留有毒物质。

口腔科小型器械如口镜、牙托、注射器、小金属器械及输液瓶等置于含  $0.5\%$  氯己定溶液的塑料盒里,以  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  ( $650\text{ W}$ )微波照射  $5\text{ min}$  可达灭菌。牙钻手机与钻针采用 **WBy-1** 型微波牙钻消毒器,用微波与增效液协同作用,只需照射  $1\text{ min}$  即可杀灭细菌繁殖体、细菌芽孢,并可将 **HBsAg** 抗原性完全破坏。该法对牙钻手机与钻针无腐蚀,使用性能无影响。

#### (四)眼科器材的灭菌

眼科器材小,但污染严重,是造成医院污染的重要原因。消毒后的眼科器材上不能残留对眼睛黏膜有刺激的化学物质,亦不能损坏器材。Rohere报道,将镜片放入小塑料袋内的生理盐水中,经  $650\text{ W}$  微波照射,对镜片上的微生物有良好的杀菌效果。经损坏试验证明,用  $650\text{ W}$  微波照射隐形眼镜,每次  $10\text{ min}$ ,连续照射  $100$  次,镜片质量不受影响。

#### (五)儿科器材的处理

乳胶奶头、玻璃奶瓶、药杯、毛巾、纱布、棉签等均可用微波消毒。用 **ER-692** 型家用微波炉( $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ ,输出功率  $650\text{ W}$ ),对毛巾、玻璃奶瓶作用  $20\text{ min}$ ,对药杯、纱布和棉签照射  $15\text{ min}$  对乳胶奶嘴照射  $10\text{ min}$ ,均能将类炭疽杆菌杀灭,除聚乙烯药杯经  $10$  次处理后开始变黄外,其余物品要是预湿水量适当,均无损坏。为此,对儿科常用护理用品用微波处理,又快又可靠,是一种较好的物理消毒方法。

#### (六)手术室器材的灭菌

平时医院手术室的器材可采用微波快速灭菌,如用  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$ 、 $3\text{ kW}$  的微波,对手术室敷料包、器械包、手术包及毛毯分别照射  $3$ 、 $5$ 、 $20$ 、 $6\text{ min}$  均可达灭菌要求。用浸有蒸馏水的棉布包在小型器械外面,以  $2\,450 \pm 50\text{ MHz}$  ( $650\text{ W}$ )微波照射  $5\text{ min}$  即可灭菌。有人报道,  $650\text{ W}$  微波炉照射盛于玻璃平皿内的  $50\text{ ml}$  医用液体石蜡或  $50\text{ g}$  凡士林  $20\text{ min}$  可达灭菌。

## 四、其他器材的消毒与灭菌

### (一)文件与纸币等

文件、货币等畏热的物品尚无理想快速的消毒方法。赵文彬用 650 W 微波炉对纸质物品进行消毒,每次处理 3 kg,照射 5 min 可杀灭二层包装内纸上的细菌繁殖体、黄曲霉、巨大杆菌芽孢和破坏 HBsAg 抗原性。黎人任等将每捆 500 g 与 1 000 g 处方单,分别用 650 W 微波照射 7 min 和 9 min 均可达消毒要求;薛文慧等用湿布包裹票证、书籍、报纸,用 650 W 微波炉照射 15 min 除表层外,可破坏 HBsAg 的抗原性。张锦屏等用微波处理饭票,取得较好的效果。用 500 W 微波炉每次处理 1.3 kg 饭票,照射 2 min 可完全杀灭痢疾杆菌、伤寒杆菌、变形杆菌和金黄色葡萄球菌;照射 6 min 可完全破坏 HBsAg 抗原性。对人民币在 1 500 W 功率下照射 2 min 可达灭菌。病历、化验单可用双层布包好,在 650 W 功率下,95℃照射 13 min 可达消毒要求。

### (二)实验室无菌器材、培养基及标本等的消毒处理

对实验室的无菌器材和培养基用  $2\,450 \pm 50$  MHz (650 W) 家用微波炉处理 400 ml 培养基 7 min 污物平皿照射 5 min,试管、吸管照射 15 min 均可达灭菌。Douglas 报道,结核分枝杆菌感染的肝脏组织经过 500 W 微波照射 20~60 s,除可杀灭结核分枝杆菌外,对组织块起良好固定作用,可作各种切片,染色和病理诊断。这种固定技术比药物固定更为理想。

血尿、粪便标本经 650 W 微波照射 15 min,可杀灭其中感染性极强的艾美球虫、丝虫及其虫卵。对含微生物的组织块,经 650 W 微波照射 1 min 可将微生物杀灭,但其组织形态均不受影响。

### (三)餐具、饮具的消毒

由于微波消毒快捷、方便、干净、效果可靠,将微波用于餐具消毒的报道较多,只要应用得当,微波消毒有希望作为餐具消毒优选方法。喻庆等报道:用 700 W 功率微波对餐具、茶具,如陶瓷碗及竹筷、抹布等快速消毒,650 W 功率下照射 3 min,可将污染的大肠杆菌全部杀灭,将自然菌杀灭率达 99.7% 以上;照射 5 min,可将 HBsAg 的抗原性破坏。

吴群等报告了专用于餐具和饮具的 WX-1 型微波消毒柜,所用微波频率为  $2\,450 \pm 50$  MHz 用该微波消毒柜,将染有枯草杆菌黑色变种(ATCC 9372)芽孢、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、嗜热脂肪杆菌芽孢及短小芽孢杆菌(E601, ATCC 27142)的菌片放置于成捆的冰糕棍及冰糕包装纸中,经照射 20 min,可达到灭菌要求。

## 五、衣服和皮毛的消毒

微波用于服装的消毒可取得良好的消毒效果,如吴少军报道,用家用微波炉,以 650 W 微波照射 8 min,可完全杀灭放置于  $20\text{ cm} \times 20\text{ cm} \times 20\text{ cm}$  衣物包(带有少量水分)中的枯草杆菌黑色变种芽孢。丁兰英等报道,用  $2\,450 \pm 50$  MHz 频率(3 kW)微波照射 3 min,可使熟羊皮上污染的蜡状杆菌芽孢 99.99% 被杀灭;用 915 MHz (10 kW)微波照射 3 min,可使马鬃上蜡状杆菌芽孢的杀灭率达 100%

## 六、驱除环氧乙烷灭菌后的残留环氧乙烷气体

医院内利用环氧乙烷对医院医疗器材进行灭菌,但对用后的环氧乙烷驱散困难。国外 Samael 报告,用微波驱除灭菌器材中环氧乙烷比自然驱散快,最快 400%, Mathews 指出,用微波



驱散环氧乙烷比 55℃ 热风机快 3 倍(见表 5-10)。

表 5-10 微波与加热机驱除环氧乙烷比较

材料种类(厚,mm)	初始浓度(%)	降低到 100 ppm 所需时间(h)	
		热风机	微波
聚氯乙烯管(1.6)	10 900	12.0	3.0
红橡胶管(2.0)	3 500	6.0	1.5
氯丁橡胶管(2.0)	1 600	4.5	1.0
输血胶管(1.5)	1 100	4.0	1.5

微波驱散环氧乙烷的原理为微波照射可使环氧乙烷分解,微波加热后可加速环氧乙烷的挥发。

## 七、废弃物等的消毒

国外 Hoffwan 等用传送带连续照射装置,对医院内废物包括动物尸体及组织、生物培养物、棉签以及病人的血、尿、粪液标本、排泄物等,进行微波处理,结果证明,该装置可有效地杀灭废弃物中病原微生物。因而,在医院内,可用这种装置代替焚烧炉。在德国,污泥的农业使用有专门法规,如培育牧草用的污泥,必须用不含致病微生物。传送带式微波处理为杀灭其病原微生物的方法之一。

微波灭菌技术应用于医院快速灭菌对于控制医院感染起重要作用。近年来,微波消毒、灭菌研究和应用不断扩大、深入,但仍存在一些技术问题,如金属器械的灭菌、特殊医疗器械灭菌专用设备、应用的技术参数(如剂量)、微波场温度测量方法(如物理法、化学法)、微波与物理、化学因子协同作用等,需要继续研究。微波在食品处理、医院医疗器械快速灭菌等方面的推广使用,是灭菌技术的一个新的突破。微波消毒技术的前景是广阔的,通过不断研究与应用,将会取得更大成果,产生更大的社会效益和经济效益。

## 第七节 微波对人体健康的影响及防护

### 一、微波对人体生理的影响

微波辐射对人体作用按其作用机制可分为热效应和非热效应两大类,而微波对人体生理影响主要来自微波热效应。所谓微波热效应是微波能量作用于人体,一部分被吸收,一部分被反射,被吸收的能量大部分转化分子的动能,而使人体温度升高。当微波对生物体产生热,由于加热到足以有伤害作用和生理影响时,则称为微波热效应。非热效应是指除了对生物体组织加热外,对生物体产生其特殊生理影响,即为非热效应。

微波对人体健康有一定危害。其危害程度随频率高低、波长大小、照射时间长短而不同,除此之外,与人体的介电常数、导电率、厚度等有关。一般讲,频率高的微波比频率低的穿透力弱,频率越高,穿透深度越浅;波长的不同,微波对组织穿透深度和对生物体组织穿透深度影响程度不同。因为人体也是介质,具有一定的介电特性。人体组织可以大致分为三类:①血液、

淋巴液。②肌肉、皮肤、肝脏。③含水低的组织(脂肪、骨骼等)。

人体不同组织的相对介电常数不同，其穿透的深度不同。消毒上常用的两种频率在人体组织中穿透深度见表 5-11。

表 5-11 微波对人体在相同频率时介电常数及穿透深度

人体组织	频率(MHz)	波长(cm)	介电常数(Er)	在组织中波长(cm)	穿透深度(cm)
肌肉	915	32.80	51.00	4.46	3.08
	2 450	12.20	47.00	1.76	1.70
脂肪	915	328.0	5.60	13.70	17.70
	2 450	12.20	5.60	5.21	11.20

微波对人有危害，其危害程度随频率之高低、波长之大小而不同。小于 150 MHz 微波可透过人体而无明显损伤,常用于消毒的 915 ± 25 MHz 与 2 450 ± 50 MHz 的微波均可引起人体组织的热效应。微波对人体组织主要效应见表 5-12。

表 5-12 微波对生物体主要效应

频率(MHz)	波长(cm)	受影响的主要组织	主要的生物效应
100 以下	300 以上	-	可穿透不受影响
150 ~ 1 200	200 ~ 25	体内器官	人体组织过热时,体内各器官受到损伤
1 000 ~ 3 000	30 ~ 10	眼睛水晶体、睾丸	对组织加热显著,眼睛水晶体易受影响
3 000 ~ 10 000	1 ~ 3	皮肤外层,眼睛水晶体	随温度增高皮肤灼热
10 000 以上	3 以下	皮肤	皮肤表面部分反射或部分发热

微波对含水多的组织,如血液、皮肤、脑等穿透能力小;对含水少的组织,如脂肪、骨骼等,穿透能力大。此外,微波对生物体来说,存在一个共振频率  $f_r$ ,其值为  $f_r(\text{兆赫}) = 11\,400/L(L\text{: 人体长度,单位为 cm})$ 。当机体处于共振频率的电磁波辐射时,其平均单位重量所吸收的功率即吸收比率(SAR)最高。对人体来说,共振频率为 70 MHz 时,毫米波对皮肤穿透深度不到 1 mm,毫米波的心血管效应如血管张力过低和心动过缓等,主要是皮肤神经反射作用。分米波和米波则可直接作用于脑和心脏等。过量的微波辐射可引起微波辐射综合征。它有急性和慢性之分。

(一)急性微波辐射综合征

急性微波辐射对职业人员很少引起损害，国内外发生仅数例，一般是在开机维修时的无意辐射所造成的事故。只有在一次辐射强度大，人体与辐射源距离近的情况下才会发生。

急性微波辐射综合征症状大致有:头痛、恶心、眩晕、激动、失眠及照射局部烧灼感等。体征方面可有高血压、心率高度波动、心律失常、视力下降、皮疹等。实验室化验检查有白细胞、血小板下降等，经过数天至数周休息后，上述症状一般均可消失。

据有关研究者实验证明，大强度微波辐射(10 mW/cm<sup>2</sup> 以上)以对眼晶状体和睾丸的损害为显著。强于 300 mW/cm<sup>2</sup> 微波辐射可造成晶体不可恢复的损害，10 ~ 300 mW/cm<sup>2</sup> 强度可发生晶体水肿的可复性改变。250 mW/cm<sup>2</sup> 高强度微波辐射能使睾丸功能减退和精子生成减少。

即使是  $5 \text{ mW/cm}^2$  强度下也可能使睾丸受到损害。大强度的微波辐射可引起体外细胞和某些细胞染色体畸变。

## (二)慢性微波辐射综合征

较低强度、长时期微波职业暴露可引起慢性微波辐射综合征。它主要反映在神经系统,心血管系统。一般表现为某些机能性紊乱,在脱离环境后,症状可逐渐消失,但具有明显的个体差异。

1.对神经系统的影响 微波对作业人员的神经系统影响的神经衰弱综合征症状为头昏(或头晕)、乏力、记忆力减退,失眠或嗜睡为多见,上述综合征发生率为  $31.6\%$ 。此外,还可发生多汗、脱发、易激动以及月经紊乱、性欲减退等症状。微波引起神经衰弱的症状与辐射强度及工龄有一定关系。

2.对心血管系统的影响 主要表现为与植物神经系统障碍密切相关的心血管系统的功能不全。一般表现为胸闷、心悸、各种性质的心前区不适和疼痛。血流动力学功能失调,血管通透性降低。轻度影响为心动过缓,血压下降,心电图改变。高度影响为心跳加快,心血管损伤。

3.对血液系统的影响 微波作业人员外周血象可在正常范围内有些变化,主要表现为白细胞和血小板的减少。有的资料报道,  $2450 \pm 50 \text{ MHz}$  微波辐射对人体血液凝结过程有影响。淋巴细胞开始时相对增高,而后降低,以及红细胞先增加后减少。

4.消化系统 轻度上腹部疼痛,恶心及食欲下降等消化道症状,检查可见胃酸缺乏。

5.对眼睛的影响 轻者表现为眼睛发干,视力模糊,重者晶体混浊,形成白内障。

6.免疫系统 人体的免疫系统敏感性一般,可引起免疫能力降低。

7.听觉系统 主要影响为听力下降。

8.嗅觉系统 引起嗅觉灵敏度降低。

9.骨骼 对生长中骨骼系统有损坏。高强度使骨骼腔内出血,骨组织疏松等。

10.睾丸 微波照射可抑制生精过程,因而可影响生育。

11.甲状腺 可引起轻度肿大。

## 二、微波照射的安全标准

微波对人体有一定伤害,为保证职业人员安全,国际上有十几个国家制定了微波照射安全标准。但这些安全标准差别很大。英、美等国家认为  $10 \text{ mW/cm}^2$  以下强度微波一般不致造成对人危害,故以此作为安全标准的依据。前苏联等东欧国家认为  $0.01 \text{ mW/cm}^2$ ,微波的非热效应就可以引起中枢神经系统功能变化,因此,制定安全标准要较英、美等国严格。参考国外标准,我国建议以平均功率强度  $50 \text{ mW/cm}^2 (6 \text{ h/d})$  作为微波辐射标准,同时以  $300 \mu\text{W/cm}^2$  作为一日最大容许限量,如以  $8 \text{ h/d}$  计算,则平均容许限量为  $38 \mu\text{W/cm}^2$ 。此外,为防止较大强度的损害,同时确定最大辐射功率强度不超过  $5 \mu\text{W/cm}^2$  (表 5-13)。

## 三、微波的防护

在微波加热器的设计中,一般在设计和加工时都尽可能使微波能的泄漏最小,使加热器效率高、成本低和操作安全;但由于多种原因,微波从加热器中或多或少泄漏出来,向空间辐射,这种泄漏辐射能量称为漏能;对这种漏能,只要我们采取有效的防护措施和遵守操作规程,懂得保护知识,完全可以进行安全操作,除此之外,为了确保工作人员安全,可采取下列一些防护措施。

表 5-13

国家	微波频率(MHz)	最大容许强度(mW/cm <sup>2</sup> )	持续时间
美国	10 ~ 100 000	10	0.1 h 的平均值
加拿大	10 ~ 100 000	10	8 h/d
英国	30 ~ 30 000	10	全天
法国	30 ~ 30 000	10	712 h
		10 ~ 100	1 h
		10	无限
德国	30 ~ 30 000	10	无限
荷兰	30 ~ 30 000	1.0	无限
		10	< 6 min
瑞典	300 ~ 30 000	1.0	长期照射
		10	偶尔照射
波兰	300 ~ 300 000	0.01	全天
		0.2	8 h/d
		0.2 ~ 1.0	< 8 h/d
捷克	300 ~ 300 000	等幅波 0.025	8 h/d
		脉冲波 0.01	8 h/d
前苏联	300 ~ 300 000	0.01	1 天内
		0.1	2 ~ 3 h/d
		1.0	15 ~ 20 min/d
中国	...	0.038	8 h/d

#### (一)严格设计加热器,减少辐射漏出

1.对来自微波源漏能的防护 为减少微波源漏能辐射,将微波源装置装在箱内,利用波导或同轴线,将微波能送到加热器,减少微波阴极和灯丝出现的能量泄漏。对于微波管的阴极和灯丝部分可采用专门屏蔽。

2 对来自水负载漏能的防护 水负载的进出口水管处,有泄缝会使能量泄漏,一般在负载尾部进出口水管处加一个截止波导,要求截止波导半径  $\lambda > 3.41 R_0$ 。

3 对来自加热器进出口的防护 对这部分漏能要重点防护,因为为使被加热物品通过加热器,一般进出口大,难免有能量泄漏,而加热器进出口大都是操作人员的位置,应重点加强防护。

采用以下几种措施:

(1)梳型片状抑制器结构。这是一种对直波导、隧道式、组合波导、平板波导等各类加热器的常用漏能抑制器,这种结构制造方便,效果较好。

(2)群岛式抑制器。

(3)微波炉微缝密封法防泄漏装置。一般离箱体 5 cm 处,漏能不超过  $1 \text{ mW/cm}^2$ ,使用状态下,不应超过  $1 \sim 5 \text{ mW/cm}^2$ 。

#### (二)设置屏蔽,阻挡微波扩散

目前应用屏蔽的材料有反射性和吸收性材料两大类。屏蔽可用反射性的,如用金属纤维

与合成纤维混合编制而成者;亦可用吸收性的如木板、有机硅橡胶、含钡基铁填料的聚氯乙烯树脂等制成者,可吸收 95% 左右微波。亦可两种性质的屏蔽合用。

### (三)遥控操作,减少照射剂量

微波照射强度与距离平方成反比,远离箱体可减少所受照射强度。开机时,工作人员应退出到屏蔽之处。如要进入高场强范围内进行特殊工作时,可穿上直径为 0.457 mm、线间隙为 1 mm 涂银尼龙线编织成的“尼龙布”工作服。戴防护眼镜。

### (四)提供防护装备,加强个人防护

工作人员进入微波场操作时,必须穿用金属丝织成的屏蔽防护服、帽、手套等,对微波有较好的阻挡作用,佩戴涂有二氧化铅层的防护眼镜,对眼睛有良好的保护作用。

### (五)建立工作制度

- 1.合理安排工作人员工作时间,如间隙性接触微波,定期体格检查,并做好就业前体检。
- 2.应安排参加工作的人员定期休养及补充营养。
- 3.工作环境、磁场强度和功率密度不超过国家规定标准(参见表 5-11)。
- 4.定期检查设备及屏蔽室是否有缝隙,防止微波的泄漏。

### (六)正确合理使用家用微波炉应注意事项

家用微波炉的使用,应严格按照使用说明书要求进行。由于微波加热迅速,遇到金属物体反射,微波外泄将造成人体伤害;如不按要求操作,微波炉易损坏,缩短使用寿命,为此在家庭使用微波炉时应注意以下几点。

1.微波炉使用后,应即时用干净毛巾揩抹干净。如有油渍,可先用布沾清洗液擦干净,再用清洁的布抹干。不可用有腐蚀作用的或硬质的清洗剂,以免腐蚀或擦伤金属内壁。

2.用清洗剂处理后,要将清洗剂去除干净,不要残留在炉门附近,否则易使密封效果不佳,造成微波泄漏。如果炉内有残留气味,可放一杯水内加一汤匙柠檬汁,加热片刻,便可清除异味。

3.炉内没有被消毒物品时,绝对不允许开机使用。空炉情况下,微波无法被吸收,会出现故障、甚至导致磁控管损坏。

4.金属钢架或金属物体不可碰触炉门上的透明窗和炉壁,以免擦伤,引起微波外泄。

5.微波炉后排气孔要保持畅通,若有灰尘阻塞,应及时清除。

6.炉体内部有高压装置,一定要配用负载量较大的电源插座,并接上地线,方保安全。

7.保持炉内干净,若有被消毒物品残渣或水分时,将降低微波的加热效率。

8.微波炉要放在干燥平坦之处,与墙保持适当的距离,并远离火炉及水源,以免热气和水气导致漏电,造成对人的伤害。

微波对人体虽有一定的危害,但只要微波加热器设计合理,工作时采用上述防护措施,工作人员的安全完全可以得到保障。

(丁兰英 杨华明)

### 参考文献

- 1 刘育京,微波消毒.见:刘育京,袁朝森,主编,医用消毒学简明教程.北京:中国科学技术出版社,1989;

- 2 杨华明,丁兰英.微波消毒与灭菌.见:杨华明,易滨,主编现代医院消毒学.北京:人民军医出版社,2001:64-71
- 3 李荣芬.微波杀菌机理.中国消毒学杂志,1992;9(4):243-247
- 4 李荣芬,李素卿.微波杀菌机理研究.微波照射与水浴加热效果比较.中国消毒学杂志,1993;10(3):129-133
- 5 丁兰英,蒋莉,杨华明,等.WBY-1型微波牙钻手机消毒的研制.中国消毒学杂志,1995;12(2):65
- 6 丁兰英,杨华明,蒋莉,等.WBM-4A型微波灭菌器对微生物杀菌效果的试验观察.中国消毒学杂志,1998;15(2):74-77
- 7 杨华明,丁兰英,姚红双,等.微波与洗必泰协同杀菌效果的实验观察.中国消毒学杂志,1997;14(2):142
- 8 吴群,邓少范,魏尚珍,等.WX-1型微波消毒柜杀菌作用.中国消毒学杂志,1991;8(2):106
- 9 杨华明,丁兰英,蒋莉.医用微波灭菌器对枯草杆菌黑色变种芽孢杀灭效果影响因素的研究.中国消毒学杂志,1994;12(2):65
- 10 高东旗,丁兰英.微波杀菌作用及其应用研究进展.中国消毒学杂志,1999;16(2):95-98
- 11 姚耿车.微波辐射对人体健康的影响.职业医学,1982;6:39-43
- 12 Sasaki K, Honda W, Miyalce Y. Evaluation of high temperature and short-time sterilization of injection ampules by microwave heating. PDA, Pharm Sci Technol, 1998;52(1):5
- 13 Harris MG. Inoffice microwave disinfection of soft contact lenses. Optom Vis Sci, 1990;67(2):129
- 14 Sasaki K, Honda W, Shimizu K. Microwave continuous sterilization of injection ampoules. 1996;50(3):172
- 15 Kindle G, Busse A, Kampa D, et al. Killing activity of microwave in milk. J Hosp Infect, 1996;33(4):273
- 16 Hoffman PN, Hanley MJ. Assessment of microwave-based clinical waste decontamination unit. J Appl Bacteriol, 1994;77(6):607
- 17 Samuel AH. Microwave desorption: a combined sterilizer-aeration for the accelerated elimination of ETO residues from sterilization supplies. Med Instrum, 1988; 22:39
- 18 Matthews IP. Enhancement of the kinetics of the aeration of ETO sterilization polymers, using microwave radiation. J Bio-medical Materials Res. 1989;23:143

## 第六章 等离子体灭菌

等离子体是高度电离的电子云,是物质存在的一种形式,是物质的第四态。它是某些中性气体分子在强电磁场作用下,产生连续不断电离而形成的正负离子和中性粒子的集合体。它与气体有本质上的区别。首先,它是一种导电流体,但客观上保持电中性。其次,中性分子间没有电磁力作用,而带电粒子间存在电磁力,因而导致群体运动。等离子体分两大类,即平衡(热)等离子体与非平衡(非热)等离子体。如果电子与离子的运动能量相差很小,而且接近中性粒子的热运动能,则等离子体是热(平衡)等离子体。如果电子的能量比离子的运动能量高得多,则等离子体是非平衡(非热)等离子体。

非热等离子体的研究可以追溯到上个世纪 50 年代。1857 年 Simens 首先利用介质阻挡放电非热等离子体技术合成臭氧。至今,非热等离子体技术已广泛应用,诸如合成臭氧,产生无声放电紫外光源,表面处理,薄膜制备,工业废气(烟气,挥发性有机物,汽车尾气)的处理等。非热等离子体产生的方法有介质阻挡放电,电晕放电,微波处理,沿面放电和电子束辐射等。

等离子体的形成过程是一个复杂的物理化学过程。不同方法产生的等离子体的性质完全不同,等离子体中各种粒子的化学活性与反应特征差异很大。因此,还没有一个统一的科学理论能够解释等离子体的形成机理。目前的研究主要集中在等离子体特性(电子温度、电离度),应用效果(臭氧产率、有害气体去除率、灭菌效率)和放电条件(电压、频率、气体成分、温湿度和反应器结构)的相互关系上。

等离子体灭菌技术于 20 世纪 60 年代始于美国。Menashi 等首先提出卤素类气体等离子体有很强的杀菌作用。等离子体灭菌技术 1987 年获专利,美国强生公司研制的 Sterrad100 等离子体灭菌器于 1993 年经 FDA 批准上市。

### 第一节 等离子体灭菌器

等离子体灭菌器基本组成为电源、激发源、气源、传输系统和灭菌腔等。根据激发源将等离子体灭菌器分为以下几种类型。

#### (一) 激光等离子体灭菌器

激光源发出的激光束通过一个棱镜折射,透镜聚焦,激发腔内气体产生等离子体。这种灭菌器腔体小,等离子体温度又较高,所以至今未投入使用。

#### (二) 微波等离子体灭菌器

微波等离子体是一种非热(低温)等离子体。微波等离子体装置的特点:①电离度高,成分丰富;② 电子温度高,介质气体分子温度低,二者比值大;③ 可在高压下维持等离子体浓度;④属静态等离子体,无噪声。

#### (三) 高频等离子体灭菌器

这类灭菌器的激发源是高频电磁场。1986 年以射频能发生电磁场、以  $\text{H}_2\text{O}_2$  蒸气为基础气体的非热等离子体灭菌器 Sterrad 100 问世。Sterrad 100 灭菌器柜室体积为 73 L,温度在 50℃

以下。整个灭菌周期主要分三大步，用时 75 min。第一步，使柜室在 300 mTorr 下去除空气与水汽，以便使柜室进一步达到所要求的真空度( 0.5 Torr)；将 2 ml 浓度为 58% 的  $H_2O_2$  从特制小盒内注入柜室， $H_2O_2$  蒸发，扩散，从而使柜室内浓度达 6 mg/L。第二步，用 13.56 MHz 射频能产生电磁场，激发  $H_2O_2$  气体产生等离子体，杀灭微生物。第三步，用经高效过滤的空气使柜室恢复常压。灭菌物品可直接使用，无需通风处理。 Sterrad 等离子体灭菌器还有两个型号，即 Sterrad 50 灭菌腔呈矩形，44 L，腔内有一个搁板)和 Sterrad 100 S( 灭菌腔呈圆柱形，73 L，腔内有两个搁板)。它们的灭菌周期由两个半个周期组成。每半个周期都包括  $H_2O_2$  蒸发，扩散和激发  $H_2O_2$  气体产生等离子体。这两种灭菌器柜室内过氧化氢的浓度分别为 14.4 mg/L 和 6 mg/L，灭菌周期分别缩短为 50 min 和 52 min。Sterrad 50 和 100 S 所以能缩短灭菌周期，原因是：①过氧化氢注入期与扩散期压力改变；②再次注入过氧化氢。Sterrad 100 S 也已获得 FDA 批准上市。

另一种等离子体灭菌器是 AbTox。它交替使用两种混合气体。一种是 1 mg/L 过氧乙酸蒸气和 4 mg/L 过氧化氢蒸气混合物，另一种是氢气和氧气的混合物。它与 Sterrad 不同点在于：AbTox 灭菌器首先用非等离子体的过氧乙酸蒸气与过氧化氢蒸气处理物品，再用灭菌腔外由氢气和氧气生成的等离子体输入腔内进行二次处理（表 6-1）。

表 6-1 Sterrad 和 AbTox 的优缺点比较

灭菌器	优 点	缺 点
Sterrad	对环境和医务人员安全	不可处理纸和亚麻制品及液体
	无毒物残留	灭菌腔小，约 1.07 m <sup>3</sup>
	灭菌周期为 75 min，不需换气处理，易操作且安装和调试简单	美国规定不可用于处理腔长 > 40 cm、内腔直径 < 3 mm 的装置，需聚丙烯等包装或用特制容器
AbTox	对环境和医务人员无害	灭菌腔较小，约 1.67 m <sup>3</sup>
	灭菌周期取决于被灭菌物品的量	不可处理液体与其他一些物品，目前仅可处理
	无毒物残留	不锈钢外科器械 必须用美国生产的包装材料

（四）许多气体都能作为产生等离子体的基础气体

Hurry 等报道， $O_2$ 、 $N_2$ 、 $H_2$ 、卤素类气体、 $N_2O$ 、 $H_2O_2$ 、 $H_2O$  蒸气、 $CO_2$ 、 $SO_2$ 、 $SF_6$  以及醛和有机酸蒸气都可在强电磁场作用下产生等离子体。尽管 Hurry (1998) 等报告，用  $CO_2$  比用  $H_2O_2$  产生的等离子体杀芽孢效果更好，但是，到目前为止，用得最多的仍然是  $H_2O_2$  蒸气，主要原因在于：①  $H_2O_2$  本身有很强的杀微生物作用；② 等离子体使用后的最终产物为  $H_2O$  与  $O_2$ ，无毒性物质遗留；③ 灭菌周期比其他低温灭菌技术( 环氧乙烷、甲醛、戊二醛 )短。

第二节 等离子体灭菌的原理

气体物质在高频电磁场的作用下高度电离形成气体云。气体云中包含有电子、荷电的分子和原子、基态和激发态的分子和原子以及紫外线、 $\gamma$  射线、 $\beta$  粒子等。介质气体不同，在灭菌柜内形成的等离子体成分或同种成分的浓度也不一样。例如，无声放电发生器  $O_3$  的产生效



率,用空气作基础气体为  $60 \text{ g O}_3/(\text{kW}\cdot\text{h})$  ,用氧气作基础气体为  $120 \text{ g O}_3/(\text{kW}\cdot\text{h})$  。因此,杀灭微生物的作用不尽相同。

### 一、活性基团的作用

氧化性气体等离子体成分中含有大量活性氧、高能自由基等活性物质。目前人们认为,这些活性基团在等离子体杀灭微生物中起着最重要的作用。

目前,市售的等离子体灭菌器多以  $\text{H}_2\text{O}_2$  蒸气为介质。它在高频电磁场作用下形成等离子体的可能的反应式为:

1.  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{HO}\cdot + \text{HO}\cdot$  (氢氧自由基)
2.  $\text{HO}\cdot + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{HO}_2\cdot$  ( $\text{HO}_2\cdot$  为过羟自由基)
3.  $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2^*$  (为激发态的过氧化氢分子)
4.  $\text{H}_2\text{O}_2^* \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{可见光 / 紫外线}$
5.  $\text{HO}\cdot + \text{HO}\cdot \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}\cdot$  ( $\text{O}\cdot$  为活化氧原子)
6.  $\text{HO}\cdot + \text{O}\cdot \rightarrow \text{H}\cdot + \text{O}_2$  ( $\text{H}\cdot$  为活化氢原子)
7.  $\text{HO}\cdot + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$

过氧化氢等离子体中有氧氢自由基  $\text{HO}\cdot$ 、过羟自由基  $\text{HO}_2\cdot$ 、激发态  $\text{H}_2\text{O}_2^*$ 、活性氧原子  $\text{O}\cdot$ 、活化氢原子  $\text{H}\cdot$  等活性成分。这些活性基团极易与微生物体内蛋白质和核酸物质发生反应,使微生物死亡。试验研究表明,用  $20 \text{ W}$  功率的微波激发形成的等离子体,每作用  $1 \text{ h}$ ,可消耗  $42 \text{ mg}$  糖标本。由此可推论,等离子体成分可直接氧化蛋白质链中的氨基糖。

### 二、高速粒子击穿作用

电镜图像清晰显示,细菌菌体与病毒颗粒经等离子体作用后呈千疮百孔,这是高速粒子的击穿效应。

### 三、紫外线的作用

在等离子体形成过程中,亦可释放出大量紫外线。在激发  $\text{H}_2\text{O}_2$  形成等离子体的过程中,伴随  $\text{H}_2\text{O}_2$  等离子体形成的同时产生大量紫外线。这种高能紫外光子 ( $3.3 \sim 3.6 \text{ eV}$ )可被微生物的核酸吸收,使其破坏,致微生物死亡。试验证明,等离子体紫外线中有  $80\%$  以上在具有杀菌作用的波长以内。因此,紫外线在等离子体杀菌中也发挥着重要作用。

### 四、温度的辅助作用

非热等离子体中,电子温度很高(高达  $104 \text{ K}(1 \text{ eV})$  以上),而离子温度近乎室温 ( $300 \sim 500 \text{ K}$ )。Peeples分别测定了相同功率的微波场和等离子体灭菌腔内玻璃瓶底部的温度。结果表明,作用  $1.5 \text{ s}$ ,玻璃瓶底的温度,在微波场中者为  $113^\circ\text{C}$ ,在等离子体中者仅为  $33^\circ\text{C}$ 。另外,细菌芽孢经等离子体作用后,在电镜中看不到灰化作用。综上所述,等离子体杀菌主要不是靠温度。尽管如此,灭菌腔内高于室温的温度对增加活性基团、紫外线等的杀菌效果还是有一定作用的。

### 第三节 等离子体的杀微生物作用

等离子体杀灭微生物的作用很强。使用过的医疗器具凡经水冲洗并干燥,都能被等离子体灭菌。但是,等离子体像所有其他低温灭菌因子一样,都不能使污染血和盐的器具达到灭菌。

Nelson 等用 50 W 功率激发  $O_2$  产生的等离子体,作用 30 min,可完全杀灭梭状杆菌芽孢(ATCC 7955);用 200 W 功率激发,作用 5 min,就可完全杀灭枯草杆菌芽孢(ATCC 9372)。

Holton 等(1995)报告, $H_2O_2$  等离子体能使医疗器械上污染的产气荚膜杆菌芽孢和破伤风杆菌芽孢减少 6 lg 10。

Donald(1984)等用红宝石激光触发耦合微波场产生的等离子体能完全灭活污染于 10 ml 血清玻璃小瓶内的枯草杆菌芽孢。

Vickery 等(1999)报告,用含鸭乙肝病毒(DHBV)的血清污染玻璃纤维垫,用 Sterrad 100 处理。结果表明, $H_2O_2$  等离子体可使 DHBV 滴度下降 7 lg10,动物试验证明处理后的载体无传染性。他们进一步用污染了 DHBV 的腹腔镜感染鸭子,对照组 26 只鸭子全部感染,水冲洗腹腔镜组 11 只鸭子 7 只感染,而  $H_2O_2$  等离子体处理的腹腔镜组 8 只鸭子全部未感染。

Chales 等(1998)报告,用混悬于宿主细胞培养基中的病毒悬液接种玻璃载体,干燥后用 Sterrad 100 处理。操作中,使  $H_2O_2$  在灭菌腔内蒸发扩散的时间由 50 min 缩短为 25 min,用等离子体处理 7.5 min 载体上的 HIV、HAV、RSV、HSV-1、水痘病毒和细小病毒-2 型全部灭活。其中,HIV-1、RSV、HSV-1、水痘病毒等为脂包膜病毒,细小病毒-2 型、HAV 为非脂包膜病毒。 $H_2O_2$  等离子体对两类病毒都有较好的灭活效果。

Willian 等(1998)报告,将染有嗜热脂肪杆菌芽孢的平滑的不锈钢载体,无菌地放入不锈钢管内腔的中部,无论腔的直径 3 mm、2 mm 或 1 mm, Sterrad 50 和 100 S 都能使所有载体灭菌,灭菌率为 100%(30~50 个样本)。

### 第四节 等离子体灭菌效果的影响因素

等离子体灭菌效果的影响因素很多,有些因素对等离子体能否付诸实用起着决定性的作用。

#### 一、基础气体

基础气体对其产生的等离子体的灭菌效果有显著影响。

Boucher 比较了三种基础气体(氧气、氩气和氮气)与各种醛类化合物一起作为介质气体,经激发产生的混合气体等离子体,对污染在 AOAC 专用瓷杯上的枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭效果。结果表明:① 三种基础气体中,氩气与氮气等离子体比单氧气等离子体好;② 醛类中,除甲醛、乙二醛和戊二醛外,其他都比较差(表 6-2)。

Hurry(1998)报告,枯草杆菌芽孢经四种基础气体产生的等离子体作用 120 min 的 lg10 减少值分别为氩气 1.19,氧气 2.217,  $H_2O_2$  蒸气 2.80 和  $CO_2$  气 3.56。

表 6-2 不同介质气体产生的等离子体的灭菌效果

醛类名称	不同作用时间(min)的灭菌效果								
	氧气			氩气			氮气		
	10	15	30	10	15	30	10	15	30
甲醛	-	-	-	-	-	-	-	-	-
乙醛	+	-	-	+	-	-	+	+	-
乙二醛	+	-	-	-	-	-	-	-	-
丙醛	+	-	-	+	-	-	+	-	-
丙二醛	+	+	-	+	+	-	+	+	-
丁醛	+	-	-	+	-	-	+	-	-
丁二醛	-	-	-	-	-	-	+	-	-
戊二醛	-	-	-	-	-	-	-	-	-
基气组	+	+	+	-	-	-	-	-	-

注：+表示有菌生长，-表示无菌生长

## 二、激发功率

等离子体的灭菌效果与激发源的激发功率密切相关。

Tensmeyer 等以激光和微波耦合作为激发源,激发功率为 200 W 的耦合等离子体杀灭枯草杆菌黑色变种芽孢的  $D_{10}$  值为 2.2 s;而功率加大到 500 W 时,  $D_{10}$  值降为 0.3 s。

Nelson 等比较了用不同功率激发氧气产生的等离子体效果。完全杀灭枯草杆菌黑色变种芽孢(ATCC 9372),200 W 功率时只需 5 min;50 W 功率时则需 60 min。

等离子体的价电子处于高能轨道成为激发态,空间弛豫时间很短( $10^{-10} \sim 10^{-2}$  s)。因此,必须加高能量才能产生高浓度等离子体,也才能使等离子体浓度得以维持。

## 三、微生物的种类

Nelson 等报告,用 50 W 功率激发  $O_2$  产生的等离子体达灭菌效果,对枯草杆菌黑色变种芽孢(ATCC 9372)需 60 min,对梭状杆菌芽孢仅需 30 min。

Hurry 等(1998)报告,在特制的 DECR 等离子体反应器中,4 种细菌芽孢对  $O_2$  产生的等离子体的抗力有差异。其中,嗜热脂肪杆菌芽孢最弱,枯草杆菌芽孢稍强,短小杆菌芽孢和蜡样杆菌芽孢抗力居中且相近。

Willian 等则建议用嗜热脂肪杆菌芽孢作为  $H_2O_2$  与过氧乙酸等离子体灭菌效果评价的指标菌(同时建议以枯草杆菌芽孢作环氧乙烷的指标菌)。

Hollel 等报告,短小杆菌芽孢,嗜热脂肪杆菌芽孢和枯草杆菌芽孢对  $H_2O_2$  等离子体的抗力不一致。

## 四、物体表面细菌芽孢的密度

Hurry(1998)等研究了表面芽孢密度对  $CO_2$  等离子体灭活枯草杆菌芽孢动力学的影响。结果表明,污染的芽孢菌总数虽然相同,但表面芽孢密度越低,杀灭效果越高。从 0~5 min,表

面芽孢密度不同的两条线的斜率大小相近,密度大者 D 值为 6 min,密度小者 D 值为 3 min;作用 10 min 后,杀灭率波动在 2 lg10~3 lg10 之间;作用 30 min,两条曲线呈平行走势,斜率更小,D 值为 40 min。作者认为,表面芽孢密度越大,对其下层芽孢的屏蔽作用越强,致使等离子体杀菌速率减慢。

五、温度

对等离子体灭菌来说,操作时的温度也是一个应严格控制的参数。Hurry 等报告了温度对 CO<sub>2</sub> 等离子体灭活枯草杆菌芽孢动力学的影响。15℃时,杀灭效果最差;60℃时,杀灭效果最好;-15℃时,效果居中。

六、有机物和无机物

Willian 报告,有机物(蛋白、血)和无机物(尤其是盐)对等离子体灭菌效果都有显著影响。当载体不含盐或血清时,绝大多数低温灭菌技术包括等离子体灭菌都能使微生物减少 6 lg10。但是,当有盐或血清存在时,所有低温灭菌技术都不能使微生物全部灭活(表 6-3)。

表 6-3 等离子体和其他低温灭菌技术灭菌效果的比较

灭菌条件	EO (12/88)	EO (100%)	EO - HCFC	Sterrad 100	Sterrad 100 S	AbTox	Steris
无盐和血清	100%	100%	96%	100%	...	100%	...
0.65%盐和 1%血清	97%	60%	95%	37%	...	32%	...
内腔(长 125 cm × 宽 3 mm)							
无血清和盐	...	96%	96%	...	...	...	...
0.65%盐和 10%血清	44%	40%	49%	35%	...	6%	100%
内腔(40 cm 长)							
宽 3 mm	...	...	100%	95%	100%	...	8%
宽 2 mm	...	...	100%	93%	100%	...	...
宽 1 mm	...	...	100%	26%	100%	...	...
宽 3 mm*	...	...	100%	100%	100%	...	...

注: \* 为直的不锈钢管 EO:环氧乙烷 HCFC:氢氟氯烷

表 6-4 水处理样本对等离子体灭菌效果的影响

处理方法	处理后样本的细菌数(cfu/个)	灭菌率
未作处理	1.5 × 10 <sup>6</sup>	0/60
静止浸泡		
去离子水组	2.5 × 10 <sup>5</sup>	60/60
自来水组	8.6 × 10 <sup>4</sup>	60/60
(200 ppm 硬度)		
漱洗		
去离子水组	6.0 × 10 <sup>3</sup>	60/60
自来水组	2.8 × 10 <sup>3</sup>	60/60
(200 ppm 硬度)		

注: 灭菌器: Sterrad 100

他们进而观察了水处理染菌样本对等离子体灭菌率的影响。用含嗜热脂肪杆菌芽孢的组织培养基和 10% 胎牛血清污染不锈钢刀片,干燥后放入水中浸泡或漱洗 60 s,灭菌率由原 0/60 提高到 60/60。同时测得氯化铁的释放率 > 95%,盐结晶迅速溶解,从而消除了高浓度盐对等离子体灭菌效果的影响(表 6-4)。

## 第五节 等离子体灭菌的应用

耐热与耐湿物品用压力蒸汽灭菌,对热与湿敏感的物品要采用低温灭菌技术。环氧乙烷是常用的低温灭菌剂,目前最常采用 12% 环氧乙烷与 88% 氟利昂的混合气体。但是,1995 年 12 月在美国的 **Clean Air Act** 中规定将逐步取消氟利昂,原因是它严重破坏地球臭氧层。为此,FDA 批准了两个替代的混合气体,那就是 8.5% 环氧乙烷和 91.5%  $\text{CO}_2$  以及 8.6% 环氧乙烷和 91.4% 氢化氟利昂。氢化氟利昂虽然对地球臭氧层的破坏为氟利昂的 1/50,但价格较贵,且美国环境保护署规定到 2030 年停止生产。然而环氧乙烷灭菌技术中最根本的问题还在于环氧乙烷具有致癌与致过敏作用。到目前为止,美国 FDA 还批准了两个低温灭菌技术,即过氧乙酸浸泡和等离子体灭菌。过氧乙酸浸泡(在 **Seeris System 1** 中进行)的缺点是,它不能长期贮存,且与一些材料如铝不相容,生物指示剂不适用于常规监测,一个灭菌周期只能处理一个内窥镜和少量器械。

等离子体灭菌是低温灭菌技术家族中的新成员。它可用于内窥镜,各种医疗器械,某些陶瓷和玻璃制品及其他畏热器材的处理,甚至用于外科使用的电线、电极和电池等的灭菌处理。

等离子体可用于体内植入物、一些人工器官和心脏外科材料的灭菌处理。**Goldman** 等用  $\gamma$  照射和过氧化氢等离子体对全关节置换术(**UHMWPE**)中连接软骨的替代物进行灭菌处理。结果, $\gamma$  照射使其密度增高,对疲劳损害和环状磨损的抵抗力降低;等离子体不仅未使其密度改变,而且使其抗疲劳损害与抗环状磨损的能力增强。因此,作者建议用 **Sterrad** 等离子体灭菌代替  $\gamma$  照射处理 **UHMWPE** 所用的替代物。

体内植入装置由多聚体材料制成。**Gogolewski** 等以 100 W 功率激发  $\text{O}_2$  与  $\text{CO}_2$  产生的等离子体,作用 15 min 可使三种不同立体构型(L.D./DL)的多聚体全部达到灭菌。多聚体的分子量虽有增大,但变化无显著差异,而它们的融解温度与结晶性都无改变。但多聚体的融解温度表面比内部有所降低。研究者认为低温  $\text{O}_2$  与  $\text{CO}_2$  等离子体可替代环氧乙烷对多聚体制成的装置进行灭菌处理。

等离子体不能用于处理植物纤维素制品(如棉布、亚麻布、纸),不能用于处理尼龙和聚酯纤维制品,不能处理液体,也不能用于处理有长 40 cm 以上,直径 3 mm 以下内腔的内窥镜或医疗器具。它不能使血清与盐污染的医疗用品达到灭菌。不适用于必须在灭菌后清洗的器具。被处理物品要用特殊材料(聚丙烯等)包装并放在特制的盘子内。金属物品不能与灭菌腔侧壁接触,否则灭菌作用将受到干扰。

**Adler** 等对等离子体、环氧乙烷和甲醛三种灭菌技术单次处理的实际费用进行了比较。如果不考虑等离子体灭菌处理用时短和周转速度快,所花费用环氧乙烷 > 等离子体 > 甲醛。作者进而对三种灭菌技术分别处理 5 组器具(一次性用品,电子产品、内窥镜、锋利器械、常规器械)的花费进行了比较研究。结果,由于等离子体用时最少,需要预处理和后处理的器具很少,因此所花费用环氧乙烷 > 甲醛 > 等离子体。处理一个灭菌单位(30 cm × 30 cm × 60 cm)的费

用,等离子体较环氧乙烷低 7.0 德国马克。

## 第六节 展望

1. 一个理想的低温灭菌技术应具有以下特点 广谱杀菌,速效,穿透性强,不损害物品,无毒性,效果受有机物和盐影响不明显,实用性强,可操作性强,成本可行。以此衡量,等离子体灭菌也不是一个十分理想的技术。器械设计制造产生的难点(内腔直径 $< 3\text{ mm}$ ,长 $> 40\text{ cm}$ ,有盲端或尖角等)和有机物(血清与蛋白质)与无机物(盐)的污染同样给等离子体灭菌提出了严重的挑战,使之欲达而不能。尽管如此,等离子体灭菌在某些方面完全可以替代环氧乙烷。在环氧乙烷因其自身问题,使用越来越受限甚至可能被淘汰的情况下,等离子体灭菌技术的价值也就越来越大。

2. 对等离子体灭菌技术应作深入研究,主要方面应包括 ①不同激发源与基础气体产生的等离子体成分不一,同种成分的浓度也可能不一,因此,杀微生物效果和机理以及影响因素就会有差别。对每一种等离子体进行灭菌动力学和灭菌参数的深入研究很有必要。②究竟哪种细菌芽孢对等离子体的抗力最强,各家说法不一,也未见系统研究报告。当然也可能不同等离子体的抗力最强菌不一致,为了更好地了解等离子体对芽孢结构的作用机制和决定有关的生物指示剂,需要就细菌芽孢对等离子体的抗力进行深入的研究。③怎样克服等离子体灭菌的两个难点,更是需要深入研究的问题。

(沈德林)

## 第七章 过滤除菌

过滤除菌是利用直接截留(包括筛孔截留和毛细管截留等)、静电吸附、惯性撞击、扩散沉积和重力沉降等物理阻留法去除液体、固体或气体等悬浮介质中的微生物或其悬浮杂质与尘埃粒子,使介质达到无菌要求或减少悬浮介质中微生物,使达无害化的处理方法。对悬浮介质中微生物过滤除菌与其他理化消毒因子对微生物的灭菌含意不同,灭菌指将微生物体完全杀死,死亡的微生物可能仍悬浮于介质中,而过滤除菌是将微生物从悬浮介质中去除,但微生物不一定被杀死。

由于应用过滤除菌技术去除悬浮介质中的微生物时,介质必须通过过滤除菌装置,经由物理截留等多种方式将其中的微生物滤除,所以过滤除菌技术用于液体介质时,可对水或其他溶液进行消毒或无菌处理,但微孔薄膜滤器不能用于混悬液、乳剂和油质液体等的消毒与灭菌。用于气体介质时,可对空气进行净化或无菌处理,但气体介质中尘埃粒子浓度不可过高,否则可能因尘埃堵塞滤器而影响除菌效果。

### 第一节 过滤除菌设备与方法

#### 一、硅藻土滤器和素陶瓷滤器

硅藻土滤器(Berkefeld filter)是以含硅石( $\text{SiO}_2$ )的硅藻土(diatomaceous earth)为原料煅烧制成,质地较软。在1891年,由德国的Carl Nortmeyer研制成功,在美国称之为Mandler滤器。素陶瓷滤器(unglazed ceramic filters)是1884年由法国的Chamberland首次研制成功,亦称Chamberland滤器,由瓷土(kaolin)与白陶土烧结而成,质地较硬。

这两类滤器的制造原料不同,但其性质与功能相似。有盘状与柱状两类,柱状滤器中空,细长似烛,又称滤烛(candle filter)(图7-1A)。

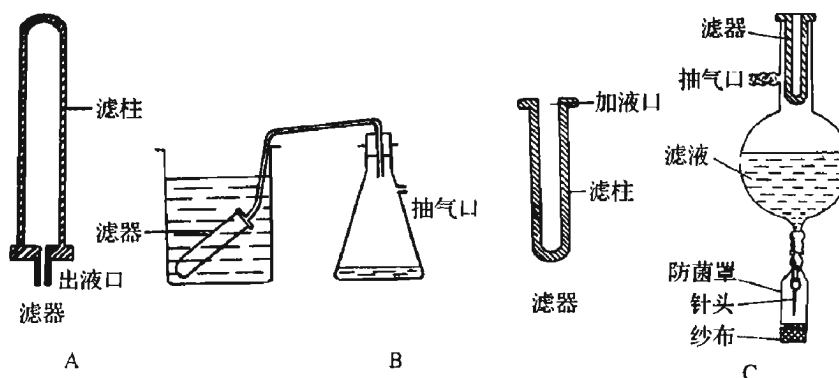


图 7-1 柱状素陶瓷滤器及其过滤装置

硅藻土滤器壁厚一般为 6~12 mm,按孔径大小分为 3 种规格,粗滤器(V),孔径为 8~12  $\mu\text{m}$ ;中滤器(N),孔径为 5~7  $\mu\text{m}$ ;细滤器(W),孔径为 2~3  $\mu\text{m}$ 。

素陶瓷滤器壁厚一般为 3~5 mm,按孔径大小分为多种规格,常以  $L_1$ 、 $L_2$ 、 $L_3$ 、 $L_5$ 、 $L_7$ 、 $L_9$ 、 $L_{11}$  和  $L_{13}$  编号。其中以  $L_1$  的孔径最大, $L_{13}$  的孔径最小。 $L_1$ 、 $L_2$  和  $L_3$  依次相当于硅藻土滤器粗滤器、中滤器和细滤器, $L_5$  孔径为 1.5~1.7  $\mu\text{m}$ , $L_7$  孔径小于 1.3  $\mu\text{m}$ 。

新滤器在使用前,用清水浸泡 12~24 h,除去滤器内的空气,在 1.5~1.8  $\text{kg}/\text{cm}^2$  的压力下冲洗滤器内外,除去尘埃颗粒,并做气泡试验,测定滤器性能是否合乎要求,最后,将滤器接到抽气机上抽气过滤,除去滤器中的水和其他固体颗粒,置 30~40  $^{\circ}\text{C}$  的温度下干燥,灭菌后备用。

过滤除菌时,将滤器与抽气装置和溶液收集容器连接(图 7-1B,7-1C),先用少量新制备的蒸馏水加到滤器中,抽气过滤,检验是否工作正常,而后再过滤需要消毒的液体。

过滤除菌完成后,及时用软刷洗滤器外层,用清水在 1.5~1.8  $\text{kg}/\text{cm}^2$  的压力下反向冲洗滤器,直到流出的水清洁通畅。然后用 1%碳酸钠水溶液煮沸 30 min,再用蒸馏水煮沸 30 min 或用 pH 8.5 的胰蛋白酶溶液浸泡过夜(40 $^{\circ}\text{C}$ ),再用蒸馏水抽滤 5 min,去除残存的胰蛋白酶及其他物质,冲洗至流出液体的 pH 达中性,置 30~40 $^{\circ}\text{C}$  的温度下干燥,灭菌后备用。

硅藻土滤器和素陶瓷滤器主要用于饮用水的消毒。

二、石棉板滤器

石棉板(fibrous pad)滤器亦称 Zeitz 滤器(Zeitz filter),是由石棉纤维、硼化硅酸盐玻璃纤维、聚酯纤维或醋酸纤维等,在适宜的温度下压制而成,可依据需要制成直径大小不同的过滤板。过滤板质地上层疏松,下层致密。使用时不可倒置。

石棉板滤器按孔径大小可分为  $K_1$ 、 $K_3$ 、 $K_5$ 、 $K_7$ 、 $K_{10}$  和 EK 等不同规格,其孔径分别为 7  $\mu\text{m}$ 、5~6  $\mu\text{m}$ 、4~5  $\mu\text{m}$ 、3  $\mu\text{m}$ 、2  $\mu\text{m}$  和 1  $\mu\text{m}$ ,另外还有编号为  $S_1$  和  $S_2$  的滤器,其孔径分别为 0.3~0.5  $\mu\text{m}$  和 0.1  $\mu\text{m}$ 。不同孔径的滤器流量各有差异(表 7-1)。EK、 $S_1$  和  $S_2$  可用于水或其他液体的消毒与灭菌,而其他各种规格的滤器则仅用于水的卫生洁治。

使用前,应对石棉板滤器进行压力蒸汽灭菌或干热灭菌处理。过滤时,先用无菌蒸馏水浸润,再过滤需要消毒或灭菌的液体。使用后须经消毒或灭菌处理再丢弃。

近年来发现,石棉板滤器在使用时常有微细纤维脱落,导致中毒危险,因此美国食品药品监督管理局(FDA)已禁止在制药工业中使用该类滤器。

三、烧结玻璃滤器

烧结玻璃滤器(sintered glass filters)由德国(Schott u Gen 厂)在 1924 年发明,该滤器的过滤

表 7-1 石棉板滤器的孔径与流量

孔径( $\mu\text{m}$ )	流量( $\text{ml}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{min}$ )
5	9.50
3~4	6.79
2	3.38
1~2	2.71
1	2.04
0.5	1.02
0.1	0.67



板应用硬质纯玻璃粉末烧结而成。使用时，将过滤板固定在玻璃漏斗上，组装成烧结玻璃滤器过滤装置(图 7-2)。

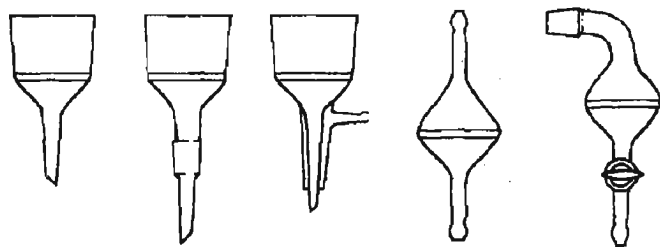


图 7-2 烧结玻璃滤器过滤装置

烧结玻璃滤器的型号各厂不一,一般以孔径大小分型,常以 G 编号(表 7-2),其中孔径为 1.5~2.5  $\mu\text{m}$  和 <1.5  $\mu\text{m}$  的 G<sub>5</sub> 与 G<sub>6</sub> 型可用于过滤除菌。另外还有棒状烧结玻璃砂滤器(滤烛式)等不同形状,型号也不一致,其中 110 型可用于过滤除菌。

烧结玻璃滤器可反复使用。使用前,应对烧结玻璃滤器进行压力蒸汽灭菌或干热灭菌处理;使用后,用蒸馏水反向通过滤板进行清洗或先用 1% 碳酸氢钠水溶液浸泡,再放到稀盐酸中,使碳酸氢钠与盐酸反应产生二氧化碳气体,将粘附于微孔内的颗粒带出,最后用蒸馏水冲洗干净。本类滤器不可放于硫酸和重铬酸钾清洗液中处理,否则铬酸酐易吸附在过滤板的玻璃颗粒上。

表 7-2 烧结玻璃滤器的型号与孔径

滤器型号	孔径( $\mu\text{m}$ )
G <sub>1</sub>	20~30
G <sub>2</sub>	10~15
G <sub>3</sub>	4.5~9
G <sub>4</sub>	3~4
G <sub>5</sub>	1.5~2.5
G <sub>6</sub>	$\leq 1.5$

四、烧结金属滤器

烧结金属滤器(sintered metal filters)是应用金属微粒烧结制成的多孔金属薄板。如青铜、铜镍合金、不锈钢和银等都可制成烧结金属滤器,其中烧结银滤器有较好的除菌作用。由于该类滤器制造困难,目前较少应用。

五、薄膜滤器

薄膜滤器(membrane filters)是将纤维滤膜固定于过滤漏斗或其他特制金属框架内构成的过滤装置。

最早应用的薄膜滤器的滤膜是植物纤维素薄膜,由 Zsigmondy 和 Bachmann 于 1918 年首先研制成功,但直到 20 世纪 60 年代才得以广泛应用。薄膜滤器的滤膜主要用纤维素酯、高分子聚合物和尼龙材料以及多聚碳酸盐和氟化碳等材料,应用胶化和浇铸法、放射腐蚀法和膨胀伸展等技术制成。其孔径大的有 14  $\mu\text{m}$ ,小的可达 0.05  $\mu\text{m}$ ,孔径小于 0.22  $\mu\text{m}$  者可用于灭菌处理,孔径小于 0.45  $\mu\text{m}$  者可用于过滤消毒。

## 六、滤材滤器

滤材滤器是由各种纤维,包括植物纤维、玻璃纤维、石棉纤维、玻璃棉、矿渣棉、过氯乙烯纤维以及活性炭等材料为原料制成的滤材与其固定装置组成的除菌设备。固定装置多为金属或塑料或其他复合材料结构,常见的形式有平面结构、反复折叠的波状结构和多种不同除菌效率的滤材叠加而成的复合结构。

滤材滤器的除菌效率取决于滤材的性能、质地松紧和纤维的粗细,超级玻璃纤维、矿渣棉和过氯乙烯纤维除菌效率较高,质地紧直径细的纤维除菌效果好。用于过滤的纤维直径可小于  $1\text{ }\mu\text{m}$ 。按照滤材滤器的过滤效率(即在额定流量或风量下,过滤前后空气中含尘埃或微生物粒子浓度之比的百分数),可将滤器分为五级(表 7-3)。

滤材滤器主要用于气体介质中微生物的去除。

表 7-3 过滤器的分类和性能要求

分 类	滤 材	通过尘埃或微生物 粒子最大值( $\mu\text{m}$ )	过滤效率 (%)	初阻力 (Pa)
低效过滤器	动植物纤维与合成 纤维	$\geq 5.0$	20 ~ 80	$\leq 50$
中效过滤器	玻璃纤维、纸浆与 泡沫塑料	$\geq 1.0$	60 ~ 90	$\leq 80$
亚高效过滤器	玻璃棉、高级纸浆 和石棉纤维	$\geq 0.5$	70 ~ 99.9	$\leq 120$
高效过滤器	玻璃棉与矿渣棉	$\geq 0.3$	99.9	$\leq 250$
超高效过滤器	超级玻璃纤维、矿渣 棉和过氯乙烯纤维	$\geq 0.1$	99.999	250

## 七、电气积尘过滤除菌装置

电气积尘过滤除菌装置是由风量调节装置、高压静电吸附装置,低效过滤和高效过滤系统以及活性炭吸附材料等组成的复合除菌装置。可高效去除气体介质中的微生物及其尘埃粒子(粒径  $\leq 5\text{ }\mu\text{m}$ )及微量异味。由电气积尘过滤除菌原理制造的空气净化装置对医院手术室空气的除菌效率可达 60% 以上。

## 八、滤料过滤池

滤料过滤池是由石英砂、无烟煤、磁铁矿、钛铁矿、金刚石和石榴石等颗粒滤料以及聚苯乙烯和聚氯乙烯等轻质滤料与滤料支持装置组成的水净化过滤池。主要用于水的净化,它利用滤料层的筛除、沉淀和接触凝聚作用,截留水中的悬浮杂质和微生物,包括细菌、病毒、寄生虫和蠕虫等,特别是阿米巴原虫包囊、兰氏贾第鞭毛虫包囊与隐孢子虫卵囊,它们对消毒剂的抵抗力较强,用于日常水消毒的消毒剂量很难将它们完全杀死,因此通过滤料过滤池截留是去除阿米巴原虫和兰氏贾第鞭毛虫包囊以及隐孢子虫卵囊的有效方法。

滤料过滤池的过滤除菌效率与滤料颗粒的配级、孔隙率、滤料层厚度、过滤速度和滤料过

滤池的类型有关。滤料颗粒的配级是指滤料中不同粒径颗粒所占的重量百分比。孔隙率则指过滤池中的滤料颗粒间空隙体积与滤料总体积的比值。孔隙率小,过滤效率好,但过滤速度慢,过滤周期短;孔隙率大,过滤速度快,滤池沉积悬浮杂质的能力强,使用周期长,但过滤效率低。滤料层应有一定的厚度,以便有足够的流经距离截留水中的悬浮杂质和微生物,滤料层厚度与滤料颗粒、过滤速度及水质的浊度有关,滤料颗粒大、过滤速度快、浊度高所需的滤料层厚度深。过滤速度指水体流动通过滤层整个水面的速度 ( m/h)。水流速度愈快,愈难将水中的悬浮杂质和微生物截留在滤料上。

过滤池有慢过滤池、普通快滤池、双层和三层滤料过滤池及接触三层滤料过滤池等多种类型。

慢过滤池多用石英砂 (如河砂、海砂或采矿场的砂) 等颗粒直径较小的滤料,滤床高度为 0.8~0.9 m,上层水高 1 m,过滤速度一般为 0.1~0.2 m/h,最大过滤速度不超过 0.6 m/h。简单、经济,净水效果好(表 7-4)。

普通快滤池采用粒径为 0.5~1.2 mm 的石英砂为滤料,滤料厚度为  $\geq 700$  mm,过滤速度一般为 8~10 m/h,最大过滤速度不超过 12 m/h。净水效果与慢过滤池相似。

双层滤料过滤池的滤料上层为无烟煤,下层为石英砂,由于无烟煤孔隙率较大,较粗的悬浮颗粒首先在无烟煤层中被截留,因而能提高石英砂层的过滤效率,在水质浊度相同时,双层滤料过滤池过滤速度比普通快滤池的过滤速度快。三层滤料过滤池的滤料中增加了重质磁铁矿砂滤料,其过滤效果更好。

接触三层滤料过滤池的结构与双层滤料过滤池相似,只是将混凝剂和助凝剂直接加入水中,在滤池中同时接触絮凝作用,水体过滤净化前不需经过混凝沉淀,对过滤前水的浊度适应范围大,不需沉淀设备,但过滤速度低,使用周期短。

另外对水的过滤除菌设备和方法还有压力过滤池法、虹吸滤池法等,可依据实际选择使用。

表 7-4 慢过滤池的净水效果

相关指标	净化效果
色度	降低 30%~100%
浊度	小于 1 度
大肠菌群	去除率 95%~100%
原虫包囊和寄生虫卵	去除率 99%~100%
有机物	降低 60%~75%
铁、锰和重金属	降低 30%~95%

第二节 过滤除菌机制

一、直接截留

直接截留 (direct interception) 指液体或气体介质流经滤器时,介质中的微生物被截留于滤材的微孔结构中或滤膜表面上,从而将介质中的微生物去除。素陶瓷滤器、硅藻土滤器、烧结金属与玻璃滤器中无数细小曲折重叠排列的网状纤维管状通道,可截留液体介质中的微生物或其他颗粒状杂质,这种截留亦称毛细管截留。气体介质中的微生物或其尘埃粒子可随气流运动碰撞于滤材滤器的纤维上被截留。该种结构的滤器不仅可截留体积大于滤材孔径的微生物,也可截留体积小于滤材孔径的微生物,但其过滤效率较低。

薄膜滤器的微孔结构犹如筛子,当液体介质通过滤器时,可将微生物截留于滤膜表面,这

种截留又叫筛孔截留。该种结构的滤器只能截留体积大于滤膜孔径的微生物。薄膜滤器用于液体中微生物的滤除可达灭菌要求。

## 二、静电吸附

静电吸附( **electrical attraction** )指液体或气体介质流经带有正电荷的滤器(如石棉纤维和过氯乙烯纤维滤材)时,带负电荷的微生物颗粒可被吸附于滤材表面,或流经由通电电极形成的静电磁场时,微生物或其尘埃粒子可感应带电,被异性电荷吸附而沉积于滤材表面,后者又称静电积尘除菌。石棉纤维和过氯乙烯纤维滤材的除菌作用都以静电吸附为主。其他各种滤材滤器也都具有静电吸附作用。

## 三、惯性撞击

惯性撞击( **inertial impaction** )指带有微生物或其尘埃粒子的气体介质流经滤材滤器时,由于气流的惯性力作用,当遇到滤材纤维的阻挡时,不能随气流改变运动方向,而是继续按原轨迹运动撞击于滤材纤维被截留。可经惯性撞击截留的微生物或其尘埃粒子一般其直径均大于  $1\ \mu\text{m}$

## 四、扩散沉积

扩散沉积( **diffusion sedimentation** )指液体或气体介质中小于  $1\ \mu\text{m}$  的微生物或其尘埃粒子,在其随机和不规则的布朗运动中,接触滤材表面而被粘附截留,而从介质中分离去除。其扩散沉积的效率取决于粒子的大小、粒子在介质中的密度、介质的流速及滤材的结构。对同种滤材,一般粒子直径小于  $0.2\ \mu\text{m}$  介质流速低而粒子密度高时,过滤效率高。

## 五、重力沉降

重力沉降( **gravitation attraction** )指在气体介质通过过滤纤维时,微生物或其尘埃粒子由于重力吸附而粘附于滤材上,而从介质中去除。

这些机制在一定条件下,哪些起主要作用,取决于介质的种类、流速、滤材的性质和粒子的特性。较大的微生物或其尘埃粒子可通过重力沉降和直接截留等被去除,较小的微生物或其尘埃粒子则主要通过扩散沉积、静电吸附或惯性撞击被截留。对液体介质中的微生物的去除,直接截流、扩散沉积和静电吸附起主要作用,对气体介质,一般情况下微生物都附着在尘埃粒子上,其颗粒直径大于  $1\ \mu\text{m}$ ,重力沉降、扩散沉积、静电吸附、惯性撞击和直接截流都起重要作用,应用亚高效和高效过滤器进行过滤可将大多数微生物或其尘埃粒子滤除,但对气体介质中的单个病毒颗粒较难滤除,应使用超高效过滤器等或滤器与其他综合措施进行处理。

# 第三节 过滤除菌的应用

过滤除菌技术已广泛用于生活饮用水和矿泉水的除菌与洁治,生物制药业用水、液体和固体药剂的无菌处理,医药工业、电子和核工业、医院病房与手术室、生物实验室和超净工作台等局部环境空气的净化与无菌处理,在保证饮水卫生、医药和生物制品、高精密度电子和核工业产品的质量、提高医疗护理与治疗水平、防止有害微生物污染环境和感染实验人员等许多方

面,都发挥了重要作用。

一、液体过滤除菌

滤料过滤池可用于自来水的前期处理,去除水中悬浮的杂质和微生物,但经过滤的水一般不宜直接饮用。应用素陶瓷滤器、硅藻土滤器、烧结玻璃滤器、石棉板滤器和微孔薄膜滤器等方法可过滤浊度较低( $< 15$ 度)的水体去除微生物,经过滤处理后可直接饮用。

使用微孔薄膜滤器,在医院和制药工业中,可对不能用热力和化学消毒剂消毒或灭菌处理的药剂用水、注射液、器官保存液、腹膜透析液、生物培养液、高营养液、抗生素、眼药水、放疗制剂、变态反应原提取物、疫苗、血清及血清制品、麻醉剂、类固醇、发酵溶液和某些诊疗性药物等进行消毒或灭菌。但微孔薄膜滤器不能用于混悬液、乳剂和油质液体等的无菌处理。

使用微孔薄膜滤器时,使用者应预知滤膜孔径(除菌用滤膜孔径不应大于  $0.22\ \mu\text{m}$ ),先检查微孔薄膜有无破损或皱折,然后将微孔薄膜正确安装在滤器筛板状衬垫处,进行压力蒸汽灭菌处理。压力蒸汽灭菌时,温度不得超过  $125^{\circ}\text{C}$ 。

表 7-5 滤膜孔径与流量	
孔径( $\mu\text{m}$ )	流量( $\text{ml}\cdot\text{cm}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$ )
0.30	40
0.22	21
0.10	2
0.05	1

过滤除菌操作应在无菌的密闭系统中进行,滤过的溶液应防止再污染。过滤时,保持适宜的流量(表 7-5),压力一般为  $1.0\sim 1.5\ \text{kg}/\text{cm}^2$ ,不宜过高。液体混浊时,可先用孔径较大的滤膜进行过滤处理,将大颗粒去除,以防滤膜堵塞。

微孔滤膜不可重复使用。每次过滤后,应先检查滤膜有无裂纹等破损现象,若有破损,应重新进行过滤除菌处理。用过的滤膜必须在进行消毒或灭菌处理后再丢弃。

二、固体物质的过滤除菌

微孔薄膜滤器用于固体物质的无菌处理时,先将易溶固体物质溶解到适当的溶剂中,经薄膜滤器过滤除菌,收集滤液,再将滤液中的溶剂经蒸发、真空或冰冻干燥去除。这一工艺常用于生物制品、抗生素等无菌药物与制剂的生产。但收集滤液和去除溶剂时,应防止再污染。

三、气体的过滤除菌

空气洁净是指对室内局部空间污染空气的净化处理,主要应用过滤除菌方式除去空气中的微生物粒子和其他各种尘埃粒子,以使局部空间的空气达到要求的洁净度。由过滤除菌装置及其安装场所组成洁净室、洁净工作台或其他空气洁净设备。空气洁净设备在医院有洁净手术室、洁净病房和洁净病床(又称洁净层流罩)等;在生物、医药及其他领域有洁净工作台、洁净实验室和洁净车间等。空气洁净设备可依据空气中尘埃与微生物粒子检出数分为不同的洁净度;洁净度级别的高低与室内局部空间内安装的滤材过滤效果高低及通风方式密切相关,因此可依据通风方式将空气洁净设备分为乱流式、矢流式和平行流式 3 类。

(一)空气洁净度的级别

空气中尘埃与微生物粒子检出数是空气洁净度分级的主要依据。按检出尘埃粒子(粒径  $\geq 0.5\ \mu\text{m}$ )数最大值可将空气洁净度分为 6 个级别,依次为 1 级( $0.035$  个/L)、10 级

(0.35个/L)、100级(3.5个/L)、1000级(35个/L)、10000级(350个/L)和100000级(3500个/L)。

美国宇航局制定了常用的3个洁净度级别空气中尘埃与微生物粒子数的标准(表7-6)。我国执行的是4级制标准(表7-7)。

表 7-6 不同级空气洁净度尘埃与生物粒子数的标准

级 别	尘埃粒子数(个/L)		生物粒子数 (个/m <sup>3</sup> )	微生物粒子落下的平均值	
	≥0.5μm	≥5μm		个/(m <sup>2</sup> ·周)	个/(φ90皿·h)
100	3.5	0.00	3.5	12 900	0.49
10 000	350	2.30	17.6	64 600	2.45
100 000	3 500	25.00	88.4	323 000	12.20

表 7-7 洁净室空气洁净度标准

级 别	尘埃粒子数(个/m <sup>3</sup> )		换气量(次/h)
	≥0.5 μm	≤5 μm	
100	≤3.5	0	200~600
1 000	≤35	0.25	50~70
10 000	≤350	2.50	30~40
100 000	≤3 500	25.00	20~30

(二)空气洁净室

空气洁净室使用高效或超高效滤材过滤器。按通风方式主要分为乱流式(又称湍流)、矢流式和平行流式(又称层流或单向流)。

1 乱流式 采用局部送风和局部排风方式,空气过滤器安装在室内一侧的上方或下方,将过滤除菌的洁净空气送入室内,排风口则对应开在室内另一侧的下方或上方。依靠气流的混合稀释作用,将室内污染空气逐渐排出,直至达到平衡。由于气流流向不平行,在室内便形成明显的湍流。乱流式洁净室使用滤器较少,通风量小,对污染空气的清除或置换时间较长,当换气次数达到一定界限时,室内空气的污染程度不会再有明显下降(表7-8)。其室内空气洁净度仅可达到1000级以下。

表 7-8 乱流式通风达到平衡时空气中微生物含量

滤器滤效(%)	通风达到平衡时空气中微生物含量(cfu/m <sup>3</sup> )		
	轻度污染	中度污染	重度污染
30	141.26	1 412.25	14 122.56
60	70.63	706.28	7 062.80
90	45.91	459.08	4 590.82
100	42.38	423.77	4 237.68

2. 矢流式 矢流式通风是乱流式通风和平行流式通风的过度形式,采用单侧局部送风方

式和双侧局部排风方式，空气过滤器安装在室内底部或顶部，经过过滤除菌的洁净空气由带弧形过滤器的送风口送入室内，室内污染空气则由上方或下方的两侧排风口排出（图 7-4）。所以气流在室内产生较少的湍流区，因而矢流式通风的洁净度可达到 100 级，但其通风量只有平行流式通风的一半。可在要求洁净度 100 级，但场所较小的环境使用。

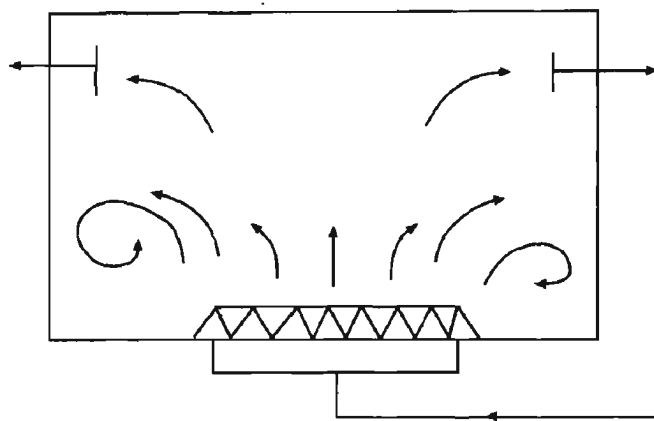


图 7-4 矢流式通风示意图

3. 平行流式 平行流式通风是由经过过滤除菌的新鲜空气将室内污染空气在整个断面上或自上而下(垂直式)或由一侧向另一侧(水平式)以相同的速度平行推向排风口,排出室外。

由于气流在室内一面整个断面上平行流动,几乎没有横向之间的混合,很少被稀释,没有湍流,也很难扩散,因而平行流式通风过滤除菌的洁净度可达到 100 级、10 级或更高级。

平行流式通风整个断面的气流平均速度垂直式一般大于  $0.25 \text{ m/s}$  水平式大于  $0.35 \text{ m/s}$ 。若以断面平均流速  $0.25 \sim 0.40 \text{ m/s}$  计,单位面积的送风量可达到  $900 \sim 1440 \text{ m}^3/\text{h}$ ,由此可知,对空间高度为  $2.5 \sim 3.0 \text{ m}$  的室内换气量可达  $300 \sim 600$  次/h。

由于平行流式通风滤器满布室内顶部或一侧侧面的整个断面,所需设备复杂,过滤除菌滤器须使用高效或超高效滤材,滤器的结构和滤材的均匀度要求高,每个过滤器的阻力都要均衡,造价高;运行中空气不能循环使用,由于通风量大,需要的空调能量较大,所以运行和维护费用高。另外由于过滤器满布面积大,垂直式通风时,不利于手术室无影灯的安装。因此只有在确实需要时才选用平行流通风方式。

使用空气洁净室时,应在装置高效或亚高效过滤器的洁净室或空气净化设备上安装中效或低效过滤器,以捕集粒径较大或浓度较高的尘埃,提高过滤除菌效果,延长过滤器的使用寿命。

避免滤器潮湿,以防增加阻力和凝并纤维,使微生物更易穿透。

室外进风口应远离污染环境和灰尘多的地方。过滤器使用一定时间后,应适时清除灰尘和消毒。

### (三)空气洁净工作台

空气洁净工作台主要由预滤器、高效滤材滤器、风机以及支架等组成。有水平流式和垂直流式两种。水平流式将过滤除菌的空气从操作者对面的整个断面平行流动,将污染空气推出,

可有效防止试验样品受到污染,但不能保护操作人员免受有害微生物的感染(图 7-5A)。水平流式空气洁净工作台通常使用高效滤材滤器,用于无菌样品或无有害微生物存在的样品,防止因操作而造成再污染,不能用于含有害微生物样品的操作。

垂直流式空气洁净工作台过滤除菌的空气从顶部的整个断面平行流动,将污染空气推出(图 7-5B)。垂直流式空气洁净工作台通常使用高效或超高效滤材滤器,可用于含有害微生物样品的操作。既能防止因操作而造成的再污染 又能保护操作人员免受有害微生物的感染。

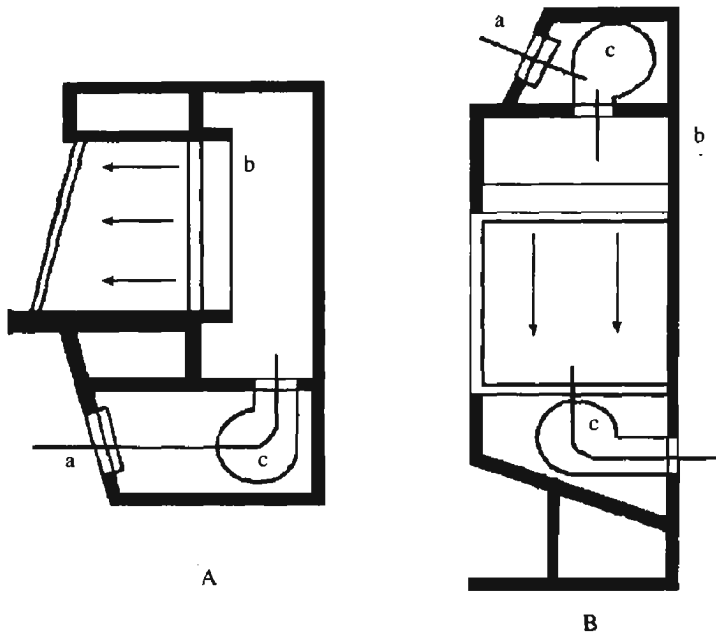


图 7-5 洁净工作台结构示意图

A:水平流式,B:垂直流式; a.预过滤装置;b.高效滤器;c.风扇

(四)洁净病床

洁净病床是医院为护理免疫力低下的肿瘤病人、白血病病人等而设计的局部空气净化装置。使用时,将室内空气经高效过滤器过滤,以平行流方式从四周透明的涤纶罩顶部送入洁净空气,从底部两侧排出污染空气,整个涤纶罩内空气的洁净度可达到 10 000级到 100 级。这种洁净装置大大缩小了洁净空间,设备简单,造价低,也很实用。

随着对空气洁净设备需要的增加,为适应不同场所的使用要求,近年来又研制出了隧道式洁净室等空气洁净设备。随着现代空气洁净技术的发展,各种局部净化装置将会得到更加广泛的应用。

(王太星)



## 参考文献

- 1 Denyer SP. Filtration sterilization .In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ, eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 2th ed. London, 1992:573 – 604
- 2 刘美玲. 手术室的感染管理. 见: 刘振声, 金大鹏, 陈增辉. 医院感染管理学. 北京: 军事医学科学出版社, 2000:526 – 537
- 3 杨在昌, 李宏霞. 饮水卫生. 见: 蔡宏道. 现代环境卫生学. 北京: 人民卫生出版社, 1995:536 – 591
- 4 Proud DW, Sutton SV. Development of a universal diluting fluid for membrane filtration sterility. Appl Environ Microbiol, 1992; 58:1035 – 1038
- 5 Bembauer R, Walther J, Jung WK. Ultra – filtration of dialysis fluid obtain a sterile solution during hemodialysis. Blood Purif, 1990; 8:309 – 317
- 6 Sundarm S, Auriemma M, Howard G. Application of membrane filtration for removal of diminutive bioburden in pharmaceutical products and processes. J Pharm Sci Technol, 2000;53:186 – 201
- 7 《消毒杀虫灭鼠手册》编写组. 消毒杀虫灭鼠手册. 北京: 人民卫生出版社, 1980:43 – 63

## 第八章 常用化学消毒剂

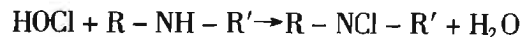
在卫生防疫中,利用药物杀灭病原微生物的方法叫做化学消毒法,所用药物称为化学消毒剂。有的化学消毒剂杀灭微生物的能力较强,可以达到灭菌,又称为灭菌剂。按化学成分与性质,可将常用化学消毒剂分为 8 类:①含氯消毒剂;②过氧化物类消毒剂;③醛类消毒剂;④杂环类气体消毒剂;⑤醇类消毒剂;⑥酚类消毒剂;⑦季铵盐类消毒剂;⑧其他类消毒剂。

化学消毒剂的使用方式多种多样,可归纳为三大类:第一,用消毒剂溶液浸泡、擦拭、喷洒或进行气溶胶喷雾。多数消毒剂都可采用此种方式。第二,用其气体或烟雾进行熏蒸。主要有杂环类气体消毒剂、甲醛、过氧乙酸以及含氯消毒剂。第三,直接用药物粉剂处理。主要为含氯消毒剂。方法的多样化为各种对象的消毒提供了有利条件。但在多数情况下,化学消毒效果不如热力消毒可靠,因此,多在不具备热力处理的条件时,或对不能用热力处理的物品,才选择合适的消毒剂,使用化学法消毒。

### 第一节 含氯消毒剂

通常,含氯消毒剂是指溶于水可产生次氯酸的消毒剂。本类消毒剂分为无机化合物类与有机化合物类。前者以次氯酸盐为主,杀菌作用较快,但性质不稳定;后者以氯胺类为主,性质稳定,但杀菌作用较慢。含氯消毒剂的杀菌机制为:

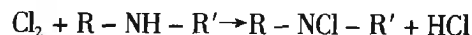
(1)形成的次氯酸作用于菌体蛋白质



(2)次氯酸分解形成新生态氧,二氧化氯的强氧化能力,将菌体蛋白质氧化



(3)消毒剂中含的有效氯直接作用于菌体蛋白质



本类消毒剂的作用多与有效氯含量成正比,因此,使用剂量一般按药物的有效氯含量计算。目前我国常用的含氯消毒剂有:漂白粉、三合二、次氯酸钠、二氧化氯、二氯异氰尿酸钠、二氯二甲基海因、三氯异氰尿酸与溴氯海因等。

#### 一、理化性状

##### (一)漂白粉

别名含氯石灰、氯化石灰。是一种混合物,主要成分为次氯酸钙〔 $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ 〕,另含氢氧化钙、碳酸钙与氯化钙等。为白色粉末,有氯的气味。能溶于水,溶液浑浊,有大量沉渣。其水溶液呈碱性,pH 随浓度增加而升高。含有效氯 25%~32%(g/g)。稳定性差,遇日光、热、潮湿等分解加快。对物品有漂白与腐蚀作用。

##### (二)三合二

化学名称为三次氯酸钙合二氢氧化钙〔 $3\text{Ca}(\text{OCl})_2 \cdot 2\text{Ca}(\text{OH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 〕。性质与漂白粉相

似。但是,有效氯含量比较高,达  $56\% \sim 60\%$  ( $\text{g/g}$ );较漂白粉稳定;溶液中杂质沉淀较漂白粉少。

### (三)次氯酸钠 ( $\text{NaOCl}$ )

别名高效漂白粉、次亚氯酸钠。纯品为白色粉末,通常为灰绿色结晶,在空气中不稳定。工业上将氯气通入氢氧化钠溶液中,制成白色次氯酸钠乳状液,含有效氯  $8\% \sim 12\%$  ( $\text{g/ml}$ )。小型发生器采用电解食盐水法制取次氯酸钠溶液,含有效氯约  $1\%$  ( $\text{g/ml}$ )。有氯的气味,能与水混溶。溶液呈碱性。乳状原液的  $\text{pH}$  值高达 12, 随水溶液稀释度增加,  $\text{pH}$  值可降至  $7 \sim 9$ 。性质不稳定,遇热分解加速。对物品有漂白与腐蚀作用。

### (四)氯化磷酸三钠

为含次氯酸钠的白色结晶( $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot \text{NaOCl} \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ),有微弱氯气味,含有效氯  $3\%$  ( $\text{g/g}$ )左右。易溶于水,溶液呈碱性。贮存中易吸水潮解,对物品有漂白作用。

### (五)二氧化氯 ( $\text{ClO}_2$ )

在常温下为气体,有强烈刺激性,可溶于水中。由于其气体易爆,难以用钢瓶压缩贮存,一般现制现用。常见有用亚氯酸钠与酸性活化剂(柠檬酸、盐酸等)配制二氧化氯的二元型包装制剂。

### (六)二氯异氰尿酸钠 ( $\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_2\text{Na}$ )

别名优氯净。为白色晶粉,有浓厚的氯气味,含有效氯  $60\% \sim 64.5\%$  ( $\text{g/g}$ )。性质稳定。易溶于水,溶解度为  $25\%$  ( $25^\circ\text{C}$ )。溶液呈弱酸性,其  $1\%$  水溶液的  $\text{pH}$  值为  $5.8 \sim 6.0$ , 浓度增高,  $\text{pH}$  值变化很小。溶于水中产生次氯酸,水溶液稳定性较差。

### (七)二氯二甲基海因 ( $\text{H}_6\text{C}_5\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$ )

别名二氯二甲基乙内酰脲。为白色粉末或颗粒,含有效氯  $60\% \sim 66\%$  ( $\text{g/g}$ )。性质较稳定。溶于水。对铜、铝等金属有一定腐蚀作用。

### (八)三氯异氰尿酸 ( $\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_3$ )

为白色晶粉,有较浓的氯气味,含有效氯  $\geq 89.7\%$  ( $\text{g/g}$ )。溶于水,但溶解度较低(溶解度为  $2\%$ )。溶液酸性,其  $1\%$  水溶液  $\text{pH}$   $2.7 \sim 2.9$ 。对金属有一定腐蚀作用。

### (九)氯溴二甲基乙内酰脲 ( $\text{H}_6\text{C}_5\text{N}_2\text{O}_2\text{ClBr}$ )

别名溴氯海因。为白色粉末,含有效氯约  $44\%$  ( $\text{g/g}$ )。性质较稳定。微溶于水。对金属有一定腐蚀作用。

## 二、杀菌作用

除二氧化氯外,其他含氯消毒剂溶于水中形成次氯酸,由之产生杀菌作用。漂白粉与三合二在溶液中形成次氯酸的多少与  $\text{pH}$  值有关,  $\text{pH}$  值愈低,次氯酸形成愈多。二氯异氰尿酸钠水解常数较高,杀菌能力较大多数其他氯胺类消毒剂为强。与次氯酸盐类消毒剂相比,在低浓度下二氯异氰尿酸钠作用较慢;在高浓度下,因其溶液可保持弱酸性,所以杀菌效果有时甚至可优于次氯酸盐类。二氯二甲基海因、溴氯海因、三氯异氰尿酸杀菌能力与二氯异氰尿酸钠相似。与上述含氯消毒剂(有效氯化化合价为正 1 价)相比,二氧化氯的氯为正 4 价,氧化能力更强,杀菌能力亦较强。

上述含氯消毒剂杀菌谱广,对细菌繁殖体、病毒、真菌孢子及细菌芽孢都有杀灭作用。

### 三、影响杀菌因素

#### (一)浓度与作用时间

一般规律是药物浓度愈高,作用时间愈久,杀菌效果愈好。但漂白粉与三合二药物浓度增高,其溶液 pH 值亦随之上升,有时反需延长作用时间才能灭菌。

#### (二)酸碱度

pH 值愈低,杀菌作用愈强。其原因在于,酸度愈大,二氧化氯活化率较高,杀菌能力较强;其他含氯消毒剂的杀菌作用主要依赖于溶液中未分解的次氯酸浓度,而溶液 pH 值愈低,则未分解的次氯酸愈多。随着 pH 值上升,愈来愈多的次氯酸分解成氢与次氯酸根离子,而失去杀菌作用。

#### (三)温度

温度增高可加强杀菌作用。但不能对次氯酸钠溶液加热,否则会导致其分解,使杀菌效果降低。

#### (四)有机物

有机物的存在可损耗有效氯,影响其杀菌作用。对低浓度消毒液的影响比较明显。例如,漂白粉杀灭蜡状杆菌芽孢,在水悬液中,1% (g/ml) 浓度药物作用 30 min 即可;加入 20% (ml/ml) 马血清后,需作用 60 min。淀粉、脂肪、醇类的影响较小(甲醇对次氯酸钠反而有增效作用),糖类中仅果糖的影响较大。但有机物对二氯异氰尿酸钠影响较小。

#### (五)还原性物质

硫代硫酸盐、亚铁盐、硫化物、含氨基化合物等还原性物质,亦可降低其杀菌作用。在消毒污水时应予以注意。

#### (六)水质的硬度

硬度小于 400 mg/L,对其杀菌作用影响不大。

### 四、应用

二氧化氯主要用于饮水消毒(5 ~ 10 mg/L)。若用于消毒器材,一般以含二氧化氯 1 000 ~ 3 200 mg/L 溶液浸泡 15 ~ 30 min。

其他含氯消毒剂对食具消毒,可用有效氯含量  $\geq 200$  mg/L 溶液(相当于 0.1% 漂白粉溶液或 0.05% 优氯净溶液)浸泡 30 ~ 60 min。消毒被结核杆菌或肝炎病毒污染的用具、墙壁、地面,采用含有效氯  $\geq 10\,000$  mg/L 的溶液(相当于 2.5% 优氯净溶液)浸泡用具 15 ~ 60 min,喷洒墙壁、地面后作用 1 ~ 2 h;消毒被细菌芽孢污染者,采用含有效氯  $\geq 20\,000$  mg/L 的溶液(相当于 5% 优氯净溶液)分别如上处理;消毒污染其他细菌繁殖体与病毒者,只需用含有效氯  $\geq 2\,000$  mg/L 的溶液如上处理。消毒排泄物,可用含有效氯  $\geq 20\,000$  mg/L 的溶液 2 份与 1 份排泄物混匀(对含水分较多的排泄物,可直接加干粉,漂白粉用量为排泄物的 1/5),一般肠道传染病患者排泄物作用 2 ~ 4 h,肝炎或肠结核者作用 6 h,肠道炭疽者应作用 12 h。

可将漂白粉或三合二加入福尔马林中,用产生的蒸气进行熏蒸消毒。用药比例为三合二 7 g 或漂白粉 8 g 对 8 ml 福尔马林。

将多聚甲醛干粉与二氯异氰尿酸钠干粉按 24:76 的比例混合,制成醛氯合剂,点燃后产生具有杀菌作用的气体。因两药相混后可逐渐反应而自燃,故应于临用前混合。在温度

18~20℃,相对湿度大于70%的条件下,用药量为3 g/m<sup>3</sup>,点燃后关闭门窗作用1 h,可杀灭室内表面细菌繁殖体99.90%以上。

将金属还原剂或酸性增效剂与高锰酸钾及二氯异氰尿酸钠干粉相混,可制成氯烟熏剂或酸氯烟熏剂,点燃后产生杀菌作用较强的气体。在温度18~20℃,相对湿度70%~80%的条件下,用药量为10 g/m<sup>3</sup>,点燃后关闭门窗作用1 h,氯烟熏剂的杀菌效果接近于多聚甲醛熏蒸消毒;酸氯烟熏剂的效果远比多聚甲醛为好,可将室内表面蜡状杆菌芽孢杀灭99.98%。在上述条件下,用酸氯烟熏剂1.5 g/m<sup>3</sup>作用1 h,即可将室内表面细菌繁殖体杀灭99.90%以上。

## 五、注意事项

1.配制溶液应先测定有效氯含量、二氧化氯浓度。例如,漂白粉有效氯含量不低于25%(g/g)时,配制5%(g/ml)漂白粉溶液的有效氯可 $\geq 10\,000\text{ mg/L}$ ;当其有效氯含量降至20%(g/g)时,则需配制6.25%(g/ml)漂白粉溶液方可。

2.消毒纺织品、金属制品时,使用浓度不宜过高,作用时间不宜过长;消毒后尽快用水清洗,去除残余药物,以减轻腐蚀与漂白。

3.室外小量使用,人应居于上风向;大量使用时,应戴防毒面具或口罩、橡胶手套,穿防护服或长靴与围裙。室内喷洒消毒,工作人员如停留较久,应戴防毒面具,其他人员需待充分通风后再进入。

4.药物应贮于密闭容器内,放置阴凉、干燥、通风处,以减少有效氯丧失与氯气积累。

5.稀释次氯酸钠应使用冷水,以免其受热分解。

## 第二节 过氧化物类消毒剂

过氧乙酸、过氧化氢与臭氧为国内常见的过氧化物类消毒剂。其中,过氧乙酸的杀菌能力最强,使用最广泛。

### 一、理化性状

#### (一)过氧乙酸( $\text{CH}_3\text{COOOH}$ )

别名为过醋酸。为混合水溶液,主要成分是过氧乙酸,另含过氧化氢、醋酸、硫酸等。属氧化剂,呈无色透明液体,具弱酸性,有刺激性酸味。易挥发,可溶于水与乙醇等有机溶剂。熔点0.1℃,沸点110℃,比重为1.226。腐蚀性强,有漂白作用。性质不稳定,遇热或有机物、重金属离子、强碱等易分解。含量>45%(g/ml)的高浓度溶液,经剧烈碰撞或加热可爆炸(闪点40℃)。我国市售消毒用过氧乙酸浓度多在20%(g/ml)左右,一般无此危险。

#### (二)过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

别名双氧水。属氧化剂,为无色、几乎无臭的水溶液,具弱酸性。有漂白作用,对金属有轻度腐蚀作用。遇光、有机物、金属离子和碱易分解,在水中可分解为水及氧。遇还原剂,其具氧化作用;遇比其更强的氧化剂,则起还原作用。市售多为不低于29%(g/ml)过氧化氢溶液。

#### (三)臭氧( $\text{O}_3$ )

别名三氧。属强氧化剂,常温下为带蓝色的爆炸性气体,有特殊臭味,比空气重。经冷压处理可成液体。其液体沸点为-112.3℃,比重为1.71。可溶于水。腐蚀性强,有漂白作用。

稳定性极差,常温下即可自行分解为氧,其在大气中常温下半衰期约为 16 min。

## 二、杀菌作用

过氧乙酸杀灭微生物首先是依靠其强大的氧化能力。通过氧化作用使酶失去活性,导致微生物死亡。此外,过氧乙酸亦具有酸的特性,可通过改变细胞内的 pH 而损伤微生物。因此,过氧乙酸杀菌作用远较一般的酸与过氧化物为强。

过氧乙酸的气体与溶液都有较强的杀菌作用,是一种高效灭菌剂。过氧乙酸溶液杀灭繁殖体型微生物需 0.01% ~ 0.5% 浓度作用 0.5 ~ 10 min;对肝炎病毒与结核杆菌需 0.5% 浓度作用 30 min;杀灭细菌芽孢则需 1% 浓度作用 5 min 左右。对肉毒杆菌毒素亦有较好的破坏作用。

过氧化氢可形成氧化能力很强的自由羟基,臭氧易释放出新生氧,过氧化氢与臭氧是依靠氧化作用破坏蛋白质结构而杀菌。3% 过氧化氢溶液可杀灭细菌繁殖体,高于 10% 过氧化氢溶液才能杀灭细菌芽孢。0.1 mg/L 臭氧作用 5 s 可杀灭水中大肠杆菌,对水中枯草杆菌芽孢需 59 ~ 728 mg/L 臭氧作用 30 ~ 90 min 才能全部杀灭。

## 三、影响杀菌因素

### (一)浓度与作用时间

杀菌作用随浓度的增加与作用时间的延长而加强。例如,过氧乙酸浓度系数为 1.0 ~ 2.3,即浓度减半,作用时间需延长为原来的 2 ~ 5 倍。

### (二)有机物

可降低其杀菌效果。对过氧乙酸杀灭细菌繁殖体的影响大于对其杀灭细菌芽孢的影响,如以 20% (ml/ml) 血清保护,前者所需药液浓度需增加 4 ~ 15 倍,后者仅 2 ~ 3 倍。

### (三)温度

温度低可减弱过氧乙酸与过氧化氢杀菌能力,但即使温度低至 -20℃,过氧乙酸仍有一定杀菌作用。温度低有利于臭氧溶于水,其杀菌效果较好。

### (四)还原性物质

溶液中加入 20% ~ 70% (ml/ml) 醇类可加强过氧乙酸杀菌作用 1 ~ 4 倍。其中以加入甲醇或异丙醇的效果较好。但包括醛在内的其他一些还原性物质可减弱此类消毒剂杀菌作用。

### (五)相对湿度

空气中的相对湿度对过氧乙酸蒸气与臭氧气体杀菌效果有影响。相对湿度在 40% ~ 80% 时,可有较明显的杀菌作用,其中以 80% 最好。相对湿度低至 20%,杀菌作用微弱,失去实用意义。

### (六)酸碱度

在溶液呈酸性时,杀菌作用较强。

## 四、应用

### (一)过氧乙酸

过氧乙酸溶液常用于浸泡、喷洒、擦抹、气溶胶喷雾等。所需纯过氧乙酸浓度或用量与作用时间见表 8-1,处理温度以室温 (15 ~ 25℃) 为准。配制好的稀释溶液放于有盖塑料容器内,

常温(15~25℃)下保存时间不宜超过 2 d。

在低温下消毒,必要时可在药液中加入乙醇或乙二醇防冻。不同温度下所需防冻剂浓度可见表 8-2。

表 8-1 过氧乙酸溶液消毒处理剂量

消毒对象	处理方法	过氧乙酸浓度	作用时间
皮肤表面	擦拭、浸洗(手)	0.2%	1~2 min
黏膜	含漱、滴眼	0.02%	...
服装	喷洒	0.1%~0.5%	30~60 min
	浸泡	0.04%	2 h
餐具	洗净浸泡	0.5%~1.0%	30~60 min
蔬菜、水果	洗净浸泡	0.2%	10~30 min
室内表面(芽孢)	气溶胶喷雾	2%(8 ml/m <sup>3</sup> )	30 min
污染表面	喷洒、擦拭	0.2%~1.0%	30~60 min
体温计	擦净浸泡	0.04%	2 h
	擦净浸泡	0.5%	15~30 min
去毛鸭(表面)	浸泡	0.2%	3 min
饮用水	加入搅匀	1 mg/L	30 min
	加入搅匀	10 mg/L	10 min
污水(含肠道菌)	加入搅匀	100 mg/L	1 h

表 8-2 不同防冻剂于不同温度下在过氧乙酸溶液中的用量

防冻剂	在过氧乙酸溶液中的含量(%, ml/ml)				
	0℃	-10℃	-20℃	-30℃	-40℃
乙二醇	5	25	36	45	53
乙醇	10	20	30	40	60

以气溶胶喷洒消毒室内时,先关闭门窗,以 JM-2 型喷雾器在固定点将过氧乙酸溶液喷成平均直径小于 30 μm 的细雾,待雾粒扩散并作用到规定时间再开窗通风。该处理既起喷洒消毒作用,亦起熏蒸作用,用药量较省。对细菌芽孢污染的表面,每立方米喷雾 2% 溶液 8 ml,作用 30 min(在 18℃ 以上的室温下),杀灭率可达 99.90%。

在室内进行普通喷雾消毒时,每立方米喷雾 0.5% 溶液 32 ml,关闭门窗作用,亦可兼收到熏蒸效果。

将过氧乙酸加水稀释成浓度为 5% 的溶液,盛于陶瓷或搪瓷容器中,加热使其蒸发,用于对密闭性较好的房间内污染表面的消毒。当室温在 20℃,相对湿度为 70%~90% 时,对细菌繁殖体用过氧乙酸 1 g/m<sup>3</sup>(相当于 5% 溶液 20 ml),熏蒸 60 min;对细菌芽孢用量为 3 g/m<sup>3</sup>,熏蒸 90 min。因其蒸气穿透能力较差,消毒处理时应为其创造接触物品的有利条件。加热蒸发药液时,如在室外不能控制热源,应在药液蒸发将完时,戴防毒面具进入,将火源熄灭,以免损坏容器。

## (二)过氧化氢

过氧化氢溶液可用于浸泡、喷洒、擦抹、气溶胶喷雾等。对物品消毒,可用 3% ~ 6% 过氧化氢溶液(约等于原液的 5 ~ 10 倍稀释液)浸泡 20 min 以上;对物品灭菌则需用 10% ~ 25% 过氧化氢溶液作用 1 h 以上。

## (三)臭氧

臭氧主要用于饮用水、工业与生活污水、室内空气的消毒。对饮用水,根据水质好坏,加臭氧 0.5 ~ 6.0 mg/L,作用 5 ~ 10 min。对污水,加臭氧 100 ~ 200 mg/L,作用 30 min 以上。消毒室内空气,对密闭性较好的房间用臭氧 5 ~ 10 mg/m<sup>3</sup> 作用 30 min 以上,30 mg/m<sup>3</sup> 作用 15 min 以上。

## 五、注意事项

1. 消毒液于用前以清洁水配制,配制时应先测定有效成分含量,按实际含量稀释。
2. 谨防高浓度药液溅到眼内或皮肤、衣服上,不慎溅及,应即时用水冲洗。消毒皮肤、黏膜的药液浓度要准确,不宜超过。
3. 金属器械与天然纤维纺织品经浸泡消毒后,应尽快用清水将药物冲洗干净,以防被腐蚀或漂白。
4. 药液应贮存于阴凉通风处。
5. 臭氧对人体有害,空气允许浓度为 0.2 mg/m<sup>3</sup>,消毒空气时人不宜在室内。

## 第三节 醛类消毒剂

常用的醛类消毒剂为甲醛与戊二醛。醛类消毒剂对微生物作用主要靠醛基。其作用于菌体蛋白(包括酶)的巯基、羟基、羧基、氨基,使之烷基化,引起蛋白质变性、凝固,造成微生物死亡。

### 一、理化性状

#### (一)甲醛(CH<sub>2</sub>O)

为无色、具有强烈刺激性气味的可燃气态。可溶于水、醇,易聚合,有还原性。用于消毒的是其 36% (g/g) 水溶液(通常称为福尔马林或甲醛水),或者白色粉末状聚合物(称为多聚甲醛)。

国产福尔马林含 10% ~ 12% 甲醇以防止聚合。有甲醛气味,在冷处久置会因部分聚合而浑浊,能与水、乙醇任意混溶,溶液呈酸性。

多聚甲醛含甲醛 91% ~ 99% (g/g),常温下不断分解放出甲醛气体,加热时分解加速,放出甲醛气体与少量水蒸气。难溶于水,但可溶于热水或碱溶液中。

#### (二)戊二醛[CHO(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>CHO]

纯品为无色油状液体,味苦,挥发性较低,挥发速度比水和乙醇慢。气味较小,有微弱的醛气味。易溶于水、乙醇和其他有机溶剂。溶液呈弱酸性。在 4℃ 时稳定,随着温度升高聚合速度加快。在酸性条件下相对稳定,随着溶液 pH 值增高,聚合速度加快, pH 值高于 9 时,可迅速聚合。



## 二、杀菌作用

甲醛、戊二醛的水溶液与气体皆可杀灭各型微生物，但杀灭细菌芽孢所需剂量较大。例如，甲醛水溶液对伤寒杆菌，用 0.2% 浓度作用 60 min，或 3% 浓度作用 5 min；对肉毒杆菌毒素与葡萄球菌肠毒素，用 5% 浓度作用 30 min；对结核杆菌，用 4% 浓度作用 5 min；灭活各种病毒，一般使用 0.05% ~ 5% 浓度作用 10 min；对细菌芽孢，则需用 8% 浓度作用 6 h，或 2% 浓度作用 32 h。再如，2% (g/ml) 碱性戊二醛水溶液作用 2 min 可杀灭细菌繁殖体，作用 5 min 可杀灭真菌与结核杆菌，作用 10 min 能灭活除乙型肝炎病毒外的其他病毒；但对细菌芽孢，则需作用 4 h 以上才能杀灭。甲醛气体亦是如此，使用浓度为 15 mg/L，作用 2 h 可杀灭细菌繁殖体，作用 12 h 才能杀灭细菌芽孢。

戊二醛杀菌作用较甲醛强 2~10 倍。

## 三、影响杀菌因素

### (一) 浓度与作用时间

溶液浓度较高，作用时间延长，杀菌作用较好。但甲醛溶液随着浓度增加，甲醛聚合亦愈多，待非聚合甲醛含量保持恒定后，浓度再增加，杀菌效果亦不再明显增长。戊二醛常用其 2% 碱性水溶液或异丙醇溶液，随其浓度下降，杀菌作用减弱。

### (二) 温度

温度增加，杀菌效果加强。对甲醛的影响更显著，用 5% 甲醛水溶液杀灭炭疽杆菌芽孢，在 20℃ 下需作用 32 h，在 37℃ 下则作用 90 min 即可。对戊二醛的影响较甲醛小，用 2% 碱性戊二醛水溶液杀灭炭疽杆菌芽孢，在 40℃ 下作用 2 min 的杀灭率与在 20℃ 下作用 15 min 时相同。

### (三) 有机物

蛋白质被甲醛凝固后，药液不易渗透，存于其深处的微生物因受到保护而不易杀灭。只有在有机物含量较高时，才对低浓度碱性戊二醛的杀菌作用有影响，即使菌悬液中存在 20% (ml/ml) 血清，对杀菌效果影响仍不大。

### (四) 酸碱度

对戊二醛的影响较大，在碱性情况下 (pH 7.5 ~ 8.5) 杀菌效果较好。

### (五) 相对湿度

对甲醛气体的杀菌效果有影响。相对湿度低于 60%，甲醛气体杀菌作用显著降低；在过饱和状态下，因纺织品吸水过多，影响甲醛气体的穿透。最适相对湿度为 70% ~ 90%。

### (六) 多孔性物品

可吸收甲醛气体，减少空气中甲醛的浓度。若多孔性物品过多，熏蒸消毒时应增加甲醛用量。

## 四、应用

### (一) 溶液的应用

多用于浸泡。所用甲醛溶液可以是水溶液、醇溶液或石油乳剂。25% 福尔马林水溶液可用于消毒体温计，在 20℃ 下需作用 10 min 以上。6% 福尔马林水溶液消毒器械，室温下浸泡 1 h。0.2% ~ 0.4% 福尔马林水溶液可用于疫苗中灭活病毒，灭活过的病毒仍保留抗原性。

0% 福尔马林水溶液加 0.5% 四硼酸盐,11% 福尔马林异丙醇溶液加 0.1% 硼砂与 1% 萘品醇,都可用以浸泡消毒金属器械,且后者可用于医疗器械灭菌。常用的还有 12.5% 福尔马林乙醇(75%)溶液 25℃ 下泡 24 h 可杀灭细菌芽孢,含 20% 甲醛的水(石)油乳剂(用于消毒毛毯)等。

消毒用的戊二醛有水溶液与醇溶液。2% 碱性戊二醛水溶液或醇溶液(用浓度为 70% 的异丙醇配制)的 pH 值为 7.5~8.5(用碳酸氢钠调整,其浓度约为 0.3%),可用于消毒或灭菌不宜加热处理的外科、泌尿科器械。通常浸泡 10~30 min 灭菌需浸泡 10 h)后,取出用无菌水漂洗干净。配制好的 2% 碱性戊二醛水溶液在 20℃ 室温下经 14 d 后,因其浓度降低,杀菌作用明显减退。酸性强化戊二醛是在 2% 戊二醛溶液中加入 0.25% 聚氧乙烯脂肪醇醚(或其他某些非离子型表面活性剂)作为强化剂配制而成。此类复方溶液仍保持酸性 pH 3.4),故较稳定,室温下贮存 18 个月,杀菌能力不减。另外,因复方有协同、增效作用,故杀菌能力与碱性戊二醛相似。高频超声波可增强复方的杀菌效果。酸性强化戊二醛经碳酸氢钠调整 pH 值至 7.0,即得中性戊二醛。中性戊二醛溶液稳定性比碱性溶液好,但不及酸性强化戊二醛,在室温下可反复使用 3 周;其对金属的腐蚀性比酸性强化戊二醛弱,仅对碳钢制品有一定损害。

(二)熏蒸处理

甲醛可用于在消毒间或密闭容器内对污染物品的消毒。由于其气体穿透性差,不能消毒用布纸、塑料膜包装好的物品。

可用下列方法产生甲醛气体:①加热福尔马林或多聚甲醛;②化学反应法,先将氧化剂(高锰酸钾、漂白粉或三合二)放入容器中,然后徐徐注入福尔马林,药物配比可参见表 8-3;③蒸气喷雾法,以蒸气(压力 2~3 kg/cm<sup>2</sup>)作动力,通过雾化器将福尔马林喷成气溶胶,使之扩散于空中蒸发气化。

表 8-3 甲醛熏蒸消毒间内物体表面消毒处理剂量

产生甲醛蒸气方法	微生物类型	使用药物与剂量	作用时间(h)
福尔马林加热法	细菌繁殖体	福尔马林 12.5~25 ml/m <sup>3</sup>	12~24
	细菌芽孢	福尔马林 25~50 ml/m <sup>3</sup>	12~24
福尔马林高锰酸钾法	细菌繁殖体	福尔马林 40 ml/m <sup>3</sup>	12~24
		高锰酸钾 30 g/m <sup>3</sup>	
福尔马林漂白粉法	细菌繁殖体	福尔马林 20 ml/m <sup>3</sup>	12
		漂白粉 20 g/m <sup>3</sup>	
福尔马林三合二法	细菌繁殖体	福尔马林 40 ml/m <sup>3</sup>	1
		三合二 35 g/m <sup>3</sup>	
	细菌芽孢	福尔马林 80 ml/m <sup>3</sup>	2
		三合二 70 g/m <sup>3</sup>	
多聚甲醛加热法	细菌芽孢	多聚甲醛 10~20 g/m <sup>3</sup>	12~24

注:温度为 18~20℃,相对湿度为 70%~90%

蒸气喷雾法只用于消毒间处理。消毒间可以是固定的建筑,也可以安设在特制的消毒车上

在消毒间内处理时,应充分暴露拟消毒物品的表面,并将相对湿度维持在 70%~90%,温

度应在 18℃以上。药物用量与作用时间随产生甲醛气体的方法、消毒的物品与微生物种类而异。以蒸气喷雾法产生甲醛蒸气处理皮毛服装时，根据微生物种类，福尔马林用量为 37 ~ 125 ml/m³,作用时间为 45 ~ 165 min 表 8-4)。

表 8-4 甲醛熏蒸消毒皮毛服装的处理剂量

微生物类型	温度(℃)	福尔马林用量(ml/m³)	作用时间(min)	挂衣密度(套/m²)
细菌繁殖体	58 ~ 59	37	45	5
	49 ~ 51	75	90	5
结核杆菌	58 ~ 59	50	120	5
	58 ~ 59	75	60	5
细菌芽孢	58 ~ 59	125	165	3
皮肤真菌	58 ~ 59	125	165	5

注:相对湿度为 70% ~ 90%

消毒后需驱散甲醛气味。一般多用自然通风，但因甲醛气体扩散能力差，需时较长。如急于排除其气味,可将 25%氨水加热蒸发或喷雾以中和之。氨水用量为所用福尔马林之半，中和作用时间为 30 min。

戊二醛气体亦可用于密闭空间内表面的熏蒸消毒，因其不易在物体表面聚合，故优于甲醛。有人用于消毒微生物安全操作箱,将浓度 10% 的溶液蒸发,用量为 1.06 ml/L,在室温下，相对湿度大于 75%时,作用过夜。

五、注意事项

- 1. 甲醛对人有一定毒性与刺激性，使用时应注意防护。戊二醛亦有一定毒性，避免吸入，若眼触及,应立即用水冲洗。用甲醛、戊二醛溶液消毒的外科器械,必须用无菌水充分冲洗后使用。
- 2. 温度、湿度对熏蒸处理的效果影响较大，处理时应保持在要求的范围内。
- 3. 熏蒸处理时,消毒物品间应有一定空隙,尽量将污染表面暴露在外面。

第四节 环氧乙烷

环氧乙烷( C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)为常用的杂环类气体消毒剂，常见的该类消毒剂还有环氧丙烷、乙型丙内酯等。这类化合物是通过对微生物蛋白质分子的烷基化作用，干扰酶的正常代谢而使微生物死亡。这类消毒剂的液体与气体都有杀菌作用，但大多作为气体消毒剂使用。

一、理化性状

别名氧化乙烯、氧丙环。液体无色透明，具乙醚气味，在 4℃时的比重为 0.89。沸点 10.8℃,只能灌装于特制安瓿,或耐压金属罐中。在 60℃时,蒸气压力为 5 kg/cm²。在常温常压下为气体,其气体易燃易爆,闪点< 0℃,空气中浓度达 3% 以上即有爆炸危险。环氧乙烷气体具有良好的扩散和穿透能力,可穿透玻璃纸、马粪纸、聚乙烯薄膜、聚氯乙烯薄膜以及薄层的

油和水等,对空气的比重为 **1.49(40℃)**。环氧乙烷液体与气体能溶于水、乙醇和乙醚,在水中与金属盐类反应,可生成金属氢氧化物,使溶液 **pH** 值升高。

环氧乙烷液体可溶解聚乙烯、聚氯乙烯;而其气体则对塑料无损坏,亦不损坏金属、棉毛、橡胶、合成纤维,但可损坏赛璐珞制品。

## 二、杀菌作用

对环氧乙烷抵抗力最差的是酵母菌和霉菌,最强的是细菌芽孢,细菌繁殖体与病毒介于其中。在细菌繁殖体中,金黄色葡萄球菌的抗力较大肠杆菌为强。环氧乙烷杀灭细菌芽孢与杀灭细菌繁殖体所需浓度的比值较低,一般在 **10** 以内。环氧乙烷气体熏蒸亦可破坏肉毒杆菌毒素。

环氧乙烷液体在 **1% ~ 5%** 浓度下作用数小时,可杀灭各种微生物。

环氧乙烷气体杀灭细菌芽孢所需时间随浓度而异。例如,在室温下 (**25℃**),浓度为 **88.4 mg/L** 时需作用 **24 h**,**442 mg/L** 时作用 **4 h**,**884 mg/L** 时作用 **2 h** 即可。

## 三、影响杀菌因素

### (一) 温度

温度升高可加强环氧乙烷的杀菌作用。

### (二) 浓度

浓度愈高,杀菌所需时间愈短。

### (三) 相对湿度

对熏蒸消毒效果影响很大,小型处理以 **30% ~ 50%** 为宜;对大型物品(容积超过 **0.15 m<sup>3</sup>**),要求的相对湿度较高,在 **60% ~ 80%**。过湿,因水解反应,可损耗环氧乙烷;过于干燥,有机物质形成硬壳,可妨碍环氧乙烷穿透,增加消毒的困难。

### (四) 物品性质

不同性质物品对环氧乙烷气体的杀菌作用亦有影响。纸、布等有孔材料消毒效果好,玻璃、金属等无孔材料较差。塑料、橡胶、水液等可吸收大量环氧乙烷,降低作用浓度,使杀菌效果下降。例如, **1 g** 橡胶在 **10%** 环氧乙烷气体中消毒后测定,可吸收环氧乙烷 **15.4 mg**。盐类晶体可保护其中的微生物不被环氧乙烷所作用。

## 四、应用

环氧乙烷沸点较低,在室温下即可气化。小型消毒使用的药量较小,可依靠自然蒸发。大型消毒使用药量较多,可加温促其蒸发。加温不得使用明火,只能用热水浴,温度不宜超过 **60℃**。

加温环氧乙烷铝罐或钢瓶时,应先将阀门打开后,再往水浴容器中徐徐倒入热水。给药完毕,应先将热水放掉或移走才关闭阀门。

### (一) 保温瓶消毒法

适用于室内温度较低时对小型物品的消毒处理,如小型精密仪器、医疗器械、敷料和橡胶手套等。在保温瓶中加入 **45℃** 热水至瓶的 **1/3 ~ 1/2** 处,将拟消毒物品与用双层布制小袋(层间絮以棉花)包好的环氧乙烷安瓿放入聚乙烯袋内(安瓿颈部保持向上),自袋外将安瓿颈掰

断,立即放入保温瓶内,盖上盖,让环氧乙烷自然气化,进行消毒。用药量为 1 ml/L(890 mg/L),作用 16~24 h。

#### (二)塑料袋消毒法

适用于对中、小型物资装备进行消毒,如服装、医疗用具、手术包、敷料、通讯器材、测绘仪器及文件等。塑料袋用 0.2~0.5 mm 厚聚氯乙烯膜制作,消毒时用由角铝与铁夹组成的铝夹并中间衬以橡胶条封袋口。将物品与盛有环氧乙烷的容器放入袋内,封好袋口,于室温( $>15^{\circ}\text{C}$ )下使环氧乙烷自然气化,进行消毒。用药量为 1.5 ml/L(1 335 mg/L),作用 16~24 h。

#### (三)丁基橡胶袋法

适用于快速消毒小型物品,特别是对外科手术器械与敷料进行灭菌。袋底部装有专用的通气小管,可与装环氧乙烷小型铝罐的出气口相连,以便在袋外给药。装入物品并扎好袋口后,由袋外给药(打开铝罐阀门后再用热水加热铝罐,促环氧乙烷气化),待袋鼓足时停止给药,隔 10 min 再如前给药一次。两次给药总量约为 2.5 g/L。在室温( $>20^{\circ}\text{C}$ )下作用 2 h。

#### (四)塑料篷幕消毒法

适用于大型物品的消毒。篷幕侧面开孔并装以固定的双向接头,外接环氧乙烷钢瓶,内接聚乙烯散药软管(内径 10 mm,管壁厚 4 mm 并每隔 30 cm 钻 1 个 3 mm 直径小孔,供铺于幕内均匀分散环氧乙烷气体)。堆放物品于幕内(行列间留适当空隙),安放散药软管、封闭幕口后,由幕外如丁基橡胶袋法给药。用药量为  $0.4\text{ kg/m}^3$  时,在环境温度  $>15^{\circ}\text{C}$  条件下作用 40~48 h;或以  $0.7\text{ kg/m}^3$ ,作用 20~24 h。

#### (五)消毒柜法

市售有大、小、小型环氧乙烷消毒柜,可控制柜内温度与相对湿度,适合经常性对大、中、小型物品的消毒处理。其环氧乙烷用量,控制柜内温度与湿度,作用时间等,参见产品说明书。在  $55\sim 60^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 60%~80% 的条件下,一般用 900~1 000 mg/L 药量,作用 6 h。

### 五、注意事项

1. 环氧乙烷易燃易爆,且有一定毒性,使用时必须注意安全。经环氧乙烷消毒的物品,必须将残留药物驱散后才能使用。
2. 给药前,应详细检查所用容器有无破裂漏气之处,如有则应修补或更换。给药后,亦应经常检查有无漏气处,以便及时采取措施,防止继续渗漏。
3. 消毒时,应注意环境温度与相对湿度,勿使超出规定范围。如果拟消毒物品的温度过低,应事先在消毒场所放置至接近环境温度,再进行消毒处理。
4. 环氧乙烷穿透性能好,但仍是有限的。因此,消毒时仍需尽量为其穿透创造条件。
5. 环氧乙烷不宜用于食品消毒。
6. 工作人员应事先熟悉环氧乙烷性能、使用方法及安全操作要求。

### 六、环氧乙烷消毒安全守则

环氧乙烷是一种易燃易爆并具有中等毒性的危险药品。为保证消毒的安全进行,除做好有关物资器材的准备外,工作人员应事先熟悉其性能与使用方法,认真按下列安全守则进行操作。

1. 贮存时,环氧乙烷瓶口必须关严。贮存场所应通风,防晒,温度低于  $40^{\circ}\text{C}$ ,不得有火源

或转动的马达。装有环氧乙烷的铝罐与安瓿不得放于电冰箱中。搬运时应轻拿轻放。

2. 消毒现场(大量使用时应在 30 ~ 50 m 内)不得有明火、变电设备、转动的马达及其他可产生火星的设备与操作。

3. 投药时,应徐徐打开钢瓶阀门,勿使药液突然喷出。钢瓶的出气口不得朝向人的面部。如不慎皮肤、黏膜或眼睛沾上环氧乙烷液体,应立即用水冲洗,防止烧伤。

4. 在消毒袋外打开安瓿时,事先应将安瓿置冰浴中 10 ~ 20 min。打开时,安瓿颈不得对向人脸。

5. 大规模消毒只能在室外或防爆建筑中进行。现场除防爆灯外,禁止使用其他电气设备,并设消防器材以防万一。

6. 加热装有环氧乙烷的容器,应在容器阀门打开后进行。加热不宜太猛。给药完毕,应先将热水放掉或移走,再关闭阀门。

7. 消毒过程中,严禁穿带钉鞋进入现场,以防摩擦产生火花,引起爆炸事故。经常用浸以加有适量酚酞的饱和硫代硫酸钠无色溶液(如呈浅红色,可加适量盐酸消除)的滤纸测消毒容器可疑部位,发现漏气(滤纸变为粉红色)应即修补。

8. 消毒终了,必须先打开门窗,再打开容器,排散环氧乙烷气体。室内环氧乙烷气味很浓时,除防爆灯外,绝不可开其他电灯照明。

9. 橡胶、塑料、有机玻璃等防护用品与医疗器械,消毒后必须通风散气,待环氧乙烷挥发后才可穿戴、使用。

10. 工作人员如发现头晕、恶心、呕吐等中毒症状,应立即离开现场至通风良好处休息。重者须及时送医疗部门进行治疗。

## 第五节 醇类消毒剂

常用的醇类消毒剂有乙醇、异丙醇。醇类消毒剂杀灭微生物依靠三种作用:①破坏蛋白质的肽键,使之变性;②侵入菌体细胞,解脱蛋白质表面的水膜,使之失去活性,引起微生物新陈代谢障碍;③溶菌作用。

### 一、理化性状

#### (一)乙醇( $C_2H_5OH$ )

别名酒精。医用乙醇浓度不低于 94.58%(ml/ml),为无色透明液体,易挥发,有辛辣味,易燃烧。其沸点为 78.5℃,闪点 9 ~ 11℃。与水能以任意比例混合。

变性酒精为乙醇中添加了有毒物质,如甲醇、甲醛、升汞等,使不能饮用,但可用于消毒,其效果与乙醇同。

#### (二)异丙醇( $CH_3CHOHCH_3$ )

别名 2-丙醇或第二丙醇。浓度不低于 98.5%,为无色透明可燃性液体,有类似丙酮、乙醇混合的气味,味微苦。沸点为 82.5℃,闪点 11.7℃。能与水、乙醇混合。

### 二、杀菌作用

乙醇对细菌繁殖体、病毒与真菌孢子有杀灭作用。革兰阳性菌较革兰阴性菌抗力略强。

对细菌芽孢无效。

60% ~ 70% 乙醇作用 5 min 可杀灭细菌繁殖体(包括结核杆菌)对病毒,因多包于蛋白质之中,需时较长(3 ~ 10 min),对乙型肝炎病毒效果尚有争论;对真菌孢子则需作用 30 ~ 60 min 之久。乙醇浓度低于 30% 时,对细菌繁殖体的杀灭亦需延长到数小时以至 1 d 以上。

异丙醇可杀灭细菌繁殖体、部分病毒与真菌孢子等,不能杀灭细菌芽孢。

### 三、影响杀菌因素

#### (一)浓度

杀菌需有一定量的水。浓度在 95% 以上的乙醇,一接触菌体便引起菌体表层蛋白质凝固,形成保护膜,阻碍乙醇分子继续渗入,而导致杀菌能力减弱。因此,稀释到一定程度,杀菌作用才能达到较好水平。过浓或过稀,杀菌作用都减弱。乙醇浓度为 65% ~ 80%,异丙醇浓度为 50% ~ 70% 较适合。

#### (二)有机物

醇可使蛋白质变性凝固形成保护层,影响杀菌作用,故不宜用于消毒被血、脓、粪便等污染的表面。

#### (三)温度

杀菌能力随温度升高而加强,但不如酚类、醛类明显。

### 四、应用

对细菌芽孢无杀灭作用,不能用于灭菌,只能用于消毒。

消毒时,一般用 75% 乙醇水溶液或 60% 异丙醇水溶液浸泡、涂擦,作用时间为 5 ~ 60 min。体温计在浸泡前先擦去黏液,手在浸泡前先用肥皂和水擦洗。

消毒结核患者的痰液,加 2 倍量的 95% 乙醇,作用 30 ~ 60 min。对于干燥的痰膜,则需用 70% 乙醇作用 30 min 以上,浓度高于 70%,效果反而不好。

乙醇、异丙醇亦可作为溶剂,加强碘、氯己定、戊二醛等消毒剂的作用。

### 五、注意事项

1. 不能用于外科器械灭菌。
2. 消毒前,尽量将物品表面沾附的有机物清除。
3. 不宜用于消毒涂有醇溶性涂料的表面。
4. 注意使用浓度,浸泡处理时,勿使物体带有过多水分。
5. 应放于有盖容器内,以免有效成分挥发。

## 第六节 酚类消毒剂

常用的酚类消毒剂有甲酚皂溶液,滴露消毒药水,其杀菌作用的机理有:①高浓度下可裂解并穿透细胞壁,与菌体蛋白结合,引起蛋白变性;②低浓度下,或较高分子的酚类衍生物可使细胞的主要酶系统(氧化酶、脱氢酶,催化酶等)失去活性,干扰了物质代谢;③减低溶液表面张力,酚类消毒剂积聚在菌体细胞上,增加细胞壁的渗透性,使菌体内含物逸出,改变了细胞蛋白

的胶质状态，致细菌死亡；④ 酚类易溶于细胞类脂体中，因而能积存在细胞中，其羟基与蛋白的氨基起反应，破坏细胞的功能。表面活性大的酚类消毒剂减低溶液表面张力作用较大，杀菌能力亦较强。衍生物中的某些烃基与卤素，有助于降低表面张力，并且卤素还可促进衍生物电离以增加溶液的酸性，因此，卤素与烃基的取代能增加其杀菌能力。卤素与烃基在对位上的化合物比邻位上的化合物杀菌能力强。

### 一、理化性状

#### （一）甲酚皂溶液( $C_6H_4OHCH_3$ )

别名煤酚皂溶液或来苏儿，是以三种甲酚异构体为主的煤焦油分馏物与肥皂配成的复方。我国市售的甲酚皂溶液含甲酚 48% ~ 52% (ml/ml)。其配方为：甲酚 500 ml，植物油 173 g，氢氧化钠 27 g，加蒸馏水至全容量为 1 000 ml。制取时，先以植物油与氢氧化钠制成肥皂，趁热加入甲酚与蒸馏水。得到的甲酚皂溶液为黄棕色至红棕色黏稠液体，有酚臭。沸点 191 ~ 201℃，熔点 30 ~ 36℃。可溶于水及醇中，溶液碱性，呈透明浅棕色。性质稳定，耐贮存。

#### （二）滴露消毒药水

是含对氯间二甲苯酚、表面活性剂、香料等成分的复方消毒剂溶液。原液含对氯间二甲苯酚 4.8% (ml/ml)，为黄色透明液体，具有皂酚气味。振摇时产生大量泡沫。可溶于水与醇中，溶液碱性。性质较稳定。

### 二、杀菌作用

可杀灭细菌繁殖体、真菌与某些种类的病毒(主要是亲脂性病毒)，常温下对细菌芽孢无杀灭作用。常用浓度可破坏肉毒杆菌毒素。

甲酚皂溶液中主要杀菌成分为甲酚，肥皂使甲酚易溶于水，并可降低表面张力。肥皂种类与用量对杀菌作用有影响。以椰子油脂脂肪酸肥皂最好，其次为豆油、蓖麻油脂皂，花生油脂脂肪酸或橄榄油肥皂较差。肥皂用量过多易使溶液碱性过大，从而使杀菌效果降低；用量过少，溶液在低温下不能保持透明和稳定。

### 三、影响杀菌因素

#### （一）浓度与作用时间

浓度愈高，作用时间愈长，杀菌效果愈好。

#### （二）有机物

可减弱其杀菌能力，但对较高分子量的酚类影响较小。相比之下，对从煤焦油中提取的其他高沸点酚类消毒剂影响较大，对甲酚皂溶液的影响较小。

#### （三）温度

升温可加速其杀菌作用，当由 20℃ 升至 40℃ 时，消毒时间可缩短一半。

#### （四）食盐

可加强其杀菌作用。

#### （五）酸碱度

酸可加强其杀菌作用。

#### （六）其他物质

乙醇、氯化铁、氯化亚铁可增强其杀菌能力；肥皂可降低表面张力，用量适当亦可增强杀菌



能力。因为硬水可使肥皂沉淀，所以用硬水配制的甲酚皂消毒液杀菌能力降低。

#### 四、应用

一般多用 1% ~ 5% 浓度的甲酚皂水溶液浸泡、喷洒或擦抹污染物体表面，作用 30 ~ 60 min。用 1.9% 滴露水溶液浸泡衣物。对结核杆菌，用 5% 浓度甲酚皂水溶液作用 1 ~ 2 h。

为加强杀菌作用，可将药液加热至 40 ~ 50℃。若用甲酚皂溶液浸泡金属器械，可加 1.5% ~ 2.0% 碳酸氢钠作防锈剂。

消毒皮肤，可用 1% ~ 2% 甲酚皂溶液浸泡。用 1% 浓度刷手 2 min，消毒效果优于肥皂流水洗手，但远不及 0.2% 过氧乙酸水溶液(表 8-5)。对伤口、皮肤亦可用 4.6% 滴露水溶液冲洗。

表 8-5 过氧乙酸、甲酚皂溶液和肥皂流水洗手的消毒效果

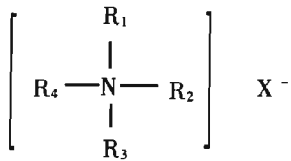
消毒剂	试验人次	对照平均菌数 (cfu/人)	洗后平均菌数 (cfu/人)	平均灭除率(%)
0.2% 过氧乙酸水溶液	86	94 287	2	99.99
1.0% 甲酚皂水溶液	23	31 270	258	99.17
肥皂 + 流水	41	23 717	370	98.44

#### 五、注意事项

1. 因此类消毒剂溶液毒性较大，气味易滞留，故不可用于消毒食物或食具。
2. 因甲酚皂溶液刺激性强，消毒皮肤所用浓度不能超过 2%，并且此类消毒剂溶液均勿用于消毒黏膜。
3. 配制甲酚皂水溶液勿使用硬度过高的水，否则应加大甲酚皂浓度。

### 第七节 季铵盐类消毒剂

季铵盐类消毒剂是一种阳离子表面活性剂，其结构通式为：



其中， $R_1 \sim R_4$  代表有机根，它们与氮原子结合成一阳离子基团，为杀菌的有效部分。 $X^-$  为一阴离子，如卤素、硫酸根或其他类似的阴离子。用作消毒剂的季铵盐，在  $R_1 \sim R_4$  中，一般有 1 ~ 2 个是碳链长达 8 ~ 18 的烷基(短于或长于此碳链者，杀菌能力差)。

本类消毒剂杀菌作用机理主要有：①改变细胞的渗透性，使菌体破裂；②使蛋白质变性；③抑制细菌体内某些酶(如脱氢酶、氧化酶以及分解葡萄糖、琥珀酸盐、丙酮酸盐的酶)，以致使之

失去活性;④因其有良好的表面活性,可高浓度聚集于菌体表面,影响细菌的新陈代谢。对酶的抑制,有的是可恢复的,由此可解释其抑菌作用。随着药物浓度增加或作用时间延长,这种可恢复性逐渐减弱,以致不可恢复。

由于季铵盐类消毒剂表面活性作用强,因此将之从菌体表面去除亦较难,一般得使用化学中和剂。由于忽略这种特性,往往在杀菌试验中导致错误结论。

我国市售的季铵盐类消毒剂有苯扎溴铵(新洁尔灭)、苯扎氯铵(洁尔灭)、百毒杀与新洁灵消毒精。

## 一、理化性状

### (一) 苯扎溴铵( $C_{22}H_{40}BrN$ )

为溴化二甲基苄基烃铵(别名十二烷基二甲基苯甲基溴化铵)的混合物。常温下为淡黄色胶状体,低温下形成蜡状固体;具有芳香气味(不纯者有令人不愉快的气味),极苦。易溶于水或乙醇,溶液澄明,呈碱性,振摇时产生大量泡沫,具有表面活性作用。耐光、耐热,性质较稳定,可长期贮存。

### (二) 苯扎氯铵( $C_{22}H_{40}ClN$ )

是氯化二甲基苄基烃铵的混合物。为白色蜡状固体或黄色胶状体;溶于水或乙醇,水溶液呈中性或弱碱性,振摇时产生大量泡沫,具有表面活性作用。

### (三) 百毒杀

化学名称为双十二烷基二甲基溴化铵,别名双癸甲溴铵,为双长链季铵盐。易与水混合,具有表面活性作用。原液浓度为 50%(g/ml),性质较稳定。对某些金属有轻微腐蚀。

### (四) 新洁灵消毒精

化学名称为溴化双十二烷基二甲基乙撑二铵,为双长链季铵盐。易溶于水,具有表面活性作用。原液浓度为 5% ~ 10%(g/ml)。

## 二、杀菌作用

苯扎溴铵与苯扎氯铵对化脓性病原菌、肠道菌与部分病毒有较好的杀灭作用;对结核杆菌与真菌的杀灭效果不好;对细菌芽孢仅有抑菌作用。

百毒杀对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌等细菌繁殖体有一定的杀灭能力。

新洁灵消毒精对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌等有一定的杀灭作用。

一般,本类消毒剂对革兰阳性菌的杀灭能力较对革兰阴性菌强;抑菌浓度远低于杀菌浓度。

## 三、影响杀菌因素

### (一) 有机物

有机物的存在,可减弱本类消毒剂的杀菌作用。

### (二) 酸碱度

可影响杀菌效果,pH 值愈低,所需杀菌浓度愈高。

### (三) 温度

温度升高可加强其杀菌作用。

#### (四)水质硬度

通常,配制溶液用水的硬度过高,可降低其杀菌能力。硬水对百毒杀杀菌能力的影响较小。

#### (五)拮抗物质

阴离子的肥皂或洗衣粉等洗涤剂,碘、碘化钾、蛋白银、硝酸银、硫酸锌、酒石酸、硼酸、水杨酸盐、枸橼酸及其盐类、黄降汞、升汞、氯化锌、白陶土、过氧化物、磺胺类药物,以及钙、镁、铁、铝等金属离子,都对之有拮抗作用。

#### (六)吸附

本类消毒剂易吸附于各种物体表面,浸泡纤维织物时吸附量较大,可影响其在随后溶液中的浓度。

### 四、应用

对污染物品表面消毒,可用 **0.1%~0.5%**浓度的溶液浸泡、擦抹或喷洒,作用 **10~60 min**。消毒皮肤可用 **0.1%~0.5%**浓度的溶液涂抹、浸泡。消毒黏膜可用 **0.02%**溶液冲洗。

### 五、注意事项

1.本类消毒剂易被微生物污染,最好随用随配,配好后放置时间一般不宜超过 **2~3 d**。使用次数较多,或发现溶液变色、发浑以至产生较多沉淀时,应随即更换。每次更换药液时,盛放的容器应进行灭菌处理。

2.如物品表面(或皮肤)沾有拮抗药物,应洗净后再消毒。不得与肥皂或其他阴离子洗涤剂同用,也不可和碘或过氧化物等消毒剂合用。

3.配制的水溶液,使用时避免形成泡沫,因泡沫中药物浓度比溶液中高,影响药物的均匀分布。

4.因本类消毒剂不能杀灭结核杆菌和细菌芽孢,不是灭菌剂,不宜用于消毒粪便、痰液等排泄物与分泌物,不宜用于对手术器械灭菌,或浸泡无菌器材。

## 第八节 其他类消毒剂

目前常用的其他类消毒剂有氯己定(洗必泰)、碘、碘伏、高锰酸钾、高氧化还原电位酸性水等。

### 一、氯己定

为双胍类化合物。其杀菌机理主要有:①吸附于细胞表面,破坏细胞膜,造成胞浆组分渗漏;②抑制脱氢酶的活性;③高浓度时可凝聚胞浆组分。

#### (一)理化性状

化学名称为 **1,6-双(正-对氯苯双胍)己烷**,别名双氯苯双胍己烷。因其难溶于水,一般多制成盐酸盐、醋酸盐或葡糖酸盐使用。

其盐酸盐或醋酸盐为白色晶粉,无臭,味苦,无吸湿性,性质稳定。在 **20℃**时,水中溶解度分别为 **0.06%**与 **1.9%**,加入适量的阳离子或非离子表面活性剂,或提高水温,可增加溶解度。

可溶于乙醇。

其葡萄糖酸盐多为 20% 无色或浅黄色水溶液,无气味,味苦,能与水、醇、甘油等互溶。性质稳定,耐贮存。

### (二)杀菌作用

可杀灭革兰阳性与阴性的细菌繁殖体,但对结核杆菌、某些真菌以及细菌芽孢仅有抑菌作用。其水溶液与醇溶液都有较好的杀菌作用。抑菌浓度可低至  $10^{-5} \sim 10^{-6}$ 。

### (三)影响杀菌因素

有机物的存在可减弱其杀菌作用。

因系阳离子消毒剂,与阴离子洗涤剂有拮抗作用。有 0.1% 以上肥皂存在时,可显著降低其杀菌效果;但当肥皂浓度减至 0.001% 时,影响不大(一般洗手后残留肥皂的影响甚微)。

与下列药物不宜配伍使用:阿拉伯胶、硝酸银、蜂蜡、煌绿、藻朊酸钠、硫酸铜、羧甲基纤维素钠、荧光素钠、甲醛、红汞、硫酸锌等。

碱性条件可加强杀菌效果, pH 值低于 8 时,效果锐减。

### (四)应用

手可使用其 0.5% (5 000 mg/L) 水溶液或乙醇 (70%) 溶液浸泡、擦抹,浸泡时间为 3 min。

擦抹法为擦拭 2 遍,作用 2 min。对阴道、膀胱或伤口黏膜消毒,用 0.05% ~ 0.1% (500 ~ 1 000 mg/L) 水溶液冲洗。

对低度危险性物品,可用其 0.1% ~ 0.5% (1 000 ~ 5 000 mg/L) 水溶液或乙醇 (70%) 溶液喷洒、浸泡、擦抹。作用时间为 10 ~ 60 min。

### (五)注意事项

1. 勿使用硬度过高的水配制溶液。水质过硬可使氯己定与碳酸盐和硫酸盐产生复分解反应而出现浑浊。配制时应将水软化,或用蒸馏水与去离子水。配制的溶液存放,如有结晶沉淀,应加热至 90℃ 使之复溶。

2. 不要与肥皂及其他拮抗消毒剂同用。

3. 若创面脓液过多,应延长冲洗时间,至冲洗液变清。

4. 不宜用于消毒粪便、痰液等排泄物与分泌物。

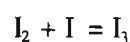
5. 因不能杀灭结核杆菌和细菌芽孢,故不宜用于对外科器械的灭菌。

## 二、碘 ( $I_2$ )

属于卤族元素,亦有人将之与含氯消毒剂统称为卤素类消毒剂。碘液中起杀菌作用的主要是碘元素本身。它可直接卤化菌体蛋白质,与蛋白质的氨基结合,使菌体的蛋白质和酶受到破坏,微生物因代谢机能发生障碍而死亡。

### (一)理化性状

是一种非金属元素,蓝黑色鳞晶或片晶,有金属光泽,性脆,熔点 114℃,沸点 184℃,易升华。蒸气呈紫色。微溶于水,能溶于碘化钾溶液、醇、醚、氯仿、二硫化碳、四氯化碳及苯。碘的饱和溶液微呈酸性。碘在溶液中除呈双原子游离碘 ( $I_2$ ) 外,还可呈三原子碘的络离子 ( $I_3^-$ ) 以及碘离子 ( $I^-$ )、次碘酸根离子 ( $IO^-$ ) 与碘酸根离子 ( $IO_3^-$ )。双原子游离碘杀菌能力比三原子碘的络离子强。在溶液中它们的变化是可逆的:



## (二) 杀菌作用

具有广谱杀菌作用,且对各种微生物的杀灭剂量比较相近。50 mg/L 浓度作用 10 min 可杀灭细菌繁殖体;60 mg/L 作用 30 min 可杀灭细菌芽孢;10 mg/L 作用 5~10 min 或 125~375 mg/L 作用 1 min,即可使病毒灭活;对皮肤真菌,用 12~300 mg/L 浓度即可杀灭。2% 碘液作用 1 min,可杀灭各种微生物。

## (三) 影响杀菌因素

1. 酸碱度 在酸性条件下,游离碘增多,杀菌作用较强;在碱性条件下,游离碘减少,杀菌作用减弱。在浓度很低的水溶液中,上述影响明显;当浓度高于 0.02% 时,pH 值在 2.2~8.0 范围内都可保持较好的杀菌作用。

2. 有机物 可降低碘的杀菌作用。在 1 000 mg/L 浓度的溶液中,存在少量有机物,可借加入 0.1% 盐酸以克服,若有机物过多,则其杀菌作用可基本丧失。外科消毒使用的碘液,浓度较高(2%),有机物的影响可忽略不计。

3. 碘化物 溶液中如有大量碘化物存在时,可使游离碘变为过碘化物,从而失去或减弱了杀菌作用。配制碘液时,加入约等量的碘化钾,对杀菌作用无影响。

4. 温度 影响较小,在 0~5℃ 下,杀菌作用比室温下稍迟缓,作用时间需延长 20 min。

## (四) 应用

一般用水溶液或酊剂进行消毒处理。皮肤、伤口消毒用 2% 碘酊或碘液涂擦,作用 1 min,需要时可用 70% 乙醇将残余碘擦净。黏膜或伤口用 0.05%~0.1% 碘液冲洗。外科小件器材、体温计和洗手刷在 2% 碘液中浸泡 5 min。

碘酊(2%)的配方为:

碘	2 g
碘化钾(钠)	1.5 g
蒸馏水	48 ml
乙醇(95%)或异丙醇加至	100 ml

碘液(2%)的配方为:

碘	2 g
碘化钾(钠)	2.4 g
蒸馏水加至	100 ml

配制以上碘制剂时,先将碘化钾(钠)溶于水与乙醇中,然后再加碘。

碘液的杀菌能力与液体中游离碘的颜色深浅成正比。如在 1:4 000 浓度碘液中加入有机物(10% 肉汤),其颜色立即退到和 1:10 000 浓度相似,其杀菌效果也相应下降。在 2 ml 1:1 000 碘液中加入二滴 2 mol/L 氢氧化钠,碘色褪尽,杀菌作用亦完全消失。应用中,可以借药液颜色深浅判断其杀菌能力。

## (五) 注意事项

1 碘在室温下可升华,易挥发,固体碘与配制的溶液应存于密闭容器中。时间过久,溶液颜色变浅,应测定碘的含量,将浓度补足。

2. 使用低浓度碘液消毒时,应根据介质的酸碱度与含有机物的量,考虑增加浓度或延长作用时间。

3. 宜及时清除物品表面沾有的碘液,以免长期作用引起损害。

4.碘(特别是碘酊)对伤口刺激性强,用时应注意。

### 三、碘伏

是碘以表面活性剂为载体的不定型络合物。其中,表面活性剂兼有助溶作用。该消毒剂中的碘在水中可逐渐释放,以保持较长时间的杀菌作用。所用表面活性剂,应既能作为碘的载体,又能有较好的溶解性,阳离子、阴离子或非离子型皆可,但以非离子型最好,比较稳定。常用的有聚乙烯吡咯酮、聚乙氧基乙醇、聚乙烯醇等。

#### (一)理化性状

原液呈深棕色。气味较小。水溶性较好。因含表面活性剂,易起泡沫,有清洁剂的作用。着色作用小,物品染上后较易洗去。原液稳定。此外尚有固体碘伏,用时现配成溶液。消毒用的稀溶液稳定性较差,2 d 后有效碘下降率达 50% 以上。其消毒液对黏膜刺激性小,毒性低,对银、铝、二价合金有一定腐蚀作用。

#### (二)杀菌作用

具有广谱杀菌作用,对细菌芽孢与真菌孢子的作用较弱。以含 50 mg/L 有效碘溶液作用 8 min,可杀灭大肠杆菌、绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等细菌繁殖体;200 mg/L 有效碘溶液作用 30 min,可破坏乙型肝炎表面抗原抗原性,作用 15 min 可灭活脊髓灰质炎病毒。然而,杀灭细菌芽孢需 100 mg/L 有效碘作用 2 h 以上。虽然用含 20 mg/L 有效碘溶液作用不到 1 min 可杀灭 90% 黑曲霉(*Aspergillus niger*)孢子,但用含 446 mg/L 有效碘溶液作用 1 h 亦不能杀灭纯黄丝衣霉(*Byssoschlamys fulva*)孢子。对白色念珠菌,用含 10 000 mg/L 有效碘溶液作用 5 min,方可杀灭 99.99% 以上。

#### (三)影响杀菌因素

1. 温度在 10~30℃ 范围内,温度影响较小。温度增至 40℃ 以上,杀菌效果有明显提高。

2. 有机物 可降低碘伏的杀菌作用。当菌液中加入 20% 小牛血清或 5% 酵母悬液时,则碘伏的杀菌作用明显减弱。

3. 拮抗物质 因其含有离子表面活性剂,故与该离子表面活性剂有拮抗作用的物质,可使杀菌作用减弱。

#### (四)应用

一般稀释成一定浓度的水溶液使用。卫生性消毒皮肤用 500 mg/L 有效碘溶液刷洗、涂擦,作用 2 min,或 750 mg/L 有效碘溶液刷洗 1 min。外科洗手用 3 000~5 000 mg/L 有效碘溶液刷洗 3 min。注射部位皮肤消毒,用 3 000~5 000 mg/L 有效碘溶液擦拭 2 遍,作用 2 min。对阴道黏膜或伤口黏膜,可用 250 mg/L 有效碘溶液冲洗 3~5 min。对创口及口腔黏膜,用 500 mg/L 有效碘溶液擦拭,作用 3~5 min。对物品消毒,可用 2 000 mg/L 有效碘溶液浸泡 0.5~2 h。

碘伏溶液颜色的深浅与含有效碘多少有关。当有效碘含量下降至 10 mg/L 以下时,颜色基本消失,杀菌作用亦消失。

#### (五)注意事项

1. 消毒用的稀溶液稳定性差,宜现用现稀释。

2. 消毒时,若有机物含量较多,应提高有效碘浓度或延长作用时间。

3. 避免与拮抗药物同用。

4. 尽量不用于消毒银、铝与二价合金的器具,以免器具受腐蚀损坏。

#### 四、高锰酸钾( $\text{KMnO}_4$ )

为强氧化剂, 依靠其氧化能力杀灭微生物。主要是将酶的巯基(  $-\text{SH}$  )氧化成硫基(  $-\text{S}-\text{S}-$  ),使酶失去活性,导致微生物死亡。

##### (一)理化性状

别名过锰酸钾、灰锰氧。为深紫色晶体, 有金属光泽, 性质稳定, 耐贮存。在  $240^\circ\text{C}$  下分解, 释放出氧。能溶于水, 呈紫色溶液, 在  $10^\circ\text{C}$  溶解度为 4%, 在  $20^\circ\text{C}$  时为 6.5%。其水溶液在酸、碱条件下都不稳定, 亦易为醇类、亚铁盐、碘化物等分解。

##### (二)杀菌作用

0.01% ~ 0.1% 浓度的溶液作用 10 ~ 30 min, 可杀灭细菌繁殖体、病毒, 破坏肉毒杆菌毒素。2% ~ 5% 浓度的溶液作用 24 h, 可杀灭细菌芽孢。

##### (三)影响杀菌因素

1. 温度升高可加强其杀菌作用。
2. 有机物可降低其消毒效果。
3. 碘化物及其他还原性物质对之有拮抗作用, 使杀菌效果降低。

##### (四)应用

多用其水溶液喷洒、浸泡、擦抹。可用其 0.1% 浓度的溶液消毒皮肤、水果和饮具。可用 0.01% ~ 0.02% 浓度溶液消毒黏膜, 冲洗伤口(对吞服某些有机毒物中毒, 可用以洗胃)。对污染的物体表面, 使用浓度可由 0.1% 至 1% ~ 2%, 作用时间一般为 10 ~ 60 min。

将高锰酸钾加于福尔马林中, 可产生甲醛气体进行熏蒸消毒。也可与二氯异氰尿酸钠等配成烟雾剂进行熏蒸消毒。

0.1% ~ 1% 高锰酸钾溶液可用于除臭。

##### (五)注意事项

1. 存放于密闭容器中, 勿使与有机物接触。
2. 水溶液暴露于空气中易分解, 宜用时现配。
3. 消毒后容器应及时洗净。若着色时间较久, 一般清洗不易除去, 可用过氧乙酸或草酸溶液洗净。
4. 勿用湿手直接拿取本药的结晶, 以免染色或腐蚀。
5. 消毒黏膜应将使用浓度限制在规定范围, 以免引起不良反应。
6. 有机物或其他拮抗物质过多, 不宜用本药消毒。

#### 五、高氧化还原电位酸性水

为将含 0.05% 食盐的水置一阳极与阴极间隔有阳离子交换膜的电解槽内, 通以高压电流, 使之电解, 在阳极产生的含有氧、活性氯等的混合溶液。该液依靠其高氧化还原电位与活性氯杀灭微生物。

##### (一)理化性状

原液 pH 值为 2.0 ~ 3.0, 氧化还原电位为 1050 ~ 1190 mV。稳定性差, 宜现用现制。该液在光照下氧化还原电位可降至 700 mV 以下, 其中活性氯遇光(主要是紫外线)和有机物会被破坏。对皮肤和黏膜刺激性较小。

## (二)杀菌作用

原液作用 30 s,可杀灭大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、肠炎弧菌、发癣菌,作用 5 min 可杀灭白色念珠菌,作用 20 min 可杀灭枯草杆菌黑色变种芽孢。

## (三)影响杀菌因素

温度升高可加强其杀菌作用。

随该液氧化还原电位下降,杀菌能力减弱。

有机物可降低其消毒效果。当乙型肝炎表面抗原悬液中含小牛血清  $\geq 1.5\%$  (ml/ml) 时,该液作用 10 min 亦不能将其抗原性破坏;而对不含小牛血清者作用 30 s,即可将之破坏。

## (四)应用

高氧化还原电位酸性水可用于冲洗伤口,对手冲洗消毒。对物品消毒,可用其擦抹、浸泡,作用 2~20 min。消毒室内空气时,可用其喷雾( $30\text{ ml/m}^3$ ),作用 30 min。

## (五)注意事项

- 1.存放于密闭容器中,置于避光处。存放时间不宜超过 3 d。
- 2.物品表面沾有较多有机物时,应洗净后再消毒。
- 3.浸泡处理时,勿使物品带有过多水分,以免稀释了药液,降低效果。
- 4.该液对铜、铝、碳钢有一定腐蚀作用,使用时应予以注意。

(袁朝森)

## 参考文献

- 1 刘育京,袁朝森,主编医用消毒学简明教程,北京:中国科学技术出版社,1989:96-149
- 2 袁朝森,常用化学消毒剂,见:刘胜文,主编,现代医院感染管理手册,北京:北京医科大学出版社,2000:126-155



# 第九章 防腐与保藏

## 第一节 概述

防腐和保藏历史悠久，是人类在学会使用生产工具和改善生活营养的不断发展过程中经验的总结和科学的升华。在原始人时期，可因雷电击触使森林起火烧死飞禽走兽而成为熟的肉食，它比生的味美可口又富含营养，易于消化。在人类祖先学会了保存火种，以及击石和钻木取火后，火的应用便是人类有意识地应用消毒防腐的开始。用火烧、煮、烤食物而杀死了微生物，便于食用和防腐及保藏食物。对一时吃不完的剩余猎物 and 种植的谷物、养殖牲畜、家禽等，利用风和阳光吹晒，使谷物干燥，肉食风干和晒干，可以防腐和便于保藏。在长期的生活和生产实践中，人类还逐渐学会了利用烟熏、盐渍等防腐和保藏技术。随着科学技术和人类物质文明的高度发展，防腐和保藏技术也有了快速高度的发展，而且在人类社会文明中的地位也越来越重要。

### 一、我国防腐和保藏的历史悠久

早在公元前 17 世纪我国殷商时期，《吕氏春秋》中就有饮水需“九沸九度”之说。在公元前 210 年左右，我国西汉时期，就有用烟熏消毒防腐的方法。从湖南长沙市马王堆汉墓出土女尸的陪葬品中有《彩绘陶熏炉》就是证据。而且，女尸保藏的防腐技术也十分高明。

在世界各国，也早有在生产和生活中发展防腐和保藏的历史。在公元 1485 年，威尼斯用醋熏蒸消毒信件。1804 年法国开始使用热封装保藏食物。

### 二、防腐和保藏技术的形成与发展

在人类发展的漫长岁月中，一直有个像“幽灵”般的敌人在世界上作祟。它给人类带来了瘟疫、传染病，杀死人、畜，无形毁灭村庄和城市。到了 17 世纪列文·虎克发明了第一台显微镜，才首次找到了这个敌人——微生物；但直到 200 年以后，巴斯德才完成了真正揭开微生物奥秘的使命。与此同时，巴氏消毒法应运而生，用巴斯德法消毒的啤酒不再腐败变酸，起到防腐保鲜、利于保藏的作用。

1874 年，李斯德写信给巴斯德，颂扬他给予自己的启发和帮助。李斯德此时期对败血症很感兴趣，他用消色差显微镜检查了脓液，找到了引起化脓的细菌，并开创了防腐杀菌的化学之路；他用石炭酸杀菌，处理开放性骨折、脓肿等获得良好效果，为医学闯出了一条新路。因此，Cushing 称他为“外科败血症镣铐的解放者”。继后，Neuber 提出使用手术衣、帽；Halsted 提出使用手套等防护技术以减少微生物对伤口的感染等。再后，一系列的化学和生物抗菌药物的问世使医学上的伤口、组织抗感染和防腐有了更加可靠的保障。

随着各项科学技术的发展，农、林、牧、渔业生产和医疗卫生事业、制药工业、食品工业、化妆品工业，以及高、精、尖仪器设备的制造和科学研究等的需要，各种现代化的技术和设备也有

了高速发展,如高温高压灭菌技术和设备、低温冷冻技术和设备、冷冻真空干燥技术和设备、高温干热干燥技术和设备、微波和红外设备和技术、辐射灭菌技术和设备、各类除尘和滤菌设备和技术、各种化学及物理杀菌技术和设备,再加之与科学技术发展相伴的各类新技术与设备的不断涌现等,为各类物品及人与动、植物的防腐和保藏需要提供了无穷的设备和技术选择空间,是推动防腐和保藏技术高度发展的不竭动力。

### 三、防腐与保藏相关名词及术语

1.防腐 应用杀生物剂或生物抑制剂杀灭或抑制受损组织上微生物生长繁殖,预防受损组织感染的作用。这是最早给防腐下的定义,但现今防腐的概念已有了广义的发展,可以认为,凡是用于防止各类有机物腐败变质的方法和技术处理统称为防腐。所以,防腐也涉及我们生产和生活的各个领域。

2.防腐剂 用于防腐的化学药剂。

3.防腐法 用于排除、杀灭或抑制微生物,预防活组织受微生物污染或使材料不孳生微生物的方法。

4.生物致死剂 能杀死某些或所有微生物的理化因子。

5.保藏 用化学药剂或物理学方法防止食物、药物或工业材料等被微生物腐败。在生产生活中,它涉及食物、药物、工业材料等的保藏,使其货架寿命或使用寿命延长、延缓腐败变质或保持果蔬等新鲜的方法和技术;在医学中上,它涉及尸体、组织、器官、血液及其制品,以及生物制品等的保藏。

6.保藏剂 用于保藏物品使之不易腐败的药剂。

## 第二节 微生物污染与物品“腐败变质”

在过去几十年中,食品、药品、化妆品及卫生保健用品等的生产和防腐技术有了长足的进步。在生产工艺、质量控制、卫生标准和科学管理等方面都趋完善,但食物中毒、药物失效、化妆品、卫生保健用品损害等问题在世界各地仍然普遍存在,且有些有持续上升之势。归根结底,多数是微生物使这些物质腐败变质或产生毒素所致。可致物品腐败的微生物种类很多,包括细菌、放线菌、酵母、霉菌等。

### 一、引起食品腐败的微生物

#### (一)引起食物中毒的微生物

食品的营养丰富,微生物在其中生长繁殖使食品腐败变质,某些微生物在生长繁殖过程中产生毒素,不慎被食用,可引起食物中毒或感染。可引起感染和产生毒素的细菌有沙门菌属、弯曲菌属、金黄色葡萄球菌和肉毒梭菌等。

1.沙门菌属 本菌属大约有 2 000个血清型,其危害各不相同。一般认为,所有的血清型都有引起人感染的能力,许多食物中毒病例是其引起。对目前的食品处理工艺,它的抵抗力并不强,食品受到污染时,在适宜温度下可在非酸性高水分食品中生长。

2 空肠弯曲菌 本菌与结肠弯曲菌常共同寄生于各种动物肠道中,经常污染肉类(特别是家禽),它可生长的最低温度约为 30℃,可以在食物中生长繁殖。

3. 李斯特菌 在食物中毒中，只有极少数本菌污染食物的例子。食入未经消毒的牛奶及软干酪是食物中毒的主要原因。但因本菌属对人体免疫系统和孕妇有较高毒性，应引起高度重视。本菌存在于某些冷冻储存食品中。

4. 耶尔森菌属 本菌在猪体内多数情况下可产生有毒菌株。所引起食物中毒大多与巧克力奶、巴士杀菌的牛奶及饮用未消毒的井水有关。本菌可耐低温，在 0℃ 下可缓慢繁殖。

5. 弧菌属 本菌为引起食物中毒的主要菌属。一些习惯于生吃海产品的国家和地区，约 50% 的肠炎型中毒是副霍乱弧菌引起。本菌有较强的耐盐力（10% 氯化钠中生长），可在鱼及鱼类制品中生长繁殖。

6. 大肠埃希菌 本菌属现有 5 个血清型，即致病性、产肠毒素性、侵袭性、黏附性和肠出血性大肠埃希菌，若其污染食物，可引起食物中毒。

7. 金黄色葡萄球菌 本菌污染食物，在其中生长，产生毒素而引起食物中毒。毒素加热不失活。

8. 肉毒梭菌 本菌为严格厌氧菌，广泛存在于土壤、海水、干燥的泥土、粪便和腐烂的蔬菜中。肉毒为剧烈神经毒素，但该毒素可于 80℃ 10 min 灭活。其中 A 型菌株可分解蛋白质，引起典型腐败变质。不分解蛋白的菌株可在 3~4℃ 下生长，不正确冷冻贮存食品可受污染。

9. 产气荚膜梭状芽孢杆菌 已知本类菌有 5 个型（A~E 型），食物中毒中 A 型最重要。该菌可污染多种食品和原料（特别是禽肉类食品），食入的细菌可在肠道中繁殖，迅速生长，同时产生肠毒素，一般食入被污染食物后 8~24 h 发病。

10. 枯草杆菌 本菌广泛存在于土壤和垃圾中。某些食品，如调味品、大米、牛奶及奶制品中带有较多本菌。本菌可形成芽孢，大多数食物中毒爆发是由于食入缓慢冷却的蒸煮食品或长期贮藏的熟食品。在食入含有大量活菌或毒素的食物后 8~24 h 即可发病。

## （二）可引起食品腐败的微生物

引起食品腐败的微生物种类繁多，它们各自引起食物腐败的基本原理和作用如下：

1. 革兰阴性，产过氧化氢酶和氧化酶的细菌 该类细菌为需氧型，生长快；在有氧条件下，低温或者室温下可引起肉、鱼、家禽、蛋及其他富含蛋白质的食品腐败变质。醋酸杆菌属在含醇的饮料和腐败的水果中可把乙醇氧化成醋酸。这类菌中还有一些菌如葡萄糖酸杆菌可产生雾气及把软饮料中的葡萄糖氧化成葡萄糖酸。许多假单胞菌属可引起植物病害。

2. 革兰阴性，可产生过氧化氢酶、不产生氧化酶的杆菌 这类菌中可发酵的微生物包括肠道菌群，除能污染一些天然的富含蛋白质的食品外，还有一些如着色性欧文氏菌等，可引起植物病害，如软腐病、枯萎病和坏死病等。同时它还能在较低温度下生长。

3. 革兰阳性，可产生过氧化氢酶，不形成芽孢的杆菌 其中棒状杆菌包括 30 多个菌种，具有多形性，表现为颗粒与棒状，多为嗜常温菌，通常寄生于人和动物的皮肤上；但也有些属于嗜冷菌，多寄生于植物中，故此类菌常污染蔬菜和其他食物。它们对有些防腐剂（如亚硫酸盐）具有一定的耐受能力，因此其中一些菌成为某些食物腐败菌丛中的优势菌种。该类菌有耐 CO<sub>2</sub> 的能力，可在低氧、真空包装、冷藏的肉类中生长。

4. 革兰阳性，可产生过氧化氢酶的球菌 因革兰阳性的球菌很多是寄生在动物皮肤上，故分布非常广泛需氧的微球菌属及葡萄球菌属常存在于奶及肉制品中在真空包装中，某些微球菌可被抑制，但在较高的温度下，可促进某些葡萄球菌的生长有些菌种的耐热能力很强，可在经巴氏消毒的奶中存活。

5.革兰阳性,不产生过氧化氢酶,不形成芽孢的杆菌或球菌 乳酸菌可使食物腐败,继而变酸或同时产气。该类菌广泛存在于易发酵的天然物质如牛奶、水果汁、蔬菜等中。它们常常可以在革兰阴性菌群被抑制的食物上生长繁殖,与其他的腐败菌类相比,对低 pH 值有更强的耐受力,有些甚至可在 pH3.6 的条件下繁殖。一些球菌属有较强的耐盐性。乳酸菌的繁殖可以显示贮存条件不当,特别是食物在较高温度下存放时间过长,但它的繁殖使食品 pH 值下降,也抑制了很多有危害微生物的生长。

6.革兰阳性,可产生过氧化氢酶,可形成芽孢的杆菌 已知此类杆菌由 48 种细菌组成,它包括嗜冷菌、嗜常温菌和耐热菌。其中大多数杆菌生活在土壤中,故易污染食品。嗜冷菌、常温菌和耐热菌均可形成芽孢,能分别抵抗低温、常温及较高温。如一些嗜冷菌在 80℃时,其 D 值为几分钟,近似 D 值时许多常温菌则为 100~120℃,而耐热菌(如耐热的脂肪杆菌)则高于 120℃ 这类菌在各种包装的食品中均可生长。因其有形成芽孢的能力,在加热、煮沸及巴氏消毒的食品中亦可存活。

7.革兰阳性,不产生过氧化氢酶,可形成芽孢的杆菌 严格厌氧的梭状芽孢杆菌属,已知由 90 多种杆菌组成。它们与前述杆菌相似,也包括耐热菌、嗜常温菌和嗜冷菌。大多数的梭状芽孢杆菌有较高的分解蛋白质能力,因此可使食品彻底腐败。耐热菌中也包括耐热性极强的菌种,有些食品虽经高温处理,但在该类菌的作用下仍可引起腐败。

8.酵母与霉菌 酵母与霉菌是引起食物腐败的主要微生物,因为它们对低水分活性和低 pH 值具有很强的抵抗力,所以在低水分活性食物及 pH 值低于细菌能够在食品中繁殖的水平时,酵母及霉菌仍能引起食品腐败;许多酵母菌可在有氧或缺氧的条件下繁殖,而霉菌在无氧的包装中常被抑制,在完全抑制霉菌繁殖所需最低氧浓度下,酵母菌仍能很缓慢地繁殖。

## 二、引起药品腐败的微生物

药品染菌会使药品受损,可引起腐败变质,危及患者安全。其污染可能来源于生产原料、设备、空气、生产人员不当操作、包装容器等各个环节。污染药品的微生物中有许多种类是以药物本身为营养进行生长繁殖的,其结果可使药物产生一系列可察觉的物理或化学变化;即使产品要最后灭菌,死亡的细菌也可能含有毒素或热原质,无质量和安全保障。所以,药物的防腐保藏十分重要。

药品中污染微生物的类型很多,有细菌、霉菌、酵母菌、放线菌等。从药品中检出的细菌有 10 多个属,其中大部分为致病菌或产毒菌,如大肠埃希菌属、沙门菌属、假单胞菌属、变形杆菌、葡萄球菌、链球菌、梭状芽孢杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌等。酵母菌有 10 个属,如假丝酵母等。霉菌有 19 个属,如青霉、曲霉、芽枝霉、毛霉等,也有已知具有强烈致癌作用的黄曲霉毒素。

在受到微生物污染的药品中,中成药最为普遍,尤以含药材原粉的各种剂型,主要是原料染菌量过高;有些是由于生产流程不合理、水源处理不当等造成的。一些液体制剂,如合剂、糖浆剂杂菌超标多与灭菌不当、包装不严密有关。药品的各种微生物污染源中的微生物种类如下:

### (一)空气

从空气中可分离到芽孢杆菌、梭菌、葡萄球菌、链球菌、棒状杆菌等;还可分离到青霉、曲霉、毛霉、芽枝霉和酵母等。

## (二)水

自来水中不应有已知的病原菌,除控制大肠菌群数外,仍含有其他微生物,某些革兰阴性菌、酵母菌、丝状真菌和放线菌等。软化水中,除了天然带来的菌外,还有利用盐或耐盐的微生物,如芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌等。去离子水中,污染微生物仍严重。蒸馏水中,污染的菌群通常是革兰阴性菌,也有发现绿脓杆菌的记载。

## (三)包装材料

通常含数量较多的青霉、曲霉、芽枝霉孢子、芽孢杆菌和微球菌等。

## (四)建筑与设备

可有上述空气、水及包装材料等中的各种微生物,其中霉菌最常见。

## (五)生产人员

人体的皮肤、手、脸、毛孔、皱纹处及潮湿部位等常有金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、类白喉杆菌等;偶有革兰阴性菌,如小球菌、赫子氏菌及产碱菌;在皮肤上还有正圆形酵母、亲脂酵母、瓶形酵母及各种皮肤真菌,如表皮癣菌、小孢霉菌、发癣菌等。人体的肛门及会阴部还有各种微生物群落。

## (六)原料中所带微生物

1.植物性原料 中药材、生药及植物原料中污染的细菌有欧文菌、假单胞菌、链球菌、乳杆菌、芽孢杆菌等;真菌有芽枝霉、交链孢霉、镰刀菌、木霉及非丝状体酵母等。

2.动物性原料 动物性原料,如明胶、甲状腺粉、胰脏、五灵脂、胭脂虫、地龙和土鳖等有来自动物的寄生微生物、病原微生物及土壤微生物。

3.合成原料 虽然相对微生物数较少,但也常受到环境物品、空气中的细菌和真菌污染,如霉菌和酵母,芽孢杆菌等。

4.生化制剂原料 生化原料自身营养丰富,生产过程加热或不加热,污染的环境或自身微生物可在其中繁殖。如胃酶、胰酶、磷酸酯酶、淀粉酶等有时染菌也很严重。

5.原料贮藏 原料贮藏可因环境卫生条件、温湿度、通风等不当,或因贮藏的工具及包装,堆放与管理不当,虫、鼠害等使其染有环境和自身微生物并可能繁殖。

以上原材料和生产环境中的各种微生物在条件适宜下均可导致药品腐败变质。

## 三、引起化妆品腐败的微生物

化妆品可因污染细菌的繁殖使产品腐败、变臭而失去其价值,或者给消费者造成人体损害;若污染的为病原菌,还会诱发感染。

1.液体香波、奶液香波、洗发膏等可污染绿脓杆菌、黄色杆菌及粪产碱杆菌等。

2.疏水及含水制剂(加或未加防腐剂)可污染绿脓杆菌、葡萄球菌和真菌等。

3.加入甾类化合物的软膏可污染绿脓杆菌、无色杆菌等。

4.软膏、霜及涂擦剂,婴儿用粉、霜膏剂,粘性液可污染枯草杆菌、葡萄球菌、链球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌和真菌等。

5.加羊毛脂手蜜、手用露液可污染绿脓杆菌、肺炎杆菌等

### 第三节 防腐剂及保藏剂

用于防腐的药剂称为防腐剂。防腐剂一般并不具有选择性毒性。它们对微生物和组织细胞都有影响,其作用原理是非特异性的。而防腐剂一般不能用作消毒剂。主要用作防腐剂的化合物,在具有抑菌和慢性杀菌作用的浓度时,很少引起组织损伤。这些药剂不损害机体的天然防御机构。因此,防腐剂比主要用于消毒的药物具有更多的选择性作用。有些作用强的消毒剂用于皮肤或组织时刺激性太强,腐蚀性或毒性太大,一般不用于防腐。

保藏是在药品、化妆品、食品和物品中,添加一种药剂以抑制微生物的生长繁殖,从而防止产品的腐败或致病性。因此,保藏剂的定义为:在复方产品中用以阻止微生物生长繁殖,防止产品腐败或污染的广谱抗微生物药剂。许多化学药剂兼具消毒、防腐和保藏的作用。亦有少数药剂的作用仅限于保藏。对保藏来说,往往联合使用两种或多种药剂,比在消毒和防腐中应用复方更为普遍。故必须注意到一个十分重要的问题,就是慢性毒性和配方中的有害物交互反应问题。因此,要选择能满足所有要求的合适防腐剂和保藏剂是一项十分艰难的任务。选择时应考虑:作用机理、作用谱、最适 pH、溶解度、在复方中的分布系数以及来源和价格等。本节仅介绍目前常用的防腐剂和保藏剂。

#### 一、醇类(alcohols)保藏剂

用于防腐和保藏的醇类化合物有苯甲醇、乙醇、苯乙醇、苯氧乙醇、异丙醇、丙二醇、氯丁醇(三氯叔丁醇)等。本节仅介绍常用的苯甲醇、氯丁叔醇和丙二醇。

##### (一)苯甲醇(benzyl alcohol)

分子式:  $C_7H_8O$ , 分子量: 108.13; 性状: 本品为无色液。具有微弱的花香。本品药用含量  $\geq 98\%$ , 工业用含量  $\geq 95\%$ 。

1. 杀微生物作用 本品对细菌繁殖体有杀灭作用,但对病毒和细菌芽孢作用不强。常作为防腐剂,有效浓度为  $0.5\% \sim 1.0\%$ 。

2. 影响抗微生物作用的因素 本品遇热稳定,配伍禁忌少,只适用于外用。本品能缓慢地自然氧化,部分生成苯甲醛和苯醚,故不宜久储存,应注意密闭,贮阴凉、避光处。

3. 使用方法 本品是防腐剂和极有用的定香剂,是茉莉、月下香、依兰香精调配时不可缺少的香料。用于配制香皂、日用化妆香精,以及供药用等。

4 毒性 属低毒类。具有麻醉作用,对眼、咽喉及上呼吸道黏膜有刺激作用,进入体内代谢迅速。急性毒性:小鼠经口  $LD_{50}$  为  $1.58 \text{ g/kg}$ , 静脉  $LD_{50}$  为  $< 0.48 \text{ g/kg}$  (纯度  $94\%$ ); 大鼠吸入  $LC_{33}$  为  $0.88 \sim 1.31 \text{ g/m}^3 \times 4 \text{ h}$ , 吸入  $LC_{100}$  为  $0.88 \sim 1.31 \text{ g/m}^3 \times 8 \text{ h}$ , 经口  $LD_{50}$  为  $3.1 \text{ g/kg}$ ; 狗静脉  $LD_{50}$  为  $0.83 \sim 1.06 \text{ g/kg}$ 。亚急性和慢性毒性:大鼠经口  $450 \text{ mg/kg} \times 10$  次,体重减轻,未见病理组织学改变;人吸入  $300 \text{ mg/m}^3 \times 30 \sim 45 \text{ d}$ , 出现剧烈头痛、眼花、恶心、呕吐等。

##### (二)三氯叔丁醇(trichlorobutanol)

分子式:  $C_4H_7Cl_3O \cdot \frac{1}{2} H_2O$ , 分子量: 186.47。本品含  $C_4H_7Cl_3O \cdot \frac{1}{2} H_2O$  不得少于  $98.5\%$ 。性状:本品为白色结晶,有微似樟脑的特臭,易挥发。

1. 杀微生物作用 本品对细菌繁殖体及霉菌都有作用,且较苯甲醇为强。

2. 影响抗微生物作用的因素 本品在碱性环境中不稳定,即使在酸性环境中高压或蒸汽加热也可分解。其 0.5% 浓度作注射液或眼药水的保存剂,此浓度低温时接近饱和,可出现结晶。若处理不当均可影响其防腐作用。

3 使用方法及用量 本品为防腐药,现仅有限地用于药物保存。防腐用 0.5% 浓度。

4. 毒性 本品属中等毒性。急性毒性:大鼠经口 MLD 为 213 mg/kg; 狗经口 MLD 为 238 mg/kg; 人经口 MLD 为 50 mg/kg。

### (三)丙三醇(propylene glycol)

分子式:  $C_3H_8O_2$ , 分子量: 76.09。性状: 本品为澄明、无色、粘稠、有辛辣味、几乎无臭、具有吸湿性的液体。能溶于水、丙酮、氯仿、乙醇及甘油,与乙醚的溶解比为 1:6,可溶解某些芳香油。但与轻矿物油、不挥发性油不相混溶。

1. 对微生物的作用 本品广泛用作溶剂、萃取剂、防腐剂。其防腐能力与乙醇相似,抗霉菌能力低于乙醇,与甘油相似。

2. 使用方法 本品在药剂中常用作溶剂、保湿剂、防腐剂等。作口服溶液剂浓度为 10% ~ 15%; 注射剂溶液浓度为 10% ~ 60%; 外用制剂浓度为 5% ~ 8%; 气雾剂浓度为 10% ~ 30%; 半固体制剂使用浓度为 15% ~ 30%。也用作食品、化妆品工业的增塑剂、保湿剂、防腐剂等。

3. 毒性 小鼠经口  $LD_{50}$  22 g/kg; 兔经口  $LD_{50}$  19.2 g/kg; 亚急性和慢性毒性: 大鼠经 1%, 10% 吸入 140 d 无异常; 猴吸入饱和蒸气 12 ~ 18 个月未见变化。

## 二、酸、酯和醛类保藏剂

用于防腐、保存的酸类和酯类药剂有: 苯甲酸及其钠盐、丙酸、山梨酸、苯甲酸酯类、对羟基苯甲酸酯类、富马酸二甲酯、肉桂醛。

### (一)苯甲酸(benzoic acid)

分子式:  $C_7H_6O_2$ , 分子量: 122.12。性状: 本品为白色有丝光的鳞片或针状结晶性粉末,质轻、无臭或微臭,在热空气中微有挥发性,水溶液显酸性反应。本品在乙醇、氯仿或乙醚中易溶,在沸水中溶解,在水中微溶。

1. 杀微生物作用 苯甲酸有较好的抑霉和抑制细菌繁殖体的作用。本品对几种细菌的最小抑菌浓度( $\mu\text{g/ml}$ )为: 金黄色葡萄球菌 50 ~ 100, 绿脓杆菌 200 ~ 500, 大肠杆菌 100 ~ 200, 肺炎克雷伯菌 100 ~ 200。对霉菌的抑菌浓度与苯甲酸钠同。

2. 使用方法 苯甲酸适用于内服液体制剂和外用制剂中,但不适用于眼用药剂和注射剂。苯甲酸的溶解度,在水中为 0.29%, 在乙醇中为 1:2.3 (20℃)。作防腐剂的有效浓度为 0.1% ~ 0.2%。

3. 毒性 对皮肤有轻度刺激作用,低毒。急性毒性: 小鼠经口  $LD_{50}$  为 2 370 mg/kg, 经腹腔  $LD_{50}$  为 1 460 mg/kg; 大鼠经口  $LD_{50}$  为 2 530 mg/kg; 豚鼠腹腔 MLD 为 1 400 mg/kg; 兔经口 MLD 为 2 000 mg/kg; 兔皮下 MLD 为 2 000 mg/kg; 猫经口  $LD_{50}$  为 2 000 mg/kg; 狗经口  $LD_{50}$  为 2 000 mg/kg; 人经口  $LD_{50}$  为 500 mg/kg, 经口最低中毒量为 6 mg/kg, 可引起皮肤损害。

### (二)苯甲酸钠(sodium benzoic)

分子式:  $C_7H_5NaO_2$ , 分子量: 144.11。性状: 本品为白色颗粒,粉末或结晶性粉末;无臭或微

带臭气,味甜带咸。本品在水中易溶,在乙醇中微溶。本品按干燥品计算,含  $C_7H_5NaO_2$  不得少于 99.0%。

1. 杀微生物作用 苯甲酸钠与苯甲酸一样有较好的抑霉菌作用。二者防腐机理相同。本品的防腐力在于其没有电离的酸分子,故 pH 较低时防腐力较好。苯甲酸钠在各种不同 pH 的介质中,其未离解部分的分数与抑菌浓度的关系见表 9-1。

表 9-1 苯甲酸钠在不同 pH 的介质中对葡萄酒酵母的抑菌浓度

pH	未电离的分数	抑菌浓度(mg/100 ml)
3.65	0.77	35
4.1	0.55	50
4.4	0.38	100
5.0	0.13	500
5.8	0.022	1 500
6.5	0.003	> 2 500

2. 使用方法 与苯甲酸同。苯甲酸钠在水中的溶解度为 1:1.8(20℃)。

(三)丙酸(propionic acid)

分子式:  $C_3H_6O_2$ , 分子量: 74.08。性状: 本品为无色澄清油状液体,稍有辛辣刺激性和腐败气味。本品按标准,  $C_3H_6O_2$  不得  $\leq 96\%$ 。

1. 杀微生物作用 丙酸有抗霉作用和抗细菌繁殖体的作用。其抗细菌的最小抑菌浓度(MIC,  $\mu g/ml$ ),金黄色葡萄球菌为 2 000  $\mu g/ml$ ,绿脓杆菌为 3 000  $\mu g/ml$ ,大肠杆菌为 2 000  $\mu g/ml$ ,肺炎克雷伯氏菌为 1 250  $\mu g/ml$ 。

2. 用途及用法 本品主要用于食品、化妆品的防腐、保存。化妆品中最大允许浓度为 2% (按酸计)。本品也是一种有效的皮肤真菌、小孢子菌和发癣菌的抗真菌剂。用作局部药膏或扑粉,常用其钙、钾及锌盐。食品工业中规定仅能使用钙、钾及钠盐。

3. 毒性 属低毒类。高浓度接触可引起皮肤、眼和黏膜表面的局部损害。急性毒性: 大鼠经口  $LD_{50}$  为 4.92 g/kg;兔经皮  $LD_{50}$  为 0.5 g/kg。

(四)丙酸钠(sodium propionate)

分子式:  $C_3H_5O_2Na$ 。分子量: 96.06。性状: 本品为无色透明颗粒结晶或白色晶状粉末。无臭或微臭,似丙酸。当湿度在 60% 以上时具有引湿性并潮解。溶于水、乙醇;不溶于氯仿或乙醚。水溶液 pH 值为 8.5 ~ 10.5。

1. 杀微生物作用 本品具有与丙酸相似的抗真菌作用。对霉菌、酵母菌具有广谱的抗菌作用在酸性介质中抗菌作用尤显。

2. 用途及用法 常用作化妆品防腐,在化妆品中的添加量通常在 20% 以下。临床上作为抗真菌治疗,一般使用 5% ~ 10% 的浓度。作为药剂辅料,一般使用 0.5% ~ 2% 的浓度。作为内服制剂使用,如糖浆剂、含剂、溶液剂的抑菌剂,可防止霉菌生长。可与苯甲酸钠、山梨酸钾、尼泊金酯等合用。在食品中用作防腐剂,在糕点等制造中使用。

3. 毒性 本品属微毒类,小鼠经口  $LD_{50}$  为 5.1 g/kg,适宜浓度对皮肤和黏膜无刺激性。



### (五)山梨酸(sorbic acid)

分子式:  $C_6H_8O_2$ , 分子量: 112.13。性状: 本品为微结晶体。熔点  $132 \sim 135^\circ\text{C}$ , 沸点  $228^\circ\text{C}$  (分解), 蒸气压  $<0.01 \text{ mmHg}(20^\circ\text{C})$ , 溶于热水, 易溶于乙醇、乙醚。可溶于甘油(0.31%)和丙二醇(5.5%)。本品按  $C_6H_8O_2$  不得少于 99.0%。

1. 杀微生物作用 本品有较强的抗微生物作用。对微生物的防腐效能如表 9-2。

表 9-2 山梨酸的防腐效能

微生物	抑菌浓度(MIC, %)	pH
白色念珠菌	0.10	4.5
产黄青霉	0.15	3.5
黑曲霉	0.15	3.5
大肠杆菌	0.12	5.0~5.5
枯草杆菌	0.15	5.6~7.0
金黄色葡萄球菌	0.12	5.0~5.5

本品对革兰阳性菌的最小抑菌浓度为  $11 \text{ mmol/L}$ , 对革兰阴性菌的最小抑菌浓度为  $15 \text{ mmol/L}$ 。

2. 用途和用法 本品特别使用于含有吐温的液体制剂的防腐。吐温类对本品虽然也会发生络合而降低其防腐力, 但在常用浓度约为 0.2% 的情况下, 仍然有相当的抑菌力。因为山梨酸在水中的最适抑菌浓度为 0.07%~0.08%, 而在 5% 的吐温-80 溶液中溶解的山梨酸若为 0.2%, 则其中未络合的部分经研究证明约占 1/3。所以该溶液中含山梨酸 0.2%, 则仍有约 0.07% 可发挥防腐作用。山梨酸可广泛用于内服药液的防腐。

3. 毒性 属微毒类。急性毒性: 小鼠腹腔  $LD_{50}$  为  $2820 \text{ mg/kg}$ , 皮下  $LD_{50}$  为  $2820 \text{ mg/kg}$ ; 大鼠经口  $LD_{50}$  为  $7360 \text{ mg/kg}$ , 皮下最低中毒量为  $1040 \text{ mg/kg}$ ; 人(不明)最低致死剂量为  $5000 \text{ mg/kg}$ 。

### (六)对羟基苯甲酸酯类(尼泊金类)(parabens hydroxybenzoates)

对羟基苯甲酸酯类常用的有甲、乙、丙三种, 丁酯和苯酯应用很少, 本类化合物的共同结构为:

甲酯 methylparaben  $R = CH_3$ :  $C_8H_8O_3 = 152.2$

乙酯 ethylparaben  $R = C_2H_5$ :  $C_9H_{10}O_3 = 166.2$

丙酯 propylparaben  $R = C_3H_7$ :  $C_{10}H_{12}O_3 = 180.2$

本类防腐剂具有不挥发、无毒性、稳定性好, 在酸、碱介质中都有效, 而且颜色、气味极微。现以对羟基苯甲酸乙酯为例说明其基本性质。

对羟基苯甲酸乙酯(ethyl-p-hydroxybenzoate)

分子式:  $C_9H_{10}O_3$ , 分子量: 166.2, 本品含  $C_9H_{10}O_3$  不得少于 99.0%。性状: 本品为白色结晶性粉末, 无臭或有轻微的特殊香气, 味微苦、灼麻。本品在乙醇或乙醚中易溶, 在氯仿中略溶, 在甘油中微溶, 在水中几乎不溶。熔点  $114 \sim 118^\circ\text{C}$ 。

1. 杀微生物作用 对羟基苯甲酸酯类具有较强的抗霉菌、真菌和酵母活性, 但对细菌的作用较弱。对羟基苯甲酸酯类对细菌繁殖体的抑制活性见表 9-3。

表 9-3 对羟基苯甲酸酯类对细菌的抑制作用

对羟基苯甲酸酯类	最小抑菌浓度( $\mu\text{g/ml}$ )			
	金黄色葡萄球菌	绿脓杆菌	大肠杆菌	肺炎克雷伯杆菌
甲酯	800	1 000	800	800
乙酯	500	800	600	600
丙酯	150	400	300	300
丁酯	120	175	150	100

## (1)影响抗微生物作用的因素

①酸碱度对抗微生物效能的影响。习惯上把对羟基苯甲酸酯类归属于苯甲酸衍生物,从防腐性能上讲,它有酚基并在碱性条件下效能减弱,因此可列为弱酸类防腐剂。

在酸性条件下,对羟基苯甲酸酯类基本上以分子状态存在,电离较少,透膜吸收较易,制菌作用强。当 pH 上升时其在水中的溶解度增加,透过微生物细胞膜的能力减弱,制菌能力也降低,需使用较大量才有效。用对羟基苯甲酸酯类对某些霉菌(如黑曲霉等)作最小抑菌浓度试验,证明不同 pH 条件下,其用量不同,随着介质 pH 的升高,用量也需加大(表 9-4)。

表 9-4 对羟基苯甲酸酯类在不同 pH 值下的最小抑菌浓度(%)

对羟基苯甲酸酯类	pH			
	3.0	5.0	7.0	9.0
甲酯	0.03~0.05	0.10	0.10	0.15
乙酯	0.02~0.04	0.06	0.06	0.10
丙酯	0.02	0.03	0.04	0.06
丁酯	0.015	0.02	0.02	0.03

Allwood MC 作了对羟基苯甲酸甲酯对金黄色葡萄球菌的杀菌试验,证明当介质的 pH 升高时,MIC 加大,杀菌时间延长(表 9-5)。

表 9-5 pH 对对羟基苯甲酸甲酯杀菌效能的影响(金黄色葡萄球菌)

介质 pH	MIC( $\text{mg/ml}$ )	杀死 90% 菌所需时间(min)
5.0	1.10	5
6.0	1.60	96
7.0	1.80	195
8.0	2.10	216

Wickliffe 等(1964)进行了一些防腐剂在中性和弱碱性条件下的作用比较试验,结果对羟基苯甲酸酯类中,0.2% 甲酯,0.1% 乙酯在 pH 7 时均有效,pH 升至 8 时均失去制菌效能;0.075% 丙酯在 pH 8 时有制菌效能,pH 9 时失效,0.03% 丁酯在 pH 8~9 范围内均有效。此结果比较符合实际情况。目前国内对乙酯使用较多,适用的 pH 范围为 3~6 之间。

②表面活性剂的影响。当不同量的吐温-80 存在时,对羟基苯甲酸甲酯对普通培养基中

的产气杆菌的有效抑菌浓度如表 9-6。

表 9-6 吐温-80 对对羟基苯甲酸酯抑菌作用的影响

吐温-80 含量(%)	对羟基苯甲酸甲酯的抑菌浓度(%)
0	0.075~0.08
极少量	0.065
2	0.180~0.20
4	0.280~0.30
6	0.400~0.42

当极少量(<0.01%)的吐温-80 存在时,对羟基苯甲酸甲酯的有效抑菌浓度稍有下降,制菌效能略有提高,这种现象可以用表面活性剂增强微生物细胞膜的通透性来解释。而表面活性剂的含量加大时,即产生结合作用,而使对羟基苯甲酸甲酯减效。根据上列数值可以算出:每 1%的吐温-80 与约 0.058%的甲酯结合。因此,可以对加有不同量吐温-80 的药液中应需要的尼泊金甲酯量进行计算。如合剂中含 3%吐温-80 时,则甲酯的需用量为:

$$(0.065 + 0.058) \times 3\% = 0.239\%$$

即存在 3%吐温-80 时,有抑菌浓度的尼泊金甲酯的浓度为 0.239%。

③不同溶媒对对羟基苯甲酸酯类的溶解度及其在水中的抑菌浓度的影响。在液体制剂中,当含有低浓度(2%~5%)丙二醇时,可增强对羟基苯甲酸酯的防腐作用。溶媒中以乙酯对对羟基苯甲酸酯的溶解度最大,丙二酯次之,水的溶解度最小(表 9-7)。

表 9-7 对羟基苯甲酸酯的溶解度及抑菌浓度

酯类	溶解度(g/100 ml, 25℃)					在水溶液中		
	水	乙醇	甘油	丙二醇	脂肪油	1%吐温-80 水溶液	酚系数	抑菌浓度
甲酯	0.25	52	1.3	22	2.5	0.38	3	0.05~0.25
乙酯	0.16	70		25		0.50	8	0.05~0.15
丙酯	0.04	95	0.35	26	2.5	0.28	17	0.02~0.075
丁酯	0.02	210		110		0.16	32	0.01

(2)用途和用法:对羟基苯甲酸的甲、乙、丙、丁和卡酯及其盐类用于化妆品和药物制品,如乳脂、乳剂和洗剂的防腐。它们不适合用于注射液和滴眼液。它们不易溶于水,在油剂中溶解度随分子量增加而增加。甲酯在水中溶解度最高,通常用 0.1%~0.2% 的水剂。而分子量更高的酯类则使用近于饱和的溶液。其钠盐衍生物比相应的酯类本身更易溶于水中制成溶液。而在非水制剂中可溶于丙酮、乙醇、熔化的脂和油、甘油或丙二醇中。

对羟基苯甲酸酯类的抗微生物活性随分子量增高而效果更好,但溶解度也相应降低而受限。因此使用两种或多种酯类的混合物比使用单一脂类的效果更好。因为这种方法可以制得总浓度更高的防腐剂溶液。同时,混合剂的抗微生物范围可能更广,甲酯和丙酯的混合物通常使用 2:1 的比例(浓度分别为 0.06% 和 0.03%)。

低浓度的甲、乙、丙、丁酯对防止革兰阳性菌和真菌生长是有效的。但对革兰阴性菌效果

差。从甲酯到丁酯抗真菌活性递增。对细菌的最小抑菌浓度高于真菌。 0.4%的甲酯或乙酯, 0.8%的内酯或丁酯只有在使用 NaOH 增加其溶解度时方可获得对绿脓杆菌的抑菌浓度。糖浆中含有 0.1% 甲酯和 0.02%丙酯的混合物的防腐作用因加入 2%或 5%的丙二醇而增强。

2. 毒性 对羟基苯甲酸酯属低毒类。在食品和药品中应用是安全的。钠盐的毒性随烷基长度的增加而增加, 丁酯的毒性是甲酯的 3 倍。

甲酯急性毒性:狗经口 LD<sub>50</sub> 为 3 000 mg/kg;丙酯急性毒性:小鼠腹腔 LD<sub>50</sub>为 490 mg/kg ;人经口 MLD 为 500 mg/kg。

对羟基苯甲酸酯类的稀释液对眼有刺激性, 可引起疼痛。含对羟基苯甲酸酯的制剂可引起过敏反应。

3. 注意事项 对羟基苯甲酸酯类禁忌与非离子表面活性剂配伍。因非离子表面活性剂可与它形成复合物而降低其防腐活性。对羟基苯甲酸的甲酯和内酯同某些分子量的巨醇 (如聚乙二醇 4 000)、甲基纤维素、吡咯烷酮和明胶相互影响, 但在正常使用浓度下其防腐活性无明显影响。

(七)富马酸二甲酯 (dimethyl fumarate)

本品又名反丁烯二酸二甲酯。性状: 本品为白色粉状或针状结晶, 溶于乙酸乙酯或氯仿, 难溶于水,熔点为 103~104℃,沸点为 192℃。本品国产产品纯度为 98%左右。

1. 杀微生物作用 本品对多种霉菌都具有较强的抑制作用, 如表 9-8 所示。

表 9-8 富马酸二甲酯对霉菌的最低抑菌浓度

霉菌名称	最低抑菌浓度(ppm)	霉菌名称	最低抑菌浓度(ppm)
黄曲霉	100	黑曲霉	100
构巢曲霉	100	展青霉	100
桔青霉	100	常现青霉	100
禾谷镰刀霉	800	半裸镰刀霉	100
异常汉逊酵母	800	亚膜汉逊酵母	800
白色球拟酵母	800	黑根霉	130
草状毛霉	150	蜡叶枝孢霉	100
互隔交链孢霉	100		

2. 用途及用法 本品可作为食品添加剂,用于面包、鱼、肉和蔬菜等食品的防霉,比丙酸及其盐类有更好的防霉效果。面包、糕点防霉以 0.2 g/kg 为宜。

3 毒性 本品属低毒类。LD<sub>50</sub> 为 2 240 mg/kg ,无三致(致癌、致畸、致突变)作用和蓄积毒性。本品进入人体后能很快变为延胡索酸(富马酸), 属机体正常代谢成分。

(八)肉桂醛(cinnamaldehyde)

分子式: C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>O,分子量: 132.15。性状: 本品为淡黄色液体, 具有桂皮油和肉桂油的香气。沸点为 252℃,相对密度 1.0497,折射率 1.6195 ,微溶于水。本品含肉桂醛 95%~96%。

1. 杀微生物作用 本品有较强的抗真菌作用, 其对真菌的最小抑菌浓度见表 9-9。

表 9-9 肉桂醛对真菌的抑菌浓度

试验菌株	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )	试验菌株	MIC( $\mu\text{g/ml}$ )
皮肤真菌:			
断发癣菌(T <sub>4</sub> )	46.8	紧密着色霉(D <sub>7</sub> )	166.0
猴类癣菌(京 001)	31.2	疣状瓶霉(D <sub>8</sub> )	14.3
絮状表皮癣菌(4783)	229.2	疣状瓶霉(京 001)	333.0
红色毛癣菌(4863)	36.4	曲霉:	
石膏样毛癣菌 4935)	104.0	黑曲霉(京 001)	72.9
石膏样毛癣菌 T56)	13.7	烟曲霉(京 001)	83.3
石膏样小孢子菌(4777)	31.2	酵母及酵母类菌:	
卡氏枝孢霉(京 001)	20.8	光滑球拟酵母(京 001)	333.0
粉小孢子菌(M <sub>6A</sub> )	44.3	新型隐球菌(京 001)	41.6
奥杜盎小孢子菌(M <sub>4</sub> )	22.1	新型隐球菌(D <sub>2A</sub> )	104.0
深部真菌:		白色念珠菌(C <sub>1A</sub> )	135.0
裴氏着色霉(M <sub>6</sub> )	31.9	热带念珠菌(京 001)	70.3
皮炎着色霉	104.0		

注: \*表中数据为 48 h 结果,三次试验平均值

2.应用范围 本品可用于调制素馨、铃兰、玫瑰等日用香精用防霉,也用作糕点食品的增香剂用于防腐。

3.毒性 本品属于低毒类。急性毒性:小鼠腹腔 LD<sub>50</sub> 为 200 mg/kg;大鼠经口 LD<sub>50</sub> 为 2 220 mg/kg;豚鼠经口 LD<sub>50</sub> 为 1 160 mg/kg。

### 三、季铵盐类阳离子表面活性剂 ( quaternary ammonium compounds with cation surfactant )

#### (一)氯化苄烷铵( benzalkonium chloride)

分子式: [C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>·CH<sub>2</sub>·N(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·R]Cl,其中 R 代表从 C<sub>8</sub>H<sub>17</sub> 到 C<sub>18</sub>H<sub>37</sub> 到的烷基。性状:本品为一种白色或黄白色的粗凝胶,或带有芬香气味和极苦味的胶片。含水量不得过 15%。本品极易溶于水、乙醇及丙酮,几乎不溶于其他溶剂。其水溶液通常显微碱性,剧烈振摇时起泡沫。

1.杀微生物作用 本品对细菌繁殖体有明显抑杀作用。酚系数: 429(伤寒杆菌)或 407(金黄色葡萄球菌),在 1/20 000 ~ 1/10 000 浓度下可杀死大多数的病原菌和霉菌。1:7 500 的本品溶液可将绿脓杆菌单个菌存活时间由 45.5 min 减少到 7 min。0.003% 的本品的抗菌效果因加入 0.175% 的苯甲醇、苯乙醇或苯丙醇而增加,尤以添加苯丙醇效果更佳。

#### 2.影响抗微生物作用的因素

(1)配伍禁忌:本品与碘化物、磺胺类药物钠盐、硝酸银、蛋白银、荧光素钠、饱和的硼酸溶液等产生溶解极小的沉淀,有配伍禁忌。本品可与肾上腺素、阿托品、后马托品、丁可因、可卡因、普鲁卡因、东莨菪碱等相配伍。

(2)有机物影响: 本品对人肠杆菌的制菌力受高分子物质的影响。在空白对照液中本品对大肠杆菌的最低杀菌浓度为 20 ppm。加入不同的高分子物质(20%)后最低杀菌浓度均有不同

程度增大:甲基纤维素 25 ppm, 聚乙二醇 40 ppm, 鲸蜡硬脂醇 50 ppm, 乳化蜡、鲸蜡聚乙二醇和西黄芪中本品含量增至 200 ppm 尚不能杀死大肠杆菌。

(3)吸附和损失: 0.02%本品水溶液 30 ml, 经多孔玻璃滤器、素烧瓷滤器、石棉垫, 或滤膜滤器的吸附损失率分别为 11%、38%、50% ~ 60% 和 14%。本品同塑料接触亦会丢失。本品的水溶液同聚氯乙烯接触时, 由于吸附和吸收而损失, 在 pH 3 时损失最低, 稀溶液比浓溶液损失更大, 在有乙醇、甘油、巨醇 400 以及聚乙烯二醇存在时减少。在棉花中活性损失明显, 用 0.1%本品水溶液浸泡粘有革兰阴性菌的棉拭子, 曾在某医院引起 15 名病人感染。其中 4 人表现出临床症状, 2 人死亡。因为本品的水溶液同棉纤维或蛋白等接触时抗菌活性丢失。

3.使用方法 本品性质稳定, 加热不易分解。在一般条件下无刺激性。是一种优良的眼用药防腐剂。

4.毒性 本品毒性小。蛙口服  $LD_{50}$  为 30 mg/kg。

5.注意事项

(1)本品不能与肥皂和阴离子表面活性剂、柠檬酸盐、碘、硝酸盐、高锰酸盐、水杨酸盐、银盐、酒石酸盐、硫酸盐和碱配伍。

(2)液用高压灭菌或过滤除菌、贮于容器中密封、闭光保存。

(3)本品不得反复在皮肤上使用, 可能发生超敏反应者(有超敏反应史)不得使用。

(4)本品不得用于设备的消毒剂。

#### (二)氯化苄甲乙氧铵 (benzethonium chloride)

分子式:  $C_{27}H_{42}ClNO_2 \cdot H_2O$ , 分子量: 448.09(无水), 466.1(含  $H_2O$ )。性状: 本品为无色、无臭、有苦味的结晶。熔点 158 ~ 163℃。本品按  $C_{27}H_{42}ClNO_2$  干基质计算不少于 97.0%。

1. 杀微生物作用 本品对革兰阳性和阴性细菌繁殖体有杀灭作用, 但后者需更高浓度。而对细菌芽孢、抗酸杆菌、病毒和真菌无效。

2. 用途与用法 本品为一种季铵盐性质的消毒剂, 应用与十六烷三甲基相同。0.1%水溶液用于伤口处理, 0.2%的乙醇和丙酮溶液用于术前皮肤消毒。也可用于清洗食具与奶具, 控制游泳池藻类生长。还可用作除臭剂及防腐剂。

3. 毒性 含本品 0.0022% 氯化钠注射液中加入红细胞, 孵育 45 min 发生完全溶血, 当浓度减少到 0.0015% 时则仅发生轻度溶血。

本品经口服会引起恶心和呕吐。有使肌肉去极化松弛的特性和毒性症状, 包括因呼吸肌麻痹所致的呼吸困难和紫绀。

#### (三)溴化十六烷三甲基铵 (cetyltrimethylammonium bromide)

分子式:  $C_{19}H_{42}BrN$ , 分子量: 364.45。本品含溴化十六烷三甲基铵不得少于 96.00%。性状: 本品为白色或乳白色、卷曲、易流动、无明显特殊气味的吸湿性粉末, 带有苦味或肥皂味。其水溶液表面张力低, 振摇有泡沫。2%的溶液为清澈或极轻微乳光的液体。本品 1 份可溶于 2 份水中, 极易溶于乙醇, 1%的水溶液 pH 为 5 ~ 7.5。

1. 杀微生物作用 本品为季铵盐消毒剂, 对革兰阳性菌有杀菌活性, 对革兰阴性菌需有更高浓度才有杀菌活性, 但对细菌芽孢、抗酸杆菌、病毒和真菌无效。铜绿假单胞菌和结核分支杆菌对本品有抗性。对细菌芽孢即使延长接触时间也不能杀灭。阳离子表面活性剂有良好的抗白色念珠菌活性, 但抗真菌活性是易变的

2 影响抗微生物作用的因素

(1) 有机物:本品能很快地同蛋白质结合,如有血液、棉花、纤维以及其他有机物的存在而使有效成分大大减少。

(2) 相容性(配伍):季铵化合物可被阴离子沉淀或结合在胶团中而灭活。但可与两性化合物配伍。此外,当有超过某种比例的非离子表面活性剂存在时,本品的杀菌活性因形成胶团而降低,这一临界值对于多种基质的结合和各种微生物的影响是不相同的。

(3) pH 可影响本品杀微生物活性:本品在中性或弱碱性溶液中杀菌效果最佳,酸性时杀菌活性明显降低。

3.用途和使用方法 本品可用于药品和化妆品的防腐、保存及皮肤消毒等。

本品和氯苄烷铵的水溶液和乳剂,用于术前皮肤清洁和清除皮肤病的痂壳、皮屑,水溶液用于清洗污染的器具。

4.毒性 本品经口可引起恶心、呕吐,有使肌肉去极化松弛的特性和毒性症状,包括因呼吸肌麻痹所致的呼吸困难和发绀,很可能导致窒息,可使中枢神经系统功能降低,也可发生低血压及昏迷。对皮肤无刺激性,但有些人反复使用本品后有过敏反应,皮肤变得过分干燥。季铵盐去垢剂,如氯化苄甲乙氧胺和氯化十六烷基吡啶等的致死剂量是 1~3 g。用斑贴试验证明,皮肤对本品敏感。

5.注意事项 本品禁与肥皂和其他阴离子表面活性剂、皂土、碘、硝酸苯汞以及碱性氢氧化物配伍,溶液用高压灭菌或过滤除菌后贮存。

本品不宜在皮肤上反复使用,发生超敏反应者不得接触本类湿化妆品。本品不得用软木塞密封。

(四)氯化十六烷基吡啶(cetylpyridinium chloride)

分子式:  $C_{21}H_{38}ClN \cdot H_2O$ ,分子量:358.0。性状:带有轻微特殊气味的白色粉末。熔点 79~83℃。溶解度为 5%,极易溶于乙醇和氯仿,微溶于其他溶剂。1%的水溶液 pH 为 5~5.4。

1.杀微生物作用 本品和其他阳离子表面活性剂一样属碱性基团,与菌体细胞壁上的酸性基团,即带负电荷的酸根相结合而发生作用。革兰阳性菌细胞壁表面的酸性基团多于碱性基团,阳离子表面活性剂与之结合较弱。所以,本品对革兰阳性菌的作用远比阴性菌强(见表 9-10)

表 9-10 阳离子表面活性剂对细菌的最低抑菌浓度

药物名称	大肠杆菌	绿脓杆菌	金黄色葡萄球菌
氯化十六烷基吡啶	1:40 000	< 1:1 000	1:400 000
溴化十六烷基铵	1:20 000	< 1:1 000	1:400 000

2.用途与用法 应用与溴化十六烷三甲基相同。用于消毒和药品防腐。

3.毒性 与溴化十六烷三甲基相同。

4.注意事项 本品为阳离子表面活性剂,忌与肥皂和其他阴离子表面活性剂配伍。

(五)溴化十四烷三甲基铵(tritradecyl trimethyl ammonium bromide)

分子式:  $C_{13}H_{28}BrN$ 。性状:本品为白色至乳白色流动性粉末,微带特殊气味,味苦,有皂样味;有吸湿性。溶于水(1:2, 25℃),易溶于热水及乙醇,微溶于丙酮,不溶于乙醚及苯。1%的水溶液 pH 为 5~7.5。

1. 对微生物的杀灭作用 对革兰阳性及阴性细菌繁殖体有杀灭作用；对抗酸杆菌、霉菌、病毒及细菌芽孢效果差。
2. 用法及用量 常用作防腐剂及消毒剂。常用浓度为 0.01% ~ 0.1%。
3. 毒性 豚鼠或小鼠静脉内注射  $LD_{50}$  为 50 mg/kg；口服本品可引起恶心呕吐，引起呼吸肌麻痹致呼吸困难并可导致窒息；个别人可产生过敏。
4. 注意事项 密封保存，防止吸入及摄入，不得与皮肤及眼睛接触。

#### 四、复方防腐剂及保藏剂

为了充分应用各种防腐剂的优点，克服其缺点，常将两种或数种防腐剂作成复方，联合应用以加强抗微生物作用。

各种防腐剂都有一定的应用浓度。有时单一的防腐剂在应用浓度下达不到防腐效果，其原因是相当复杂的。微生物对防腐剂耐药是主要因素。不同种微生物对各种防腐剂有不同的敏感度，即使同一种细菌的不同菌株对防腐剂的敏感性也不相同。对防腐剂比较敏感的菌株，应用普通浓度的单一防腐剂即可达到制菌，但也有的菌株对防腐剂不敏感，需要较高的制菌浓度，甚至用较高的浓度也不能达到制菌的目的。除微生物因素外，药品和化妆品处方也是重要的因素。有的制剂配方组成比较复杂，对防腐剂效能干扰的因素较多，用一般浓度的防腐剂亦不能达到制菌的目的。加大防腐剂的浓度可以克服某些菌的耐药以及由于某些药剂成分复杂而引起效能降低的现象。但一般不采用此法。因为许多防腐剂都有一定的生理作用，加大浓度可引起机体反应，包括全身作用和局部刺激作用。有的防腐剂本身溶解度低，加大浓度可能引起溶解困难。应用复方防腐剂可以克服上述缺点。合理的配伍可以达到增强防腐剂效能，克服不易溶解的缺点等目的。

复方防腐剂的作用方式。一般药物的联合应用的作用方式有协同、相加、无关和拮抗等四种。但在防腐剂联合应用上，无关作用实际上是不存在的。当两种或两种以上的防腐剂联合应用时，其作用不可能是无关的。因此，实际上只有协同、相加和拮抗三种作用。协同作用是指两种或两种以上的防腐剂联合应用出现作用加强的现象。使微生物对防腐剂的敏感性提高，耐药现象消除，从而加强了防腐剂的作用。相加作用是指防腐剂联合应用时，所出现的作用为防腐剂各成分作用相加之和。相加作用并不能使防腐剂的效能得到增益。拮抗作用是指防腐剂联合应用时出现作用削弱的现象。这种情况是在选择配方组分时应当十分注意的问题，只要严格掌握配伍禁忌原则，可以避免拮抗作用的产生。常用复方防腐剂如下：

##### （一）三氯叔丁醇和苯乙醇复方防腐剂

当三氯叔丁醇或苯乙醇单独应用时都不能有效地杀灭绿脓杆菌，而两者配伍可以表现出明显的杀菌协同作用。Stok(1962)报道，0.4% 三氯叔丁醇加 0.48% 苯乙醇可在 6min 内杀灭绿脓杆菌。Deeb(1958)也曾报道三氯叔丁醇与苯甲醇或苯乙醇配伍用，对绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌、变形杆菌等有协同杀菌作用，防腐力增强。

##### （二）苯乙醇和其他防腐剂复方

Richards 等(1971)将各种防腐剂低于 MIC 的溶液，接种绿脓杆菌，由于防腐剂浓度不够，微生物仍能生长繁殖。经添加苯乙醇(0.2%，低于有效浓度)后，结果发现，苯乙醇和许多防腐剂都有协同作用。0.2% 苯乙醇加入 0.2% 三氯叔丁醇或 0.275 mg% 洗必太可使绿脓杆菌立即溶菌。0.2% 苯乙醇加入 0.003% 氯苄烷铵、0.024% 氯甲酚、0.1 mg% 硫柳汞、尼泊金(0.023%)、



甲酯和 0.0115%丙酯混合物或硝酸苯汞(0.4 mg% )中,虽未达到完全抑菌,但微生物增殖时间延长,显示了明显的协同作用。

### (三)依地酸钠和一些防腐剂配伍

依地酸钠有抗微生物作用,它与一些防腐剂可以产生协同作用。依地酸钠可加强氯甲酚、洗必太、氯苯烷铵、多粘菌素等药物抗绿脓杆菌的作用。微生物对季铵类防腐剂有时可产生耐药性,添加依地酸钠可使微生物恢复对季铵类的敏感性。0.01% 氯苯烷铵和 0.05% 依地酸钠,各自单独应用均不能有效地抗绿脓杆菌,而联合应用可显示较好的作用。

### (四)防腐剂和增效添加剂的复方

表 9-11 中列出了 Gyorgy Hangay 博士(1985)推举的防腐剂和增效添加剂复方。

表 9-11 防腐剂和增效添加剂复方

复方商品名称 <sup>R</sup> 或所含基本化合物名称	成 分	备 注
<b>Nipastat<sup>R</sup></b>	对羟基苯甲酸甲酯、丙酯和丁酯	微生物数减少,速度加快 1-2 倍
<b>Phenonip<sup>R</sup></b>	对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯和 2-苯氧基乙醇	抗微生物谱及 pH 谱广
<b>Liqua Par<sup>R</sup></b>	对羟基苯甲酸、丁酯、异丁酯、异丙酯的复方	对霉菌、酵母和革兰阳性菌有效
<b>Lauricidinplus41<sup>R</sup></b>	<b>Lauricidin</b> , 对羟基苯甲酸甲酯和丙酯以及依地酸	适用于水包油及油包水型乳剂
<b>Emericidine<sup>R</sup></b>	2-苯氧基乙醇和对氯间二甲苯酚	pH 谱广
<b>Germaben II<sup>R</sup></b>	<b>Germall 115</b> , 对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、丙二醇 (30:11:3:56)	抗微生物谱广,配伍性好
<b>Phenonip</b>	加 <b>Germall 115</b> 复方	不被非离子乳化剂及胶原灭活作用谱完全
对羟基苯甲酸酯类	加溴硝丙二醇 0.01% - 0.02% 加 <b>Kathon CG</b> 加 2,5-丙二醇加 <b>Pionin</b>	油加强作用 pH8 时也有有效协同作用
<b>Dowicil 200</b>	加对羟基苯甲酸甲酯类或酚聚乙醇	加强作用
山梨酸	或聚乙烯丙二醇	加强作用
锌-巯氧吡啶	加依地酸(1:1)	最适 pH 为 4.5,加强作用
<b>Kathon CG</b>	加 <b>Irgasan Dp300</b>	加强作用,非常有效

在药品中,以含对羟基苯甲酸酯类的复方最好。其中 **Nipacombin** 和 **Nip-Nip** 已使用一个阶段,而 **Nipastat** 使用时间还不长。以前对羟基苯甲酸甲酯和丙酯复方(4:1)也因加入了丁酯,而使效果进一步提高。根据 **Maddox(1982)**的报告,将复方 **Nipastat** 的杀灭微生物的速度较对羟基苯甲酸甲酯和丙酯复方要快 1~2 倍。

## 第四节 生物学中的防腐和保藏

### 一、尸体、组织解剖物和器官移植防腐与保藏的原理及特点

科学地认识人体结构,探求和掌握人体奥秘,熟知人体结构的规律,研究预防医学和临床

医学等生命科学的发展,为人类的健康长寿和文明服务,离不开尸体解剖和组织细胞的研究,也必须需要保存完好的尸体、组织和器官。生命科学工作者均熟知,人和动物的尸体、组织和器官是以细胞为单位的,细胞是由各种有机物构成的。因此,未经处理的尸体、组织和器官很易受到微生物侵袭而导致腐败,腐败后就无法用来解剖和作各种研究。另一方面,随着现代科学技术尤其是临床医学、细胞、组织和器官移植技术的飞速发展。要求移植的细胞、组织和器官保持其生命活力,更需要科学保存,严格防止其腐败。这就要求有一套先进的科学的防腐和保存技术。因此,弄清组织腐败的原因和防腐保存原理非常重要。

### (一)组织的腐败和自溶的原因

人或动物死后,尸体若未经防腐固定处理,很快就會发生组织自溶、腐败。

人体是由各种物质组成的,如蛋白质、脂肪、糖类等,这些物质本身是相当稳定的。但人或动物死后,由于机体自身具有生物活性的酶系统作用,使组织迅速分解,这些具有强大催化作用的酶系统,通常有两个来源:一是大量存在于人体细胞中的酶类,二是大量繁殖的微生物提供的酶类。

用生物化学和酶组织化学的方法,已在人体细胞的溶酶体中发现了数十种与蛋白质、脂肪和糖类有关的酶类,其中最多的是水解蛋白质的酶,称为组织蛋白酶,在肝、肾、脾等器官的组织中尤为丰富。体内组织蛋白质的分解就是受组织蛋白酶所催化的。这些酶活性的最适pH值在3~6之间,均偏酸性。溶酶体有薄膜包被,起隔离作用,防止各种水解酶与细胞质接触,以免破坏细胞结构,造成细胞的损害。当机体死亡后,因缺氧,代谢发生障碍,细菌及其毒素均可导致溶酶体膜破裂,溶酶体中所包含的各种水解酶进入细胞质中,破坏细胞,继而破坏细胞的间质成分,导致组织自溶。同时,因死后缺氧,糖无氧酵解生成大量乳酸,不能彻底氧化成水和二氧化碳,使酸性产物大量堆积,pH值下降,为水解酶增强活性提供了条件。这种表现为细胞成分大量分解的组织自溶作用,即使在严格无菌的情况下,仍能进行。细菌及其毒素除能损害溶酶体膜之外,它所释放的各种酶,也直接破坏细胞结构,参与组织腐败的过程。如蛋白质分解为氨基酸,在酶参与下进一步分解产生各种胺(尸胺、腐胺等)、吲哚、甲基吲哚、硫化氢等具有强烈臭味和毒性的产物。

### (二)防腐固定的基本原理

1.使蛋白质变性凝固 如前所述,机体的酶参与组织的腐败和自溶。酶类和微生物主要成分是蛋白质。很多理化因素均可使蛋白质变性或凝固,使酶失活,杀灭或抑制微生物生长繁殖。用理化因子防止组织自溶,可达到对尸体、组织、解剖物防腐固定的目的。常用的化学防腐剂有酚类、醇类、醛类、重金属盐等。物理因素防腐可用加热、紫外线、 $\gamma$ 射线辐照、干燥脱水、冷冻等。用于解剖研究的尸体、组织等的防腐保存方法,要求所用理化因素既能破坏酶的活性达到防腐固定的目的,又要尽量保持人体结构的自然完整状态,便于解剖观察研究。因此,对组织破坏性大、收缩率大、腐蚀严重的因素,如高温、高压、强酸、强碱等一般均不采用。

2.干扰微生物的重要酶系统 有些酶类的活性是酶结构中的特殊功能基团(如-SH)所决定的。这些功能基团若被氧化、或与其他物质结合,则酶可失去活性,致使微生物不能进行正常代谢而死亡。若用某些氧化剂、重金属离子等破坏硫氢键(巯基)酶类的功能基,则可使酶失活而达防腐目的。

3.破坏细菌细胞膜改变其渗透性 细菌细胞膜系一种半透膜,具有菌体和周围环境之间物质正常交换的功能。该膜受损后,渗透性发生改变,膜内物质外渗,水分内渗,致使菌膜肿胀

破裂或溶解,起抑菌或杀菌作用。有些药剂具有亲水和憎水基团,能降低表面张力,使油水乳化,消除油污,起洗涤清洁作用。另一些药剂能吸附于脂性细胞膜上,改变细胞膜通透性,使菌体内的酶、辅酶及核酸等重要成分漏出而达到杀菌作用。

按照解剖学和病理学的要求,一种理想的防腐固定剂,应具有防腐效力强,使用简便,价格低廉,刺激性小,没有毒性,无不良气味,防腐固定生效快,所保存的标本收缩率小,色泽接近活体状态等特点。由于每种药剂的防腐性能和方法各不相同,各有其优缺点。为了加强其功效,弥补其缺陷,往往将数种药物混合配制,以期获得理想的效果。但迄今仍未找到十分理想的防腐固定剂。

### (三)主要防腐固定药物的性能

**1.乙醇** 乙醇又名酒精,在防腐固定中,酒精具有较强的脱水作用,能将细胞表面和内部的水分脱掉。使蛋白质分子结构松解及蛋白质凝固变性。故起杀菌防腐作用。此外,酒精在组织中渗透力强,在混合防腐液中加入浓度过高能使细胞表面的蛋白质迅速变性,形成一层保护膜,阻止药物进入到深层发挥作用。故用于组织、器官等标本固定的酒精浓度不应超过**75%(v/v)**。用酒精固定的标本,色泽保存较好,刺激性不强,无不良气味。但其缺点是:脱水作用太强,标本收缩率大(可达**20%**左右),能使脂肪和类脂溶解。故富有类脂质的器官(如脑标本等)不宜用酒精作固定剂。另外,酒精为一种还原剂,在氧化剂作用下易生成乙醛。配制混合液时,应避免同时掺入氧化剂。酒精易挥发散失,对有机玻璃有轻微侵蚀作用,使用时应予以注意。

**2.甘油** 甘油又名丙三醇,为无色、无臭、透明而带有甜味的粘稠液体,能与水和乙醇任意混合,对无机盐的溶解度较乙醇大,能溶解溴、碘、磺胺药物及其钠盐。并对某些药物,如鞣酸、酚、硼酸等有特殊的溶解力,其所形成的溶液较稳定,因此是很有价值的溶媒和保存剂。甘油有很大的吸湿性,能防止干燥,使动、植物性皮膜柔软而透明,甘油能降低水的表面张力和水的冰点,比重**1.2969(25℃)**,沸点**290℃**。水溶液(**1:10**)对石蕊试纸反应中性。甘油不溶于乙醚、氯仿、挥发油和脂肪油。

在混合防腐固定剂中,甘油是一种良好的供选用药物。利用其防腐性、吸湿性和对某些无机盐类药物的特殊溶解能力,所配成的溶液比较稳定,所固定的尸体、组织等经解剖后不易干燥,比较柔韧,结缔组织稍呈透明。更重要的是甘油能吸附与其混合的药物(如甲醛、乙醚、酚等),滞留在标本内部和表面,使上述药物不易挥发和散失,达到增强上述药物的防腐固定效果,提高抗霉能力。甘油还能减轻甲醛挥发,降低刺激性气味。甘油具有亲水性和脱水作用,并随着浓度增大而加强。高浓度甘油可使蛋白质变性,起防腐作用,也可使组织严重脱水,标本收缩干涸。利用其脱水防腐作用,可制作半透明标本。缺点是:低浓度甘油渗透性能差,配制混合防腐固定剂时,也同时降低其他药物的渗透速度。所处理的标本需较长时间才能应用。高浓度甘油粘稠性大,注射时有很大阻力。用甘油制作的标本,粘腻滑滞,解剖操作不便。为弥补甘油渗透性差的缺点,有人从多元醇类中找到了渗透力较好的山梨聚糖醇代替甘油,与酒精类溶液共用,更能加强渗透穿入性能。

**3.酚** 又名苯酚,石炭酸。酚和乙醇相似,也能使蛋白质凝固,是良好的杀菌防腐剂,但对标本没有固定硬化作用,一般不单独使用,多与其他药物配伍。它的缺点是:有不良气味,使标本颜色不佳,对肌肉(特别是对心肌)和脑标本等均不理想。高浓度的酚有很强的腐蚀性,接触时应注意防护。若不慎沾上,可烧伤皮肤,应立即用酒精擦洗。低浓度酚仍可使神经末梢麻痹,

长期直接接触应采取适宜防护措施。

加热熔化酚时,因其蒸气易燃,切勿直接进火,以免引起火灾。纯酚为无色的针状结晶,在空气中易氧化,逐渐变成粉红色、红色或暗红色。故贮存时应尽量密封,不与空气接触,必要时需加抗氧化剂。已变色者会使标本染色,不宜再用。酚类化合物氧化后可生成黄色的对苯醌,其熔点高达  $115^{\circ}\text{C}$ , 不易溶。用大量酚液作尸体保存液,日久生成醌,池底会产生黄色泥浆样沉淀物。也有人认为酚和  $\text{Fe}^{3+}$  形成的复合物,污染固定液和标本。故配制含酚防腐剂需排除铁离子,可以用脱钙水配制。

用酚的衍生物五氯苯酚钠代替酚,可以克服酚的不良气味对标本染色的缺点。且杀菌防腐效果优于酚,所保存标本色泽较酚好。五氯苯酚钠的使用浓度为  $0.25\% \sim 1.0\%$ , 一般用  $75\%$  的溶液,若浓度高于  $1.0\%$ , 所处理标本的肌肉会出现黑褐色。五氯苯酚钠常与甲醛合用。

酚会腐蚀有机玻璃,经其处理的标本不宜用有机玻璃容器封装。

**4. 甲醛** 又名蚁醛。它极易与蛋白质中的氨基结合,使蛋白质、明胶凝固,组织固定,还能保存脂肪和类脂质,渗透性很强,收缩率不大,价格低廉,对标本形态、位置的维持和皮肤颜色保持良好,是一种优良的、应用广泛的防腐固定剂。甲醛的缺点是:所固定的组织易发硬变脆,肌纤维易被拉断;且有强烈的刺激性气味,对眼结膜、呼吸道黏膜及经常接触的皮肤有一定损害。

固定标本常用  $10\%$  福尔马林,即  $4\%$  甲醛。甲醛浓度过高,费用高,组织太硬,亦影响渗透力,效果反而不佳。用福尔马林灌注尸体,经一周即可渗透到全身各部,但需  $4 \sim 6$  个月方可完全固定,适于解剖操作要求。

甲醛为还原剂,不应与氧化剂配合,因可氧化成蚁酸。日光照射下亦可氧化,贮存应置暗处或棕色玻璃瓶避光。甲醛水溶液易发生聚合作用,若放置过久,水分蒸发,与空气接触或低于  $20^{\circ}\text{C}$  时,常可生成白色沉淀,为三聚甲醛或多聚甲醛。对已发生沉淀的福尔马林,可经加热,使多聚甲醛解聚,分解为甲醛,可继续使用。

福尔马林可与氨水混合,经浓缩而成环六亚甲基四胺的白色晶体,称为乌洛托品。它在酸性条件下可分解出甲醛,故有甲醛的各种防腐性能,但效力比直接用甲醛液要弱得多。乌洛托品的主要优点是无强烈的刺激性气味,可改善操作环境,亦可减少长期接触甲醛对健康不利的危害。

#### (四)常用防腐固定剂配方

**1. 单方防腐固定剂** 许多药剂单独使用不易克服其缺点,现多采用混合液。唯福尔马林价低、效优,毒性相对较小,虽有一些缺点,仍为常用防腐固定剂。福尔马林使用浓度为  $10\%$ , 较适于固定婴儿、残肢、内脏、神经系统和一些要求保持外形的标本。

**2. 混合防腐固定剂** 混合液配方众多,各有利弊。混合配方时,增减药物的原则是充分发挥各药物的优点,克服其缺点,按尸体、组织标本的不同使用要求灵活应用。同时必须根据药物配伍规律,避免不良化学反应。消毒防腐剂作用的强弱,除受药物浓度和时间影响外,剂型不同亦影响其作用。如同一药物,其酒精溶液的作用最强,水溶液次之,油溶液最弱,刺激性却最小;苯酚水溶液有强大的杀菌作用而甘油和油溶液则作用很弱。下面介绍一些常用配方供参考。含甲醛的混合液见表 9-12。

表 9-12 常用甲醛混合液配方表

药 品	常用浓度(%)	调整幅度(%)	标本效果
福尔马林	10	5 ~ 15	防腐固定作用强,标本成形好,但硬度大
石炭酸	5	0 ~ 10	杀菌抗霉力强,肌肉组织色泽不佳
乙醇	30	0 ~ 75	渗透力好,固定彻底,色泽好,对脂肪、 类脂有溶解作用
甘油	10	0 ~ 30	增加柔软性耐干性
水	45	适量	

在上述配方基础上,针对不同情况和需要,还可选性地加其它药品,来提高渗透力,增加防腐固定液的防腐抗霉力和对标本的保色作用。

此外,砷、汞对组织有较好的渗透性能,因有巨毒,一般不采用。

不含甲醛的混合液:不含甲醛的混合液一般没有很强的刺激味,尸体也比较柔软,但防腐固定的作用较弱。

### (五)器官移植物的防腐和保藏原理

安全有效的器官防腐保存是器官移植成功的先决条件。供体的血型尽量与组织配型、受者的选择、供移植用器官的运输、移植术的实施等,均要求器官在移植前能保持其存活力一段时间。器官保存的目的在于使离体缺血的器官保持最大的活力,并于血液供应恢复后迅速恢复功能。所以器官保藏已被列入移植学的三大支柱之一。

1. 器官缺血后的病理生理变化 器官缺血后氧和各种代谢底物终止供应,氧化磷酸化作用及三磷酸腺苷(ATP)的含量迅速减少,糖原分解和无糖氧酵解过程代偿性增强,故使 ATP 的合成在短时间内继续进行。但 ATP 合成不足很快导致细胞 ATP 含量及 pH 下降、乳酸积累,引起细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶的失灵。线粒体随后也发生浊肿,胞壁内的膜性结构破裂,这就超过了细胞可复苏的临界点。随着缺血时间延长,缺血器官的血管内皮水肿、坏死、脱落,导致再灌注的困难,最终恢复血流后会出现“不再流现象”(no-reflow phenomenon)。

2. 低温的保护作用与细胞肿胀机制 目前,有效的器官保藏方法主要为低温。低温的保护作用在于降低器官的新陈代谢而保存器官活力,延长保藏时限。常温动物大多数酶的活性随温度每降低  $10^\circ\text{C}$  就减少到  $2/3 \sim 1/2$ 。当温度从  $37^\circ\text{C}$  降至  $0^\circ\text{C}$  时,器官代谢速度被抑制到  $1/12 \sim 1/13$ 。大多数器官能耐受缺氧  $30 \sim 60\text{min}$  而不完全丧失功能。将一个器官从  $37^\circ\text{C}$  降至  $0^\circ\text{C}$  能延长保藏期  $12 \sim 13\text{h}$ 。但另一方面,低温也可引起组织细胞损害。低温抑制细胞膜  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$  酶活性并降低细胞膜电位。结果  $\text{Na}^+$  及  $\text{Cl}^-$  沿浓度梯度进入胞内,而胞内  $\text{K}^+ \cdot \text{Mg}^{2+}$  外逸,细胞内水分蓄积而肿胀。

### 3. 器官保藏中的能量代谢

(1)腺嘌呤核苷酸代谢:腺嘌呤核苷酸 adenine nucleotide, AN) 在低温时其代谢发生了变化。因低温抑制了 AN 转位酶的活性而限制了 ATP 的合成速度。其结果使 ATP 在细胞内蓄积并被腺苷酸激酶分解为 AMP, AMP 进一步分解为氧嘌呤,导致保存器官在保存期间及再灌注期间能量缺乏。更直接恢复 AN 值的一个途径就是使用 ATP 本身。ATP 对于维持细胞膜适当的构型与功能特征是必需的,具有稳定细胞膜的作用,在器官保存中 ATP 对延迟保存诱发的膜损害有辅助作用。

(2)保存对线粒体的作用：在低温保存期间，线粒体的活性持续丧失。其机理为保存期间磷脂酶的作用，产生高自由脂肪酸值，后者的酰基衍生物在细胞内积累，导致 ADP 转运入胞内受阻，故抑制了氧化磷酸化。10℃以下的膜脂质的固化作用也可阻止磷酸酶的有效转运，因此抑制了 AN 穿入线粒体膜的速度，阻止 ATP 的快速合成。而线粒体功能的丧失对于细胞成活是致命的。离体保存线粒体唯一有效的方法就是低温保存。

4. 器官糖代谢的差异 各器官间糖代谢存在很大差异，该差异可直接影响到器官保存效果。器官保存中无氧糖酵解的增加可引起细胞内酸中毒。肝脏与肾脏的无氧糖酵解及其调控机理不同。由于肝脏具有较多的糖原储存及细胞膜对葡萄糖较大的通透性，使其具有比肾脏产生更多氢离子的能力。由葡萄糖酸酶完成葡萄糖磷酸化为葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)。而肾脏是由己糖激酶完成葡萄糖磷酸化的。而且两酶活性也不同，肝脏中葡萄糖激酶的最大催化活性约为肾脏己糖激酶的 15 倍。因此，普通含葡萄糖、甘露醇的保存液也往往不能有效地保存肝脏和胰腺。

5. 氧自由基与自灌流损伤 许多研究发现，在器官保存过程中，器官缺血本身几乎不引起组织结构的任何改变，而是在移植后血液恢复后出现明显的病理改变。一般认为与氧自由基损害作用有关。正常情况下组织内广泛存在着黄嘌呤脱氢酶(xanthine dehydrogenase, DO)，它以异柠檬酸脱氢酶为电子受体而不产生氧自由基。但通过对巯基的氧化或蛋白水解作用，DO 可转化成黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XO)，而 XO 以氢作为电子受体，产生游离的带有不成对电子的分子、原子或离子的氧自由基。

在了解了尸体、组织、解剖物和器官腐败及变化机理后，才能采取有效的防腐、防护和保存措施，确保这些物品在使用时符合规定的基本要求。

#### (六)尸体防腐的技术特点

1. 尸体的防腐固定 尸体防腐固定的方法有浸泡法和灌注法两种。浸泡法是将标本浸泡于适当浓度的防腐液中，药物渗入器官内部，以达到防腐固定的目的。由于直接渗透只能达到一定深度，因而此法只适合于小件离体器官或局部的防腐保存。整体尸体防腐保存常用灌注法。将防腐固定液注入血管，使之循血管流遍全身，渗透到所有组织器官。虽人死后不久血液即出现凝固，但凝血块不与血管壁胶着，且动脉血管内含血量少，甚或无血，经动脉加压灌注防腐效果最好。依加压方法不同分为以下几法。

(1)注射器直接注射法：用 50 ~ 100 ml 玻璃注射器或 100 ~ 500 ml 金属注射器直接注射。此法灌注量小，手推压力难以持久和保持恒压，多用于处理婴尸、残肢、内脏或局部补充性注射。

(2)吊桶灌注法：用一容积为 10 000 ~ 20 000 ml，下部装有出水管的吊桶，其侧面装上可指示液量的标尺。用时将桶悬于约 2 m 高处(可利用高度来调节压力)，用橡皮管下 Y 形管和灌注导管相连。此装置操作较简便，压力均匀，易控制，为常用灌注方法。

(3)唧筒式灌注法：将一个密封灌注瓶与一打气唧筒连接起来，最好能装上压力计，压力维持在 18.6 kPa 左右。若无压力计，使用时要注意，打气量应适量，防止压力过高，造成血管破裂。

(4)水压灌注法：此法系利用自来水压进行灌注，是一种简便易行的方法。使用此装置应注意，当盛水的瓶快满时，要及时倒去，以免流入防腐剂瓶冲淡防腐液。并应随时观察调节水压。

(5)微型泵灌注:临床血管灌流时使用的微型泵,可调节流速、流量及压力,改装加大贮存瓶用于灌注尸体比较方便。

在灌注防腐固定液时,有时在尸体表面的某些区域,特别是在靠近灌注区出现一些水泡,说明灌注压力太大,应予调整。

(6)加压渗透法:尸体清洗灌注后置于可密闭的加压铁箱中,箱内加防腐液浸泡尸体后加压,并维持两周,使固定液渗入体内。

## 2. 防腐灌注时应注意的几个问题

(1)暴露灌注部位的血管时要仔细鉴别动脉及其伴行静脉,不要出错。因死后动脉腔内空虚,灌注通畅,能保证防腐效果。血液多积存于静脉腔内,易凝成血块,阻塞管道,若误将导管插入静脉,药液往往不能均匀地分布于全身。灌注时应随时检查效果,以便发现问题,及时纠正。

(2)尸体搁置过久,胸腹腔腐败已很明显,大面积变绿发胀,人体组织变质已较严重,血管内往往有血栓,在这种情况下,会影响充分灌注,防腐效果不佳。因此,一般不再作灌注。若由于某种原因,必须防腐保存时,可先注入 95%乙醇或 4%重铬酸钾 200~400 ml,帮助血栓溶解,然后注入常规防腐剂。最后通过肛门、口腔和胸腔作局部补充灌注,加强防腐措施,才能保证防腐效果。

(3)尸体防腐液的灌注量,应随尸体情况及固定液种类而定。一般为体重的 20%。灌注时若药液从口、鼻、创口等处淌渗出来,应予回收,过滤后放入桶内,反复注入。此外,病人年龄、体质状况、疾病种类、死因等复杂因素往往造成防腐固定效果不佳。

(4)尸体灌注效果的观察。通过动脉灌注防腐药液,应均匀地渗透到组织间隙。灌注已达到要求的部分,皮下微呈水肿,胸腹饱满,口鼻涌出泡沫状药液,用手按压有坚实的弹性感。若防腐液内有石炭酸成分,当防腐液已达到皮肤区时会出现白色斑点,并向四周扩散,斑点将在数小时或隔夜后消失。它可作为灌注已达到要求的一个标志。

(5)为了特殊目的,需要将组织器官内的血液冲洗干净的标本,可于尸体防腐固定前进行血管灌流冲洗。这种标本需用死后不久血液尚未凝固的尸体。用加有抗凝剂的生理盐水(枸橼酸钠 3%~5%,草酸锂 0.15%,草酸钾 0.2%)以 20 kPa 的压力持续灌入动脉,同时多处切开动脉放血,将血凝块冲出。灌注压力要注意调整合适,压力过高会使液体大量流入组织,引起组织水肿,压力太低,血凝块不易冲出。

(6)尸体一经固定,形态位置基本定型,特别是两手握拳状收缩后,很难校正,不便于解剖操作。因此,灌注时应注意按解剖位置摆好尸体。即尸体仰卧,头放正,上肢伸直,指伸直,两下肢伸直并分开约 30℃,选为注射的一侧略外旋。要特别注意使手指伸直,避免拳缩。

(7)尸体灌注完毕,应搁置 2 d,让动脉内的防腐液充分渗入组织间隙后,再移入尸池浸泡。

## (七)尸体保藏的技术特点

尸体经防腐灌注后,应有妥善的保存措施,避免水分蒸发,发生干枯僵硬,表面霉烂等变化。

1. 湿保存 湿保存是一种常用的保存法,设备简易,成本较低,效果良好。此法是将尸体浸泡在盛有保存液的尸槽、尸箱或尸池中。保存液可酌情选用。

(1)甲醛类溶液:常用浓度为 10%福尔马林溶液,保存效果好,但刺激气味强,可发生氧化、挥发、聚合沉淀等变化,以致浓度下降,效果减弱是其缺点。为减少刺激气味,可改用乌洛

托品。

(2)酚类溶液:常用浓度为 2% ~ 3%,防腐效果好,刺激气味小,但对神经末梢有损害作用。酚可氧化变成对苯醌。日久,尸池有黄褐色的泥浆状沉淀物,会降低防腐效果。可用 0.25% ~ 1.0% 五氯苯酚钠代替酚。

(3)食盐溶液:常用 20%氯化钠溶液,浓度过高,则脱水作用太强。食盐价廉,刺激性小。但尸体长期浸泡于高渗液中,可脱水收缩,给解剖操作带来困难。

(4)新洁尔灭溶液:新洁尔灭无刺激性,毒性低,抑菌作用明显,有一定杀菌力。常用 0.1% ~ 0.2%溶液。可使菌体蛋白变性,改变细菌细胞膜通透性。灭活酶类使细菌代谢障碍而杀菌。但因有机物可降低效果,对经常翻动、捞取的尸体防腐效果较差。

2. 油保存 油浸保存是一种较老的方法,成本太高,不易推广,以液体石蜡最好。各种植物油亦可,但易分解。油的比重小于水,久存,尸体内部水分渗出沉于底层,可使尸体腐败。因此,用于油保存的尸箱应使一角稍低,并装置下出水口,定期排水,以保证质量。

3. 干保藏 干保藏一般适用于短期保存或长途搬运,在气温较低地区也可用于长期保藏。

(1)将能溶解于挥发性有机溶剂的塑料,如聚氯乙烯软制品或合成橡胶(如丁基橡胶),制成稀薄溶液,喷洒到尸体表面,使其凝成一层薄膜,起到囊状密封作用,内部水分不致蒸发,外部微生物不能侵入。

(2)在尸体表面涂抹一层凡士林,再用布带缠裹。此法常用于尸体长途搬运。

(3)充氮保藏。采用密封容器(如密闭尸库、尸箱、塑料袋等),放置尸体后,抽样充氮,保藏于缺氧状态。

4. 塑料袋保存 经固定的尸体,在尸池中浸泡 1~3 个月,使表面固定,取出放置于大小相宜的塑料袋内,袋内留有少量福尔马林与石炭酸的保存液,密封袋口,尸体连袋放于架上贮存。

5. 冷冻保存 冷冻保存可使尸体脏器位置保持良好,色泽鲜,还能保存未经防腐注射的尸体,具有很多优点。但大型冷库造价高、需消耗大量能源,费用高昂,一般解剖用尸体的保藏不必用此法。

6. 防腐尸体的管理 为了完整保藏及合理使用尸体,应有科学的管理制度,专人负责,定期检查。尸体存放应将不同性别、年龄、残肢、器官分类集中。特殊防腐注射的,作专题研究的,或制作陈列标本的都应单独存放,并应分类造册,按入库日期、顺序整理,合理安排使用。

经防腐固定集中保藏在尸库里的尸体、组织和解剖物标本,要定期检查。冷藏尸库的温度要保持在 0℃以下恒定低温中。干保存的尸体在尸库中也要求保持恒定低温(5℃左右)的密闭环境,设架分层放置,避免重叠挤压,防鼠咬虫蛀和风干变形。湿保存的尸库(包括油保存)可用尸箱或尸池。

#### (八)组织、解剖物和器官移植物的防腐和保藏

人体细胞组织、器官的保藏技术是随着细胞、组织和器官移植和血液成分疗法的开展而逐渐形成的。由于器官移植的广泛开展,移植物的来源就成为一个中心问题,往往有供体来源而无受体,造成移植物的浪费;或者有许多受体(患者)而无供体,因患者得不到及时医治往往造成严重的后果,甚至死亡。所以研究供体保存技术非常重要,是细胞、组织和器官移植获得成功的主要条件之一。

##### 1. 细胞、组织和器官的保藏技

(1)保存液:离体的细胞、组织和器官没有由机体供应的必需营养物质,将逐渐失去活力而



趋向死亡。为了继续保持细胞、组织和器官的活力和延长生命，必须供给它们必需的营养和适宜的环境。此外，调整保存液的酸碱度及降低保存温度，降低细胞代谢的能力，以期保全维持细胞活力的能量产生机构，从而延长保藏期。为了达到上述要求，配制各种保存液时一般可注意以下几点：

①溶液的等渗度。一种满意的保存液虽不一定等渗，但应接近等渗，因为细胞内外环境虽不相同，但细胞膜内外物质所能维持的渗透压是相同的或是相近似的。将细胞放于高渗溶液中，水分即从细胞内向外渗出，体积缩小；相反，将细胞放在低渗溶液中，水分即从细胞外向内渗入，体积膨大。所以保存液偏离等渗过远，细胞的正常结构将受破坏。

②保存液的 pH。机体和细胞一般能经受住它们的外环境在 pH 方面的很大变化，相反，细胞内的过程对 pH 的变化是很敏感的，并且这些过程是发生在一个精细调节着的 pH 介质中。但是，细胞内可能存在着局部的 pH 变化，例如，在膜的表面。大多数细胞内的过程发生在 pH 接近中性的条件下。此条件下各种代谢过程的速度最大。在生物系统中，实际上是通过有效的缓冲系统来稳定 pH 的，该系统的化学性质使得它们能抵抗得住由于酸（如乳酸）和碱（如氨类代谢引起的 pH 变化。在细胞液中主要的缓冲系统有磷酸盐、碳酸氢盐、氨基酸和蛋白质。

③缓冲液。生物学上的缓冲液是一种能抵抗因加入酸或碱而引起的氢离子浓度改变的溶液。这种抵抗力称为缓冲作用，缓冲作用大小称为缓冲能力（B），故以通过改变一单位的 pH 所需的强碱量来衡量。即：

$$B = \frac{db}{d(pH)}$$

式中：d(pH)是另加入 db 的碱所引起的 pH 的增加。

缓冲液通常由一种弱酸或弱碱和它的盐的混合物组成，如乙酸和乙酸钠。在这种弱酸和它的盐溶液中，加入的氢离子被盐的阴离子所中和，这种盐起到了弱碱的作用；相反，加入的氢氧离子由酸中和去除。因此，一个缓冲对的缓冲能力在其浓度相等时最大，即 pH 等于酸的  $Pka$  时。缓冲液中酸和盐的一般浓度在  $0.05 \sim 0.20 \text{ mol/L}$  左右，一般混合物在  $pH = PKa \pm 1$  的范围内具有满意的缓冲能力。

④抗凝剂。常用的抗凝剂有以下几种：

a. 化学药物。化学药物抗凝剂多选用钙结合剂，其用量依抗凝剂与钙的结合能力而定，如  $EDTA - Na_2$  与钙结合为络合物。其结合能力很强，一克分子  $EDTA - Na_2$  可结合一克分子的  $Ca^{2+}$ ，每 500 ml 全血（其中  $Ca^{2+}$  含量为 30 mg，相当于  $0.75 \text{ mmol/L}$ ）用 1.36%  $EDTA - Na_2$ （相当于  $1.1 \text{ mmol/L}$ ）溶液 30 ml 即可。而枸橼酸钠与  $Ca^{2+}$  采用同样血液即需 2~3 g 枸橼酸钠，相当  $10 \text{ mmol/L}$ ，为血液中所含  $Ca^{2+}$  的 10 倍左右。主要用于红细胞和骨髓细胞的保存。

b. 生物制剂。如肝素，是一种酸性粗多糖，其作用主要是阻止凝血酶的生成而达到抗凝的目的。10 mg(1 000 单位)可使 100 ml 血液数天不凝固，主要用于白细胞和血小板的分离和保存，以及肾脏器官保存和细胞培养中，但因抗凝能力有一定的时间限制和不能长期保存血液的缺点，应用受到限制。

(2)保存液种类：由于每种细胞、组织和器官保存所需保存液配方均不一样，所以保存液配方种类繁多，约数百种。但它们之间也有共同之处。概括起来有以下几类。

①电解质平衡盐溶液，分两类。

a. 仿细胞外液型溶液:有复方 NaCl 溶液和单纯林格氏乳酸钠溶液。

b. 仿细胞内液型溶液:已确定的很多“生理”等渗或高渗盐溶液,均由 Ringer 溶液派生而来,通常使用的是 Krebs - Ringer 磷酸盐溶液和 Krebs - Ringer 碳酸氢盐溶液。这些盐溶液中含有不同量的 NaCl、KCl、MgSO<sub>4</sub>、CaCl<sub>2</sub>、NaHCO<sub>3</sub> 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 且有些溶液还含有 O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> 混合气体。此外, Hanks 液和 Eagle 溶液也常用。

②高渗溶液。一般选用葡萄糖、甘露醇和蔗糖作为高渗剂。渗透压一般在 300 ~ 400 mOsm 之间。

③应用核酸类物质溶液。一般选用腺苷、肌苷、次黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤等物质添加到保存液中或组织液中。

④应用含有营养物质的保存液。多含综合性的营养物质,如氨基酸、腺苷酸类物质以及葡萄糖等。如应用的 1640、TC199、Eagles 和 HanksF12 溶液等。

⑤含有一定有机成分的保存液。通常应用冷冻沉淀血浆 (CCP) 和血浆蛋白部分 (PPF), 水解乳蛋白和小牛血清等。

⑥应用含有血浆代用品的保存液。如保存液中添加右旋糖酐、羟乙基淀粉、明胶等物质。

⑦其他保存液。其中有时也添加硅胶、丙酮酸、延胡索酸等。

(3) 保存温度:细胞、组织和器官保存温度一般分为三类。

①在 37℃ 下保存。这种温度下保存一般用于细胞培养,将细胞保存于此温度,观察保存效果。

②在 4 ~ 10℃ 保存。这一温度下保存又有以下几种方法:

a. 静置保存法。用于保存细胞,如红细胞、白细胞、血小板、骨髓等,采集后即置 4℃ 保存,如肝、肾、心脏和脾等。在迅速无损地取器官后,立即浸入 0 ~ 4℃ 保存液中,并尽快用 4 ~ 6℃ 保存液经动脉灌注,通过灌注迅速使器官的深部均匀冷却,并洗去有害物质。如残留于血中的抗原,血小板聚合物,细胞和纤维蛋白样血栓,灌注压力为一米高水柱,灌注速度为 200 滴/min 左右,时间为 3 ~ 6 min,灌注液用量 200 ~ 400 ml,直至器官呈苍白色为止。灌注完成后,将器官浸于一个有 500 ml 保存液的无菌防水容器内,再将容器保存于冰箱内或装冰的苯乙烯泡沫匣内,保持温度在 4℃ 可保存 4 ~ 96 h。

b. 连续低温灌注保存法(简称灌注法)。其方法是将供体取下后,立即以 4℃ 含有肝素的高渗高钾电解质溶液 100 ml 灌洗器官,然后再与连续灌注机连接,用天然合成的液体进行连续灌注保存。常用灌注压力为 8 kPa,灌注泵搏动次数为每分钟 60 ~ 70 次,灌注 pH 保持在 7.4 左右,用 95% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 混合气体。一般可保存 24 ~ 72 h。

c. 低灌非脉冲灌注保存:方法同灌注法,不同之处是不进行搏动,一般可保存 24 ~ 72 h。

d. 高压氧灌注保存:该法较复杂,难推广。

③在低温和超低温下冷冻保存:细胞、组织和器官低温保存涉及到:冰冻方法、保护剂的选择、容器的选择、低温保护剂洗脱方法、洗脱液和稀释液成分等各个方面。

冰冻方法可分为慢冻法和速冻法。慢冻法[用 40% ~ 50% (w/v) 甘油慢冻保存细胞]系将细胞经高浓度甘油液处理后,制成甘油化细胞悬液,在 -80℃ 或 -120℃ 的特殊冰箱中保存,此时在细胞外液中生成较大的冰块;速冻法[低浓度甘油 DMSO 10% ~ 18% (w/v) 快速保存法]系将细胞、组织和器官经低温度低温保护剂处理以后又灌入容器内,置于液态氮中 (-196℃) 冰冻保存,此时细胞内也有小冰晶形成。

保护剂以其能否穿过细胞膜可分为二类。一是细胞内保护剂,如甘油、二甲基亚砜、碳水化合物(葡萄糖)、乙二醇、二元醇、三元醇、丙二醇、乙酰胺、甲酰胺、乙醇、甲醇等适用于慢冻保存。另一种是细胞外保护剂,如乳糖、蔗糖、麦芽糖、木糖、高分子化合物(PVP)、右旋糖酐、白蛋白、羟乙基淀粉、聚乙二醇、聚氧化乙烯、甘露醇、山梨醇、甜乙醇等用于快冻保存。

洗脱保护剂的方法有透析、离心(连续和分步)沉淀和混合法等几种,快冻和慢冻均适用。

洗脱液物质,慢冻和快冻有一定差别慢冻:有葡萄糖、果糖、蔗糖、乳酸钠、氯化钾;快冻:有山梨醇、氯化钠、葡萄糖、甘露醇、蔗糖。

(4)保存容器:常用的容器又分为盛物容器和保存容器两类。

①盛物容器。常用的盛物容器就其制作材料性质可分为三类,即:

a.玻璃容器。包括各种规格的玻璃瓶(贮血瓶、血浆瓶、匹力西林瓶、广口瓶,以及其他多种多样的玻璃瓶等)。

b.塑料容器。常用的塑料容器有软质和硬质两种。软质塑料容器有血袋(保存各种细胞、组织和某些器官),其原料是聚氯乙烯和少量其他物质(增塑剂、稳定剂、杀菌剂、去垢剂和挤压器等)成分制成,还有四氟乙烯和一些共聚物。硬质塑料容器有塑料瓶、塑料管等,其原料为聚乙烯、聚丙烯等。

c.金属容器和搪瓷容器:常用铝、不锈钢等制成,用于器官和细胞保存。

②保存容器。常用的有三类: a.  $4^{\circ}\text{C}$  保存容器:常用  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱、冰库保存。 b.  $-80^{\circ}\text{C}$  保存容器:用  $-80^{\circ}\text{C}$  低温冰箱。 c.  $-196^{\circ}\text{C}$  保存容器:常用液氮罐或液态机。

#### (九)防腐和保藏效果评价

在尸体、组织和解剖物的防腐及保藏中,总希望创造一个十分美好的条件,以确保防腐和保藏获得尽善尽美的效果。但实际上并不尽如人意。因为要达到良好效果取决于多种因素。这些因素包括所防腐和保藏的物品的实际生产情况和消毒、防腐处理步骤,所用杀菌、除菌、抑菌手段和制剂抗微生物的能力,各杀菌和抑菌处理,以及各种保证措施所起的实际作用等。这些都会对防腐和保存的效果带来直接的影响。因此,对防腐和保藏作出科学的评价是非常重要的。由于防腐保藏的对象不同,评价方法也各异,现分别论述于下。

1.尸体、组织和解剖物防腐和保藏效果评价 尸体、组织和解剖物经防腐固定处理后,或放于防腐液中,或干燥贮存或冷冻贮存,只要加强管理,完全可以保证有满意的效果。但仍需经常对防腐保藏效果作检查评价。保存效果评价分为两个方面。一是检查防腐质量。可抽查部分尸体的胸腹腔液,作细菌和真菌培养,观察有无菌生长。二是检查尸体保存质量,每年至少检查两次,选择在天气回暖后或盛夏进行。若标本保存不善,高温季节变化最快。定期检查可及时发现问题,以便采取有效补救措施。对于湿保存的尸体,重点检查药物浓度是否合适,尸池、尸箱有无渗漏。若发现保存液浓度改变过大,应及时调整。沉淀物过多,应予过滤或更换。尸体外露部分和液面如有霉块,要及时打捞清除,并用活动紫外灯照射杀霉菌。同时核对编号牌、登记册与实物是否相符;检查绳索有无腐烂。干尸更应勤查,检查包装密封是否严密,有无破损,充氮有无漏气。油保存尸体的池底有无积水,冷保存尸体,重点检查温度是否符合要求。

2.活细胞、组织和器官的保存效果评价方法 活细胞、组织和器官体外保存的目的,在于患者急需时能有效地应用于活机体,或输入细胞,或植入组织、器官。因此,对其保存效果的评价尤为重要,现将分别予以举例。由于细胞、组织和器官种类繁多,各自的质量评价标准也不

尽相同，应根据具体情况作出评定。

#### (1)骨髓保存质量评价法

①保存骨髓质量体内检查法: Gray(1973)等曾报道骨髓存活能力的最终试验是其在受体中增殖、成熟和恢复正常功能的能力,这种判断在实验动物上是能够进行的,但在病人身上显然是不可行的。近来认为保存骨髓在体内存活的直接依据是骨髓或血液中出现供者的性染色体。观察骨髓功能恢复的依据是在接受全身放射或药物治疗的病人中,骨髓移植后,网织红细胞减少性免疫缺陷病例中,周围血淋巴细胞增高;在其他免疫缺陷病例中,原缺乏的免疫能力重新出现。

②保存骨髓质量体外检查法:不少学者报道,保存骨髓质量体外检查指标有:骨髓细胞形态结构、骨髓细胞的染料排出能力、组织培养法、放射化学法(用氧处理骨髓悬液后,观察与核苷酸结合的能力)、生化活性测定(观察酶活性指标)等,但行之有效的指标是:

a.一般细胞形态学观察。保存时间过久,可见到裸核增加、细胞膜破裂、粒细胞肿胀等退行性变化。

b.骨髓细胞计数。主要检查保存骨髓细胞悬液中的有核细胞数。

c.染料清除试验:根据死亡细胞不能清除台盼蓝的原理,用此染料作活体染色,能着色的细胞越多,说明死亡的细胞越多。

d.活体染色法。用吖啶橙染色,在荧光显微镜下观察,活存的骨髓细胞核呈绿色荧光,胞浆呈红光,失去胞浆的细胞看不到红色荧光;濒死的细胞已发生胞浆溶解,所以红色颗粒运动迅速。

e.用相差显微镜观察细胞活动能力。

f.用 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 或 $^{14}\text{C}$ 测定进入DNA合成期的细胞百分数。

g.荧光测定试验。Persidsky(1977)报道,将双醋酸荧光素和细胞放在一起反应,此后,双醋酸荧光素的排泄量和生成骨髓细胞数保持一定比例关系,所以对骨髓生存率判断是有效的。

h.骨髓干细胞培养。骨髓移植主要是移植干细胞,因此对保存骨髓的干细胞活性鉴定有重要价值。小鼠骨髓可用脾结节(CFU-S)测定技术。可以在体外培养条件下,观察人的骨髓集落形成的能力。

(2)角膜组织保藏效果评价:角膜组织保藏效果评价是以评定角膜内皮活性为主。虽然角膜包括三种细胞类型(上皮、实质和内皮),但除了碱烧伤等严重病例外,对于大多数穿透移植成功与否的关键在于供体内皮的活性,内皮是保持正常含水状态和透明的主要因素,其主动的钠泵作用能将实质层的水分输送流向房水,和角膜实质层的粘多糖固有的吸水倾向构成一种动态平衡。只有活的内皮细胞才能起到这种屏障作用。因此,内皮细胞的损伤和死亡必将导致角膜实质层水肿(严重时上皮也发生水肿)和丧失其透明度。评定内皮活性的方法有:

①生物显微镜检查法。镜检能看到内皮是否完整,实质水肿、内皮皱褶和角膜内皮斑点,是术前常用检查法,主要能通过角膜的透明度与厚度了解供体的一般质量,缺点是无法了解内皮的代谢状态。用镜面反光检查法可以看到角膜内皮的镶嵌式模型。

②电镜检查法。透射电镜和扫描电镜均可用于评价内皮活性。扫描电镜的优点是能够检查大量细胞,并能计算出完整细胞的百分数。保存在 $4^{\circ}\text{C}$ 的角膜内皮细胞如温度恒定直到第9天仍保存完整,但若在组织固定前将温度升至体温水平达2h,则随保存时间延长,细胞破裂的百分数增加。因此,结构的完整并不一定反映功能的保存。

③锥蓝(曲利木蓝)和丽丝胺绿染色法。**Stocker**等采用锥蓝染色作为内皮细胞活性染料排除试验。经 0.25% 锥蓝溶液染色半分钟内皮细胞不被染色者为活性细胞。因为活细胞的胞膜不能被染料渗透,而损伤或死亡的细胞,由于胞膜渗透性异常可摄取染料着色。用普通显微镜观察若干个视野:取平均值来记录活的内皮细胞的百分数,如活细胞数达 70% 以上,临床移植可望成功。在检查时要防止细胞干燥,如组织在检查前已用戊二醛固定,染色久不易脱色。由于锥蓝有致畸胎作用,故染色后的植片不能用于临床移植。丽丝胺绿是一种活性染料,其原理与锥蓝同。

④酶组织化学染色法。酶参与糖酵解。**Baum(1963)**用四唑氮蓝(NBT)作各种底物的受氢体,首先提出角膜组织内皮中有 KRES 循环和戊糖支路。因染料还原后形成一种深色的甲色素,从而为脱氢酶和黄素酶的活性提供了标志。

⑤温度逆转试验。离体角膜在 15℃ 以下的环境中,由于内皮代谢降低,遂引起角膜组织的规则性水肿,若皮肤功能正常,则在复温(34℃)以后,内皮细胞的钠泵作用恢复、实质层水肿可以逆转,故称为温度逆转试验。4℃ 保存后水肿的角膜,移植前在新鲜配制 M-K 液或改良综合一号保存液复温 2~3 h,如内皮活性良好,角膜水肿可以减轻,厚度变薄,透明度增加,有利于手术的进行。

⑥角膜内皮显微镜检查。**Maurice**首创用角膜内皮显微镜看到角膜内皮的镶嵌模型和控制体外灌注过程中角膜厚度的改变,因而可以同时评价保存不同时间角膜的内皮活性和结构。**Hoesle**等改进了这种显微镜,以致可以用来检查供体眼球原位的角膜内皮。**Macareg**等又在标准的内皮显微镜上安装一个简单的透视室,能使眼球在不受加压的生理条件下看到角膜内皮的细胞形态和计算细胞密度。经几分钟检查就能看清内皮细胞密度(120 倍)和角膜的内皮斑点(400 倍),并能通过标准显微镜照相机记录内皮细胞形态和细胞密度。

### (3)肾脏保存的质量评价方法

①肾的重量。肾灌注保存 24~72 h 后,肾重量平均增加 6.7% 左右。如重量增加过多,则表示有水肿趋势,质量欠佳。

②灌注液中电解质含量变化。灌注液中电解质浓度( $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Cl}^-$ )随着保存时间的延长  $\text{K}^+$  逐渐增加,而其他离子浓度无明显变化。

③四唑盐(tetraolium salt)试纸反应。将 0.05% 3-(4,5-二甲噻唑基)-2,5-二苯基-2H 溴化唑 0.25 ml 溶于 Hanks 液中,以滤纸吸附接触,当四唑盐纸片接触保存肾的组织碎片时,以被还原呈蓝色的时间来判断肾的质量。正常肾脏 10~20 s 出现颜色,20~30 s 出现蓝色者,则表示保存肾内损害尚易恢复,肾组织尚有代谢活动,质量良好;若超过 1 min 者则表示预后不佳。

④保存期间灌注的压力和流量。舒张期灌注压力应保持较低,当灌注压力为 8 kPa 时,流量每分钟 100 ml 左右,低于 500 ml 者,不宜作移植。

⑤肾脏外观色泽的变化。一个能保持良好功能的肾脏,在灌注时灌注液很易通过肾脏,静脉流出液很快就变得很清,不带血色,肾脏色泽苍白且均匀。如肾脏在灌注时静脉流出速度很慢,肾脏内血液不易洗净,肾脏色泽呈斑驳不均匀状,则表示肾内血管有痉挛,移植后会发急性肾功能衰竭,预后不佳。

⑥灌注液 pH 变化。连续灌注时,定时测定静脉流出液 pH。质量好的肾脏在开始一小时 pH 至少会上升 0.1 单位,pH 有明显下降,则表示组织缺氧及氧中毒,细胞已大量死亡。

⑦乳酸脱氢酶浓度。灌注液流出的乳酸脱氢酶(LDH)的浓度平均每小时小于 20 单位,则表示肾脏质量良好。

⑧肌酐测定。其原理为无蛋白血滤液之肌酐与苦味酸作用,生成黄红色之复合物,与同样处理之肌酐标准液比色,求得含量。

以上几种指标,移植前以 LDH 最为敏感,移植后则以肌酐较为敏感。是目前判断肾脏保存质量的较好方法。

## 二、食品保藏的原理及特点

人们都喜欢食用保持原有品质和风味的食品,变质的食品不好吃、不能吃且有害健康,乃至危及性命。更为了有效地防止食品腐败,就必须有完善可靠的食物保藏技术和方法。我们知道,食品腐败是微生物侵入所致。因食品营养丰富,侵入的微生物在环境条件适合时大量生长繁殖,产生毒素和酶,使食品极易发生变形、变味、变色等现象,外观不良、风味衰败、甚至成为废品。引起食品败坏的因素,主要有理化及生物学因素。物理因素的光线、温度和压力可引起食品变色、变味和维生素的损失。强光进入和温度过高都会影响食品保存。化学因素主要是各种变化如氧化、还原、分解、化合,这些改变使食品发生不同程度的损坏。生物因素主要是各种微生物如细菌、霉菌、酵母等,它们大量存在于周围环境中,稍有不慎易于侵入食品,并在其中增殖,引起食品霉变、酸败、发酵、软化、变色、腐臭。食品的腐败变质,往往是多种因素综合作用的结果。食品保藏的方法分为:

### (一)物理保藏法

主要是以控制温度、湿度、真空度等物理因素达到有效地保存食品的目的。

1.脱水干燥保藏法 大多数微生物需在含水量超过 20%的食品中才能生长繁殖,若食品中水分降至 12% 以下,则这些微生物就不能生存。所以食品工业常常用自然干燥(晒干、阴干)或用人工机械干燥生产果干、菜干、鱼松、肉松等便于保存的食品。

2.冷藏和冷冻保藏法 低温下食品中微生物的生理生化反应受到有效的抑制,食品不致腐败而得以长期保存。低温保存食品的最大优点是可非常满意地保持原料或制品的新鲜状态、风味及营养成分,保存期限长。

3.食品罐藏法 利用变温杀菌,然后装罐抽真空、封罐杀菌、冷却。这是目前物理保鲜中使用最广泛,品种最多,最安全可靠,食用方便,风味完好的食品保存法。

4.食品辐射保藏法 利用 60℃产生的  $\gamma$  射线的极强穿透力,将新鲜肉类及其制品、水产品及其制品、果蔬制品等在辐射装置下进行整体包装杀菌,经抑制发芽,延缓成熟等处理,以最大限度地减小食品的损失。经处理的食品品质、风味不变,可有效地延长保存期。

### (二)化学保藏法

化学保存法就是利用经法律认可的各种化学物质保存食品。如用糖、盐、酒、醋、植物杀菌剂、防腐剂等加入食品中,以抑制或杀灭微生物达到保存食品之目的。常用的方法有:

1.糖渍保藏法 使用高于 70%浓度的糖液浸渍。在高渗透压条件下使微生物细胞原生质收缩,导致质壁分离而死,使食品得以保存,如蜜饯、果脯、果酱、果泥、果糕等就是按此法生产的。

2.盐渍保藏法 10%的生理盐溶液可产生 60 个大气压的高渗透压。在高渗透压下细菌细胞失水引起质壁分离而死亡。食盐也是电解质,高离子强度也破坏了蛋白分解酶,延缓食品变

质。如涪陵榨菜、黄桥榨菜、芽菜、辽宁地瓜、天津冬菜、北京六必居的咸菜等就是盐渍的优良品种,还有许多腌肉、腌鱼、咸蛋等优良品种都是经盐渍而成的。

3. 酸渍保藏法 采用降低食品酸碱度,抑制或损坏微生物生长繁殖以保存食品的方法。如用果醋、米醋等生化醋,其风味温和、成分纯正、浓度适宜,微生物芽孢无法在其中生存,如酸渍凉拌菜、醋蛋等。

4. 化学防腐剂保藏法 有些化学药剂可有效地抑制细菌或霉菌生长繁殖,常用作食品添加剂,以防腐和保存食品。如用 0.15%~0.2%亚强酸保存果蔬罐头半成品,如鲜蘑菇。山梨酸、苯甲酸钠等防腐剂可使微生物和蛋白酶失活,起到抑菌、杀菌和保存食物的功效。

5. 熏制保藏法 将先经盐腌的鱼、肉等用榨、橄、桦、榆、杨、樟、松、柏等枝叶或木屑熏制。其熏烟中含有的甲醛酚类、树脂等渗入食物中,产生抑杀菌和进一步干燥的,制成外表美观,脂肪不易氧化的熏鱼、熏肉、火腿等,可延缓保存期。

### (三)生化保藏法

利用某些有益微生物繁殖过程中产生的生化变化来保存食品。果蔬中含有糖类,特别是蜂糖,在各种微生物作用下,发酵形成可保存的产物。例如,乳酸菌可使乳糖发酵生成乳酸,有防腐和增进风味的作用。市场上易销的酸奶,四川泡菜等就是这类食品的典型代表。

### (四)熟食品的保藏

罐装食品的保存:罐头是将食品装入特制的容器中,抽真空密封后,进行高温灭菌、杀灭菌绝大多数微生物,借以长期保存食品。罐头食品是熟食品中生产工艺最完善、保存时间最长的一类。所以对罐藏食品容器的品质要求很高。基本要求为:对人体无害,具有良好的密封性能,适合工业化生产,适应人民生活不断增长的需要。目前所用的罐藏容器有金属罐、玻璃罐和软包装几种。为了使罐装食品能有效地保藏应做到:

#### 1. 成品检验

(1)抽样检查:按照国家标准抽取合乎要求的样本量进行质量检查。

①感观检验: a. 对罐头密封结构,如原有“牙齿”、快口、卡腰、起皱、碰伤等检查; b. 真空度测定,一般为 23 997~50 661 Pa; c. 内容物形态及色、香、味检查应俱佳。

②色泽检查:肉食类罐头以汤汁清亮为佳,浑浊为次,汤汁中不应有固形物、小颗粒及碎片。糖水水果罐头则以汁液清晰透明、无杂质及浑浊无果肉碎屑为佳。

罐头的香味及滋味主要凭质检品尝人员的嗅觉与口感来判断,以决定其品质优劣。

(2)理化指标:净重要符合国家标准及企业标准;固形物含量应符合规定;肉禽类罐头,肥瘦肉分离后,将它用于计算重量,其公式为:

$$\text{肥肉加油 \%} = \frac{\text{肥肉量(g)} + \text{油量(g)}}{\text{规定重量(g)}} \times 100\%$$

为肉类加油量:水产类罐头去肉后在 100ml 量筒中,固体物保持脂肪溶化温度,静止 3 min,油水分层,读取水层毫升数,总毫升数减去水层毫升数即为油层毫升数,乘 0.1,即得油量(g);果蔬罐头中则以果肉及蔬菜重量减去配料重量即为固形物重量。化学性能检测必须符合国家标准及企业标准。

#### 2. 微生物检验

(1)平酸菌检验:平酸菌在罐头内容物酸度增加但外观正常。开罐后通过感官和 pH 值测定可判别。检查罐中平酸菌的方法是将内容物接种溴甲酚紫胰蛋白冻葡萄糖肉汤,55℃培养 48 h,若溴甲酚变紫色,产酸不产气,即可认为耐热性平酸菌。在无菌条件下打开罐头,取样 1 g

或 1 ml,经处理后分别接种庖肉培养基和缓冲葡萄糖肉汤。前者于厌氧条件下培养,后者于需氧条件下培养,然后按常规进行细菌学鉴定。

(2)保温检查:为防止生产条件不完善,杀菌不彻底,先采用保温处理,以剔除不合格产品。方法是将杀菌和冷却的罐头产品送至保温库中,于  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  保温  $7 \times 24 \text{ h}$ ;为刚杀菌冷却至  $40^\circ\text{C}$  的罐头,保温  $37 \pm 2^\circ\text{C}$  只需  $5 \times 24 \text{ h}$ 。但有些罐头不宜采用保温法,如蔬菜、水果罐头及虾、蟹类罐头。

### 3. 罐头食品品质检测

(1)耐压强度测定:将软罐头袋夹在平台和夹板之间,板上加 50 kg,静负荷 1 h 之后,观察内容物有无漏液,若有则不合格。

(2)封口强度检测:蒸煮袋和盘状容器的封口强度为  $4.5 \sim 5.5 \text{ kg}/15 \text{ mm}$ (封口边)。切取封口处 15 mm 宽试样,夹住两端,以  $300 \pm 20 \text{ mm}/\text{min}$  的速度拉伸,测定剥离时最大拉力,规定值为  $2.3 \text{ kg}/15 \text{ mm}$  以上。

(3)袋内残存空气量测定:根据测定软罐头在水中浮力及在减压时悬浮水中的平衡压力来计算袋内残存空气量,其计算公式为:

$$\text{残存空气量} = (\text{平衡压力} \times \text{软罐头食品在水中的重量}(\text{g})) / \text{大气压} - \text{平衡压力}(\text{Pa})$$

(4)食品组织与弹性测定:测定软罐头食品的咀嚼感、弹性的主要仪器有凝乳测试仪和罔田果冻硬度计、食品流速计等,还有咀嚼型的组织测试。

(5)食品褐变程度的测定:食品工厂一般采用色差计来测定食品色差( $\Delta E$ )。将食品置色差计试样台上,先测出食品的亮度(L)和颜色(a,b),L值 100 时为白色,0 时为黑色,a 的“+”为红色,“-”为绿色;b 的“+”为黄色,“-”为蓝色。一般用 L,a,b 来判定样品的褐变程度并可求出与对照品的色差值  $\Delta E$ 。

$$\Delta E = \Delta L^2 + \sqrt{\Delta a^2 + \Delta b^2}$$

(6)保温实验和微生物实验:保温实验是将产品检样于  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  下保温 14 d,观察有无膨胀、漏液、开口现象。微生物实验是取保温实验阴性样品,无菌开封,混合取样 25 g,加入无菌 225 ml 经粉碎处理,取样 1 ml 加入 9 ml 无菌 PBS 中,混合作试液,接种 5 支巯基乙酸盐培养基试管中,每管接种 1 ml,于  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  下培养 48 h,若 5 管中一管有菌生长,则样品为菌检阳性。

罐头类食品经上述质量检查合格后,贮存于条件良好的食品库中才能保证产品在有效期内安全保藏。

4. 其他类型熟食品的保存 除罐头类食品外,其他熟食品种类繁多,如南北豆腐、卤制品、油炸制品、炸卤制品、面包制品、糕点制品、酥类制品、饼干类制品、蛋糕制品、方便面、营养米粉、八宝饭等食品。这些制品中多数含水分较重,包装简单,生产工艺简单,所以保存困难,保存时间短,少则一两天,多则三个月至半年。所以这类熟食品生产和保存的研究必须加大力度。

(1)粉剂类熟食品的保藏:对粉剂类熟食品如婴幼儿食品、学龄食品、强化食品和功能食品,孕妇及乳母食品等将配料经真空干燥后,进行粉碎,粉碎后制品保藏于防潮料箱中,待分装和包装。经包装检验合格的产品,在通风、干燥的环境中可保存 1~2 年。

(2)膨化食品:膨化的熟食,对淀粉讲,是将以  $\beta$ -淀粉形式贮存于大米、玉米的生淀粉转变到熟淀粉。采用膨化技术,使淀粉体积增大 1 000~1 500 倍。由于体积显著增大,直链和支链分子分裂、切断,形成较大间隙冷后不易复合,可防止食品老化,有利于人体吸收,减少营养



损失,食品风味好,用途广,有利长期保存,一般可存放 3~6 个月,若密封可保存 1~2 年。

(3)方便面:方便面是将调制好的面经快速脱水干燥,固定  $\alpha$  化,防止回生,固定组织和形状,便于保存。方便面可采用油炸干燥和热风干燥,油炸方便面采用 150~180℃,处理 70 s,热风干燥方便面是以 70~90℃干燥 35~45 min,干燥后水分为 12.5%左右,冷却后经袋状或杯装包装后,可贮存半年至一年。

(4)米羹、速煮米、早餐方便食品:这些都是成型干燥熟食品,经严密包装后可保存半年至一年。

(5)面包类:面包类是将面粉经发酵烘烤处理后制成的熟食品,经包装在室温下可保存 3 d。

(6)糕点和酥类:由于含糖分高,经高温烘烤成熟,无菌包装后可保存 1~3 个月。

(7)月饼类:经高温烘烤成熟,无菌包装可保存 1~3 个月。

(8)卤肉类:经高温卤制后,在常温下可保存 1~3 d,低温下可保存 1 周。

#### (五)水果和蔬菜的保藏

果蔬含有人体所需的矿物质,纤维素等营养物质。但果蔬的成熟有严格的季节性,加之含水量高,微生物易在其中孳生,导致腐败,只有利用科学合理的保存方法,才能消除其利用的局限性,尽量提高其价值。果蔬保存方法很多,常用的有以下几种:

1. 冷冻保存 果蔬的冷冻保存适合易腐产品在出售或加工前的短期贮存,以及延长某种产品销售期或加工期的长期贮存。

(1)果蔬的冷藏:果蔬在冷藏前应先冷却。应对库房、工具、垫木等彻底消毒,库房应通风,温度应适宜。果蔬在冷却间进行冷却,一般在 0~5℃,相对湿度 85%~90%,室内流速 0.5 m/s 冷却 12 h,容器中心温度达 5℃左右即可。冷却后的果蔬可进入冷库。

市场上出售的大部分是冷冻蔬菜,冷冻水果大部分用于制作其他食品,如果酱、果冻、蜜饯、点心、果汁汽水等。贮藏方法有:①气调贮存法。此法是改变贮存环境气体成分,如填充二氧化碳或氮气,使该环境中的含氧量由 21%降至 30%,二氧化碳由 0.03%提高到 3%以上,以限制果蔬的呼吸强度,延缓其变质。②辐射贮存法。利用<sup>60</sup>Co 产生的  $\gamma$  射线,电子加速器产生  $\beta$  或 X 射线对待贮存的果蔬进行辐射,以抑制成熟和发芽等,延长保鲜、保存期。如用 5~15 krad 照射马铃薯、洋葱、大蒜、生姜等,可抑制其发芽。辐射处理香蕉、芒果、蕃木瓜、香菇和蘑菇等可推迟其成熟过程,减少腐烂,延长贮运期。用  $(20\sim 25) \times 10^4$  rad 照射杨梅、甜樱桃、无花果、桔子、木瓜、菠萝、梨和油桃,也获得满意效果。

(2)化学贮存法:利用化学消毒剂、防腐剂杀灭或抑制果蔬上微生物以延长其贮存期,达到保鲜目的的方法。果蔬化学保藏法包括对环境及用具的处理和果蔬的防腐。

用于果蔬环境消毒的常用消毒剂,有漂白粉、漂白粉精、次氯酸钠、二氧化氯、脱氢乙酸、过氧乙酸等。

用于果蔬保藏常用的防腐剂有噻苯咪唑、仲丁胺、桂醛、联苯、邻苯基苯酚、乙 - 苯基苯酚钠盐、乙氧基喹啉、2,4 - 二氯苯氧乙酸等。

①噻苯咪唑。本品可用于水果、蔬菜贮存期防腐,烟草防腐,常见剂型有胶悬剂、可湿性粉剂、液剂。用于柑桔、香蕉浸果的浓度为 0.1%~0.45%。用量 5 g/m<sup>3</sup> 的烟剂,将蒜苔预冷烟熏处理效果良好。

②仲丁胺。本品只在水果、蔬菜贮存期作防腐剂用,其剂型有乳剂、油剂、烟剂、蜡剂、固体

熏剂等。本品用于柑桔、苹果、桃、蒜苔防腐保鲜的常用浓度为  $50 \sim 500 \text{ mg/kg}$ 。

③桂醛。本品作水果贮存期的防腐剂。在  $1/4\ 000$  时对黄曲霉、黑曲霉、橘青霉、串珠镰刀菌、交链孢霉、白地霉、酵母等有很强的抑制效果。我国规定,桂醛用于水果保鲜,其残留量为  $0.3 \text{ mg/kg}$  以下。

④联苯。本品  $1 \sim 5 \text{ g/m}^3$  用作水果熏蒸防腐,但可影响水果口味。现已少用。

⑤邻苯基苯酚。本品只用作水果贮存期防腐,常用量为  $5 \sim 10 \text{ mg/kg}$ 。

⑥乙 - 苯基苯酚钠盐。本品主要用作柑桔贮存期防腐。我国规定,柑桔保鲜用量为  $0.1 \text{ g/kg}$  残留量为  $70 \text{ mg/kg}$ 。

⑦乙氧基喹(喹)。本品又称虎皮灵、抗氧喹。除作食品、饲料防腐剂,抗氧化剂外,也可作苹果梨等贮存期防治虎皮病。我国规定,苹果保鲜,按需要适量使用,残留限量为  $1 \text{ mg/kg}$ ,实际中用  $4\ 000 \text{ mg/kg}$ ,本品乳液浸苹果,贮存 2 个月的残留量为  $0.7 \text{ mg/kg}$ ,贮存 4 个月为痕量,贮存 6 个月未检出。

⑧2,4 - 二氯苯氧乙酸。本品又称 2,4 - D。可用于柑桔等水果贮存保鲜。我国规定,本品用于果蔬保鲜,最大用量为  $0.01 \text{ g/kg}$ ,残留量小于  $2 \text{ mg/kg}$ 。

(3)涂膜贮存法:因水果在采收后仍进行着旺盛的吸收和水分蒸发,失重大于  $5\%$  就出现枯萎对果蔬涂膜可适当地抑制其吸收和水分蒸发,故可起到保鲜作用。

(4)低气压贮存法:该法主要通过降压使贮藏室空气中的氧耗量降低,只需维持被藏果蔬最低限度呼吸,使其代谢所产生的一系列消耗和变化减少到最低限度,以达保鲜保存的目的。

(5)果蔬保存的其他方法

①果蔬的干制保存。果蔬干制主要是采取自然晒干法。如苹果、龙眼、荔枝、葡萄干、金針菜、黄花菜、竹笋干、木耳、蘑菇等。经太阳晒干的制品色泽和风味都很好,也利于延长保存期。

②制成风味食品保存。如通过糖渍、盐渍做成罐头等,如各种果蔬的蜜饯、果脯、水果罐头、咸味橄榄和梅等。

③真空干燥保存法。可将各种蔬菜经加热杀菌,再真空干燥,可制成各种蔬菜末或粉,可基本保持蔬菜原色,也大大延长保存期。

## (六)粮食的保藏

粮食是人民生活必不可缺的东西,粮食的生产有严格的季节性,所以粮食的储藏良好是粮食生产的重要环节。粮食保存的方法很多,因地理、气候、粮食品种不同而采取不同方法。粮食保存过程需采取防霉、杀虫、防潮、防鼠等多种因素对储粮的损耗。粮食保存包括物理保存和化学保存法。

### 1. 粮食的物理保藏法

(1)干燥保存:从田地收获收获的谷物类、豆类,常采用晒干、风干,在特殊情况下也可采取烘干的方法。去除粮食中的多余水分,便于保存和长期储藏。另外,有一些薯类,如红白薯、马铃薯也可以作成薯干保存。

(2)辐射储粮:用电离辐射对谷物类、豆类、干杂类处理,可杀灭害虫,杀虫彻底,无残毒,又比熏蒸处理节省时间,安全可靠,常用低于  $100\ 000 \text{ rad}$  照射即可。

2. 粮食的化学保藏法 化学储粮一般只用作夏季短期储藏或临时抢救措施。我国目前主要用磷化氢、环氧乙烷、有机酸、漂白粉和食盐等处理储粮。

(1)磷化氢处理储粮:磷化氢既对微生物有抑杀作用,又对粮食有抑制呼吸的作用。对害

虫还有强烈的杀灭效果。

(2)低氧低剂量化学储粮：在密封条件下，粮堆含氧量减少， $\text{CO}_2$ 含量增多，用低剂量磷化铝片埋入粮堆后，可减少药物挥发空间，增大有效浓度，吸收粮堆内水分，放出磷化氢气体，从而降低粮堆湿度。可杀菌和保持粮食的稳定。

(3)环氧乙烷储粮：环氧乙烷是一种灭菌杀虫及抑制粮食呼吸的熏蒸剂。用量为每立方米粮堆室温下自然蒸发环氧乙烷 40 g，对粳米中各种微生物的杀灭率可达 100%，可储粮过夏。本法储粮应注意：①杜绝火源；②不任意增加单位剂量；③在密封缺氧的粮囤中施药。

(4)有机酸储粮：对高水分粮食常采用甲酸、乙酸、丙酸、山梨酸及其盐类处理。这些药剂可在粮仓外形成一层薄膜，将每粒粮食均匀地包裹起来，防止粮粒与外界空气接触，抑制粮食呼吸，抑制微生物繁殖，使粮食处于稳定状态，得以安全保存。

(5)漂白粉储藏：漂白粉是一种高效杀菌剂，对含水 20% 以上的粮食每千公斤拌入 1 000 g 漂白粉，放置 21 d，粮食不会发热、发芽和霉变。

(6)食盐储粮：对含水 37.1% 的晚粳稻米，拌入 1.5% 或 2% 的食盐，可安全放置 21 d。含水 29% 的油菜籽拌入 1.54% 的食盐（每 0.5 kg 食盐加水 3.5 kg 溶解后喷雾），放置 10 d 不发热、不生芽、不霉变。

### （七）奶和饮料的保存

1. 奶的保存 人们日常生活中食用奶有牛、羊奶及人奶，鲜奶味美可口，因此鲜奶保存是研究的重要主题，在一般情况下鲜奶只能保存较短时间，经特殊处理可以较长时间保存。如低温保存，国外已有人奶库。

(1)加热消毒保存法：鲜乳的质量要从产奶动物的健康、饲料卫生做起。从牛、山羊、绵羊、水牛、牦牛等采得的鲜奶要及时消毒，以保证质量。对奶常采用巴斯德消毒法。

(2)生化保存法：借助于微生物的作用而引起生物化学变化，达到保鲜的目的。发酵乳采用乳酸菌发酵鲜奶制成。乳酸菌生成的乳酸佐以酵母菌，生成加工醇和二氧化碳，使发酵乳具有独特的风味。

(3)真空干燥保存：将鲜奶先混合灭菌处理后，经真空干燥喷粉工艺做成奶粉可长期保存。国家规定，含脂奶粉的酸度不超过 20°T，细菌总数每克不得超过 5 000，且不得检出致病菌。

2. 饮料的保存 我国生产的饮料品种很多，有果蔬汁饮料、豆品饮料、乳品饮料、保健饮料、矿泉水等，由于饮料品种繁多，保存方法和技术也各不相同。

(1)豆品饮料的保存：豆品饮料种类很多，在加工工艺中由于采用加压、均质化、热磨、高温瞬时杀菌、85℃ 热水浸泡，红外线使酶失活等处理，最后装罐，加热消毒即成为饮料，可以较长期保存。

(2)乳酸发酵饮料：为用鲜奶经乳酸菌发酵后制成，在生产工艺中由于用 90 ~ 95℃ 5 min 或 130℃ 2 ~ 3 s 杀菌，然后加乳酸菌发酵，饮料中无杂菌及致病菌，可以在短期内保存供食用。

(3)果蔬汁饮料：果汁、蔬菜汁含有丰富的维生素 C、胡萝卜素及各种 B 族维生素，风味优良，受到广泛欢迎。果蔬汁饮料有酸枣汁、猕猴桃汁、醋柳汁、山楂汁、柑桔汁、葡萄汁、番茄汁、马蹄汁、香菇汁、芒果汁、椰子汁、桦树汁、花粉等制成的饮料。这些饮料严格按工艺流程处理和严格检验，只要符合国家标准和企业标准，产品可保存 6 ~ 12 个月。

(4)具有保健功能的饮料：本类饮料是针对特殊作业人群的需要而配制的，这些饮品富含维生素类和人体必需盐类。这类饮料经配料后，用全自动定量充填包装和超高温灭菌。杀菌

在密封后完成，所制成的饮料可较长期保存。

## 第五节 消毒灭菌剂用于防腐和保藏的原理

由于食品、药品、化妆品乃至一次性使用的医疗卫生用品都易受到微生物污染,会对人体构成威胁。必须对这些物品采取严密的防腐和保藏措施,以确保这些物品的安全使用。防腐和保藏除前面已经介绍的化学防腐抗菌剂外,常用的化学消毒灭菌剂在防腐和保藏使用也很广泛,而且可获得更佳、更理想的效果。

### 一、液体、固体化学消毒剂用于防腐和保藏

#### (一) 酚类消毒剂

酚类系中水平消毒剂,在工业上广泛用作防腐剂。常用的有:

1. 辛基苯酚 是一种白色结晶物质,作为一种防腐剂使用。辛基苯酚也是一种真菌抑制剂,用于蛋白类产品如动物胶和非食用明胶的防腐。在一些乳化剂存在的条件下,其杀菌活性下降,因而对肥皂和切割油的防腐不宜用辛基苯酚。

2. 2-苯基苯酚 本品系一种白色结晶粉末,较辛基苯酚易溶解,可按 1:1000 溶于水中,其钠盐易溶于水,它是抗菌剂及抗真菌剂,常用作保存剂。其钠盐的最小抑菌浓度 (MIC) 以  $\mu\text{g/ml}$  计。其 MIC 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为 32,对枯草芽孢杆菌、荧光假单孢菌为 16,黑曲霉为 4,木霉为 8。多数绿脓杆菌对其耐药,抑制它需高于上述浓度。本品被用作松木消毒剂中的配合剂和切割油的防腐剂。在造纸和纸板工业中作为粘稠剂和杀真菌剂。

3. 卤代硝基苯酚 2,4,6-三氯苯酚为一种白色或无色粉末,是一种较苯酚强的酸。它几乎不溶于水,但溶于碱和有机溶剂。用作杀菌剂、杀真菌和杀昆虫剂,可用于纺织品及木材防腐,在切割油中作为防腐剂及在防腐剂配方中作为配合剂。

4. 五氯苯酚 本品为一种乳白色粉末。几乎不溶于水,但溶于有机溶剂。本品及其钠盐制剂可作粘合剂,纺织品、木材、皮革、纸张和纸板的防腐剂,也可用作字画保存,但在阳光下可使字画脱色,在用其他苯酚保存物品时,有铁存在也能引起脱色。

5. 4-氯-3-甲基苯酚 为一种无色结晶化合物,在水中的溶解度为 0.38%,易溶于乙醇、醚和萘,亦可溶于碱性溶液,本品已用于药品防腐。在工业上用于胶、字画、浆糊、切割油和橡皮泥等的防腐。

6. 硝基苯酚 本品毒性较强,广泛使用的为 4-硝基苯酚,一种皮革制造工业防腐剂,常用 0.1%~0.5% 的浓度。

7. 双苯酚类 二氯酚可以 30  $\mu\text{g/ml}$  溶于水中,在有机溶剂中可快速溶解,可达 45~80 g/100 ml 本品对细菌繁殖体的杀灭浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ ) 较低。对金黄色葡萄球菌为 2.5,粪链球菌为 7.5,枯草杆菌为 7.5,大肠杆菌为 10,伤寒沙门菌为 7.5,绿脓杆菌为 80,奇异变形杆菌为 50。本品用于化妆品、纺织品、切割油中的防腐剂,在冷凝水系统、和潮湿设备中用于防止细菌生长。在造纸工业中用作粘稠剂,可以加入到纸和其他安装材料中防止微生物生长和温室藻类生长。

8. 氯酚 几乎不溶于水,但溶于乙醇、醚和丙酮以及碱性溶液中;它抗革兰阳性菌活性高于革兰阴性菌,对金黄色葡萄球菌最小抑菌浓度为 0.9  $\mu\text{g/ml}$ ,枯草杆菌为 0.2  $\mu\text{g/ml}$ ,普通变形

杆菌为  $4\ \mu\text{g/ml}$  ,大肠杆菌为  $28\ \mu\text{g/ml}$  ,绿脓杆菌为  $25\ \mu\text{g/ml}$  。可用作外科擦洗剂,医用肥皂的活性配合剂,化妆品中的防腐剂。在人用药中最高使用浓度为  $0.1\%$  ,兽药中为  $0.75\%$  ,在卫生用品中最大浓度为  $0.1\%$  。

## (二)季铵盐类

季铵盐类属于表面活性剂,可为阴离子、阳离子和非离子表面活性剂。它们属于低水平消毒剂类;但在防腐和保藏中使用也很广泛。最常用的为阳离子表面活性剂,是药品和化妆品常用的防腐剂和保藏剂。

1. 苯扎氯铵 为阳离子表面活性剂,较易溶于水、乙醇和丙酮。在药剂中,低浓度时可用作抑菌防腐剂,高浓度时作为消毒杀菌剂。世界各国广泛用于眼科液体制剂,也用于化妆品。做眼用制剂的防腐剂使用浓度为  $0.01\% \sim 0.02\%$  ;做鼻耳用药的防腐剂浓度为  $0.002\% \sim 0.02\%$  ;阴道栓剂浓度为  $0.05\%$  ;水溶液制剂浓度可高达  $0.5\%$  。

2. 苯扎溴铵又名新洁而灭 属阳离子表面活性剂,易溶于水和乙醇,微溶于丙酮,不溶于乙醚和苯。本品为低水平消毒剂,常用作消毒、防腐和去垢。常用使用浓度为  $0.02\% \sim 0.2\%$  。在碳酸氢钠滴耳液中用作防腐的浓度为  $0.1\%$  ;在硫酸锌滴眼液中其配方为:硫酸锌  $1\ \text{g}$  ,硼酸  $3.5\ \text{g}$  盐酸麻黄碱  $0.4\ \text{g}$  ,新洁尔灭  $0.012\ \text{g}$  ,甘油  $5.28\ \text{ml}$  ,尼泊金丙酯  $0.12\ \text{g}$  ,蒸馏水加至  $400\ \text{ml}$  。

3. 氯化十六烷基氨基吡啶 系阳离子表面活性剂,属低效消毒剂,可用作皮肤消毒和小伤口表面的防腐治疗( $0.1\% \sim 0.5\%$  溶液),亦可作口腔和咽部的防腐剂和化妆品的保存剂。化妆品可用  $0.1\% \sim 0.5\%$  的浓度;用于发胶和除臭剂中,也可以  $0.05\% \sim 0.1\%$  的较低浓度掺入修面用的香液中。

## (三)醋酸氯己定

本品为双胍类,是双胍类的典型代表,属低水平消毒剂。其盐类为白色或乳白色的粉末,可用于多种药物配方中,常用浓度范围在  $0.02\% \sim 1\% (\text{w/v})$  。其与十六烷基三甲溴铵的配合广泛用于局部防腐。本品对革兰阳性细菌繁殖体有广谱杀灭作用。但对变形杆菌和普罗菲斯登杆菌效果不佳。本品不能杀细菌芽孢,不能杀抗酸杆菌和病毒,对真菌孢子活性很低。它是主要的医学和兽医的防腐剂。其含  $0.5\% \sim 0.7\%$  的乙醇溶液是很好的皮肤消毒剂,在膀胱冲洗及妇科均有使用。常用于挤奶后母牛乳头的消毒和伤口防腐。

## (三)醇类

醇类为中效消毒剂。乙醇和异丙醇为无色液体。醇水混合物表面张力低,有湿润能力,渗透力强,具有迅速杀菌作用,可杀灭抗酸杆菌,不杀芽孢,对亲水病毒作用弱。乙醇杀菌有效浓度为  $70\% \sim 80\%$  ,异丙醇常用  $60\% \sim 70\%$  溶液,醇类浓度低于  $50\%$  ,只有抑菌作用。在化妆品中醇类作为溶剂或防腐剂用。

## (五)含氯化合物

含氯制剂中应用较广的主要是次氯酸盐和  $\text{N}$ -氯化合物。元素氯、各种能释放氯的有机和无机化合物都是依靠在水中生成次氯酸而发挥杀菌活性的。次氯酸是高效消毒剂。

1. 次氯酸盐 有很宽的抗微生物谱,可以杀灭细菌芽孢,但对某些分枝杆菌活性较低。

(1)漂白粉:本品在食品行业中用于容器、设备、水及蛋品表面消毒,特别是对蛋品可起防腐并延长保藏期的作用。

(2)次氯酸钠:本品可用于水、蔬菜、水果等消毒,也可用于食品生产设备、器具的消毒。一

般可用有效氯 500 mg/L 的溶液消毒 10 ~ 20 min。对苹果、柑桔类水果,经先洗净尘土后,用 250 mg/L有效氯溶液 30 min,捞起、晾干,可起到防腐和延长保藏期的作用。

2.二氧化氯 稳定态二氧化氯我国已有多个厂家生产,在临用时加活化剂即可使用。二氧化氯为高效消毒剂。它具有杀菌、消毒、除臭、漂白、保鲜、除酚等多种作用。在食品工业中可用作果蔬保鲜,水处理及污水无害化处理。二氧化氯使用的浓度为次氯酸盐有效氯含量的 1/2。二氧化氯用于水果、蔬菜防腐保鲜,可防止褐变,消除环境中的臭气。如用二氧化氯缓释剂进行香蕉、青椒等多种水果、蔬菜的防腐保鲜,效果均好,在改善蘑菇栽培、运输与储存中均可用二氧化氯处理,可改善蘑菇色泽,防止褐变。

3.有机氯制剂 二氯异氰尿酸钠、三氯异氰尿酸钠、氯胺 T、氯胺 B、氯胺 C 等制剂,为高效消毒剂,它们都能水解产生亚氯基,其作用小于次氯酸盐,在酸性条件下作用增强。二氯异氰尿酸钠和三氯异氰尿酸钠作用优于氯胺类,可用于局部抗感染、饮水消毒、餐具消毒、食品生产器具消毒及果蔬防腐保鲜。

#### (六)含碘化合物

含碘消毒剂常用的主要有碘酊及碘伏。碘酊和碘伏的水溶液属游离碘制剂,碘伏系复合碘制剂,它们可杀灭细菌繁殖体、真菌、病毒、分枝杆菌,杀芽孢作用较弱。

1.游离碘制剂 用于皮肤和手术部位的消毒防腐,常用 2.0%或 2.5% ~ 5.0% 碘酊,可涂擦人或动物的皮肤消毒,1%碘甘油用于口腔黏膜、牙龈感染,口腔炎症的消毒防腐。

2.碘伏 碘伏是一大类复合碘制剂。其中聚维酮碘应用最为广泛。国内常用的聚维酮碘为含有效碘 0.5% ~ 1% 的制剂。聚维酮碘除用于皮肤消毒、黏膜冲洗、手术前皮肤消毒外,还可用于器械、餐具消毒;用于瓜果及蔬菜的消毒、防腐、保鲜。

#### (七)强氧化剂

强氧化剂为高效消毒剂或称灭菌剂,高浓度时可达灭菌效果,它可以杀灭包括细菌芽孢在内的各种微生物。但由于其不稳定,腐蚀性强,在使用时应引起重视。强氧化剂包括过氧化氢、过氧乙酸、过氧戊二酸。二氧化氯前已述及,在此不赘述。

1.过氧化氢 是一种对环境无污染的消毒剂,可用于消毒、防腐、除恶臭、清洁创面等。它与组织接触后释放出氧分子,可改善局部微循环缺氧状态,达到治疗效果。非常适宜于厌氧菌感染、破伤风、气性坏疽创面的消毒防腐。一般常用于创面、溃疡、脓窦、耳内脓液的清洗。此外,还可用于治疗面部褐斑、扁桃体炎、口腔炎、白喉等。

(1)用 3%的过氧化氢溶液清洗创面、溃疡、脓窦等。

(2)用 3%的过氧化氢溶液冲洗或湿敷厌氧菌感染部位,气性坏疽,破伤风创面。

(3)以 1% 的过氧化氢溶液漱口,用于口腔炎、扁桃体炎、白喉等含漱。

同时过氧化氢建议用于包装机械送风机的喷雾消毒,丙烯酸树脂制成的外科体埋内植物、塑料餐具的消毒,隐形眼镜的消毒和保存液。在食品加工工业中用来消毒盛装“灭菌”牛奶的纸箱。

2.过氧乙酸 是乙酸与过氧化氢在硫酸催化下反应生成的无色液体,具有刺激性和腐蚀性。其杀芽孢作用强于过氧化氢,它是一种强氧化剂,可在 -20 ~ 40 °C 之间保持良好的杀菌效果。过氧乙酸用于工具、器具、场地的消毒,原料消毒防腐。可用于衣物防霉,室内空气消毒除臭。

3.过氧戊二酸 本品是一种氧化消毒杀菌剂,有固体制剂和液体制剂两种;其固体制剂稳

定性好,年下降率不到 10%。而液体制剂年下降率可达 50% 以上,其腐蚀性比过氧乙酸小。用其消毒耐腐蚀物品常用 2% 的浓度。亦可用于皮肤消毒。伤口冲洗常用 0.5% 溶液,用作消毒防腐。

4. 强氧化离子水 不同于其他强氧化剂,是水并非药品。强氧化离子水是在自来水中加入用氯化钠制成含 10% 氯化钠的水溶液在多连体电解槽中电解而成。为无色、无刺激性,原液 pH 为 2.42。为一种酸性消毒剂,系杀菌谱广、杀菌速度快的高效消毒剂。可用于医疗器械消毒,临床上用于皮肤、口腔、烧伤、创伤的消毒防腐;生活中用于蔬菜、水果、鲜花的消毒、防腐保鲜,农作物、药材种植的杀菌防腐,餐具、冷饮盛装器具的消毒等。

#### (八) 醛类

醛类是高效消毒剂,又称灭菌剂,其中甲醛和戊二醛最常用。它们可以杀灭包括细菌芽孢在内的所有微生物。除了用作消毒、灭菌剂外,也往往在防腐和保存中使用。

1. 甲醛 以气体或液体形式用作消毒防腐。经实验研究表明,吸入甲醛气体有可能给人类致癌的危险。这可能会影响到甲醛和释放甲醛的物质在消毒和防腐中的作用。要注意的是,绝对不能将浓甲醛与含氯消毒剂或其他来源的游离氯混合,因可产生潜在的致癌物二氯(氯甲基)醚。甲醛对细菌繁殖体、细菌芽孢、真菌和许多病毒都有很强的杀灭作用,其杀芽孢的作用弱于戊二醛。甲醛使用方法很多。

(1)组织的固定: 37% ~ 40% 浓度的甲醛水溶液不适宜于固定组织,甲醛组织固定液多为加水、生理盐水、缓冲液或其他试剂配合成为 1:9 的比例使用。它具有保存蛋白质、脂肪、粘液物质或一定量糖原的作用。有良好的固定和防腐保藏作用。

(2)尸体固定: 10% 的福尔马林用于固定婴儿、残肢、内脏、神经系统等,具有良好的固定和防腐保存作用。混合固定剂中含酚、乙醇、甘油、水等,对整个尸体的固定防腐保存有效。

(3)液体甲醛用于防腐保藏: 如用作某些病毒疫苗生产中的杀病毒剂,如脊髓灰质炎灭活疫苗的制备以及某些细菌毒素的脱毒等。

(4)用于防腐治疗: 液体甲醛可用于疣的治疗,在漱口药中用作防腐剂,亦可用于透析膜的消毒以及洗发香波的防腐。

2. 戊二醛 对细菌繁殖体、细菌芽孢及真菌孢子和各种病毒均有良好的杀灭作用,为灭菌剂。有机物对戊二醛杀菌影响小。戊二醛消毒灭菌及防腐保存亦以液体和气体两种剂型发挥作用。

(1)组织固定: 常配合缓冲液作为电镜标本微细结构的固定剂。使用浓度为 2% ~ 4% 戊二醛。经固定的小块组织可很好保存,由于戊二醛对组织渗透较缓慢,故不宜用于光学显微镜标本的固定。

(2)强化戊二醛: 用于金属、橡胶、塑料器具的消毒和不耐热医疗器械的消毒灭菌和保存。一般用 2% 戊二醛溶液,浸泡 20 ~ 30 min,灭菌浸泡 4 ~ 6 h; 0.65% 戊二醛用于人工心脏瓣膜的消毒。必须注意的是,经戊二醛消毒或灭菌的器械等必须用无菌水冲洗干净方可使用,因其有刺激性和对蛋白有固定作用;有些人有皮肤、黏膜过敏反应。

(3)戊二醛气体: 对微生物实验室,细菌培养室可用戊二醛加热熏蒸消毒。一般用量为 2% 戊二醛 35 ~ 5 ml/m<sup>3</sup>,可杀灭室内空气中微生物和对室内物品有防腐保藏作用。

## 二、气体消毒灭菌剂用于防腐和保藏的原理和特点

气体消毒灭菌剂主要有两大类,一类为烷基化制剂,一类为强氧化剂。烷基化制剂中有环氧乙烷、环氧丙烷、环氧氯丙烷、乙型丙内脂、烷丙环甲醛;另一类为强氧化剂,如二氧化氯和臭氧。这类制剂中烷基化制剂可作为灭菌剂使用,而强氧化剂在气体消毒方面作为消毒防腐剂使用。

### (一)环氧乙烷(ethylene oxide)

本品在二次大战前和大战期间作为一种去污方法。食品行业用本品熏蒸各种热敏产品,如调味品。后有学者对本品灭菌进行深入研究,该灭菌方法也逐渐用于某些不耐热的医疗产品。随着医药工业生产迅速发展,环氧乙烷灭菌在医院、诊所和实验室都作为常用灭菌法,而且可包装灭菌,灭菌后的用品可长期保存。目前国内很多一次使用医疗用品如一次性使用的输液管、注射器、棉签、手术衣帽、换药碗及敷料、妇女卫生巾、窥阴器等多用环氧乙烷灭菌。

1. 杀微生物作用 环氧乙烷能灭活所有类型的微生物,包括细菌芽孢。灭活作用与环氧乙烷浓度、温度、作用时间和微生物含水量有关。正确使用环氧乙烷对一次性使用的医疗产品进行大规模灭菌具有特别重要的意义。但须注意:

(1)医疗产品处理:用牛皮纸或(和)塑料包装,气体和水可自由进入,可使微生物污染到医疗产品上。①纸、纤维素、塑料等,以及微生物对可供利用的水和气体的竞争;②干燥微生物可能包裹在晶体内而受到保护。

(2)安全措施:必须考虑到对操作人员,排气过程中对环境,在治疗过程中对病人接触灭菌品引起的毒害作用,因此安全使用环氧乙烷灭菌,有经过专门培训并考核合格的人员负责操作。若安全措施不完善,必须尽可能选择高压蒸汽和干燥灭菌代替环氧乙烷,或者用蒸汽或煮沸消毒来代替环氧乙烷灭菌,工业上尽可能用辐射灭菌代替环氧乙烷灭菌,必须使用环氧乙烷时,工作人员、环境和要接触的环氧乙烷量应接近于零。使用过程中要戴防护眼镜、手套、防毒口罩等防护用品。

### 2. 环氧乙烷用于防腐和保藏

(1)医疗用品灭菌保藏:环氧乙烷主要用于医疗器械和医用日用品的灭菌。各种粉状药物和制药工业的原料也可以通过环氧乙烷进行灭菌和去污染保存。

(2)在食品工业上应用:用于食品工业原料去污染和灭菌保存。

(3)用于食品加工环境及用具消毒灭菌:食品加工车间,仓库中的采收工具、果筐、果箱等易被微生物侵染,在使用前后均应进行消毒防腐处理。量大、形态各异用环氧乙烷消毒灭菌比较合适,环氧乙烷用量为 400~800 mg/L,暴露 4~6 h。

### (二)环氧丙烷(propylene oxide)

环氧丙烷也是一种灭菌剂,但对微生物的灭活作用只为环氧乙烷的 1/2。但使用时的安全性比环氧乙烷要好些。

1. 杀微生物作用 环氧丙烷能灭活所有微生物,包括细菌芽孢。其杀微生物作用受相对湿度影响明显,以相对湿度在 80%~100% 时效果最好。温度影响也很明显:在一定范围内温度越高灭活微生物作用越强。

2. 安全性 本品有一定毒性,吸入后引起全身症状,如头痛、恶心等。严重者可导致意识丧失,对呼吸道黏膜有刺激作用。使用时应注意安全保护。贮运和使用应远离火源,不与氧化



剂、自然物质一起贮运,密闭、避光贮于阴晾干燥通风处,严禁撞击、摩擦。

### 3.环氧丙烷与防腐保藏

(1)在制药中防腐:主要用作消毒剂和防腐剂。如用 **70%** 异丙醇或者其他与之不能反应的防腐剂配成 **5%** 的溶液作消毒防腐用。

(2)在食品加工中的防腐与保藏:在食品加工中对贮运工具、器皿的消毒灭菌,有利于防腐保藏。环氧丙烷作为环境工具消毒灭菌的用量为 **800~1 600 mg/L**,作用 **8~12 h**。

(3)对种子熏蒸处理:环氧丙烷气体按 **2 400 mg·h/L** 熏蒸处理大麦种子,可杀灭所有真菌,但不能杀灭细菌芽孢,对种子发芽无影响。用这种方法处理可起到良好的防霉和保藏作用。

### (三)乙型丙内脂

乙型丙内脂是目前烷基化灭菌剂对微生物灭活作用最高的一种。比甲醛强 **25** 倍,比环氧乙烷强 **4 000** 倍。如掌握和运用得好,将是一种很好的消毒灭菌剂。

1. 杀微生物作用 对细菌繁殖体、细菌芽孢、真菌和病毒都有很强的灭活作用,且杀细菌芽孢和繁殖体浓度很接近,仅差 **4~5** 倍。

2. 安全性 液体和蒸气对皮肤黏膜均有刺激作用,可致皮疹、水疱,对小鼠皮肤有致癌作用。因此在使用时应穿防护服、戴防毒面具。

### 3. 防腐与保藏

(1)在生物战中,用于重要军事设施的灭菌去污染。

(2)用于高度危险的微生物实验室及物品的灭菌防腐去污染。一般乙型丙内脂用量为 **2~5 g/m<sup>3</sup>** 作用 **2 h**。

(3)用于医疗器材和被污染物品的灭菌保存。在密闭容器内, **25℃** 以上,用乙型丙内脂 **13~15 mg/L**,作用 **1 h**。

### (四)甲醛气体用于保藏

甲醛气体不易爆炸也不易燃烧。常温下甲醛气体的最大分压只与儿童玩具枪的压力相当,此压力相当于 **1 mg/L** 甲醛。温度低于 **80℃** 的甲醛气体能迅速聚合成各种固体聚合物,多聚甲醛是最常见的形式之一。应用甲醛气体灭菌时,最好用同一灭菌器交替进行甲醛气体灭菌和 **80℃** 饱和蒸气消毒,消毒效果要比预期的好。因为管理中和管口的多聚甲醛会释放甲醛。当灭菌温度低于 **80℃** 时,在灭菌产品上经常发生多聚甲醛沉积,使产品带有刺激性气味,如果没有较长挥发时间,对人会产生毒性危害,为了保证毒性气体和水蒸气均匀穿透物品,减少多聚物在产品上沉积,在物品暴露于甲醛之前,可以充入饱和蒸气,再排空,交替进行几次。灭菌后的物品在使用前可以安全保藏。

甲醛熏蒸在医院还可用于被褥的消毒保存。在食品生产中,甲醛蒸气也可用于果筐、网袋、货架、贮存仓库和消毒防霉。

### (五)臭氧在防腐和保存中的作用

臭氧系高效消毒剂,对细菌、病毒、真菌、细菌芽孢及原虫均有良好杀灭作用,气态的臭氧在医院和一些生产环境用来进行空气消毒、除臭和防腐保存。

1. 室内空气消毒及防腐:目前国内已生产了多种型号的臭氧空气消毒器,可用于医院、歌舞厅、影剧院、餐饮环境、食品加工环境、银行金库等环境的空气在无人时消毒、除臭防腐。

2. 在食品工业中臭氧可以用于食品业冷库消毒、生产车间空气净化、蔬菜及水果贮存及防霉保鲜。

(1)臭氧浓度为 12 ppm 时,作用 3~4 h,冷库中抗力较强的霉菌孢子均可杀灭。食品加工车间臭氧浓度达 0.5~1.0 ppm 时可杀灭空气中 80% 自然菌,可除去室内臭味。

(2)臭氧用于蔬菜水果的防腐保鲜,出库后一段时间仍保持新鲜。据唐漪关(1994)报道,经臭氧作用后使西红柿、青椒延缓成熟,延长保存期。果蔬暴露于臭氧后表面的细菌、霉菌数量降低,可起贮存保鲜作用。比较暴露前后检查亚硝酸盐含量发现,臭氧作用后亚硝酸盐含量比较低。

(张朝武)

#### 参考文献

- 1 薛广波,主编.灭菌、消毒、防腐、保藏.北京:人民卫生出版社,1993;442-484;494-501
- 2 苏学慧,译.药用微生物学.北京:科学出版社,1983;120-142
- 3 赵迪麟,主编.化工产品应用手册.有机化工原料.上海:上海科学技术出版社,1988;177-178
- 4 奚念朱,顾学裘,主编.药剂学.北京:人民卫生出版社,1990;67-68;164-172
- 5 王贞贞,颜一新.中药制剂微生物污染的去除方法.中国消毒学杂志,1991;8(3):170-171
- 6 杨祖渔,忻江维,主编.化妆品原料手册.上海:上海科学技术出版社,1994;575-576
- 7 钟静芬,主编.表面活性剂在药学中的应用.北京:人民卫生出版社,1996;29-33
- 8 杜卓民,主编.实用组织学技术.北京:人民卫生出版社,1998;9-16
- 9 夏穗生,主编.器官移植学.上海:上海科学技术出版社,1995;78-88
- 10 刘江汉,傅丽芳,编著.食品工艺学(上册).北京:中国轻工业出版社,1995;32-36;58;351
- 11 万素英,李琳,王慧君,编著.食品防腐与食品防腐剂.北京:中国轻工业出版社,1998;16-23
- 12 郭振东.粮食、蔬菜和水果的保藏.见:薛广波主编:灭菌、消毒、防腐、保藏.北京:人民卫生出版社,1993;494-501
- 13 朱蓓薇,编著.食品加工使用技术与配方.天津:天津科学技术出版社,1998;170-180;421-422;511;689-691
- 14 张秀珍,主编.当代细菌检验于临床.北京:人民卫生出版社,1999;80-170
- 15 马绪荣,苏德模,主编.药品微生物学检验手册.北京:科学出版社,2000;8-85
- 16 国家药典委员会编.中华人民共和国药典.第三部.北京:化学工业出版社,2000;11;37;360-361;530-531;825-826;960-961;996-998;1035-1036
- 17 Dasgupta A. Gas chromatographic - mass spectrometric identification and quantitation of benzyl alcohol in serum after derivatization with perfluorooctanoyl chloride: a new derivative. J Chromatogr Biomed Sci Appl, 1998; 708(1-2): 299-303
- 18 Dudareva N. Acetyl - CoA: benzylalcohol acetyltransferase - an enzyme involved in floral scent production in Clarkia breweri. Plant J, 1998; 14(3): 297-304
- 19 Caspar L. The use of benzyl alcohol and amyl - m - cresol (Strepsils) in the oral cavity. Fogorv Sz, 1998; 91(5): 143-150
- 20 Mori IC. Salicylic acid induces a cytosolic  $Ca^{2+}$  elevation in yeast. Biosci Biotechnol Biochem, 1988; 62(5): 986-989
- 21 Rouzaire - Dubois B, et al.  $K^{+}$  channel block - induced mammalian neuroblastoma cell swelling: a possible mechanism to influence proliferation. J Physiol (Lond), 1998; 510(Pt 1): 93-102
- 22 Kawakami S. Trace analysis of benzalkonium chloride on skin by flow injection ionspray mass spectrometry - mass spectrometry. Analysis, 1998; 123(3): 489-491

- 23 Jimidar M. Determination of benzalkonium chloride in drug formulations by capillary electrophoresis. *Biomed Chromatogr*, 1998;12(3):128 – 130
- 24 Malorni W. Oxidative stress leads to a rapid alteration of transferrin receptor intravesicular trafficking. *Exp Cell Res*, 1998;241(1):102 – 116
- 25 Okayama N. Exogenous NO enhances hydrogen peroxide – mediated neutrophil adherence to cultured endothelial cells. *Am J Physiol*, 1998;274(5 Pt 1):L820 – L826
- 26 Yoshizumi MO. Timing of dexamethasone treatment in experimental *Staphylococcus aureus* endophthalmitis. *Retina*, 1998;18(2):130 – 135
- 27 Zammerstedt RH. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. *Reprod Fertil Dev*, 1993;5(6):675 – 690
- 28 Schechter NR. Homa of the stomach with radiation alone. *J Clin Oncol*, 1998;16(5):1916 – 1921
- 29 Schwitalle M. Longitudinal study of vascular patients with standardized Bruckner distal limb amputation. *Zentralbl Chir*, 1998;123(3):235 – 238
- 30 Stein MT. Diurnal and nocturnal enuresis in a 6 year old. *J Dev Behav Pediatr*, 1998;19(2):105 – 108
- 31 Brazda E. *In vitro* amylase release of preserved pancreas: a simple test to assess the viability of pancreatic allograft during preservation in the pigs. *Acta Chir Hung*, 1997;36(1 – 4):46 – 48
- 32 Lerut JP. Cavocaval liver transplantation venovenous bypass and without temporary portocaval shunting: the ideal technique for adult liver grafting? *Transpl Int*, 1997;10(3):171 – 179
- 33 Wicomb WN. Evaluation of unstored hearts: immediate functional differences between St Thomas, UW, and cardiosol following cardioplegia. *Transplant Proc*, 1997;29(8):3532 – 3533
- 34 Polan CE. Protein and ruminal degradation of ensiled forage treated with heat, formic acid, ammonia, or microbial inoculant. *J Dairy Sci*, 1998; 81(3):765 – 776
- 35 Foote RH. Sperm numbers inseminated in dairy cattle and nonreturn rates revisited. *J Dairy Sci*, 1997;80(11):3072 – 3076

## 第十章 消毒动力学与杀菌作用指标

微生物的杀灭是一个动力学过程。微生物的死亡数随着暴露于消毒因子的时间而变化。这种变化随着微生物种类、消毒方法、消毒剂浓度、作用条件(如温度、pH 值等)的改变而改变。此外,还有一些其他相关因素,如微生物的生理特性、代谢机制、杀菌机理等,影响着杀灭效果。所有这些因素对消毒过程的影响,均可从数学上进行解释或模拟,并阐明其规律性。也就是说,消毒动力学是研究微生物在物理或化学因子的作用下,微生物群体死亡的规律,并用数学式给以表达。这类规律的研究,有助于探讨微生物死亡的分子机制,并对物理及化学因素的使用提供理论依据,指导消毒方法的改进与对效果的预测。

### 第一节 消毒动力学曲线

对消毒过程中微生物死亡规律的定量研究,通常将消毒数据绘制成半对数线图,即以作用时间为横坐标,以存活菌数( $N$ )与初始菌数( $N_0$ )之比的对数值为纵坐标作图,称为灭活动力学曲线,来解释微生物灭活的动力学。典型的动力学曲线(图 10-1)可能是直线,但多数情况下是曲线。曲线有 S 型、凸型、凹型等多种形态。对这些曲线的解释有多种多样,可谓仁者见仁、智者见智。既有经验上的解释,也有数学理论上的解释。

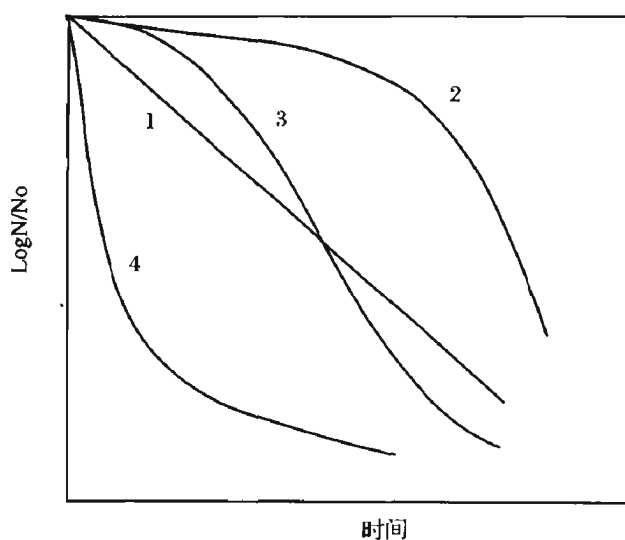


图 10-1 微生物动力学曲线图  
1 为直线,2 为凸型曲线,3 为 S 型曲线,4 为凹型曲线

早在 1918 年 Lee 与 Gilbert 就提出活力概念来解释 S 型和凸型存活曲线。他们认为,微生物个体的抵抗力是不一样的。其中,具有平均抵抗力的微生物应该占有大多数,而抗力最强或

最弱的微生物只占少数，这样所有微生物个体的存活时间呈正态分布。然而 Cerf 却认为，没有实验证据证明活力概念的正确性。Withel 发现，一些微生物存活时间的对数值呈正态分布，提示抗力弱的微生物占绝大多数。Koch 在消毒动力学的综合分析中，指出上述活力概念在理论上和经验上的几个缺陷，并认为需要进一步试验证据来证明此概念。Roy 等依据臭氧对肠道病毒灭活的试验，发现病毒群体的异质性不能解释存活曲线的性质。

关于微生物杀灭凸型曲线的解释，Oliver 与 Shepstone(1964)提出了多次打击概念，而 Morris (1970)则提出多靶点概念。多次打击，顾名思义，即经过反复多次打击作用才能灭活。多靶点认为，微生物具有多个与生命相关的位点，而且各位点必须均被击中一次才能灭活。

Berg 等认为，碘灭活病毒的曲线是一级动力学，非线性是由于灭活凝集状态的病毒所必需的多次打击效应，如果病毒形成凝集后的数量与感染性颗粒数量相同，则会出现一个典型的延迟曲线。相反，Young 与 Sharp 证明，在氯灭活单一颗粒脊髓灰质炎病毒中，低 pH 也可造成典型的延迟现象。Floyd 等用同样的微生物与消毒剂，发现在 pH6 时，出现相似的凸型曲线。有人分别证明，臭氧、氯和二氧化氯对无凝集的原生动物包囊悬液的灭活曲线，均可产生典型的拖尾现象。因此，微生物灭活中一个初步的拖尾的存在，可能不宜单纯归因于颗粒的凝集。

Prokop 等将前人的工作进行归纳后，提出了各种曲线的解释与可能的方程式。直线型，微生物经一步作用直接死亡；凸型，抗性菌变为敏感菌后死亡；凹型，部分敏感菌变为抗性菌后死亡；S 型，微生物经二步作用死亡，第一步为可逆反应，第二步为不可逆反应。各曲线的方程式见表 10-1。

表 10-1 微生物不同死亡曲线的方程式

曲线形状	反应过程	方程式	假设条件
直线型	$R \xrightarrow{K} D$	$N_t/N_0 = \exp(-Kt)$	...
初凸型	$R \xrightarrow{\lambda r} S$ $S \xrightarrow{K_1} D$	$N_t/N_0 = \lambda r / (\lambda r - K_1 \{ \exp(-K_1 t) - (K_1/\lambda_1) \exp(-\lambda r t) \})$	$\lambda r > K_1$
初凹型	$R \xrightleftharpoons[\lambda s]{K_1} S$ $S \xrightarrow{K_2} D$	$N_t/n_0 = K' \exp\{-\lambda s + K_1\} t - (1 - K') \exp(-K_2 t)$ $K' = \gamma_s (K_1 - K_2) / (K_1 + \lambda s - K_2)$	$K_2 > K_1$
S 型	$B \xrightleftharpoons[K_1']{K_1} A$ $A \xrightarrow{K_2} C$	$N_t/N_0 = [K_1' / (K_1 + K_2)] \exp(-K_2 t)$	$K_1 > K_1'$

注：R = 抗性菌，S = 敏感菌，D = 死亡，K = 速率常数，B = 原菌，A = 经第一步作用（可逆性），C = 经第二步作用（不可逆），N<sub>0</sub> = 原始菌数，N<sub>t</sub> = 作用 t 时菌数，λr = 抗性菌变为敏感菌速率常数，λs = 敏感菌变为抗性菌速率常数，γ<sub>s</sub> = 原有敏感菌数与原有总菌数之比值。

(本表引自《消毒与灭菌》1984,1:101-106)

一个常见的动力学理论，很难广泛应用。这是因为不同的微生物在相似的实验条件下的行为是不一样的，而同样的微生物在各种实验条件下的表现也会不一致。

消毒动力学的应用，主要表现在几个方面。

- 1.分析微生物杀灭资料，从量的概念上揭示微生物杀灭的某些规律。
- 2.比较多种消毒方法的灭活效率。
- 3.阐述各种环境因素（如温度、pH等）对消毒效果的影响。
- 4.指导消毒装置的设计。
- 5.建立数学模型，用计算机对消毒过程进行模拟和虚拟演示，指导教学和科研设计。

不同消毒方法的有效性，可比较杀灭一定量的微生物（如 99%），所需要的消毒强度（C）与作用时间（t）的积，即 C·t 值。该值越小，说明杀灭效果越好；反之，该值越大，杀灭效果越差。对消毒剂来说，这个积就是浓度乘时间；对热力杀菌来说，C·t 就是温度乘时间；对紫外线来说，强度的单位是 mW/cm<sup>2</sup>，时间用秒表示，则 C·t 的积为 mW·s/cm<sup>2</sup>。

可以从另一个角度来分析 C·t 值的意义。确定消毒方法后，用同样的试验条件来测试不同的微生物，就会发现 C·t 值越大，微生物的抗力就越高，反之就越低。

几种消毒剂对水中微生物的杀灭结果（C·t 值）见表 10-2。

表 10-2 四种消毒剂杀灭 99%微生物的浓度时间（C·t）（mg·min/L）

消毒剂	微生物		
	大肠杆菌	脊髓灰质炎 I 型病毒	轮状病毒
氯	0.034 ~ 0.05	1.1 ~ 2.5	0.01 ~ 0.05
氯胺	95 ~ 180	768 ~ 3 740	3 806 ~ 6 476
二氧化氯	0.4 ~ 0.75	0.2 ~ 6.7	0.2 ~ 2.1
臭氧	0.02	0.1 ~ 0.2	0.006 ~ 0.06

## 第二节 常用杀菌作用指标

在消毒试验中，为便于数据的对比与分析，前人创设了一些指标，已经成为消毒学中的专门术语，并广泛应用于消毒实践中，指导日常的消毒与灭菌过程的处理。现将常用的一些指标介绍于下。

1. 杀灭率 指消毒处理后杀灭的微生物的百分率。

$$\text{杀灭率} = \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100\% \quad (N_0 \text{ 为原有菌数, } N_t \text{ 为经 } t \text{ 时作用后存留菌数})。$$

与杀灭率性质与计算方法相似的指标有：

- (1)消亡率，指空气中微生物沉降与死亡总和的百分率。
- (2)衰亡率，指微生物自然死亡的百分率。
- (3)阻留率，指过滤除菌法中微生物被阻留的百分率。
- (4)清除率，指清除掉微生物的百分率。
- (5)灭除率，指污染于表面的微生物被杀灭与清除总和的百分率。

- 2 存活率 指消毒处理后仍存活微生物的百分率，作图分析时多用其对数值。

$$\text{存活率} = \frac{N_t}{N_0} \times 100\% \quad (N_0 \text{ 为原有菌数, } N_t \text{ 为经 } t \text{ 时作用后存留菌数})。$$

3. 杀灭指数( *killing index* ) 指消毒处理中使微生物数量减少的倍数。计算公式为

$$KI = N_0 / N_t$$

例如:消毒前原有  $10^8$  个菌, 经处理后只存留 10 个菌, 则杀灭指数  $KI = 10^8 / 10 = 10^7$ , 即使微生物减少  $10^7$  倍。

4. *K* 值 表示消毒的速度。在处理消毒实验数据时, 将存活微生物的对数值与消毒作用时间相应作图, 往往可得一直线关系, 此直线的斜率即为该消毒方法的速度常数 ( *K* 值 )。

$$K = \frac{1}{T} \lg \frac{N_0}{N_t}$$

*T* 为时间( *min* ), *N*<sub>0</sub> 为原有菌数, *N*<sub>*t*</sub> 为经 *t* 时作用后存留菌数 (即按照直线回归公式计算出的理论值)。

*K* 值越大, 表示消毒的速度越快。

5. *D* 值 指杀灭 90% 微生物所需要的时间。如某种处理方法的 *D* 值为 10, 即作用 10 *min* 杀菌率可达 90%。*D* 值为速度常数 *K* 值的倒数, 其值愈大, 杀菌速度愈慢。

6. *D*<sub>*t*</sub> 值 指在 *t* °C 下杀灭 90% 微生物所需的时间( *min* )。 *D*<sub>100°C</sub> 指在 100 °C 下杀菌率达 90% 所需的作用时间。

7. *D*<sub>*n*</sub> 值 指杀灭一定量微生物所需的处理剂量, 多用于电离辐射灭菌。 *D*<sub>10</sub> 即杀灭一个对数级( 90% )的照射剂量。12*D* 即指照射剂量为 12 倍 *D*<sub>10</sub> 值, 为食品消毒剂量计算的标准之一。设当食品处理的 *D*<sub>10</sub> 值为 0.37 Mrad 时, 则照射 12*D* 为 4.44 Mrad。此剂量可使灭菌指数达  $10^{12}$ 。

8. *D*<sub>0</sub> 值 又称 *Lea* 剂量, 即在电离辐射中杀灭微生物 63% 的剂量。

9. *D*<sub>1</sub> 值 灭菌剂量, 即在电离辐射时所有被处理物品达到灭菌时所需剂量。如 *D*<sub>1</sub> 为 5 Mrad, 即指经照射 5 Mrad 后, 所有被处理物品全部达到灭菌。

10. *n* 值 为浓度系数, 用以指示在化学消毒中药物浓度对杀菌作用的影响。*n* 值愈大, 浓度变化对消毒效果的影响愈明显。

$$n = \frac{\lg T_2 - \lg T_1}{\lg C_1 - \lg C_2}$$

(*T*<sub>1</sub> 为在浓度 *C*<sub>1</sub> 下所需作用时间, *T*<sub>2</sub> 为在浓度 *C*<sub>2</sub> 下所需作用时间)

例如, 甲醛对大肠杆菌的浓度系数为 1.05 ~ 1.5, 如将浓度减半, 则作用时间需延长 2 ~ 2.8 倍 ( $2^{1.05} \sim 2^{1.5}$ ); 而浓度系数为 2 ~ 3 的季铵盐类消毒剂, 浓度减半, 作用时间延长 4 ~ 8 倍 ( $2^2 \sim 2^3$ )。常用消毒剂杀灭一些微生物的浓度系数 *n* 值, 见表 10-3)。

11. *F*<sub>*t*</sub> 值 指热死亡时间( 121 °C ), 或指在 *t* 的温度下使杀菌达到 *n* 个对数值所需的时间 (热处理灭菌值)。

$$F_t = nD_t$$

例如, 每物品单位平均原有菌 100 个, 作用温度为 121 °C 时 *D* 值为 2 *min*, 拟将该菌杀灭至每  $10^6$  个物品单位才有 1 个菌, 所需 *F*<sub>121°C</sub> 值 =  $8 \times 2(\text{min}) = 16.0 \text{ min}$ 。

12. 灭菌度( *degree of sterility* ) 指使用某种处理方法在灭菌中失败的机会。一般用每处理多少个物品才可能发生一个未达到灭菌物品的数日来表示。

灭菌度 = 杀灭指数 / 每件物品平均染有微生物的数量

表 10-3 几种常用消毒剂的 n 值

消毒剂	菌 种	n 值
过氧化氢	伤寒杆菌	0.5
甲醛	金黄色葡萄球菌、伤寒杆菌、大肠杆菌	0.93~1.5
季铵盐类	大肠杆菌	2~3
苯酚	伤寒杆菌、微球菌、炭疽杆菌芽孢	4.0~6.4
甲酚	伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌	5.5~9.5
氢氧化钠	黑曲霉孢子	1.66,3.95
乙醇	金黄色葡萄球菌	11.3
次氯酸钠	黑曲霉孢子、枯草杆菌、炭疽杆菌	0.95~1.7
碘	黑曲霉孢子	1.15
环氧丙烷	枯草杆菌芽孢、绿脓杆菌、大肠杆菌、灵杆菌	0.7~2.7
环氧乙烷	枯草杆菌芽孢、绿脓杆菌	1.0~3.1
乙型丙内脂	枯草杆菌芽孢、绿脓杆菌、啤酒酵母	0.8~2.3

例如,甲种物品的污染程度是每件 10 个菌,乙种物品平均每件  $10^5$  个菌,使用灭菌方法的杀灭指数为  $10^7$ 。这样,甲种物品的灭菌度  $= 10^7/10 = 10^6$ ,即每处理 100 万件物品中才有可能发生一件未达到灭菌物品的危险,此为一般可接受的标准。乙种物品的灭菌度  $= 10^7/10^5 = 10^2$ ,即每处理 100 件就可发生一件未达到灭菌要求的物品,失败的概率过大。

13.石炭酸系数 又称苯酚系数,即用标准化试验方法与菌株,测知被试消毒剂与对照消毒剂(石炭酸)杀菌能力的差别,以对照消毒剂的杀菌能力为 1,对比计算出被试消毒剂的系数。石炭酸系数愈大,该药的杀菌能力愈强。本系数一般多用于酚类药物杀菌能力的比较。

14. $Q_{10}$  值 又称温度系数。指消毒时,在一定条件下,温度每增加  $10^{\circ}\text{C}$  杀灭微生物所需时间(min)的变化。 $Q_{10} = (X^{\circ}\text{C}$  时所需消毒时间)/( $X + 10^{\circ}\text{C}$  时所需消毒时间)

温度系数因杀菌方法或药物种类与菌种而异,系数越大,温度效应越明显。如湿热的温度系数高,干热的低,甲醛的温度系数高,石炭酸的低。

15.Z 值 使 D 值增减 10 倍时,加热所需达到的温度( $^{\circ}\text{C}$ )。

$$Z = (T_2 - T_1) / (\lg D_1 - \lg D_2)$$

( $D_1$  为温度  $T_1$  时的 D 值,  $D_2$  为温度  $T_2$  时的 D 值)

$$Z = (T_2 - T_1) / (\lg F_1 - \lg F_2)$$

( $F_1$  为温度  $T_1$  时的 F 值,  $F_2$  为温度  $T_2$  时的 F 值)

几种常见的细菌芽孢热处理的 D 值与 Z 值见表 10-4。



表 10-4 细菌芽孢对热处理的 D 值与 Z 值

菌 种	干 热		湿 热	
	D <sub>120</sub> (°C)	Z (°C)	D <sub>121</sub> (°C)	Z (°C)
产芽孢杆菌	115 ~ 195	21.7 ~ 22.8	0.15 ~ 1.4	8.7 ~ 13
巨大杆菌	...	...	0.04	8.8
蜡状杆菌	...	...	0.0065	9.7
枯草杆菌	195 ~ 295	18.3	0.57	7.4 ~ 13
枯草杆菌黑色变种	38 ~ 55	27.2	...	...
嗜热脂肪杆菌	19	24.4	4	7

(本表引自《消毒与灭菌》, 1984, 1: 101 - 106)

(张文福)

#### 参考文献

- 1 刘育京. 消毒动力学与杀菌作用指标. 消毒与灭菌, 1984, 1: 101 - 106
- 2 刘育京, 袁朝森, 主编. 消毒学简明教程. 北京: 中国科学技术出版社, 1989: 1 - 18
- 3 Wichramanayake GB, Sproul OJ. Kinetics of the inactivation of microorganisms. In: Block SS ed. Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991: 72 - 84
- 4 Benarde MA, ed. Disinfection. New York: Marcel Dekker Inc, 1970: 61
- 5 Cerf O. Tailing of survival curves of bacterial spores. J Appl Bacteriol, 1977; 43: 1
- 6 Berman D, Hoff JC. Inactivation of simian rotavirus SA11 by chlorine, chlorine dioxide and monochloramine. Appl Environ Microbiol, 1984; 48: 317 - 323



## 第二篇 消毒学应用

第十一章	医院消毒与灭菌 .....	(177)
第十二章	传染病疫源地消毒 .....	(191)
第十三章	饮水消毒 .....	(195)
第十四章	空气消毒 .....	(222)
第十五章	食饮具消毒 .....	(227)
第十六章	血液及其制品的消毒 .....	(234)
第十七章	生物战剂污染的消毒 .....	(243)
第十八章	灭菌与消毒效果的监测技术 .....	(253)



# 第十一章 医院消毒与灭菌

## 第一节 医院感染与消毒

### 一、医院感染的特点

1. 医院是病人和病原微生物携带者集中的场所,通过医疗活动为这些人群之间提供了许多不同于自然环境中发生接触的机会,因而出现某些疾病的特殊传播途径,例如通过污染的医疗器械、针刺、输血等造成院内感染。此外,医护人员的手和诊疗用具也极易成为疾病的传播媒介。

2. 侵入性器械如各种内窥镜、插管、导尿管造成的创伤、外科手术破坏了机体屏障的完整性以及某些化学、免疫抑制剂的使用引起机体抵抗力下降,使某些本来不致病或条件致病菌成为院内感染的病原微生物。

3. 由于滥用抗生素和消毒剂,导致抗性菌株出现,或引起局部菌群改变,常住菌被抑杀,过路菌定植,也可由于常住菌进入其他部位成为致病菌,如上呼吸道的链球菌可因扁桃腺摘除术后进入血流,导致亚急性心内膜炎。

4. 院内感染病原体流行株的毒力和对环境因素的抵抗力,往往比实验室培养的菌株要强。

### 二、消毒在控制医院感染中的作用

消毒是切断传染病传播途径的重要措施,在医院感染控制中,消毒与灭菌亦起到同样作用,在预防与控制内源性感染方面,层流通风技术用于恶病质病人、免疫抑制剂病人,在控制外源性感染方面则发挥其关键作用,如医疗器械的消毒灭菌,医院环境的消毒等,将病原微生物消灭于外环境,从而保护病人免受其感染。

从传染病的观点来看,医院也是疫源地,它具备存在传染源和曾经存在过传染源的场所的特点,因此,医院应做好随时消毒和终末消毒。医院又具有没有明确传染源存在的特征,因此,医院也应做好预防性消毒。做好医院清洁、消毒和隔离必将减少医院感染。

## 第二节 医院消毒灭菌方法的选择

### 一、医院常用消毒剂应具备以下条件

1. 至少要求可杀灭结核杆菌,即中效消毒水平以上,可灭活肝炎病毒,且要求速效杀灭细菌繁殖体。

2. 杀菌作用受有机物的影响小。

3. 使用浓度对人体无毒,不污染环境。

#### 4.使用方便,价格便宜。

### 二、医院医疗器械消毒灭菌方法选择的原则

#### (一) 医疗器械的用途和危险程度

1. 高危医疗器械、用品 如外科、口腔科各种手术器械,注射器,穿刺器材,输液器,输血器,器官移植物,进入无菌体腔的各种窥镜,导管等必须灭菌。

2. 中危医疗器械、用品 如进入开放体腔的各种窥镜,妇科窥器,探测器,压舌板,体温表等,应按其用途分别选用高、中、低效消毒剂消毒。

3. 低危物品 如床、椅、台面、墙、地面,一般情况下,只须作清洁处理,但是,当有传染病病原体污染时,仍须要消毒。

#### (二) 根据杀菌因子的特性选择

至少具备中效消毒水平以上,杀菌因子对微生物的作用可分为杀灭作用和抑制作用,一般说来,高水平消毒剂的最低杀灭浓度与最低抑制浓度相差较小,而低水平消毒剂的这种差别可相距数百倍,乃至数千倍,消毒要求杀灭微生物,而非仅仅抑制其生长。要杀灭微生物,杀菌因子必须穿透进入微生物体内作用于其生命活质使其失去活性,因此,杀菌因子的穿透力与其杀菌作用有直接关系,可供选择的强穿透力的物理因子有辐射线,如<sup>60</sup>Co、微波,化学因子有环氧乙烷、戊二醛,穿透力弱的物理因子有紫外线,化学因子有甲醛。

#### (三) 消毒对象污染微生物的种类、数量和存在的状态

1. 不同种类微生物对理化因子的抵抗力各不相同,细菌芽孢的抵抗力最强,如枯草杆菌芽孢对干热的抵抗力最强,嗜热脂肪杆菌芽孢对干热的抗力不如它,但对湿热的抗力则以嗜热脂肪杆菌芽孢为最强,因此,它们分别作为干热和湿热灭菌效果监测的指示菌。按照微生物对理化因子的抗力由强至弱的次序排列为:细菌芽孢(*Bacillus subtilis*)→分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)→非脂性小病毒(*polio virus*)→真菌(*Trichophyton spp*)→细菌繁殖体(*Pseudomonas aeruginosa*; *Staphylococcus aureus*)→亲脂性、中等大小病毒(*herpes simplex virus*; *hepatitis B virus*; *human immunodeficiency virus*)。但是,也有例外,如微球菌虽然是繁殖体,对辐射线的抗力比细菌芽孢还要强,这就给辐射灭菌效果检测增加困难。又如,空气中的八叠球菌对紫外线的抗力比其他细菌繁殖体强得多。此外,近年出现新的病原体称朊病毒,是一种不含核酸的蛋白质,如疯牛病毒,对各种理化因子的抗力明显高于细菌芽孢。它的出现改变了微生物抗力的排序,对于它的认识尚待深入系统研究。

2. 微生物数量越多对理化因子的抗力越强,在微生物群体中存在个体间抗力差异,其中少数个体的抗力要明显高于大部分个体,想要杀灭这小部分具有高抗力的个体往往需要高出几倍,甚至几十倍的消毒剂浓度或作用时间,因此,当微生物污染严重时,为取得可靠的消毒效果,应增加消毒剂的浓度或延长其作用时间,一般说来,后者比前者更有其实际意义。

3. 微生物常常与某些有机物或无机物同在,如与血液、痰液、体液、分泌物、排泄物及尘埃在一起。这些有机物不仅可阻碍理化因子接触微生物,使其免受损害,而且可直接消耗理化因子的作用能量。因此,在有机物存在的情况下,同样必须加大消毒剂的浓度或延长其作用时间,才能获得满意的消毒效果。

#### (四) 消毒物品的理化性状和使用价值

医院里所有物品都有可能受污染,需要消毒,它们由各种不同性质的材料制成,对不同消

毒因子的耐受能力不同,例如,对热、湿、辐射的耐受性,不同的理化因子对它们的作用亦各异,例如,金属不吸收微波,因而,不能直接用来消毒金属制品,而应用湿布包裹后进行消毒。医院里除废弃物可用焚烧消毒外,大部分物品消毒后应保持其原有使用价值,因此,必须严格按其理化特性选择适宜消毒方法。

1.耐热、耐湿物品,如金属、玻璃、棉织物等首选压力蒸汽灭菌,金属、玻璃、粉剂、油脂等还可选用干热灭菌或微波消毒。

2.畏热、畏湿物品和精密仪器可选用环氧乙烷、甲醛气体及等离子体技术灭菌。

3.畏热、耐腐蚀医疗器械可用过氧化物类、醛类消毒液浸泡消毒或灭菌。

4.有些物品的质材可吸附某些化学因子,如化纤、塑料可吸附季铵盐类化合物、酚及其衍生物。聚氯乙烯、橡胶可吸附环氧乙烷,对这些制品用相关消毒剂时应适当提高使用浓度,如果反复使用,应测定其浓度,及时更换。

### 三、医院消毒灭菌方法,适用范围和用法

#### (一)焚烧

以电、煤气为燃料的专用焚烧炉,用于焚烧医院具有传染性的废弃物,如截除的残肢、切除的脏器、病理标本、敷料、引流条、一次性使用注射器、输液(血)器等,操作过程中应注意燃烧彻底,防止污染环境。

#### (二)烧灼

利用酒精灯或煤气灯火焰消毒微生物实验室的白金耳、接种棒、试管、剪刀、镊子等。使用时应注意将污染器材由操作者将其逐渐靠近火焰,防止污染物突然进入火焰而发生爆溅,造成实验室感染或周围污染。

#### (三)干烤

以电热、电磁辐射等热源加热物体,主要用于耐高热物品,如金属、玻璃制品和粉剂、油脂的消毒或灭菌。

1.电热干烤 以电阻丝制成电热干烤箱,其热量依靠空气传导,因而,加热过程较慢。主要用于玻璃器材、金属器械、油脂、粉剂等耐高热物品,加热至 **160℃、170℃、180℃**,持续时间分别为 **2 h、1 h 和 30 min**,可达到灭菌。使用过程中应注意不可在加温过程中途添加上述物品,待箱内温度降至 **60℃**以下,方可打开箱门取物,防止因温差过大引起玻璃器材炸裂。

2.红外线消毒 红外线是一种电磁辐射线,照射于物体产生热效应加热物品,不依赖空气传热,因此,加热过程较快。但是,加热不均匀,未照射到的部位依赖物体内部热的传导,且物体的颜色不同加热的速度有所差别,深色者较浅色者为快。主要用于餐具和一般耐热用品消毒。红外线消毒柜内温度达到 **125℃**,维持 **15 min**可杀灭细菌繁殖体,灭活肝炎病毒。

3.微波消毒 医用微波消毒器采用的频率为 **2 450 MHz** 和 **915 MHz**,在有水分(**15%**)存在的条件下,可杀灭各种微生物。当用于不含水分物品消毒时,应用湿布包被。微波也可用于纱布灭菌,但操作时应注意掌握照射剂量,且照射时间与消毒物品的量有关。

#### (四)湿热消毒与灭菌

1.煮沸消毒 一般污染小件物品或耐热诊疗用品可用蒸馏水煮沸 **20 min**,可杀灭细菌繁殖体和肝炎病毒,水中加碳酸钠(**1%**)效果更好。

2.流动蒸汽消毒 在常压条件下,利用蒸屉或专用流动蒸汽消毒器,消毒时间以水煮沸时

开始计算, 20 min 可杀灭细菌繁殖体、肝炎病毒, 在消毒设备条件不足时, 可用此法消毒一般诊疗器具。

3. 巴氏消毒 血清、疫苗、牛奶可加热至  $56 \sim 65^{\circ}\text{C}$ , 持续 30 ~ 60 min。

4. 低温蒸汽消毒 利用密闭柜室抽真空, 通入饱和蒸汽时控制其压力, 使温度控制在  $60 \sim 80^{\circ}\text{C}$ , 作用 10 ~ 15 min, 可达到消毒。如果在低温蒸汽柜中反复通入甲醛气体, 即为低温蒸汽 - 甲醛灭菌, 可杀灭细菌芽孢, 用于医疗器械灭菌。

5. 压力蒸汽灭菌 利用蒸汽遇物品时放出潜热, 加热物品, 使其达到消毒或灭菌。目前医院常用的压力蒸汽灭菌器有以下几种:

#### (1) 医院下排气式压力蒸汽灭菌器操作要点

①物品包大小不得超过  $30\text{ cm} \times 30\text{ cm} \times 25\text{ cm}$ , 装载量不得超过柜室体积的 80%, 物品包应放于金属丝框中, 包间应留空隙, 以利冷空气排出。大包织物放在上层, 小包、金属放在下层, 且不要贴近柜壁, 防止湿包。注射器、针头等应置于带孔贮物器中, 容器应侧放。

②排除冷空气是决定灭菌成败的关键, 冷空气排出时间至少 20 min。在仪表正常工作的情况下, 当柜室的压力达到 102.9 kPa 时, 温度表应当指示为  $121^{\circ}\text{C}$ , 如果压力与温度失调, 即表明可能有排气管阻塞, 应及时疏通。

③手提式压力蒸汽灭菌器排气口位于底部, 应注意软管通畅, 勿受挤压。待灭菌器加热压力升至 50 kPa 左右, 开始排出冷空气, 至少 20 min。

④正确计算灭菌时间, 灭菌时间由热穿透时间、微生物死亡时间和安全时间构成。热穿透时间与物品的导热性、物品包大小和物品包的松紧度有关。微生物的热死亡时间则与微生物对热的抗力有关, 例如, 嗜热脂肪杆菌芽孢对  $121^{\circ}\text{C}$  饱和蒸汽的 D 值为 1.3 ~ 1.9。如果要达到灭菌保证水平, 6 个 D 值即  $6 \times 1.9 = 11.4\text{ min}$ 。安全时间一般按热死亡时间的 50% 计算。

#### (2) 预真空式压力蒸汽灭菌器操作要点

①物品包的大小和摆放与下排气压力蒸汽灭菌器的要求相同, 但装载量可增至 90%。不得少于 10%, 否则, 可能出现少装量效应, 反而造成灭菌失败。

②预真空压力蒸汽灭菌器的排气依赖于机械力, 将柜室抽气, 使其压力达到 2.0 ~ 2.7 kPa, 约可排出 98% 的冷空气, 且该灭菌器程序化操作, 其灭菌效果受人为因素的影响较小。

③预真空压力蒸汽灭菌器的压力可达 205.8 kPa, 温度  $132^{\circ}\text{C}$ , 灭菌时间维持 4 ~ 6 min。但此种灭菌器不适用于液体灭菌。

④定期进行 B - D 试纸试验, 将该试纸置于物品包中心, 完成预定灭菌周期后, 取出观察变色是否均匀, 均匀者为合格。出现变色不均匀时应对该灭菌器进行检修。

#### (3) 脉动真空压力蒸汽灭菌器操作要点

①物品包大小, 摆放, 装载量与预真空压力蒸汽灭菌器相同。

②将柜室内抽气使其压力降至 8.0 kPa。然后, 进蒸汽使其压力恢复至 49.0 kPa, 此操作重复 2 ~ 3 次, 使冷空气排除更彻底。

③进蒸汽使柜室压力达到 205.8 kPa, 温度达到  $132^{\circ}\text{C}$ , 时间维持 4 min。

#### (4) 手提压力蒸汽灭菌器操作要点

①物品摆放时, 包间应留有空隙, 容器应侧放, 装载量不超过 80%。

②排气软管插入侧壁套管中, 加热水沸, 压力升至 50 kPa 后, 排气 20 min。



③柜室压力升至 102.9 kPa, 温度达到 121℃, 时间维持 30 min。

④慢放气, 尤其是灭菌物品中有液体时, 防止减压过快液体溢出, 需烘干物品可取出放入烘箱烘干保存。

#### (五)紫外线消毒

杀菌紫外线的波长范围为 200~270 nm, 杀菌的中心波长为 253.7 nm, 在紫外线强度和照射时间足够的情况下, 可杀灭所有微生物, 但是, 紫外线的穿透力极弱, 其照射强度与距离平方呈反比, 且仅在照射到的表面上才能发挥杀菌作用。

##### 1. 紫外线灯的选择

(1)紫外线灯型: 有直管型, H 型, 螺管型等, 功率有 8、15、30、40 W。管材有石英玻璃、玻璃(掺入某些化合物增加其紫外穿透)。

(2)紫外线强度: 紫外线灯新产品 30 W 功率的直管型灯强度要求  $\geq 90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 医院使用中 30W 功率的紫外线灯强度要求  $\geq 70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。用于表面消毒的异型紫外线灯(器)按实际使用照射距离测定其照射强度。

2. 紫外线杀菌 剂量 紫外线照射剂量 = 紫外线强度 ( $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ )  $\times$  照射时间(s), 例如紫外线强度为  $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  时, 照射时间为 8 min, 则紫外线照射剂量为  $90 \mu\text{W}/\text{cm}^2 \times 8 \times 60 \text{ s} = 43200 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ 。紫外线杀菌作用决定于紫外线的照射剂量, 但是, 紫外线的强度起重要作用, 当强度低于  $40 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  时, 即使延长达到杀菌剂量亦不能杀死细菌, 甚至, 小剂量紫外线可促进细菌复苏。一般说来, 紫外线杀灭细菌繁殖体的剂量为  $10000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ , 小病毒、真菌为  $50000 \sim 60000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ , 细菌芽孢为  $100000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ , 真菌孢子对紫外线有更大抗力, 如黑曲霉菌孢子的杀灭剂量为  $350000 \mu\text{W} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$ 。

##### 3. 紫外线在医院消毒中的应用和操作要点

###### (1)空气消毒

①在无人活动的室内可采用悬挂 30 W 功率的紫外线灯(按室内面积每平方米 1.5 W 计算), 20 m<sup>2</sup> 室内, 在中央 2~2.5 m 高处挂一支带有反射罩的紫外线灯, 每次消毒时间不少于 30 min。

②在有人活动的室内则可用低臭氧紫外线灯(按室内面积每平方米 1 W 计算), 反射罩朝上悬挂 2 m 高处, 照射室内上部空气, 通过空气对流减少室内细菌, 每次消毒时间不少于 30 min。

③循环风紫外线消毒器。在箱体内安装抽风机, 滤材和低臭氧高强度紫外线灯组, 可用于有人活动的室内空气消毒。该消毒器的消毒效果取决于紫外线照射强度、空气流动速度和室内空气对流的完全与否。因此, 使用该消毒器时必须注意: a. 了解消毒器的消毒有效体积; b. 消毒器的气体流速(每小时)应是消毒空间体积的 8 倍; c. 通过实验找出室内空气流通的最佳点, 将其放置此点, 以取得最佳消毒效果。

④物体表面消毒(桌面, 化验单及其他污染物体表面): a. 桌面: 可将带罩紫外线灯(30 W)挂于桌面上方 1 m 高处, 照射 15 min。b 污染票据、化验单可采用低臭氧高强度紫外线水毒器, 短距离照射(照射强度可达到  $7500 \sim 12000 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ )可在 30 s 内对所照射的部位达到消毒要求, 但必须注意, 只有紫外线照射到而且剂量足够的地方才能达到消毒。

⑤诊疗用水消毒: 为除去某些消毒液浸泡过的物品表面上残留的消毒剂, 常可用紫外线水消毒器消毒自来水或蒸馏水, 照射水层不得超过 2 cm, 水的流量应按水消毒器说明书要求, 经

消毒的水可用于一般消毒器材淋洗及外科洗手。

#### 4. 紫外线消毒时应注意

(1)紫外线消毒适用温度范围为  $20 \sim 40^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度  $\leq 60\%$ 。

(2) 保持紫外灯管洁净, 定期用酒精棉擦去石英管上的油渍和尘埃。

(3)接触紫外线时应做好个人防护, 戴防护眼镜。

(4)测定紫外线强度时,应在电压稳定于  $220\text{ V}$ , 照度计置于灯管中央垂直  $1\text{ m}$  处,照度计应在检定有效期内。

#### (六)医院常用消毒剂及其使用注意要点

1.用于医疗器械灭菌的消毒剂 要求此类消毒剂可杀灭所有微生物, 包括细菌芽孢。

(1)环氧乙烷气体灭菌, 在灭菌过程中必须严格控制温度 ( $55 \sim 60^{\circ}\text{C}$ ), 相对湿度( $60\% \sim 80\%$ ), 环氧乙烷浓度( $800 \sim 1\,200\text{ mg/L}$ )和灭菌时间( $6\text{ h}$ )。由于不同质材制成的医疗器械对环氧乙烷的吸收值不同, 应按其对象采用不同环氧乙烷浓度进行灭菌, 对吸收值大的物品, 如聚氯乙烯和橡胶制品应加大环氧乙烷的灭菌浓度( $1\,200\text{ mg/L}$ )。在物品灭菌后, 应将残留环氧乙烷驱除, 使其浓度低于  $10\text{ ppm}$ 。一般来说, 聚氯乙烯和橡胶制品驱除残留环氧乙烷的时间需  $1 \sim 2$  周, 聚乙烯和聚丙烯制品需  $2\text{ d}$ 。医院环氧乙烷灭菌物品在通风柜内,  $50^{\circ}\text{C}$  条件下, 驱散  $2 \sim 6\text{ h}$  即可。环氧乙烷气体对人体有害, 作业现场浓度应低于  $2\text{ mg/m}^3$ 。

(2)戊二醛, 用于医疗器械灭菌时, 戊二醛的浓度为  $2.0\% \sim 3.4\%$ , 加入适量碳酸氢钠将其  $\text{pH}$  调至  $7.5 \sim 8.3$  (在加入碳酸氢钠摇匀溶解后  $1\text{ h}$  测定), 灭菌的作用时间为  $10\text{ h}$ 。由于在碱性条件下, 戊二醛不稳定, 单体戊二醛可逐渐聚合, 失去杀菌活性, 一般配制后的碱性戊二醛仅可存放  $2$  周, 使用中消毒液也仅可连续使用  $1 \sim 2$  周。经戊二醛浸泡灭菌或消毒后的器械和物品, 必须用灭菌水将残留戊二醛冲洗干净。由于戊二醛对组织有固化作用, 使用时不可接触皮肤, 戊二醛稀释液用于皮肤消毒时, 浓度不得超过  $0.1\%$ , 用于黏膜消毒的戊二醛的浓度不得超过  $0.02\%$ 。

(3)过氧化氢等离子体: 在专用柜内, 将其压力抽至  $300\text{ mTorr}$ , 注入  $1.8\text{ ml}$  过氧化氢 ( $58\%$ )后, 气化的过氧化氢弥散进入物品包内, 开启射频装置, 使过氧化氢气体在  $40\text{ W}$  电场作用下发生离子化, 作用  $15 \sim 19\text{ min}$  即可使物品达到灭菌要求。可用于医疗器械、人工移植术、各种导管、内窥镜、显微外科精密器材灭菌。不可用于纸棉制品、液体等吸水性物品的灭菌。灭菌后物品可直接使用。

#### 2. 医院常用于物品消毒的消毒剂

(1)含氯消毒剂, 属高中效消毒剂, 无机氯如漂白粉、次氯酸钠、次氯酸钙等, 有机氯如二氯异氰尿酸钠、三氯异氰尿酸、氯胺等。有机氯比无机氯性质稳定, 对光敏感, 粉末状含氯消毒剂在阴凉处保存比较稳定, 溶于水后不稳定。它们溶于水生成次氯酸而发挥其杀灭各种微生物的作用, 含有效氯  $2\,000\text{ mg/L}$  可杀灭细菌芽孢, 含有效氯  $500 \sim 1\,000\text{ mg/L}$  可杀灭结核杆菌、真菌, 灭活肝炎病毒, 含有效氯  $100 \sim 250\text{ mg/L}$  可杀灭细菌繁殖体。这一类消毒剂的杀微生物作用受有机物的影响比较明显, 且对人体有一定刺激, 大量使用可污染环境, 在医院中此类消毒剂一般用于环境表面, 污染的实验器材, 废弃物等的消毒。

(2)醇类消毒剂: 乙醇和异丙醇  $70\%$  可杀灭细菌繁殖体,  $80\%$  乙醇或异丙醇可降低肝炎病毒的传染性, 常用于皮肤消毒, 用作溶媒时, 可增强某些非挥发性消毒剂的杀微生物作用。

(3)酚类消毒剂, 包括六氯酚;  $2,4,4$  - 三氯 -  $2$  羟基二苯醚;  $4$  氯 -  $3,5$  - 二甲基苯酚

(PCMX)等酚的衍生物。六氯酚溶液常用作抗菌剂,主要用于外科擦洗、医用肥皂的活性成分。**2,4,4-三氯-2-羟基二苯醚**,易溶于稀碱液和有机溶剂中,微溶于水。**0.1~0.03 μg/ml**可抑制葡萄球菌,三倍于此浓度才可抑制大肠杆菌,**100~1 000 μg/ml**才可抑制绿脓杆菌。**1~30 μg/ml**可抑制几种霉菌生长,常用作防腐剂。PCMX常用作肥皂和擦手纸巾的佐剂。

(4)过氧化物类,过氧化氢,过氧乙酸,二氧化氯,臭氧等,其理化性质不稳定,但消毒后不留残毒是它们的优点。常以**0.5%~1.0%**过氧乙酸用于血液透析机、透析器、肝炎污染物消毒,**2%**过氧乙酸作冷库喷雾及空气消毒。**0.1%~0.2%**过氧乙酸可用于手消毒,**0.02%**过氧乙酸用于黏膜消毒。二氧化氯杀菌作用较氯强,且在**pH 6~10**的范围内不影响其杀菌能力。

(5)甲醛气体熏蒸消毒,浓度为**40~80 mg/L**,灭菌时间为**12~18 h**。甲醛穿透力弱,待消毒物品不应包裹,最好悬挂,使其与甲醛充分接触。多孔物品可吸收甲醛,如**1 g**毛织品可吸收**0.04 g**甲醛,因此需提高消毒浓度。甲醛熏蒸消毒时不可自然挥发,应采用加热福尔马林**12.5~25 ml/m<sup>3</sup>**,或氧化法,即**40 ml**福尔马林加**30 g**高锰酸钾,放出甲醛,作用**12 h**。甲醛有致癌和致敏作用,不可用于空气消毒。经甲醛消毒或灭菌的物品应用灭菌水冲洗干净。

(6)双胍类化合物,最常用氯己定(洗必泰),理化性状稳定,**0.05%~0.1%**可用作口腔、伤口防腐剂。**0.5%**洗必泰乙醇溶液可增强其杀菌效果,是良好的皮肤消毒剂,用于手术野皮肤消毒。**0.1%~0.5%**洗必泰溶液可用于洗手消毒,但必须注意革兰阴性细菌易对洗必泰产生抗性,使用中应及时更换消毒液。阿立西定(Alexidine)也是双缩胍,具有不同于氯己定的氯苯酚末端基团的乙基己基末端基团,比氯己定更具活性,主要用于口腔防腐。

(7)季铵盐类,苯扎氯铵,苯扎溴铵,理化性状稳定,此类化合物属阳离子表面活性剂,具有抗菌活性,兼有去污作用。浓度为**0.2%~0.5%**时,可杀灭细菌繁殖体,革兰阳性细菌对此类消毒剂比革兰阴性细菌更为敏感,后者易产生抗性菌株,久用此类消毒剂,常可发生绿脓杆菌抗性菌株,必须引起注意。此类消毒剂仅用于医院一般用具清洁消毒。

(8)含碘消毒剂,**2%**碘酊和**0.2%~0.5%**碘伏常用于皮肤消毒,如注射、手术野皮肤、外科洗手,**0.05%~0.1%**碘伏作伤口、口腔消毒,**0.02%~0.05%**用于阴道冲洗消毒。

(9)高锰酸钾,为一种强氧化剂,**0.01%~0.02%**溶液可用于冲洗伤口。

3.一般诊疗用品的消毒 一般病人用过的诊疗用品应及时彻底清洗,若是传染病人用过的,应先消毒后清洗,使用前再消毒。

(1)体温表用后应清洗,然后用**70%**酒精浸泡消毒,作用时间**15 min**以上,不宜用擦拭法,因为酒精极易挥发,不能保证其作用时间,即便是浸泡消毒也应定期更换酒精。

(2)压舌板,可用蒸馏水煮沸或流动蒸汽**20 min**或压力蒸汽灭菌。

(3)血压计,听诊器及各种监护仪器、设备应定期用**0.2%~0.5%**新洁尔灭擦拭,若有肝炎等血液传染病污染,则应用**2%**酸性强化戊二醛或**0.5%**过氧乙酸擦拭消毒。

(4)药杯、漱口杯,采用一次性使用,若是耐热质材,可煮沸或流动蒸汽**20 min**,若是不耐热质材可选用**250 mg/L**含氯消毒剂或**0.2%**过氧乙酸浸泡**15 min**。

(5)治疗室用持物钳应压力蒸汽灭菌,使用时保存于灭菌罐中,且及时更换。

#### 4.皮肤,黏膜的消毒

(1)手术部位皮肤消毒:按常规清洁备皮后,选用以下消毒方法。

①**2%**碘酊,用浸透碘酊的棉签或敷料,由手术部位中心向周围涂擦一遍待干,然后用**70%**酒精按同法擦拭两遍。

②0.5%碘伏,方法同碘酊。

③0.5%洗必泰酒精溶液,方法同上。

(2)静脉注射穿刺部位的皮肤消毒:与手术部位皮肤消毒方法基本相同,消毒皮肤范围不小于  $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 。

(3)受微生物污染皮肤的消毒。

①受细菌繁殖体污染可用 0.5%洗必泰乙醇溶液擦拭作用 5 min。对于破损皮肤则可用 0.05%~0.1%洗必泰水溶液冲洗。

②受肝炎病毒、艾滋病毒污染者用 0.2%~0.4%过氧乙酸擦拭作用 5 min。

(4)鼻、肛黏膜消毒。

①0.02%~0.1%洗必泰涂擦或冲洗,作用 5 min。

②0.02%过氧乙酸擦拭作用 5 min。

③0.05%碘伏溶液擦拭或冲洗,作用 5~10 min。

(5)阴道黏膜冲洗消毒

①0.05%~0.1%洗必泰水溶液冲洗 3 min。

②0.01%~0.02%高锰酸钾冲洗 5 min。

③0.02%~0.05%碘伏溶液冲洗 5 min。

(6)医护人员手的消毒。

①外科洗手消毒。

a.剪短指甲,取下饰物,用肥皂流水刷洗双手,指尖,指间及双臂 2 min,清水冲淋残余肥皂或洗涤剂。

b.用无菌刷蘸取 0.3%~0.5%碘伏或 0.1%~0.5%洗必泰溶液依次刷洗上述各部位。

c.抬高手腕部,由腕部向前臂用无菌水冲洗,然后,用无菌毛巾依次擦干。

②卫生洗手消毒(一般预防性洗手和病原微生物污染手消毒):对于无明确病原体污染的手部可用肥皂流水冲洗,即可达到减少手部 80%的细菌。对于明确受某种微生物污染时可选用以下消毒剂擦拭或浸泡,作用 1~3 min后,用清水冲洗。

a.肠道细菌、化脓性细菌污染时,用 0.2%~0.5%洗必泰乙醇溶液或 0.5%碘伏。

b.肝炎、艾滋病毒污染时用 0.2%~0.4%过氧乙酸。

c.真菌污染可选用 500 mg/L 二氧化氯或含氯消毒剂。

5.进入人体开放腔道医疗器具(妇科窥器、胃镜、肠镜、气管镜等)的消毒

(1)妇科窥器和扩肛器,在彻底清洗干净后,可采用以下方法消毒

①煮沸,浸没在蒸馏水中,加入碳酸钠(1%),煮沸后持续 20 min。

②流动蒸汽 20 min。

③对受病原微生物污染的窥器可用 1 000 mg/L 含氯消毒剂浸泡 30 min,然后,用清水冲洗干净,再按①或②法消毒。

④塑料等畏热窥器可用 0.2%~0.5%过氧乙酸或 1 000 mg/L 含氯消毒剂浸泡 30 min。然后,用蒸馏水冲净。

(2)消化内镜消毒:内镜的消毒效果关键是清洗,其二是选择适当的消毒方法,一般说来包括六个步骤:

①操作人员应戴手套,用过的内镜,卸下镜体,用纱布擦去外部的粘液,然后,用自来水

加清洗剂或酶清洗剂在自动清洗机中清洗镜体和管道外表面。

②用毛刷刷洗管道，并用水冲净管道的各个部位。

③将窥镜按下述可选用的消毒方法消毒。

④消毒后，用无菌水冲洗镜体和管道，若是用自来水冲洗，则要以酒精再冲洗一遍。

⑤对插入管和内管，在消毒后、保存前要用加压空气冲干。

⑥垂直悬挂在专用柜内，注意防尘，防止再污染。

可选用的消毒方法有以下几种：

①环氧乙烷气体消毒：环氧乙烷 450 mg/L 温度 50℃，相对湿度 60% ~ 75%，作用时间 6 h。消毒后，须将残留环氧乙烷驱除 2 h，方可使用。

②2.0% ~ 3.4% 碱性戊二醛( pH7.5 ~ 8.3)，在 20℃条件下，对一般病人用过的窥镜，清洗后将其浸泡 20 min，结核病、肝炎或艾滋病病人用过的窥镜则须浸泡 45 min，取出后用无菌水冲去残留的戊二醛，方可使用。此消毒液可连续使用 1 ~ 2 周，视产品而定。

③0.2% 过氧乙酸加防腐蚀剂，用于自动清洗机，清洗消毒 30 min。

④0.08%过氧乙酸加 1%过氧化氢，美国 FDA 已批准作为半关键器材消毒。用于自动清洗机，清洗消毒 30 min。

⑤邻苯二甲醛(含 0.55% 1,2 - benzenedicarboxaldehyde)，在 pH 3 ~ 9 范围内十分稳定，使用前无需活化，且对眼鼻黏膜无刺激，美 FDA 已批准作为内窥镜液体灭菌剂 / 高效消毒剂。作高效消毒时，将窥镜浸泡 12 min，然后取出用灭菌水冲洗干净。

⑥强酸性水( super oxidized water)：用阳离子隔膜电解食盐获得的 pH 2.3 ~ 2.6、氧化还原电位 160 mV 有效氯含量为 20 ~ 60 mg/L 的强酸性水，在无蛋白保护下，30 s 内杀灭细菌繁殖体，破坏乙肝表面抗原的抗原性，因此，强酸性水已用于消化道内窥镜的清洗消毒，且可在 5 ~ 10 min 内完成消毒全过程。

消化道内窥镜消毒中应注意几点：

①内窥镜用完后应立即清洗干净，每次用过的清洗剂必须废弃，刷子应是一次使用性的或用高效消毒。

②用于内窥镜高效消毒的消毒剂须是卫生部批准的，消毒时消毒液应进入内窥镜管道内腔，作用时间要满足要求，消毒后要用灭菌水将残留消毒剂冲洗干净。

③穿透黏膜的，可重复使用的附件（如细胞刷，活组织钳）应用超声波清洗器等机械清洗，然后，压力蒸汽灭菌。

6. 进入血管、无菌体腔、组织的医疗器具灭菌(腹腔镜, 关节镜, 膀胱镜, 宫腔镜等)

(1) 凡是耐热耐湿的内窥镜及其附件均应采用压力蒸汽灭菌，如活检钳。

(2) 凡需灭菌，但不耐热、湿的内窥镜可采用冷灭菌法。

①环氧乙烷灭菌法：环氧乙烷浓度为 800 ~ 1 000 mg/L，相对湿度 60% ~ 75%，温度 50℃，灭菌时间为 6 h，灭菌后应驱除残留环氧乙烷 2 ~ 6 h。

②戊二醛灭菌：2%戊二醛溶液中加入碳酸氢钠和防腐蚀剂，摇匀使其完全溶解，1 h 后测定其 pH 值，要求 pH 在 7.5 ~ 8.3 间，然后，将洗净、干燥的窥镜浸没其中，要求在 20℃ ~ 25℃ 条件下，作用 10 h，取出后用无菌水冲淋，直至将残留在镜体和管道中的戊二醛洗净，方可使用。

③过氧化氢等离子体灭菌：将用后内窥镜在含酶洗涤剂自动清洗机中清洗，自来水冲净、

干燥后,置于等离子体灭菌器内,抽气至压力为 300 mTorr(需 5~20 min),随之注入 58% 过氧化氢 1.8 ml(经 6 min 后),过氧化氢气化,且弥散至镜体和管道内外(约 44 min),此时灭菌器内过氧化氢浓度为 6 mg/L,然后开启射频装置(radiofrequency energy),在 40 W 电场作用下,使过氧化氢离子化(此时灭菌器内压力恢复至 500 mTorr),作用 15~19 min,最后,通过高效滤器(HE-PA)通风 4~9 min,全过程 55~75 min。

但是,此类窥镜价格昂贵,而使用频繁,因而,常常不能实施上述灭菌方法,美国 CDC 和 APIC 在腹腔镜、关节镜和其他进入无菌组织的内窥镜灭菌指南中强调:每次使用前应当灭菌,但是,如果不可能做到时,至少应作高水平消毒,即可在 2% 碱性戊二醛溶液中浸泡 20~45 min。有人在 117 000 例妇科病人腹腔镜调查中,发现采用高效消毒腹腔镜引起的感染的比例仅为 0.04%,而且有人证明引起这类感染的微生物是对 2% 戊二醛敏感的腹部皮肤菌群。

## 7. 医院重点科室的消毒

(1) 外科手术室:手术室是病人接受创伤性治疗的场所,必须遵循无菌操作。

① 洗手间:洗手刷可用压力蒸汽灭菌或 0.5% 过氧乙酸浸泡 30 min。

消毒洗手液,0.3%~0.5% 碘伏或 0.1%~0.5% 洗必泰。术者经肥皂流水洗 3 min,然后蘸取其中一种消毒洗手液,按外科洗手程序刷洗一遍,或用酸化水冲刷一遍,然后用无菌水冲洗,用无菌干纱布由指尖至前臂擦干。

② 手术室应严格区分无菌区、清洁区和污染区,患有传染病的手术病人用过的手术器械应与非传染病人的手术器械严格分开,并应先消毒(含有效氯 500 mg/L,作用 30 min),然后及时用清水冲洗刷净,也可用自动清洗消毒机。

③ 麻醉管路可用 70% 乙醇或异丙醇,0.2% 过氧乙酸或 3% 过氧化氢浸泡 15~30 min 或专用清洗机处理,取出烘干备用。

④ 感染病人切除的脏器、组织及手术中的废弃物装入黄色塑料袋封口,送焚烧。

⑤ 感染手术室每台手术后必须严格将手术布巾装塑料袋,标记污染标志送洗衣房,手术台面、地面用 0.2% 过氧乙酸,或含 500 mg/L 有效氯的消毒液或用 250 mg/L 二氧化氯擦拭,作用 30 min 或用酸化水冲刷台面、地面。

## (2) 产房

① 接产洗手同外科手术洗手,产包用压力蒸汽灭菌。

② 凡患传染病产妇隔离待产,所用接产器具、物品用后应就地用含有效氯 500 mg/L 的消毒液浸泡 30 min,自来水冲净。

③ 一次性使用物品和废弃脏器,应分别收集到黄色塑料袋中后封口,送焚烧。

④ 隔离室用具,产床,地面可用含 500 mg/L 有效氯的消毒液或 0.2% 过氧乙酸擦拭作用 30 min 或酸化水冲刷一遍。

## (3) 婴儿室或母婴同室

① 床单、用具可用热水 80℃,15 min 消毒,不耐热物品可用酸化水冲刷清洗,浸泡 5 min。

② 玻璃或耐热塑料奶瓶可用煮沸 10 min 消毒,护理人员喂奶前应肥皂流水洗手。

③ 母婴同室母亲喂奶时应消毒乳头,可用 0.05% 碘伏擦洗乳头,然后用生理盐水冲洗,灭菌纱布擦干。

④ 患传染病母婴应住隔离室,护理人员出入时,应用 0.2% 过氧乙酸或 0.5% 洗必泰洗手,作用 3 min。携带肝炎病毒的母婴护理者应用 0.3% 过氧乙酸浸泡洗手 3 min,所用检查器具用

**0.5%过氧乙酸浸泡,作用 15 min。**

⑤婴儿尿布应采用一次使用性纸尿布,复用尿布可用热水 **80℃** 清洗 **15min**。换洗尿布时,应有专用台,不可与配奶共用。

(4)重症监护室:重症监护室的病人大部分由于承受手术或使用免疫抑制剂或长期患病机体抵抗力低下,有些条件致病菌乘虚而入,因此,尤其应注意以下消毒措施,防止病人和医患间交叉感染。

①空气消毒:层流通风(HEPA),循环风紫外线消毒器,静电吸附空气净化器均可在有人活动场合下,不同程度减少空气中带菌颗粒.与此同时必须重视地面清洁,每天湿式拖地两次。

②医护人员必须戴口罩、帽子,严格注意手的消毒,肥皂流水洗手或 **0.2% ~ 0.5% 洗必泰**,或 **0.3% 碘伏**,作用 **1 ~ 2min**。

③限制探视人数,在探视者通道设立更衣,换鞋,戴口罩,洗手消毒**0.2%过氧乙酸**或含 **500 mg/L**有效氯消毒液,每天更换一次。

#### (5)检验科

①针刺采血,用一次性或压力蒸汽灭菌针具,耳垂或指端用 **70%酒精**棉擦拭二遍消毒,待干后采血,然后灭菌棉球压迫止血,采血员应更换一次性手套。

②静脉穿刺采血,用 **0.3% ~ 0.5%碘伏**或 **2% 碘酊**棉签擦拭, **70%酒精**脱碘待干,穿刺采血后,灭菌棉球压迫止血。

③用后的一次性注射器,在浸入含 **1 000 mg/L**有效氯消毒剂之前,将针头插入消毒液中吸打两次,然后将其全部浸入消毒液中,作用 **2 h** 后,作毁形处理。

④采血微量吸管,容器,废弃标本可分别浸泡于 **0.5%过氧乙酸**或含 **1 000 mg/L** 有效氯的消毒剂中,作用 **2 h** 后,用自来水清洗或废弃焚烧。

⑤各种微生物检验标本应用压力蒸汽灭菌,液体标本可按有效氯 **2 000 mg/L** 加漂白粉,或次氯酸钠,或二氯异氰尿酸钠,作用 **2 h**。倒入下水道。

⑥带有病原体的实验动物处死后,浸泡于含 **2 000 mg/L** 有效氯消毒剂中 **2 h** 后,取出装于塑料袋中封口送焚烧。

⑦操作有传染性标本时,动作要轻巧,防止微生物气溶胶发生,室内保持通风,如有意外发生,可用紫外线灯照射 **40 min**。在空气相对湿度  $\geq 80\%$  时,也可用臭氧作一次终末消毒。

⑧操作完毕用含 **1 000 mg/L** 有效氯的消毒剂或 **0.5%过氧乙酸**擦拭台面,或用紫外线灯对台面和空气作一次终末消毒。

#### (6)注射室和治疗室:

①提倡采用一次性注射器,用后,不论是否有传染性均应浸于含 **1 000 mg/L** 有效氯的消毒液中,浸泡前应将消毒液吸入注射器,作用 **2 h**,取出毁形。

②皮肤消毒采用 **2%碘酊**或 **0.3% ~ 0.5% 碘伏**, **70%酒精**脱碘或 **0.5%洗必泰**酒精溶液擦拭,待干后注射。

③灭菌敷料开包后,应置带盖灭菌容器内,持物钳应置于带盖空罐内,用后及时盖好,防止空气中带菌颗粒落入,且及时更换。

④注射器内留药必须放在铺有消毒布巾的带盖搪瓷盘内。

⑤配药前,台面用 **0.5% 新洁尔灭**擦拭消毒或清水抹一遍, **30 W** 紫外线灯 **1 m** 高处照射 **15 min** 地面每天湿式打扫两次。

(7) 口腔科消毒:口腔科的多数治疗伴有创伤性出血,口腔器械消毒灭菌稍有疏忽,极易造成血源性感染,如乙型肝炎和艾滋病,医护人员的手也可成这类疾病传播的媒介。

①凡是穿破口腔软组织和骨组织的器械,如拔牙钳、骨凿、钻针、挺子、牙周括治器、根管器械可用压力蒸汽灭菌。

②口腔检查器械、填充器、托盘等应一用一消毒。

③手机消毒,按手机生产厂家提供的说明书要求,采取不同消毒或灭菌方法,例如压力蒸汽灭菌。有的制造商认为,如能合理使用,灭菌前准备和恰当使用润滑剂,手机可耐受合理的灭菌 1 500 次,其中合理清洁,除去污垢对延长手机的寿命是至关重要的,有的品牌手机可用酒精蒸汽灭菌,也有人报道可用微波灭菌方法。

④工作台面和半关键物品受病人分泌物、血液污染时应用 0.5% 过氧乙酸擦拭消毒,每天治疗活动完毕,地面可用含 500 mg/L 有效氯的消毒剂湿式打扫一次。

⑤由于口腔科治疗过程中可产生大量微生物气溶胶,如病人咳嗽,打喷嚏及手机启动时可将病人的分泌物、血液等形成气雾,因此,工作过程中,对空气进行随时消毒可减少感染的机会,可用循环风紫外线消毒器或静电吸附空气净化机。

## 8. 医院辅助科室消毒

(1) 中心供应室:供应室是全院灭菌物品供应中心,最主要方法是压力蒸汽,应配备消毒专业技术人员从事污染器械、物品的消毒清洗和灭菌。

①供应室的布局要分无菌区,清洁区和污染区,不得由污染区逆进入无菌区。

②压力蒸汽灭菌器的性能须定期检测。

③每季度对灭菌器作一次生物指示剂监测,用以检查灭菌过程合格与否。

④预真空灭菌器每天第一次灭菌应进行 B-D 试验,以检查冷空气排除是否完全。

⑤每一个物品包中心应放置一片化学指示卡,以备灭菌包使用者检查该物品是否已达到灭菌要求。

⑥灭菌物品包装材料应符合透气不透菌要求,且一用一清洗,包装外面应有灭菌日期和灭菌标志,以便使用者避免过期使用。

⑦要有灭菌物品专用保存柜,柜底应离地面 20 cm 以上,以利防潮和清洁。

⑧运送灭菌物品的工具应密闭,且不与污染物品运送工具混用。

⑨供应室环境每周应进行消毒,污染区应在每天工作完毕后进行一次消毒,用含有效氯 250 mg/L 的消毒剂湿式拖地,擦拭物品表面、鞋及卫生洁具。

(2) 洗衣房:医院的洗衣卫生是防止医院感染的一部分,来自各病区病人和工作人员的工作服,首先应按其可能污染微生物种类和程度分类,然后分别进行消毒清洁处理。

①洗衣房的布局要求分清洁区与污染区;分收集分类,消毒,洗涤,熨烫,折叠,存放。

### ② 分类消毒

a 来自一般传染病区病人或工作服均应在清洗前视污染物不同,如血液污染可用含有效氯 500 mg/L 的消毒剂或 0.2% 过氧乙酸浸泡 30 min;如污染物非受热凝固,或影响清洗者健康的,可用 85℃ 热水洗衣机加洗涤剂清洗 15 min。

b 来自鼠疫,炭疽,出血热等烈性传染病人的衣服和工作服应用压力蒸汽灭菌,然后与其他衣服一起清洗。

c. 来自普通病区的病人衣服和工作服可用洗涤剂,各自分开清洗。



d. 污染区工作人员应有个人防护,每天工作完毕注意消毒,洗澡,更衣。

e. 运送污染衣服与清洁衣服的工具必须分开。

(3) 配餐部:医院除按营养配餐外,同时应注意饮食卫生,防蝇,灭蟑,防止医院感染。

① 注意食品冷藏保鲜,清洁时可用自来水冲洗,生食蔬菜可用酸化水浸泡或冲洗 2 min。

② 病人公用餐具,必须在清洗后用煮沸或流动蒸汽消毒 20 min,或红外线消毒碗柜消毒,畏热餐具可用含 250 mg/L 有效氯的消毒剂或 0.2% 过氧乙酸浸泡 30 min,然后用清水冲去残留的消毒剂。

③ 配餐人员除体检无各种传染病外,必须注意手的卫生,不可留长指甲,操作前应用 0.2% 洗必泰或 0.5% 新洁尔灭或 0.2% 过氧乙酸洗手 1~3 min。

④ 生熟食菜板应分开,用毕可用碱性水或洗涤剂去油污,酸化水冲洗消毒。其他刀具亦可用同法处理。

#### (4) 理发室

① 毛巾应一人一用一消毒,自来水清洗干净后,煮沸 20 min,晾干。

② 各种发梳、刀具用后,可用酸化水清洗消毒,或用 0.5% 酸性或中性戊二醛复方消毒液擦拭,作用 10 min 后自来水冲去残留消毒液。

(5) 太平间:各种病人尸体停放过程中可能有排泄物,血液等污染,因此,太平间必须经常进行消毒除臭。

① 臭氧既可消毒空气又可起到除臭作用,20 mg/m<sup>3</sup> 作用 30 min,或用紫外线,按 30 W/10 m<sup>2</sup> 照射 40 min/次,每天两次。

② 太平间物品表面可用含 1 000 mg/L 有效氯消毒清洗液冲刷,作用 30 min。

③ 运送尸体的车辆可用含 500 mg/L 有效氯的消毒剂或 0.2% 过氧乙酸擦拭,作用 15 min。

④ 传染病尸体的废弃衣物应烧毁。

⑤ 太平间地面每天应用含 1 000 mg/L 有效氯的消毒剂湿擦。

#### 9. 医院卫生洁具的消毒

(1) 一般病人的便器可用自来水冲洗后倒入下水道,对传染病人的便器应用含 500 mg/L 有效氯的消毒剂浸泡 60 min 后,冲洗干净,晾干。

(2) 浴盆用 0.3% 碘伏擦拭,自来水冲洗,传染病人用过的浴盆可用含有效氯 250 mg/L 的清洗消毒剂擦拭,作用 15 min 后,清水冲净。

(3) 脸盆,清洗剂擦拭,自来水冲净,反扣利干。

(4) 拖把,可用 80℃ 热水消毒,也可用含有效氯 500 mg/L 的消毒剂,作用 30 min,清水冲洗后,晾干。

10. 医院环境消毒 这里的医院环境仅指 I~IV 类环境以外的环境,如候诊室,电梯间,走廊,楼道及门诊大厅等。

(1) 空气消毒:一般情况下应保持通风良好,冬季应定时开窗,每天两次湿式清扫地面,避免尘土飞扬污染空气。

(2) 物品表面消毒:桌椅,窗台一般情况下可用湿布抹擦,定期用 0.2% 新洁尔灭擦拭。传染病区,每天两次用含 250 mg/L 有效氯的消毒剂或 0.2% 过氧乙酸擦拭,作用 30 min。

(3) 墙壁地面消毒:墙壁一般受污染的机会较小,但在明显受排泄物或血液污染时则须用含 500 mg/L 有效氯的消毒剂或 0.5% 过氧乙酸喷雾或擦拭消毒。地面一般情况只须每天两次

湿式打扫,只有明显受传染病病原体污染时才须用含有效氯 **250 mg/L** 的消毒剂消毒,拖擦或喷洒,水泥地面 **250 ml/m<sup>2</sup>**,土质地面 **500 ml/m<sup>2</sup>**。

**11. 医疗废弃物消毒** 医院废弃物主要是医疗垃圾和生活垃圾,这些废弃物已失去再使用价值,均应进行消毒处理。

医疗垃圾包括破损诊疗器材和各种治疗过程中的废弃物均应消毒,对破损针管,针头,血标本及动物尸体,截肢,切除脏器及病理标本等应用专用焚烧炉焚烧。皮管,敷料,压舌板也可在堆放后,浇上汽油或酒精充分燃烧。

(1)一次性注射器,一次性输液(血)器及输血袋用后应浸泡于含有效氯 **1 000 mg/L** 的消毒剂中,对在使用过程中可能回血的部位,应吸入消毒液使其充分接触,作用 **2 h** 以上,然后,取出毁形。

(2)传染病病人的排泄物,呕吐物可用含氯消毒剂如漂白粉(含有效氯 **25%**)或次氯酸钠(含有效氯 **12%**)或二氯异氰尿酸钠(含有效氯 **60%**)消毒,加入量为使其最终含有效氯 **2 000 mg/l** 左右,作用 **2 h** 后倒入厕所坑内。

**12. 医院污水消毒** 综合医院普通病区的污水应与传染病区的污水分别进行处理。对于传染病区的污水必须进行加氯处理,即在厕所内投入漂白粉,按每天 **1 kg/10床** 计算加入量。医院应设立污水处理站,由专人负责对化粪池加氯,并对排放口进行余氯量监测。

污水加氯消毒方法:可用以下 **2** 种方法。

(1)液氯法:应按医院每天的污水量计算,用加氯机定时定量向化粪池内加入液氯,按每吨污水加 **1% ~ 2%** 有效氯。

(2)电解食盐产生次氯酸钠法:预先测定次氯酸钠中有效氯含量,然后按每吨污水加入有效氯 **10 g** 计算每天加氯量,随污水流入化粪池。

对缺少上述设备的医院可采用投入漂白粉法,预先将漂白粉加水,搅成糊状,然后加水搅匀取其上清,测定有效氯含量,按上述投氯量将其均匀倒入化粪池。

(袁洽劭)

#### 参考文献

- 1 William AR. APIC Guideline for selection and use of disinfectant. Am J Infect Control, 1996; 24: 313 - 342
- 2 Caria JA. APIC guideline for infection prevention and control in flexible endoscopy. Am J Infect Control, 2000; 28: 138 - 155
- 3 Mbiti JN, Springthorpe VS, Sattar SA. Bactericidal, virucidal, and mycobactericidal activities of reused alkaline glutaraldehyde in an endoscopy unit. J Clin Microbiol, 1993; 2988 - 2995
- 4 William AR, David JW. New disinfection and sterilization methods. Emerging Infect Dis, 2001; 7(2): 348 - 353
- 5 William AR, David JW. Low - temperature sterilization technologies. Steril Med Product, 1998; 8: 301 - 312

## 第十二章 传染病疫源地消毒

疫源地消毒是切断传染病传播途径的有效措施之一，在处理疫情时应依据流行病学调查结果，及时、准确、有效地采取相应的消毒措施，以便彻底控制、扑灭疫情。

### 第一节 消毒因子与方法的选择

在疫情处理中，由于引起传染病的病原体对理化因子的抗力差别很大，加之各种传染病传播途径不同，消毒时应根据流行病学调查和病原学检查结果，选择合适的消毒因子和消毒方法，以确保消毒效果及尽量减轻对消毒对象的损坏和对环境的污染。

#### 一、消毒因子选择

1. 传染性强、病原微生物抗力强的传染病，如病毒性肝炎、炭疽、肺结核等。消毒时选择湿热或过氧乙酸、含氯消毒剂、甲醛和环氧乙烷等高效消毒剂。

2. 传染性强、但病原微生物抗力较弱的传染病，如鼠疫、霍乱、痢疾、伤寒、艾滋病等，消毒时可选择中效或高效消毒剂。不宜使用来苏儿、新洁尔灭、高锰酸钾等低效消毒剂处理。

3. 无直接传染能力的传染病，如细菌性食物中毒、黄热病、登革热、各类虫媒病毒性脑炎等不需采用特殊的消毒剂消毒。

4. 未确诊、病原不明的传染病，应选用高效消毒方法处理。

#### 二、消毒方法的选择

消毒方法很多，不同消毒因子有不同的消毒方法，同一消毒因子也有不同的消毒使用方法，且可出现不同的消毒效果，使用时应根据消毒对象、现场的特点及条件加以选择。

1. 湿热消毒，如煮沸、压力蒸汽灭菌，适用于不怕湿热的物品，如棉制品、食物等的消毒。

2. 消毒剂溶液浸泡、擦拭、喷雾或气溶胶喷雾，适用于大多数物品表面及污染环境的消毒，不适用于怕湿怕腐蚀物品的消毒。

3. 熏蒸或烟雾消毒，如过氧乙酸、环氧乙烷、甲醛和酸氯烟雾剂等，适于有较好密闭性条件时的消毒。环氧乙烷消毒无腐蚀性，适用于怕湿、怕热物品，如皮毛、纸张、电器等的消毒。

4. 粉剂直接处理，如含氯消毒剂，适于分泌物、排泄物及污水等的消毒，也可用于高湿环境的喷撒消毒。

5. 焚烧处理，消毒彻底，方法简单，适用于无经济价值物品的消毒处理。

## 第二节 消毒范围与对象的确定

### 一、消毒范围

- 1.鼠疫 消毒病人所在的整个街道,或自然村,或整个营区。
- 2.霍乱 消毒病人发病前后居住、活动的场所,包括水井和池塘。
- 3.其他传染病 消毒病人可能污染的场所。

### 二、消毒对象

- 1.呼吸道传染病 重点处理痰、口鼻分泌物及其污染的物体表面和室内空气。
- 2.肠道传染病 重点处理粪便与呕吐物及其污染的物品、水和餐饮具等。
- 3.腺鼠疫 重点处理淋巴结的脓液及其污染的物品。
- 4.乙型和丙型肝炎 重点处理血液及分泌物污染的物品。
- 5.性传播疾病 艾滋病,重点处理血液及体液污染的物品;梅毒、淋病等,重点处理局部病变分泌物、脓液污染的物品。

## 第三节 各种污染对象的消毒

污染场所、污染物品的消毒处理方法及参考剂量见表 12-1,供实际使用时参考。

表 12-1 污染场所、物品消毒处理方法及参考剂量

消毒对象	消毒方法	常用浓度	消毒时间
室外污染表面	1%三合二喷洒	500 ml/m <sup>2</sup>	30 min
	三合二干粉喷撒	10~20 g/m <sup>2</sup>	1~2 h
	漂白粉喷撒	20~40 g/m <sup>2</sup>	2~4 h
室内表面	含氯消毒剂擦拭	150~300 mg/L(有效氯)	30~60 min
	新洁尔灭擦拭	0.5%	30~60 min
	过氧乙酸擦拭	0.2%~0.5%	60~90 min
	过氧乙酸熏蒸	1~3 g/m <sup>3</sup>	30 min
	0.8%过氧乙酸气溶胶喷雾	20 ml/m <sup>3</sup>	30 min
室内地面:	0.1%过氧乙酸拖地	200~300 ml/m <sup>2</sup>	60 min
	0.5%过氧乙酸喷洒		
土质地面	5%~10%二氯异氰尿酸钠喷雾	1 000 ml/m <sup>2</sup>	60~120 min
水泥地面	5%二氯异氰尿酸钠喷雾	350 ml/m <sup>2</sup>	180 min
室内空气	紫外线照射	≥1 W/m <sup>3</sup>	30~60 min
	臭氧消毒	5~10 mg/m <sup>3</sup>	30 min
	1.5~3%过氧化氢喷雾	20~30 mg/m <sup>3</sup>	20 min

续表

消毒对象	消毒方法	常用浓度	消毒时间
餐、饮具	煮沸	100℃	20 ~ 30 min
	含氯消毒剂浸泡	500 ~ 1 000 mg/L(有效氯)	30 min
	远红外照射	140 ~ 150℃	15 ~ 20 min
被褥、书籍、 电器、电话机	环氧乙烷熏蒸 过氧乙酸擦拭	700 ~ 1 500 mg/L 0.2% ~ 0.5%	16 ~ 24 h
服装、被单	煮沸	100℃	30 min
	消毒剂浸泡:		
	含氯消毒剂 过氧乙酸	250 ~ 2 000 mg/L(有效氯) 0.04% ~ 0.3%	30 min 30 ~ 120 min
游泳池水	含氯消毒剂	余氯 0.3 ~ 0.5 mg/L	
生活污水	10% ~ 20%漂白粉溶液	10 ~ 70 mg/L	30 ~ 120 min
	5% ~ 10%三合二溶液		
粪便、分泌物	漂白粉干粉	1:5	2 ~ 6 h
	5% ~ 10%三合二	2:1	2 ~ 6 h
尿	漂白粉干粉	3%	2 ~ 6 h
便器	过氧乙酸	洗净后 0.2 ~ 0.5 mg/L 浸泡	30 ~ 60 min
	含氯消毒剂	8 000 mg/L(有效氯)浸泡	30 ~ 60 min
手	2%碘酒、0.5%碘伏、0.5%洗必泰 醇溶液擦拭		3 ~ 5 min
	75%乙醇、0.1%新洁尔灭浸泡		5 min
运输工具	0.8%过氧乙酸喷雾	30 ml/m <sup>3</sup>	15 ~ 30 min

实施消毒时对炭疽、肺结核、病毒性肝炎等传染病人污染的物品和场所应使用较高的消毒剂浓度和较长的作用时间。而对鼠疫、霍乱、痢疾、副伤寒、艾滋病等传染病人污染的物品和场所，可使用较低的消毒剂浓度或较短的作用时间。有机物污染严重时，应适当提高消毒剂浓度或延长作用时间。

对污染的池塘、河水等较大水体的处理，应采用封锁的方法待其自净。可在河、池塘边树立警告牌等告诫群众，暂停使用此水，直至水体检不出病原菌。

## 第四节 疫源地消毒的基本要求

1.消毒处理应该及时，接到甲类传染病及乙类传染病中的肺炭疽和艾滋病的疫情报告后，城市应在 6 h 内，农村应在 12 h 内落实消毒措施，其他传染病按病种不同应在 24 ~ 48 h 内落实消毒措施。

2.确保消毒效果，选择合格的消毒器械及消毒剂对污染范围内的重点对象进行消毒处理，必要时应做消毒效果测定。对于未查明原因的传染病疫源地，应根据流行病学指征，采用高效的消毒方法处理。

3.消毒与杀虫相结合，如对肠道传染病疫点，应同时开展灭蝇和灭蟑螂。鼠疫疫点应同时开展灭鼠和防蚤灭蚤。炭疽、钩端螺旋体病疫点应同时开展灭鼠。流行性出血热疫点应同时开展灭鼠和防螨灭螨。斑疹伤寒疫点应同时灭蚤、灭虱。

4.消毒人员应做好个人防护，消毒时应穿戴好防护服、口罩、胶靴，且不得吸烟及进食。

（姚楚水）

#### 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部.《消毒技术规范》.第一版.第三分册.疫源地消毒技术规范,1999
- 2 GBJ.2564-96 军队疫情处理技术规范.1996

# 第十三章 饮水消毒

## 第一节 概述

饮水消毒的定义是要杀灭或去除水中的肠道致病微生物，其目的是防止饮用者发生肠道传染病。据不完全统计，引起人类发病的传染病约有 148 种，其中 15 种是经水传播的。水中的致病微生物的种类有致病性细菌、病毒和原虫等。

### 一、水中的致病微生物

#### (一) 细菌类

痢疾杆菌:它引起痢疾,死亡率低,流行分布于全球,对氯消毒剂的抗力比大肠杆菌差。

霍乱弧菌:它引起霍乱,在 2 h 内死亡率达 10% ~ 80%。El - Tor 型弧菌引起副霍乱,流行分布于印度,东南亚。1 mg/L 氯 15 min 可以杀死。

伤寒杆菌:它引起伤寒病,死亡率达 1%。流行分布广,对氯的抗力比大肠杆菌差。

副伤寒杆菌:它引起副伤寒病,死亡率低,流行分布全球,对氯的抗力比大肠杆菌差。

致病性大肠菌:它引起急性腹泻,死亡率低,流行分布全球。

土拉巴斯德氏菌:它引起兔热病,死亡率 5%,流行分布于亚洲、非洲和欧洲。

结核杆菌:它引起结核病,对氯的抗力强。

布鲁氏菌:它引起布氏杆菌病。

钩端螺旋体:它引起钩端螺旋体病,由于接触疫水而引起感染。

军团菌:可引起肺炎,在冷却水中能大量增殖,可分离到军团杆菌  $10^5$  个/ml,连续加氯 1.0~1.5 mg/L,可以消除冷却水中军团菌的感染。

空肠弯曲杆菌:它也是肠道病原菌,对氯的抗力与大肠杆菌相似。

小肠结肠炎耶氏菌:它可以引起急性胃炎,肠炎,末端回肠炎。经氯化处理的地面水中还有 6% ~ 8% 耶氏菌阳性。

#### (二) 病毒类

甲型肝炎病毒:经水传播是甲型肝炎主要传播方式之一,经水流行死亡率为 0.2%,流行分布广。对氯的抗力比大肠杆菌强。据报道水中自由氯 2.0~2.5 mg/L 才能把甲型肝炎病毒灭活。

戊型肝炎病毒:它是另一种经水传播的肝炎病毒。

脊髓灰质炎病毒:它引起小儿麻痹和脑炎,对氯的抗力比甲型肝炎病毒强。

轮状病毒:它能引起成人和小孩胃肠炎,对氯的抗力比甲型肝炎病毒强。

埃柯病毒:它能引起脑炎、呼吸道感染、夏季发热性疾病、腹泻和夏季疹。

柯萨奇病毒:它可引起脑炎、呼吸道感染、胃肠炎、心肌炎、流行性肌痛和先天性心脏异常。

呼肠病毒:它与婴儿胃肠炎有关。

肠胃炎病毒：它能引起流行性呕吐及腹泻。

新肠道病毒：它引起脑炎、急性出血性脑膜炎、呼吸道感染、夏季发热性疾病。

诺瓦克病毒：它引起呕吐、腹泻、恶心、腹部痉挛、头痛、低热、缺氧、不适和肌痛等。目前缺乏培养方法，不能进行消毒实验。

腺病毒：它引起呼吸道感染、急性结膜炎，可经水传播。

### (三)原虫和蠕虫类

溶组织阿米巴：它引起阿米巴痢疾。分布于全球，全世界患者约 3 亿人，阿米巴对氯的抵抗力强，余氯 2 mg/L 不能杀死阿米巴包囊。

贾第氏虫：它能引起腹部疼痛、腹泻和腹部痉挛不适等症状。加氯 5 mg/L 60 min, 8 mg/L 10~30 min 才能灭活水中的贾第氏虫。

隐孢子虫：它能引起人畜共患腹泻病，水常规氯化消毒不能灭活水中隐孢子虫卵囊。

血吸虫：接触疫水时通过皮肤感染。

绦虫：引起绦虫囊虫病，分布广。

细粒棘球绦虫：引起棘球虫病，分布广。

麦地拉丝虫：引起麦地拉丝虫病。

## 二、饮水消毒卫生安全标准

评价饮水消毒是否达到卫生安全标准的指标为大肠菌群、细菌总数和游离余氯。1984 年我国正式颁布的《生活饮用水卫生标准》(GB 5749-85)规定：细菌总数： $< 100$  个/ml；总大肠菌群： $< 3$  个/L；游离余氯：在接触 30 min 后应不低于 0.3 mg/L，集中式给水，除出厂应符合上述要求外，管网末梢水不低于 0.05 mg/L。

2001 年我国卫生部正式批准的《生活饮用水卫生标准规范》规定：细菌总数  $< 100$  (cfu/ml)；总大肠菌群：每 100 ml 水样中不得检出；粪大肠菌群：每 100 ml 水样中不得检出；游离余氯：在接触 30 min 后应不低于 0.3 mg/L，集中式给水，除出厂应符合上述要求外，管网末梢水不低于 0.05 mg/L (适用于加氯消毒)。

我国广大农村饮用水大部分是分散供给，与城市供水方式和设备条件大为不同，另对农村提出“农村饮用水水质指标建议值”。农村饮用水卫生的细菌指标有：细菌总数： $< 100$  个/ml；大肠菌群： $< 3$  个/L。

军队在野战条件下，应执行《军队战时饮用水卫生标准》(GJB651-89)。军队战时饮用水卫生细菌学指标分为两种

一种为 7 d 以内限量值：细菌总数  $< 100$  个/ml；大肠菌群： $< 1$  个/100 ml；游离余氯：接触时间 30 min 不得低于 1.5 mg/L；生物战剂污染情况下，接触 30 min 不低于 5.0 mg/L。

另一种为 90 d 以内限量值：细菌总数： $< 100$  个/ml；大肠菌群： $< 1$  个/100ml；游离余氯：接触时间 30 min 不得低于 1.0 mg/L；特殊情况下，接触 30 min 不低于 2.0 mg/L。

## 三、饮水消毒方法

饮水消毒的方法很多，一般可分为物理消毒法和化学消毒法两大类。物理消毒法包括煮沸消毒、紫外线消毒、超滤消毒、超声波消毒、电离辐射和微波消毒等方法。一般情况下，大都采用煮沸消毒方法，但不适用于集中式供水和机动条件下的饮水消毒。集中式供水都采用化



学消毒的方法。下面主要介绍化学消毒剂消毒饮用水方面的问题。

## 第二节 饮水消毒剂

对饮水消毒剂有特殊的要求，一种理想的饮水消毒剂应无毒、无刺激性，能迅速溶解于水并能快速释放出杀菌有效成分，对各种天然水中所有类型的肠道致病微生物都有较强的杀灭效果，不与水中含有的无机物和有机物起化学反应或破坏其杀菌作用或产生有毒的化合物，能耐储存，便于运输，操作使用简单方便，价格便宜，能普及使用等。

现在能满足上述要求的饮水消毒剂几乎没有。近百余年来，国内外普遍使用的饮水消毒剂仍为卤素，尤以氯为主，因为氯消毒剂基本符合上述的要求。其他消毒剂有的因毒性大，有的不溶于水，有的虽然有很好的抑菌作用，但杀菌作用差，不适宜作为饮水消毒用。现将常用的饮水消毒剂介绍如下。

### 一、氯消毒剂

19 世纪末开始，氯被用来消毒饮水，一百多年来的实践使氯化消毒饮用水已达到了自动化程度。由于上世纪 70 年代，发现氯可与水中某些碳氢化合物反应产生致癌物质，人们对氯消毒饮水产生了怀疑和争论。由于未找到更好的能取代氯的饮水消毒剂，所以世界各国消毒饮用水采用氯的仍占多数。

#### (一) 氯消毒剂的种类

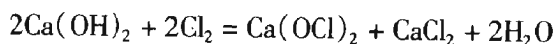
1. 液氯( $\text{Cl}_2$ ) 元素氯是黄色气体，经压缩成琥珀色液体，工业上(包括水消毒)的液氯压缩在钢瓶中储存和运输。液氯比水重 1.5 倍，气体氯比空气重 2.5 倍。液氯的比重 1.41 (48°F)，沸点  $-34.5^\circ\text{C}$ ，冰点  $-100.98^\circ\text{C}$ ，常压下氯的液化温度为  $-34.5^\circ\text{C}$ 。

液氯在水消毒中应用得最多，每年全世界生产的液氯有 3% 用于卫生事业上，主要用于饮水消毒。

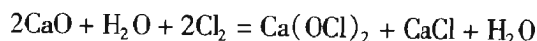
液氯可以与很多种物质起反应。无水分的液氯不侵蚀铁金属，因此液氯可压缩在钢瓶中存放。然而绝对干燥的液氯是没有的，因此盛放液氯钢瓶的壁特别厚，以防腐蚀。液氯能破坏聚氯乙烯塑料和橡胶。液氯在常温下能很快地气化成氯气。含水的氯气对铁、铜和铁合金有腐蚀性，但不腐蚀金、铂和钽。银被广泛地用于存在潮湿氯气的环境中，因为银与潮湿的氯气接触使生成惰性的氯化银。

氯气可以与石灰、某些碱和纯碱起反应，1 kg 氯气与它们反应的用量为：

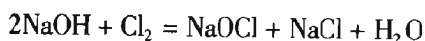
1.4 kg 工业熟石灰(含 95%  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ )：



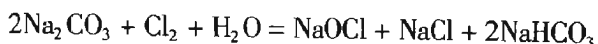
0.83 kg 工业石灰(含 95%  $\text{CaO}$ )：



1.13 kg 苛性钠：



2.99 kg 纯碱：



氯能溶于水。氯在水中的溶解度与温度的关系见图 13-1。

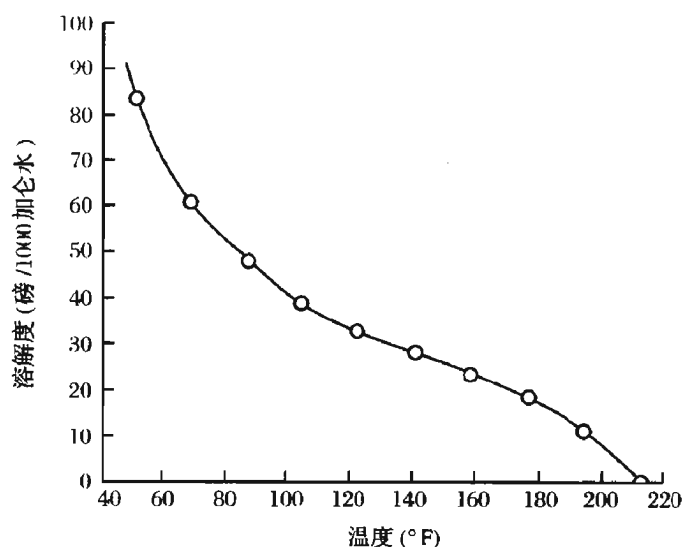


图 13-1 氯在水中的溶解度与温度的关系

氯的水溶液有很强的腐蚀性。低浓度的氯气对黏膜和呼吸系统有刺激。液氯对皮肤有强烈的刺激作用,能引起严重的烧伤,因此使用液氯时,必须十分小心,操作人员要有相应的防护措施,例如备有防毒面具等。

2. 漂白粉 ( $\text{Ca}(\text{OCl})\text{Cl}$ ) 即氯化石灰,或次氯酸钙粗制品,它是带有氯味的白色粉末,含有有效氯 28% ~ 32%,性能不稳定,储存中容易损失。宜储存于塑料袋或有色玻璃瓶中,严密封口,存放在阴凉、避光、通风、干燥的地方。由于保存条件不同,漂白粉中有效氯每日损失量 0.5% ~ 3.0%,对大量存放的漂白粉应定期加以检查,防止受热、受潮分解和引起爆炸。使用时应测定有效氯含量。

3. 漂白粉精 ( $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ ) 即为纯化的次氯酸钙,有粉剂和片剂。有效氯含量在 56% 以上,最高可达 70%,性能较稳定,耐储存。

4. 三合二 三份次氯酸钙和二份氢氧化钙组成,有效氯含量达 70%,较漂白粉易溶解于水,性能较稳定。

5. 次氯酸钠 ( $\text{NaOCl}$ ) 将氯气通入氢氧化钠水溶液中制成,纯次氯酸钠呈透明液体,工业品略带浅黄绿色,含有效氯 10% 左右。用电解法可以制造,将电流通过氯化钠溶液,在一定电压下开始电解,在阳极析出氯气,与氢氧化钠作用而生成次氯酸钠。

次氯酸钠溶液性质不稳定,宜保存在 pH 12 以上的碱性溶液中。例如次氯酸钠溶液中加入碳酸钠便成氨替福明 (antiformin)。

6. 氯氨 T 又名氯亚明,分子式为  $\text{CH}_3\text{C}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NNaCl}$ 。是一种有机氯制剂,为白色或淡黄色结晶,性能稳定,含有氯约 35%。

7. 清水龙 又名哈拉宗 (halazone),分子式为  $\text{COOHC}_6\text{H}_4\text{SO}_2\text{NCl}_2$ ,清水龙为白色粉末,性能稳定,含有效氯可达 48% ~ 52%。

8.二氯异氰尿酸钠 分子式为 $(\text{CN})_3\text{O}_3\text{NaCl}_2$ 属有机氯制剂,含有效氯 64%,溶解性好。

9.三氯异氰尿酸 分子式为 $(\text{CN})_3\text{O}_3\text{Cl}_3$ ,含有效氯达 90%,性能稳定,在水中溶解度比二氯异氰尿酸钠小。

10.琥珀酰氯亚胺 分子式为 $(\text{CH}_2\text{CO})_2\text{NCC}$ ,为有机氯制剂,含有效氯 50% ~ 54%。

11.二氯二甲基乙内酰胺 分子式为 $(\text{CH}_3)_2\text{C}_3\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}_2$ ,为有机氯制剂,含有效氯 66%,可溶于水。

12.恶唑烷酮  $(\text{CH}_3)_2\text{C}_3\text{NOCIO}$ ,常用的有一氯二甲基恶唑烷酮,为有机氯制剂,有效氯含量约 15%,溶解度 1%,性能稳定,耐储存,是一种氯胺类新产品。

## (二)氯消毒剂的化学性能

1.氯的水解 氯气或氯制剂溶于水中很快地水解成次氯酸 $(\text{HOCl})$ 。氯气在水中的反应式为: $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{H}^+ + \text{Cl}^- + \text{HOCl}$

氯水解速度特别快,甚至在 $1^\circ\text{C}$ 时,1 s 内就可完成水解。

在不同温度下,有不同的水解常数  $\text{Kh} = \frac{(\text{H}^+)(\text{Cl}^-)(\text{HOCl})}{(\text{Cl}_2)}$ 。

温度( $^\circ\text{C}$ )	氯水解常数( $\text{Kh}\cdot\text{mol/L}$ )
0	$1.45 \times 10^{-4}$
15	$2.81 \times 10^{-4}$
25	$3.94 \times 10^{-4}$
35	$5.10 \times 10^{-4}$
45	$6.05 \times 10^{-4}$

2.氯的离解 次氯酸在水中可以离解: $\text{HOCl} \rightarrow \text{H}^+ + \text{OCl}^-$ ,离解速度随水温和 pH 值而变化。在不同水温中测得次氯酸的离解常数  $\text{Ki} = \frac{(\text{H}^+)(\text{OCl}^-)}{(\text{HOCl})}$

温度( $^\circ\text{C}$ )	氯水解常数( $\text{Ki}, \text{mol/L}$ )
0	$2.0 \times 10^{-8}$
5	$2.3 \times 10^{-8}$
10	$2.6 \times 10^{-8}$
15	$3.0 \times 10^{-8}$
20	$3.3 \times 10^{-8}$
25	$3.7 \times 10^{-8}$

根据不同水温下的离解常数  $\text{Ki}$  值,可以计算不同 pH 值下不离解的  $\text{HOCl}$  百分数。

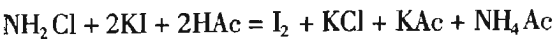
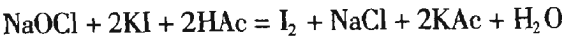
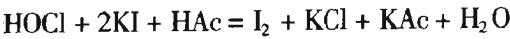
例如:求  $20^\circ\text{C}$  pH8 时,  $\text{HOCl}\%$  ( $20^\circ\text{C}$   $\text{Ki} = 3.3 \times 10^{-8}$ )

$$\text{因为:} \frac{(\text{HOCl})}{(\text{HOCl}) + (\text{OCl}^-)} = \frac{1}{1 + \frac{\text{OCl}^-}{\text{HOCl}}} = \frac{1}{1 + \frac{\text{Ki}}{\text{H}^+}}$$

$$\text{所以:} \text{HOCl}\% = 100 \times \frac{1}{1 + \frac{3.3 \times 10^{-8}}{10^{-8}}} = \frac{100}{4.3} = 23.6\%$$

3.有效氯 氯制剂中的有效氯 (available chlorine)不是指氯的实际含量,而是指它的氧化

还原反应中的当量值，它是作为比较氯制剂杀菌能力的指标。例如  $\text{HOCl}$ ,  $\text{NaOCl}$  和  $\text{NH}_2\text{Cl}$ , 如用碘量法测定其中的有效氯时,需要 2 个  $\text{I}^-$  才相当它们中的 1 个活性氯。



有效氯含量的计算以纯的  $\text{NaOCl}$  为例，它的分子量是 74.5, 氯在其中的含量为  $35.5 \div 74.5 = 47.7\%$ , 有效氯含量为  $2 \times 47.7\% = 95.4\%$

几种氯消毒剂的有效氯含量列于表 13-1。

表 13-1 几种氯消毒剂有效氯含量

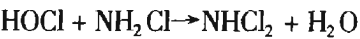
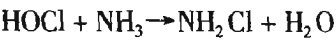
消毒剂	分子量	实际氯含量(%)	有效氯含量(%)
$\text{Cl}_2$	71.0	100.0	100.0
$\text{HOCl}$	52.5	67.7	135.4
$\text{NaOCl}$	74.5	47.7	95.4
$\text{Ca}(\text{OCl})_2$	143.0	49.6	99.2
$\text{NH}_2\text{Cl}$	51.5	69.0	138.0
$\text{NHCl}_2$	86.0	82.5	165.0

4. 自由氯 自由氯(free available chorine), 亦称游离氯, 它是指水氯化消毒中的次氯酸分子( $\text{HOCl}$ )和次氯酸离子( $\text{OCl}^-$ ) 总浓度。它是与结合氯相区别的有效氯。

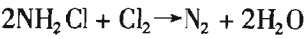
5. 结合氯 活性氯能与水中的氮化物起化学反应生成结合氯(combine chlorine)。结合氯包括一氯氨( $\text{NH}_2\text{Cl}$ )、二氯氨( $\text{NHCl}_2$ )、三氯化氮( $\text{NCl}_3$ ) 以及有机氯胺等。三氯化氮是一种气味很强的气体, 容易分解。一氯氨和二氯氨比较稳定, 气味较少。

6 折点反应 折点反应是指氯与水中的氨氮起反应过程中, 同样氨氮时, 分别逐渐增加氯量, 经一定的接触时间, 测定水样中的余氯总量, 然后将氯量对余氯在坐标纸上作图, 可得到一根起伏型的曲线, 这根曲线叫折点曲线(图 13-2)。如图 13-2 中 B 点, 当加氯量被消耗到最大的一点称为氯化中的折点(breakpoint)。氯和氨氮这种反应称为氯化中的折点反应。

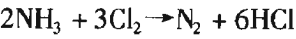
在氯与氨氮反应中, 当加氯量与水中氨氮的重量比小于 5:1 时, 如果没有其他耗氯物质的影响, 则加入水中的氯以一氯氨和二氯氨的形成出现。



当加氯量与水中氨氮的重量比大于 5:1 时, 部分氯氨将会出现如下反应:



致使加氯量的增加而在水中的余氯量逐渐减少, 当比值增加到 7.6:1 时, 氯与氨按下式反应:



在这点上加氯量消耗最大, 这就是上述的氯化中的折点, 在折点以前阶段所存在的余氯大都为结合氯, 在折点阶段后的余氯为自由氯。

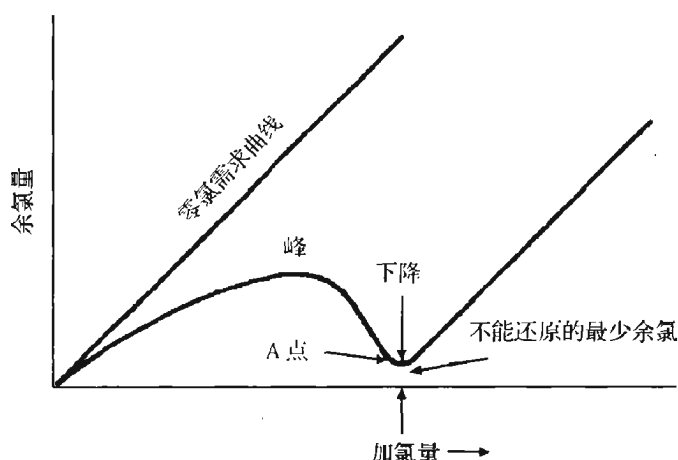


图 13-2 典型的折点曲线图

7. 氯酚 如果水中含有微量酚类，氯与酚类起反应生成氯酚。氯酚有臭味，氯酚在水环境中存在时，水中的鱼烹调后有令人厌恶的煤油味。

### (三) 氯对水的消毒效果

氯消毒剂的消毒效果随它的化学性能、存在状态和水质情况不同而差别较大。一般来说，自由氯的消毒效果比结合氯好，在酸性条件下比碱性条件下的消毒作用强。

1. 杀灭水中细菌繁殖体 在蒸馏水中氯杀灭肠道致病菌繁殖体的自由氯量需要  $0.1 \text{ mg/L}$ ，接触  $15 \sim 30 \text{ s}$ 。在同样时间内，杀灭大肠杆菌和产气杆菌需要自由氯  $0.15 \sim 0.25 \text{ mg/L}$ 。在不耗氯的水中，自由氯  $0.06 \text{ mg/L}$  以上，在室温下，接触  $3 \text{ min}$ ，可以把水中肠道病菌杀灭。结合氯杀灭水中肠道致病菌则需要  $1.2 \text{ mg/L}$ ，接触  $20 \text{ min}$ ，结合氯杀菌作用比自由氯差，如果要全部杀灭水中肠道细菌，当时间相同时，结合氯用量要比自由氯用量多 25 倍，当剂量相同时，结合氯所需的杀菌时间为自由氯的 100 倍。

2. 杀灭水中病毒 肠道病毒对氯消毒剂的抗力一般比肠道细菌强。污染有甲型肝炎病毒的净化水，余氯  $1.08 \text{ mg/L}$ ，接触  $30 \text{ min}$ ，不能消除肝炎病毒对人的感染性。自由氯  $2.0 \sim 2.5 \text{ mg/L}$ ， $30 \text{ min}$ ，能消除甲型肝炎病毒对绒猴的感染性。根据消毒试验证明，除腺病毒 3 型和呼肠病毒对氯的抵抗力比细菌低以外，大多数病毒对氯的耐力比细菌大 10 倍左右。

结合氯杀灭病毒的效果比自由氯差。用结合氯杀灭脊髓灰质炎病毒 I 型， $\text{pH } 7, 25^\circ\text{C}$ ，需要  $9 \text{ mg/L}$ ，接触时间  $30 \text{ min}$ ， $6 \text{ mg/L}$  需要时间  $1 \text{ h}$ ， $0.5 \text{ mg/L}$  需要  $7 \text{ h}$ 。

3. 杀灭水中细菌芽孢 自由氯对细菌芽孢的致死剂量比一般细菌繁殖体的高  $10 \sim 1000$  倍。杀灭细菌繁殖体，只要自由氯  $0.15 \sim 0.25 \text{ mg/L}$ ，接触  $15 \sim 30 \text{ s}$ ，杀灭厌氧性芽孢菌需要自由氯  $1.0 \sim 4.0 \text{ mg/L}$ ，对嗜气性芽孢菌，在相同时间内则要  $18 \sim 280 \text{ mg/L}$ 。

4. 杀灭水中阿米巴包囊 在常温下 ( $23^\circ\text{C}$ )， $\text{pH}$  值  $7 \sim 8$ ， $30 \text{ min}$ ，杀灭阿米巴包囊最低氯量应有  $1.2 \sim 4.2 \text{ mg/L}$ 。结合氯比游离氯杀灭细菌和病毒效果差，杀灭阿米巴包囊和芽孢的效果更差 (表 13-2)。

表 13-2 杀灭水中 99% 以上微生物的氯浓度

消毒剂	杀灭微生物的最低活性氯浓度(mg/L)			
	肠道细菌	肠道病毒	阿米巴包囊	芽孢
HOCl	0.02	0.002 ~ 0.4	10	10
OCl	2.00	20	10 <sup>3</sup>	> 10 <sup>3</sup>
NH <sub>2</sub> Cl <sup>-</sup>	5.00	10 <sup>2</sup>	20	4 × 10 <sup>2</sup>
OCl <sup>-</sup> (pH7.0)	0.04	0.8	20	20
OCl <sup>-</sup> (pH8.0)	0.10	20.2	50	50

注:水温 5℃,接触 10 min

#### (四)氯消毒的致癌问题

氯化饮水产生的副产物已超过 300 种,它们对人体的危害已引起人们的重视。氯化产生的副产物主要是三卤甲烷(THM),水中含量高达 311 μg/L。天然水中的腐殖质是氯化中形成 THM 的主要前驱物。氯化天然水除产生三氯甲烷以外,还可生成二氯溴甲烷、一氯二溴甲烷、三氯酚和二氯乙腈等。这些化合物是致癌或致突变物。当水中含有溴化物时,氯化产生氯溴甲烷,其毒性比三氯甲烷更强。氯化有机物有两类,一类是挥发性的氯化有机物如氯仿和三氯甲烷;另一类是不挥发性的氯化有机物。氯和酚反应形成氯酚使水味不好,其中形成的 2,4,6-三氯酚有致癌性,2-氯酚可使鼠胎中毒死亡。

1.氯化副产物的危害 美国癌研究所试验证明,三氯甲烷和四氯化碳能引起大、小鼠发生肝癌和胃癌。为此美国环保局规定,饮水中含量总 THM 不能超过 100 μg/L。

水中 THM 对人体的危害尚未完全弄清楚,它的危害程度正在研究讨论中。例如三氯甲烷使小鼠和大鼠致癌剂量为 477 mg/kg 和 180 mg/kg,以此剂量推算到人(按 60 kg),则人的致癌剂量应为每人每天应摄入三氯甲烷 11 ~ 29 g。由此可见,饮水中含有的 THM 等虽有致癌性,但含量极少,不足以引起癌症。但是,饮水中含有 THM 不论多少,它是一类有害物质,卫生学家仍主张将其除掉。

2.氯化副产物的去除 去除饮水中 THM 等氯化有机物主要途径包括寻找取代氯消毒剂和改进水处理方法等。

在取代氯消毒剂研究方面,认为臭氧、二氧化氯和氯氨消毒可以减少水中的 THM。但是臭氧与水中有机物生成的另一些副产物也有致癌性和致畸性。二氧化氯消毒饮水,它本身一部分变为亚氯酸盐(ClO<sub>2</sub><sup>-</sup>)。在动物试验中发现亚氯酸盐能损伤红细胞,引起溶血性贫血,因此,对二氧化氯消毒饮水的使用剂量要有一定的限制。而氯氨对病毒的消毒效果差。因此至今还没有找到能取代氯的饮水消毒剂。

消除饮水中 THM 的根本措施是改善原水水质,将水中可能形成三卤甲烷的前驱物质(THMFP)去除掉,实际上是去除原水中可溶性色度和总有机碳,常用的方法有:

(1)混凝沉淀法:此法可以去除水中 THMFP 如腐殖酸 90% 和褐酸 60%。因此,先混凝沉淀后氯化,可以降低水中总 THM 85%。如果先氯化,已经形成 THM 后,再混凝沉淀和过滤,则去除率很小。

(2)过锰酸钾预处理法:在原水中加少量过锰酸钾,将水中部分 TOC 分解,从而使后氯化处理中降低总 THM 50% 以上。

(3)颗粒活性炭过滤法：颗粒活性炭（GAC）和生物活性炭（BAC）过滤，不仅能降低水中THM，而且还可以降低氯消毒需要量，这是目前各国应用最多的方法。

## 二、碘消毒剂

碘消毒剂在消毒中的应用比较广泛。在氯、碘和溴三种卤素消毒剂中，碘在饮水消毒上的应用仅次于氯。

### （一）碘消毒剂的种类

1.元素碘 碘不易溶于水，在 25℃时溶解度为 0.33%。碘可用于小规模自来水的消毒，方法是将碘装于储罐中，使水通过储罐，碘溶于水中。碘可在酒精、甘油和碘化钾水溶液中提高其溶解度。碘酒也可以用来消毒饮水。

2.有机碘 有些有机碘化物的水溶性好，储存稳定，不像元素碘能升华，可以用来消毒饮水。用来消毒饮水的有机碘化合物有：

氢多碘化四乙氨酸  $(\text{NH}_2\text{CHCOOH})_4\text{HI}_{1.25}\text{I}_2$

氢三碘化二乙氨酸  $(\text{NH}_2\text{CHCOOH})_2\text{HI}_3$

二氢五碘化四乙氨酸  $(\text{NH}_2\text{CH}_2\text{COOH})_4(\text{HI})_2\text{I}_5$

三碘化二硝酸六脲铝  $\text{Al}(\text{CONH}_2\text{NH}_2)_6(\text{NO}_3)_2\text{I}_3$

三碘化硫酸六脲铝  $\text{Al}(\text{CONH}_2\text{NH}_2)_6\text{SO}_4\text{I}_3$

上述有机碘含活性碘 25% ~ 40%。

3.碘伏（iodophor）为一种含碘的表面活性剂。元素碘不易溶于水，表面活性剂在水中能把碘分散成胶粒，增加了溶解度，因此以表面活性剂作为碘的助溶剂和载体。碘伏是一种不定型的结合碘，并不是一种碘化物。由于碘伏中含的表面活性剂不同，可以分为非离子表面活性物碘、阳离子表面活性物碘和阴离子表面活性物碘。

非离子表面活性物碘：

聚乙烯吡咯烷酮碘（povidine - iodine, PVPI）

聚乙氧基乙醇碘（简称 wescodyne）

聚烷基乙醇碘（简称 weladial）

阳离子表面活性物碘：

碘与阳离子表面活性剂结合物。商品名 virac。

阴离子表面活性物碘：

烷基磺胺酸盐聚合碘（简称 idonate）

碘伏的特点是水溶性好，杀菌力强，刺激性小，稳定性好，但成本较贵。

4. 碘离子交换树脂 将碘载在非溶性的强碱性阴离子树脂上，可形成一种性能稳定、消毒效果好的三碘化季胺盐树脂消毒剂，它属于一种接触消毒剂，可作为过滤消毒水用。

### （二）碘消毒剂的化学性能

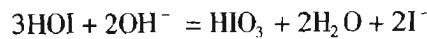
1.碘的水解 碘在水中可以水解，但是水解量少。水解常数  $K_h = \frac{(\text{HOI})[\text{H}^+][\text{I}^-]}{[\text{I}_2]}$ ，在 25℃时为  $3 \times 10^{-13}$ 。

2.碘的离解 碘水解生成 HOI，在 pH 值 9 以上才离解，离解量很少。离解常数  $K_i =$

$\frac{(H^+)(OH^-)}{(HOI)}$ , 在 25℃ 时为  $4.5 \times 10^{-13}$ 。

碘与氯不同, 碘在高 pH 值下也离解很少。

3. HOI 的分解 在 pH8 以上, HOI 不稳定, 可分解成碘酸和碘化物:



4. 三碘化物离子 碘溶液中加入碘化物, 碘就可形成三碘化物离子 ( $I_3^-$ )。

离解常数  $K_i (K_i = \frac{(I_2)(I^-)}{(I_3^-)})$  在 25℃ 为  $1.4 \times 10^{-3}$ , 0℃ 为  $0.7 \times 10^{-3}$ 。

碘与氨不起化学反应生成碘氨, 无折点反应。

#### (三) 碘的消毒效果

碘消毒作用受温度的影响比氯少, 而且碘不与水中的氨化物起反应生成碘氨。它的消毒作用不受氨化物的影响, 所以它在饮水消毒上的应用比较受人们重视。碘主要用于个人或小型给水系统的饮水消毒。1903 年就有人用 KI 和  $NaIO_3$  加入酸性物质压成饮水消毒片。这种片剂投入水中可释放出游离碘来杀菌, 经过 10 min 后再加入一片亚硫酸钠将碘味去除。在紧急情况下用碘酒消毒饮水, 每升水加入 2% 碘酒 2 滴(含活性碘约 4 mg), 15 min 后即可饮用。

1. 杀灭水中细菌繁殖体 在有利条件下, 接触 1 min, 杀灭肠道细菌最低碘量为 0.6 mg/L, 在水温低、pH 值高的不利条件下, 需要提高碘的用量到 4.3 mg/L 才有同样的效果。在实际应用时, 5 L 饮水中加入 1 ml 碘酒(含碘 2%)即可达到消毒要求。

2. 杀灭水中病毒 水温 25℃ 时, 杀灭柯萨奇 B<sub>2</sub> 型病毒 99.999% 的条件是: 2 mg/L 需 30 min; 5 mg/L 需要 12.5 min; 10 mg/L 则需要 6.4 min。HOI 杀灭病毒的效果约为元素碘的一半。

3. 杀灭水中阿米巴包囊 比杀灭病毒的效果好。HOI 杀灭阿米巴包囊的效果约为元素碘的 1/3(6℃, 或 1/2(25℃),  $I_3^-$  的效果最差。

### 三、溴消毒剂

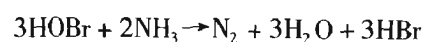
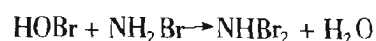
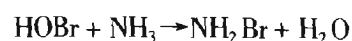
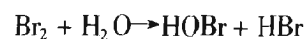
1935 年溴就开始被用于饮水消毒, 1936 年用于游泳池水消毒。现在溴主要用于游泳池水消毒。溴对鱼类的毒性比氯小, 有人主张用溴来消毒废水。

#### (一) 溴消毒剂的化学性能

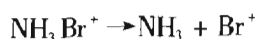
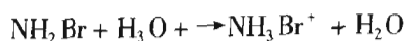
溴消毒剂在水中的化学性状与氯基本相似。但是在不同 pH 值下, 它的离解比碘大, 比氯小。pH 值在 6~8 时, 水中的溴几乎都是以 HOBr 形式存在。溴与水中氨反应生成溴氨, 则氨遭受破坏而形成  $NBr_3$  或  $N_2$ 。

溴与氨反应生成溴氨。在接近中性 pH 值的水中,  $NH_2Br$  生成  $NH_3Br^+$ 。带正电荷的  $NH_3Br^+$  容易与负电荷的细菌结合, 所以溴氨的杀菌作用比氯氨强。

溴的水解以及与氨的反应如下:







## (二) 溴的消毒效果

1. 杀灭水中细菌繁殖体 溴杀灭细菌繁殖体的剂量与碘相当，但比氯大。溴杀灭大肠杆菌和粪链球菌的最低剂量为 1.0~2.0 mg/L，次氯酸钠为 0.6 mg/L，碘为 2.0 mg/L

2. 杀灭水中病毒 溴杀灭肠道病毒的效果与氯、碘基本一致。在水温 22℃，pH 值 7.0~7.7 条件下，溴杀灭病毒的最低剂量为 0.2~0.5 mg/L。

3. 杀灭水中芽孢 溴杀灭产气芽孢菌的用量，pH 值 3.5~4.0 时需要 40~220 mg/L；pH 值 6.8~7.2 时需要 170~450 mg/L。水中荧光假单胞菌 (*Ps. fluorescens*) 的繁殖体对溴的敏感性要比芽孢大 500 倍。

4. 杀灭水中的阿米巴包囊 需要 14 mg/L，余溴 3.6 mg/L，接触时间 10 min。

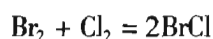
## 四、卤间化合物

卤间化合物 (interhalogens) 是两种不同卤素反应生成的化合物。卤间化合物的化学性质与卤素本身相似。卤间化合物易溶于水，水解后带正电荷的卤素变为 HOBr 或 HOI，它们的杀菌作用较好，可用来消毒饮用水的卤间化合物有：

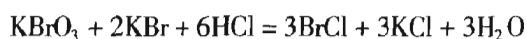
### (一) 氯化溴 (BrCl)

氯化溴在 5℃ 以下是一种暗红色易挥发的液体。液态氯化溴易气化。它与溴一样，能快速地损伤皮肤和其他组织，产生刺激和灼伤。氯化溴易溶于水，饮水消毒使用氯化溴水溶液比较方便。

在实验室中制备氯化溴的方法是溴液中通入等量的氯气，直至溶液重量加 44.3% 为止，即可获得氯化溴。由于氯化溴易溶于水，制备氯化溴时，将溴液置于水中，在冰浴里，通入氯气待溴液全部溶解，便得到氯化溴溶液。反应式为：



另外，在实验室可用盐酸溶液和溴盐来制备氯化溴水溶液。反应式为：



氯化溴在极性溶剂中比溴的溶解度大，在水中的溶解度为 8.5 g/100 ml (20℃)，它是溴溶解度的 2.5 倍，氯的 11 倍，臭氧的 3 600 倍。在水中加入氯化物氯化溴形成复合溴酸根离子 ( $\text{BrCl}_2^-$ )，使它的溶解度增高。在 pH 值 6.5~7.5 时氯化溴与氯反应生成  $\text{BrCl}_5$  ( $\text{BrCl} + 2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{BrCl}_5$ )，在较低温度下氯化溴形成一种黄色结晶水合物  $\text{BrCl} \cdot 34\text{H}_2\text{O}$ ，熔点 -18℃

氯化溴水解变成次溴酸 ( $\text{BrCl} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOBr} + \text{HCl}$ )，在 0℃ 时，氯化溴水解常数  $K_h = 2.94 \times 10^{-5}$ ，比溴的水解常数  $K_h = 0.7 \times 10^{-9}$  大 42 000 倍。在 pH 8, 0℃ 时水中氯化溴有 90% 转化为活性的次氯酸，在同样条件下，氯只产生 19% 的次氯酸。

氯化溴与水中氨反应，生成物主要形式是一溴氨 ( $\text{NH}_2\text{Br}$ ) 和二溴氨 ( $\text{NHBr}_2$ )。溴氨没有氯氨那样稳定。在二级处理污水中，余留溴氨的半衰期为 10 min，在不耗卤素的水中约 60 min。

氯化溴的化学活性很强，它与有机物质 (如芳香烃) 的反应速度要比溴的反应速度平均快 100 倍。在 25℃ 氯化溴与苯乙醚的反应速度是氯的 4.31 倍，与甲酚反应的速度是氯的 386 倍。

氯化溴的折点反应与溴相似，在含氨的水中，pH 值 7~8，即使只有微过量溴存在，氯化溴

与氨反应就马上达到折点:



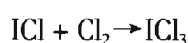
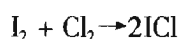
在理论上,1份氨氮要有12.4份氯化溴才能达到折点,在实际上还要比这个数字高。

## (二)氯化碘

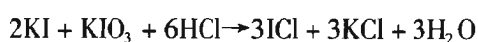
氯化碘( $\text{ICl}$ ,  $\text{ICl}_3$ )是一种活性很强的红棕色油状液体,熔点  $27^\circ\text{C}$  ( $\alpha$ 型)和  $14^\circ\text{C}$  ( $\beta$ 型)。它可灼伤皮肤和黏膜。氯化碘在空气中能挥发,易溶于水。氯化碘加成到不饱和脂肪酸的速度是溴化碘的33倍,溴的10倍,碘的1万倍。

实验室制备氯化碘的方法与氯化溴的方法相似,将元素碘置于水中,通氯气,碘全部溶解后便成氯化碘水溶液。

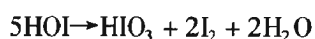
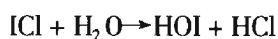
纯氯化碘可通过氯和碘在没有溶剂的情况下直接结合来制备。过量的氯气可产生黄色结晶三氯化碘。如果用干燥空气吹洗,可除去过量的氯,反应逆转:



也可将碘化物和盐酸制得氯化碘:



氯化碘可以迅速水解为次碘酸和盐酸。在没有过量盐酸(或氯化物)时,次碘酸就转化成碘酸和碘,碘被沉淀析出:

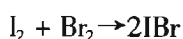


在稀盐酸中的氯化碘不能用硫代硫酸钠直接滴定,滴定前先加入醋酸钠或氰化钾,则反应才是定量的。

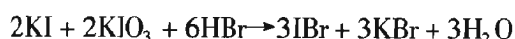
在水中氯化碘水解成次碘酸,因此它的杀菌作用与碘相似。氯化碘在水中的溶解度比元素碘大得多,应用比较方便。

## (三)溴化碘

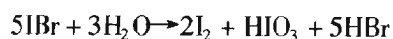
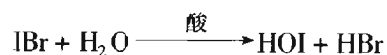
溴化碘( $\text{IBr}$ )是一种紫黑色结晶,熔点  $36^\circ\text{C}$ ,碘和溴直接结合形成溴化碘:



另外也可以在氢溴酸溶液中氧化碘化物而制得:



溴化碘易溶于水,在酸性中水解速度快,没有酸时则水解很慢:



溴化碘在水中的水解度和离解度都低,但它的溶解度比碘和溴都大,而且不产生碘氨,所以应用它杀菌有些优点。

## (四)卤间化合物的消毒效果

氯化溴的溶解度比碘和溴都大,化学活性也比它们强。氯化溴与水中氨起反应后形成的溴氨还有同样的杀菌作用。氯化溴在水中溶解分解,对水生物的毒性比氯低。因此氯化溴在水消毒的应用上比较广泛。

氯化溴的消毒效果比氯和溴都强。消毒同样的水用氯化溴与氯和溴进行比较,按投加量三者都是 0.25 mg/l,接触时间 5 min,杀灭大肠杆菌的效果氯只有 10%,溴为 80%,氯化溴达 100%。对废水中的大肠杆菌,氯在相同剂量下,废水中还余留大肠杆菌 1 000 个/ml。

氯化溴杀灭脊髓灰质炎病毒的效果比氯高 3 倍左右。在 25℃,15 min,杀灭 99.99%脊髓灰质炎病毒,氯化溴只要 0.075~0.15 mg/L,而氯要 0.25~0.3 mg/L。

## 五、二氧化氯

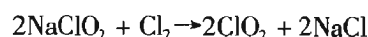
### (一)二氧化氯的理化性能

二氧化氯是一种黄绿色气体,它的氧化能力和杀菌能力比氯强,易溶于水,但在水中很不稳定。在水中二氧化氯与有机物的反应与氯不同,氯主要是氯化作用。工业很少使用二氧化氯气体,因为二氧化氯不能压缩,不能贮存,容易引起爆炸。饮水消毒和废水消毒大都使用二氧化氯溶液。

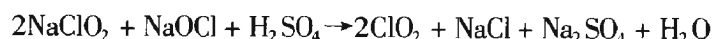
二氧化氯的沸点为 11℃,熔点 -59℃,在水中的溶解度为 2.9 g/L(4 kPa 气压),比氯的溶解度大 5 倍多。另外,二氧化氯不像氯那样在水中可以水解和离解。根据这两个特点,在制备二氧化氯时,可以将两种气体分离,因为二氧化氯极易挥发,用通空气吹泡的方法,就很容易将混合有氯气的二氧化氯从水溶液中吹出。工业上生产二氧化氯的主要原料是氯酸钾或氯酸钠、氯化钠和硫酸:



产品中含二氧化氯和氯气(2:1)。混合在二氧化氯中的氯气可以经亚氯酸钠吸收,氯气与亚氯酸钠反应生成二氧化氯:



实验室制备二氧化氯和水处理用的二氧化氯可以将亚氯酸钠与次氯酸钠反应取得:



或将亚氯酸钠溶液酸化至 pH 值低于 0.5,可得到二氧化氯水溶液。

二氧化氯是一种很强的氧化剂。它的有效氯含量为 263%。因为二氧化氯含氯量为 52.6%,在氧化还原反应中  $\text{ClO}_2$  由  $\text{Cl}^{4+}$  变为  $\text{Cl}^-$ ,有效氯含量计算为  $5 \times 52.6\%$  即 263%。

二氧化氯消毒饮水有很多优点,它与水中的氨化物不起反应;与酚类反应不生成有厌恶气味的氯酚,能脱去水中的色和味,改善水的味道。再者,二氧化氯不像氯那样与水中有机物反应生成致癌的三卤甲烷。还有二氧化氯的消毒效果不受水质、pH 值的影响,因为它在水中不发生水解。

### (二)二氧化氯对水的消毒效果

1. 杀灭水中细菌繁殖体 二氧化氯杀灭 99.9% 大肠菌的用量为 0.25 mg/L, 30℃, 只要 21 s; 5℃要 150 s。用于污水消毒,二氧化氯用量 7.5 mg/L 5 s 内就可将污水中 5 个对数级的大肠杆菌全部杀死。

2. 杀灭水中细菌芽孢 在不耗氯的水中,用  $\text{ClO}_2$  1.0 mg/L, 5 min 能杀灭 99.9% 枯草杆菌芽孢,用氯则要 3.5 mg/L。

3. 杀灭水中病毒 二氧化氯用量 0.08 mg/L,杀灭脊髓灰质炎病毒的效果与 0.25 mg/L 氯或 0.15 mg/L  $\text{O}_3$  一样。二氧化氯用量 7.5 mg/L, 20 s, 就可以将污水中 5 个对数级的病毒杀灭。

## 六、臭氧

### (一)臭氧的理化性能

臭氧是一种具有特殊刺激气味的灰蓝色气体。臭氧的密度  $2.14\text{g/L}(0^\circ\text{C})$ , 沸点  $-111^\circ\text{C}$ , 熔点  $-251^\circ\text{C}$ , 在水中的溶解度比氧大 10 倍。

臭氧是不稳定的, 它在水中比在空气中更容易分解。它在水中的半衰期随着水质和水温度不同而有显著差别, 有的测得是 15 min, 30 min, 还有的说是 165 min。臭氧在液态下  $20^\circ\text{C}$  储存, 它的半衰期为 3 d。

臭氧的氧化能力比氯和二氧化氯都强。臭氧的氧化作用可以使不饱和有机物分子断裂, 最终变成酸和醛。

臭氧在水中的溶解量甚少。因为臭氧在空气中的含量极低, 使水中臭氧从水和空气界面上逸出, 使水中臭氧浓度总是处于不断降低状态。

臭氧的氧化能力很强, 它不但可以杀菌, 而且还可以去除水中有色味的有机物, 改善水的气味。但它分解快, 性能不稳定, 只能随用随生产, 不能储存和运输。

### (二)臭氧对水的消毒效果

1. 杀灭水中细菌繁殖体 臭氧杀灭大肠杆菌, 接触 5 min, 剂量是  $0.19\text{ mg/L}$ , 对蜡样杆菌的剂量是  $0.12\text{ mg/L}$ , 巨大杆菌是  $0.19\text{ mg/L}$ 。接触 3 min, 对大肠杆菌的杀菌剂量为  $0.22\text{ mg/L}$ 。

2. 杀灭水中病毒 臭氧杀灭微生物的能力比氯高 600~3 000 倍。臭氧杀灭脊髓灰质炎病毒, 接触 2 min, 剂量为  $0.05\sim 0.45\text{ mg/L}$ , 而自由余氯则需要  $0.5\sim 1.0\text{ mg/L}$ , 接触 1.5~3 h, 才能达到相同的杀灭率。

病毒对臭氧的抵抗力顺序为: 柯萨奇 B<sub>3</sub> 型病毒 > 脊髓灰质炎 III 型病毒 > 脊髓灰质炎 I 型病毒 > 柯萨奇 II 型病毒 > 埃可 I 型病毒 > 柯萨奇 B<sub>5</sub> 型病毒。用臭氧杀灭饮用水中的病毒, 使用剂量  $3.0\text{ mg/L}$  10 min, 便可达到卫生安全要求。

3 杀灭水中芽孢 臭氧杀灭蜡样杆菌芽孢和巨大杆菌芽孢的剂量为  $2.29\text{ mg/L}$ , 接触 5 s; 杀灭水中产气荚膜杆菌芽孢的剂量为  $3\text{ mg/L}$ , 接触 5 min;  $0.25\text{ mg/L}$ , 接触 15 min。

## 七、接触消毒剂

把消毒物质吸附在非溶解性的载体上制成的接触消毒剂是一种不溶于水的消毒剂, 当水中微生物与接触消毒剂接触时, 载体上的消毒物质就直接转移到微生物上, 微生物被杀灭, 这种消毒过程称为接触消毒。接触消毒的优点是消毒水无色、无味, 接触消毒剂使用失效后可以再生, 因此可以反复作用, 把接触消毒剂装入小型过滤管中, 可做成个人饮水消毒管, 供个人野外饮水消毒用。

接触消毒剂的消毒物质有三碘化物、聚溴化物、银盐、季胺盐等。载体有离子交换树脂、活性炭、珊瑚粒、人造纤维、羊毛织物和丝棉等。带卤素的季胺盐阴离子交换树脂称为聚卤素季胺盐阴离子交换树脂以下简要介绍几种接触消毒剂

### (一)溴型接触消毒剂

把溴带到季铵盐阴离子交换树脂上制成, 又称聚溴树脂它对大肠杆菌有较好的杀灭作用在污染大肠杆菌  $10^8$  个/ml 的磷酸盐缓冲液中, 加入聚溴树脂, 水中溴浓度为  $0.7\sim$

1.4 mg/L, pH值 4.3 时, 全部杀灭大肠菌的时间为 1 min。pH值 6.2 时, 全部杀灭大肠杆菌的时间为 1 min。pH值 6.2 时, 溴浓度为 mg/L, 1 min 内, 可灭活 99.99% 大肠杆菌。

### (二) 碘型接触消毒剂

由三碘化物与季铵盐离子交换树脂结合制成。它对大肠杆菌也有较强灭活作用, 将含大肠杆菌的水以 150 ml/min 流量通过装有 3.8 g 三碘树脂柱, 可以全部杀灭  $10^4 \sim 10^5$  个/ml 的大肠杆菌。三碘化物与强碱性阴离子交换树脂结合, 杀灭水中大肠杆菌的效果更好。

### (三) 银型接触消毒剂

把银带到尼龙纤维、聚氯乙烯纤维、棉花、石棉、活性炭、珊瑚或阳离子交换树脂等载体上, 制成银型接触消毒剂, 也有较强的杀菌活性。

### (四) 季铵盐接触消毒剂

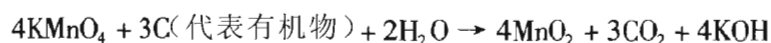
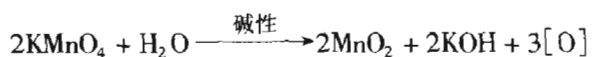
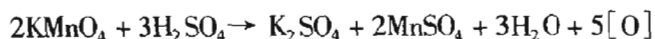
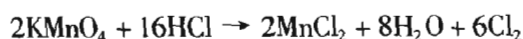
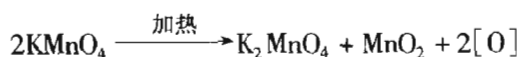
它是一种非溶解性聚合物接触消毒剂, 具有广谱杀菌活性。

## 八、过锰酸钾和高铁酸钾

### (一) 过锰酸钾( $\text{KMnO}_4$ )

过锰酸钾为黑色晶体, 水溶液呈紫色。水中溶解度 10℃ 时是 1.4 g/100 g, 20℃ 时 6.4 g/100 g。过锰酸钾氧化能力很强, 直接加热就可放出新生态氧。过锰酸钾在饮水消毒中的应用, 主要作为自来水的预处理。它可以分解水中的有机物, 可以减少氯化消毒时产生的三卤甲烷。

在水处理中过锰酸钾的化学反应有:

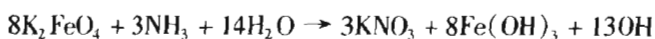
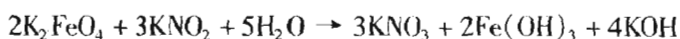
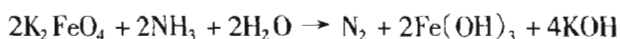


过锰酸钾的消毒效果:

对含量  $2 \times 10^5$  个/ml 霍乱弧菌, 需要过锰酸钾 10 mg/L, 接触 2 h, 才能杀灭; 对福氏痢疾杆菌需要 4 h; 对伤寒杆菌需要 12 h。在 pH 值为 5.9 时, 对大肠杆菌需要加 16 mg/L, 接触 16 min, 才能全部杀灭。

### (二) 高铁酸钾( $\text{K}_2\text{FeO}_4$ )

高铁酸钾是黑紫色结晶体, 水溶液呈紫色。它有较强的氧化能力, 能与水中的氨、酚和有机物(如胱氨酸和甘氨酸)等起反应。它与氨的反应是:



高铁酸钾的消毒效果: 高铁酸钾(6 mg/L), 杀灭水中 99% 大肠杆菌, 在 pH 8.0、8.2 和 8.5, 水温 27℃, 分别需要 8.5、7.2 和 6.4 min。在蒸馏水中, 投加量 6 mg/L, 接触 30 min, 可杀灭

99.9%大肠杆菌。

用高铁酸钾灭活  $\phi 2$  噬菌体,水温  $24^{\circ}\text{C}$ , pH值  $6.5 \sim 7.5$ ,投加量  $1 \sim 15 \text{ mg/L}$ ,灭活 99% 的时间为  $1 \sim 6 \text{ min}$ 。

## 九、过氧乙酸

### (一)过氧乙酸的理化性能

过氧乙酸是一种无色液体,易溶于水,熔点  $0.1^{\circ}\text{C}$ 、沸点  $25^{\circ}\text{C}$ 。它的水溶液不稳定,10% 的过氧乙酸在  $4^{\circ}\text{C}$  下保存 12 周,浓度下降到 8%;在  $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$  下保存同样时间,只余留 3%。高浓度的过氧乙酸有爆炸性。我国工业生产的过氧乙酸浓度约 16%。

### (二)过氧乙酸的消毒效果

过氧乙酸用于饮水消毒,加入量  $10 \text{ mg/L}$ ,接触  $10 \text{ min}$ ,可使澄清水达到消毒要求。杀灭大肠杆菌,  $25 \text{ mg/L}$ ,只要  $2 \text{ min}$  杀灭病毒要 20 倍以上的剂量,杀灭芽孢要提高 200 倍以上的剂量。

## 十、银和铜

微量银对微生物有杀灭作用。用银消毒的制剂有硝酸银、电解银、胶态银和烧结氧化银等。阿波罗宇宙飞船上使用电解银消毒饮水。铜主要用于储存水的消毒,铜容器上的微量铜能自行释放到水中,使微生物中毒死亡。

## 第三节 影响饮水消毒效果的因素

评价饮水消毒剂的效果时要考虑的因素有:消毒剂浓度、消毒时间和水质条件等。前两个因素已在前面介绍了。这里着重讨论水质条件如 pH值、水温、有机物和其他水质因素对水消毒效果的影响。

### (一)pH 值的影响

1.对氯消毒的影响 由于微生物一旦悬浮于水中,它的表面带有负电荷,因此带负电荷的消毒剂就难于接近、吸附和透过微生物的细胞,那么消毒效果就降低。消毒剂所带的电荷取决于水质的 pH值。有些消毒剂在水中起水解和离解作用,而离解作用与水质 pH值有关。氯消毒剂在水中水解成  $\text{HOCl}$ , pH8 时,  $\text{OCl}^-$  占 76.8%,氯的消毒效果就降低了。

(1)对自由氯消毒效果的影响:低 pH值对结合氯的消毒作用也有利。pH值 7.0 和 9.8 时,杀灭大肠杆菌的自由氯有效剂量两者相差 24 倍( $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ )和 7.5 倍( $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ ),而杀灭伤寒杆菌则相差 25 倍( $2 \sim 5^{\circ}\text{C}$ )和 2.7 倍( $20 \sim 25^{\circ}\text{C}$ )。

(2)对结合氯消毒效果的影响:低 pH值对结合氯的消毒作用也有利。pH值 6.5 和 9.5,杀灭大肠杆菌的结合氯有效剂量两者相差 2 倍( $20^{\circ}\text{C}$ ),而杀灭伤寒杆菌时两者相差 2.5 倍( $20^{\circ}\text{C}$ )。

(3)对氯杀灭病毒的影响:低 pH值对氯杀灭病毒的效果也有利,对脊髓灰质炎 I 型病毒,在相同剂量下,当 pH值 6 和 9 时,杀灭时间相差 2~4 倍;对氯杀灭其他病毒的效果也有影响,例如 pH值相差 2,在有效消毒剂量和消毒时间上,有 2.5 倍的差别

(4)对氯杀灭芽孢的影响:在相同时间内杀灭芽孢,pH值相差 1.4,加入氯量相差 10 倍左右。

(5) 对氯杀灭阿米巴胞囊的影响: 氯杀灭阿米巴胞囊在 pH 值 7 以下差别不大, pH 值 7 以上受影响较大, pH 值 7 和 8, 氯杀灭胞囊的剂量相差 6~8 倍。

2. 对碘的消毒效果影响 用碘消毒饮水, 消毒效果受 pH 的影响不大。这是因为 pH 值 6~8 范围内, 碘水解量少,  $\text{OI}^-$  离子在水中的量更少。例如用碘杀灭芽孢时, pH 值 6~8 杀灭 99% 芽孢的时间为 2.3~2.8 min, 两者相差不大。

3. 对溴消毒效果的影响  $\text{Br}_2$  比  $\text{HOBr}$  的活力大 10 倍, 在 pH 值 6~8, 溴溶于水几乎全部都是  $\text{HOBr}$ 。在 pH 值 8 以上,  $\text{HOBr}$  就逐渐离解为  $\text{OBr}^-$ 。pH 值 6~8, 25 mg/L 溴杀灭水中枯草芽孢杆菌的时间为 2 min, pH 值 9 则需要 4 min。

4. 对臭氧消毒效果的影响 pH 值对臭氧的消毒效果的影响不像氯那样严重。

5. 对二氧化氯消毒效果的影响在 pH 值高的水质中, 二氧化氯的消毒效果反而较好, 这是与氯有所不同的。

6. 对银消毒效果的影响 银在高 pH 值的消毒效果比值低时好, pH 值相差 1.0, 消毒所需时间相差 1.55 倍。

## (二) 水温的影响

消毒作用是消毒剂与微生物之间的化学反应过程, 化学反应速度与温度有关。消毒剂的杀菌效果受温度影响, 有关参数主要有:

1. 活化能(E) 活化能 E 是一个常数, E 值愈高, 化学反应速度愈慢, 消毒效果越差。

消毒剂的活化能按下列公式计算:

$$\ln \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{R \cdot T_1 \cdot T_2} \text{ 或 } \lg \frac{t_1}{t_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{2.303 R T_1 T_2} = \frac{E(T_2 - T_1)}{19.184 T_1 T_2}$$

式中:  $T_1$  和  $T_2$  代表消毒中两个不同的绝对温度, R 为气体常数(8.33J/℃), E 为活化能, 单位为焦耳(J),  $t_1$  和  $t_2$  代表在两种不同温度( $T_1$  和  $T_2$ )下, 消毒剂达到相同杀菌百分数所需时间。

2.  $Q_{10}$  值 表示当温度相差 10 度时, 同量消毒剂达到相同杀菌百分数需要时间的比值, 即

$$\lg Q_{10} = \lg \frac{t_1}{t_2} = \frac{10E}{19.184 \times 283 \times 293} = \frac{E}{159\,000}$$

## (三) 有机物的影响

消毒剂的消毒效果受水中有机物的影响很大, 原因是有机物消耗了部分消毒剂。以氯为例, 以有机物 N 为 1, 接触时间 1 h, 左旋酪氨酸耗氯量是 38, 左旋胱氨酸是 26, 甘氨酸是 20, 消旋亮氨酸 12, 氯化氨是 9, 蛋白胨是 6, 肌酸和玉米胚是 2。

有机物影响氯消毒效果很大。例如: 杀灭水中的肠道病毒, 接触 10 min, 需自由余氯 0.2~0.5 mg/L, 如果水中加入蛋白质 50 mg/L, 那么就要提高氯量 30 倍才能达到同样的效果。

有机物对溴的消毒作用也有影响。溴也可与水中有机物发生折点反应, 消耗溴。不过如果溴与氨的比例适当, 可生成溴氨, 溴氨的消毒效果依然很好。如果水中含的氨氮量少, 那将对溴的消毒效果影响很大, 如果氨氮超过加溴量的 25 倍以上, 反而对它的消毒效果没有影响。

同样, 水中有机物对碘的消毒效果也有影响, 但不如氯那样大, 因为碘不与氨起反应, 因此碘在水中余留量比较稳定。

臭氧、过氧乙酸和二氧化氯等的消毒效果也受水中有机物的影响而降低。由于有机物消耗消毒剂, 在消毒实践中, 为了保证饮水消毒效果, 必须预先测定原水的耗药量, 才能确定适宜的加药量。

## 第四节 井内水消毒

井水消毒是在我国农村和分散式供水中普遍使用的饮水消毒方式。井内消毒效果不稳定,一方面是因井壁井底有机杂质耗氯量大,另一方面是因井水被汲取后,未经消毒的水不断补充井内,由于水接触消毒剂的剂量小和时间短,以致消毒效果变动较大。因此,消毒前没有淘井和未经过超氯消毒的水井,一般井内消毒效果不够稳定。

用常量氯直接加药消毒,30 min 井水余氯分布大多集中在 2 m 以上水层,3 m 以下无余氯。因此,加氯 30 min 之后,可以认为水面下 2 m 以内的水是安全的。

水井构筑不良,井周围环境卫生不好,有污染源,没有公用水桶,水井使用没有卫生管理制度等,对井水的消毒效果影响较大。对井水加氯消毒,必须消除水井附近污染源,整修水井的卫生技术设备,事先要淘井,清除井底淤泥,并进行超量氯消毒后使用。井水消毒的方法有直接加药法和持续消毒法。

### 一、直接加药法

按常量氯消毒法,将配制的漂白粉澄清液直接倒入水井,搅动混合经过 30 min 后检查余氯,应维持在 0.5 mg/L 以上。由于不断地从井内取水和地下水的流动,井水不断更新,余氯逐渐减少,经过一定时间后,余氯耗尽,必须再次投药,两次投药间隔时间,由 1 日数次到数日 1 次相差很大,要经常检查余氯,当余氯不足时,就要再次投药。一般情况下,夏秋季每天消毒 2 次左右,冬季消毒 1 次,但应根据井水水质和余氯变化情况而定。每天消毒 1 次,可在晚饭后进行,每天消毒 2~3 次时,可安排在早饭后,午饭后和晚饭后进行。雨后井水污染较严重或用水量增加应再次加药,加药量随贮水量多少与混浊程度而定。一般需要保证达到所要求的余氯量。

常量氯消毒的漂白粉用药量,可参考表 13-3 数据。按表中所列漂白粉用量,如漂白粉含有效氯 20%,加入水中后水中有效氯范围在 1.6 mg/L 左右;含有效氯 25%时,加入水中后水中有效氯范围在 2.0 mg/L 左右。

表 13-3 水井常氯消毒的漂白粉用量

水深(m)	不同直径(m)用药量(g)				
	0.5	0.8	1.0	1.8	2.0
1	1.6	6.1	6.4	14.4	25.6
2	3.2	8.2	12.8	28.8	51.2
3	4.8	12.3	19.2	43.2	76.8
4	6.4	16.4	25.6	57.6	102.4
5	8.0	20.5	32.0	72.0	128.0
6	9.6	24.6	38.0	86.4	153.6
7	11.2	28.7	44.8	100.8	179.2
8	12.8	32.8	51.2	115.2	204.8
9	14.4	36.9	57.6	129.6	230.4
10	16.0	41.0	64.0	144.0	256.0



## 二、持续氯消毒法

由于在井水内一次加氯消毒后,余氯仅能持续数小时,消毒持续时间较短,如反复加氯又比较繁琐。所以在实际工作中,采用了持续氯消毒法,例如用竹筒、塑料袋、广口瓶等容器。容器内盛有漂白粉,其量可为一次消毒的 20~30 倍,调成糊状。在竹筒、塑料袋或瓶盖上打 0.2~0.4 mm 的小孔数个,将其悬在水井中,容器中的漂白粉溶液可借水的振荡而由小孔溢出。放入一次约可持续消毒 10~20 d 左右。可根据水中的余氯来确定容器中孔的大小及数目,以调节漂白粉溶液流入水中的量。

## 三、缓释消毒片在井水消毒时的应用

缓释消毒片最早见于美国的专利产品,缓释期 4~5 d,主要用于游泳池水的消毒。1993 年军事医学科学院研制的饮水缓释消毒片,缓释期为  $11.43 \pm 1.99$  d,崩解期为  $10.5 \pm 2.2$  d。

缓释消毒片的特点:杀菌成分在水中缓慢而持续地释放,有利于饮水消毒;而漂白粉精片的杀菌成分一次性释放,5 h 左右达到释放高峰,其他比较见表 13-4。

表 13-4 两种消毒片性能的比较

消毒剂	有效氯含量(%)	储存期(年)	每片有效氯含量(mg)	每月投加次数(次)
缓释消毒片	84	3	840	1
漂白粉精片	50	2	300~350	20~30

为了延长、降低缓释消毒片的释放高峰,使用时将片剂放入缓释消毒器中,将装有缓释消毒片的容器投放于水体中,无论是实验室结果还是现场试验结果,水体里各部位余氯分布均匀,详见表 13-5。

表 13-5 某岛储水池中药械合用余氯的分布

时间(d)	余氯含量(mg/L)			
	上部	中部	下部	末部
5	0.59	0.48	0.47	0.41
10	0.88	0.90	0.72	0.45
15	0.10	0.82	1.28	0.74
20	0.20	0.50	0.28	0.19
25	0.23	0.15	0.48	0.23
30	0.16	0.11	0.10	0.13

从结果看出,在静态储水条件下,使用缓释消毒药械消毒储水,余氯在水体中各部位的分布也是较为均匀的。用缓释消毒药械消毒动态蓄水时,所取得结果与静态时相同。

缓释消毒药械可用于井水、河水、高层建筑二次供水、水窖水、雨水、雪水的消毒。消毒井水时,可根据每天用水量,将定量缓释消毒片放入缓释消毒器中,直接投入井中,在一个月左右的时间不用任何管理。

水源水较为清洁时, 每吨水加 25 ~ 30 片。污染严重的水源水适当增加, 以 35 ~ 40 片为宜。

## 第五节 饮水消毒效果检测和评价方法

### 一、饮水消毒效果检测方法

#### (一) 滤膜法检测水中大肠菌群

检测水中的大肠菌群, 是评价饮水是否遭受粪便污染, 以及饮水消毒后是否达到了饮水卫生安全标准的一项可靠指标。检查饮水中大肠菌群, 采用滤膜法。此法设计原理是取一定量的水样, 通过过滤, 将大肠菌群浓集到膜上, 然后将膜贴在远藤 (Endo) 平板上培养计数。

##### 1. 试验方法和步骤

(1) 取未经消毒水样 10 ml 注入灭菌试管中, 用生理盐水作 10 倍稀释至  $10^{-3}$ 。

(2) 用小镊子取无菌滤膜一张, 平放在漏斗套上, 旋紧螺丝。

(3) 将待检水样 1 ml 注入漏斗中滤膜上面, 开动抽气泵, 将水抽掉。卸下漏斗, 用小镊子将滤膜取下贴在远藤平板上培养。原液及每一稀释度培养 3 张滤膜。

(4) 将贴有滤膜的远藤培养平板置  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中 24 h, 计数生长的发紫色金属光泽的菌落数。

(5) 对消毒过的水体, 取水样 100 ml, 注入消毒过的漏斗中, 抽滤后将膜贴在远藤培养基上, 置  $37^{\circ}\text{C}$  培养, 需做 3 份水样。

2. 结果整理与分析 滤膜直径为 30 mm。膜上生长的菌落在 100 以下, 计数较为方便; 大于 200 则计数较为困难, 只好记录为大于 200。在几个稀释度下培养计数时, 取膜上菌落数 10 ~ 60 个左右的稀释度, 计数较为准确。如果用原水 1 ml 培养后滤膜上仍无菌落生长, 则记录为 1 ml 培养为 0, 计数为  $< 100$  个/L, 100 ml 为 0, 计数为  $< 10$  个/L。在 3 份水样中最高浓度下有 1 ~ 2 份有菌生长, 另 1 ~ 2 份无菌生长, 则取 1 份或 2 份在某一容量下的数值加上另外少于的数值, 求出其平均数, 记录为  $<$  平均数。如 100 ml 中一份为 5 个, 另一份为 9 个, 第三份为 1 个, 记录为  $(5 + 9 + 1) \div 3 = 5$ , 即  $< 50$  个/L。

根据培养的结果, 选择计数清楚准确的某一稀释度的菌落数, 求出平均值。

#### (二) 大肠杆菌 (*E. coli*) 灭活效果检测

污染菌消毒试验法是在实验室中检测消毒剂对水中 *E. coli* 的灭活效果的方法, 即在水中人工污染大肠杆菌, 加入消毒剂进行消毒, 经消毒后, 检测水中存活的大肠杆菌数。此法可以测定消毒剂对水的消毒效果, 也观察消毒剂浓度、接触时间、pH 值、水温、有机物和其他水质因素对消毒效果的影响。

##### 1. 方法步骤

(1) 容量 1L 的三角烧瓶 2 个, 内各盛入采来的天然河水 (或按实验设计所用的水) 1 000 ml。每瓶中加入大肠杆菌悬浮液 1 ml, 混合均匀, 使原水中含大肠杆菌约  $10^6/\text{ml}$ 。

(2) 每瓶水样取 1 ml, 注入灭菌试管中供检测原水实际污染的大肠杆菌数。用生理盐水稀释到  $10^{-3}$  和  $10^{-4}$ , 每个稀释度取 1 ml, 一式 2 ~ 3 份, 经滤膜过滤, 滤膜贴在远藤平板上, 在  $37^{\circ}\text{C}$  培养 24 h 后计数。计算污染菌数  $N_0/\text{L} = \text{平板计数} \times \text{稀释倍数} \times 1\ 000$ 。

(3)在若干 250 ml 灭菌三角瓶中, 分别加入灭菌中和剂 2%硫代硫酸钠溶液 2 ml。

(4)在污染大肠杆菌的水样中加入待测消毒剂, 加入消毒剂后按设计的时间 5、10、15、30 min,依次取出水样 250 ml,置于盛有灭菌中和剂的三角烧瓶中。每次倒出水样之前,把三角烧瓶置酒精灯火焰上通过,进行瓶口消毒。

(5)经消毒而中和的水样, 每瓶分别吸取 100 ml、10 ml、1 ml 和各 2 份,以滤膜过滤,滤膜贴于远藤培养基上,37℃ 培养 24 h 后,计数菌落数为  $N_t$ 。

## 2.结果整理与分析

(1)分别求出原水水样中大肠杆菌平均数 ( $N_0$ ) 和消毒后存活的大肠杆菌平均数( $N_t$ )。如 100 ml 水中未检出,则每升水中存活的大肠杆菌小于 10,即  $<10$  个/L。

(2)杀灭率或存活率计算:

$$\text{杀灭率} : \frac{N_0 - N_t}{N_0} \times 100\%$$

## (三)现场消毒效果检测

饮水消毒的目的是杀灭或除去水中肠道致病菌。在天然水中检测肠道致病菌较复杂和费时。经过研究,认为可以用水中大肠菌群的检验来代替肠道致病菌的检验。为了验证消毒剂对各种天然水的消毒效果。把现场采来的天然水,不外加污染菌,进行消毒试验,检测消毒前和消毒后的大肠菌群数。根据饮用水卫生细菌学标准来评价消毒后的水是否合格。

### 1.方法和步骤

(1)原水大肠菌群检测: 用无菌吸管取原水水样 10 ml,注入无菌试管中,按 10 倍稀释至  $10^{-7}$ 。每一稀释度取 1 ml 用滤膜过滤,将滤膜贴在远藤平板上, 37℃培养 24 h,计数结果。为慎重起见,未稀释原水也取 1 ml 一式 3 份进行培养。

(2)取容量 1 L 的三角烧瓶, 盛入采来的天然水 1 L。加入消毒剂后,摇匀,按设计的接触时间例如 5、10、15、30 min 依次倒出水样 250 ml, 盛于有灭菌的中和剂的三角瓶中。

(3)消毒后水样,每瓶分别吸取 100 ml、10 ml 和 1 ml 各 2 份,经滤膜过滤,滤膜贴在远藤平板上,37℃培养 24 h 后计数。

### 2.结果整理和分析

(1)分别求出原水样和消毒后水样大肠菌群平均数,再折算成每升水样中的含量。如 100 ml 中未检出,则为  $<10$  个/L。

(2)检测结果表示不同水样、不同作用时间的大肠菌群数。

## (四)水消毒动力学试验

水消毒试验中,为了定量地评价消毒剂的杀菌速度,将细菌存活率对数 ( $\lg N_t/N_0$ ) 对时间  $t$  在正坐标纸上作图,如呈现指数曲线趋势,细菌存活率曲线则是:

$$\lg \frac{N_t}{N_0} = -Ktm$$

这里  $K$  为杀菌速度常数, $t$  为作用时间, $m$  为时间  $t$  的指数, $\lg \frac{N_t}{N_0}$  与  $tm$  之间是以斜率为  $K$  的直线关系。

1.试验方法步骤 将普通琼脂斜面培养的埃希氏大肠杆菌用灭菌生理盐水配制成细菌悬液,然后加入采来的水样中,人工染菌  $10^6$ /L。取 1 000 ml 的三角瓶。盛入 1 000 ml 染菌水样,

加入消毒剂,按设计的接触时间,例如每隔 1、3、5、10 和 15 min,取样加于含灭菌中和剂的 250 ml 三角烧瓶中,终止消毒作用后,用滤膜法检验消毒后存活细菌数。检查水样量,根据预实验的存活细菌而定,以每张滤膜菌落数少于 100 个为宜,分别过滤 1 ml、10 ml 或 100 ml。滤膜贴于远滕平板上,37℃培养 24 h。

## 2. 结果的整理与分析

(1) 分别求出原水样大肠杆菌平均数( $N_0$ )和消毒后活存的人肠杆菌平均数( $N_t$ )。计算出  $\lg \frac{(N_t)}{(N_0)}$ ;

(2) 以  $\lg \frac{N_t}{N_0}$  的数据对时间( $t$ )在正坐标纸上点图,呈现指数曲线趋势;

(3) 细菌存活率曲线以  $\lg \frac{N_t}{N_0} = -Ktm$  进行曲线拟合,求出细菌存活曲线回归方程。然后进行拟合优度检验。根据统计学进行回归系数  $t$  检验,比较不同消毒剂之间杀菌速率的差别。

## (五) 大肠杆菌噬菌体 f2 灭活效果检测

病毒对消毒剂的抗力比肠道细菌强,用大肠杆菌作指标,不能代表水中肠道病毒。有人建议用大肠杆菌噬菌体作为肠道病毒消毒指标。大肠杆菌噬菌体 f2 的生物学特性与甲型肝炎病毒脊髓灰质炎病毒相似, f2 噬菌体作为病毒消毒指示物,它的优点是:对消毒剂的抗力与致病性肠道病毒相似,检测方法简便,对人无致病。现将大肠杆菌噬菌体 f2 灭活效果检测方法介绍如下。

### 1. 材料和器材

(1) 噬菌体 f2 悬液:取 100 ml 无菌肉汤,加入噬菌体 f2 储备液 5 ml,加寄主菌 *E. coli* 285 10 ml 摇匀,移至 37℃培养 24 h,此时应是透明或半透明。若不透明,可置 4℃冰箱内存放一周左右,使其澄清,然后将此液在无菌条件下,经蔡氏滤器(E.K 滤板)或玻璃砂芯漏斗(G5)过滤,除去被 f2 噬菌体裂解的寄主菌残余碎片。分装于小试管内(5~10 ml),经无菌检测后,测定其滴度,一般滴度为  $10^9$  pfu/ml,于 4℃冰箱中保存,储存期一年。

(2) 寄主菌(*E. coli* 285)幼龄菌:将寄主菌(*E. coli* 285)幼龄菌斜面接种到 50 ml 左右无菌肉汤中,37℃培养 8 h 左右。4℃冰箱保存。*E. coli* 285 幼龄菌储存期一周;

(3) 底层培养基(2% 营养琼脂),上层培养基(8% 营养琼脂)。

(4) 消毒中和剂。

(5) 无菌平皿,无菌吸管,无菌试管,1 000 ml 三角烧瓶和无菌生理盐水等。

### 2 操作步骤

(1) 下层平板的制备:每个无菌平皿内倾入融化的 2% 营养琼脂 10 ml 左右,凝固备用。

(2) 稀释噬菌体 f2 悬浮液:取噬菌体 f2 储备液 1 ml,用无菌生理盐水按 1:10 稀释到  $10^{-6}$ 。取  $10^{-6}$  稀释度进行噬菌体培养。作为对照计数用。

(3) 污染试验水样:取 1 000 ml 水样,根据实验设计的污染量加入上述稀释的噬菌体 f2。

(4) 准备采样无菌试管:按实验设计,取若干无菌试管,编号,加入 10% 无菌中和剂 1~2 滴

(5) 灭活试验:将消毒剂按设计的量加入到含有噬菌体 f2 的试验水样中,混匀,按设计的时间取样 10 ml 置于有中和剂的采样无菌试管中。

(6)噬菌体 f2 培养:将 1 ml 待测水样原液或稀释液,加到已凝固的底层营养琼脂上,一式 2~3 份,再加入 0.1 ml 寄主菌 *E. coli*285 幼龄菌液,随后倾入事先融化好的 45℃保温的上层营养琼脂 5 ml 左右,充分混匀,冷却凝固后翻转平板置 37℃培养 24 h。

(7)计数:在平板反面,可观察到一个个透明的蚀斑,记录蚀斑单位 ( plaque forming unit, pfu)。每毫升水样中的噬菌体 f2 的含量计算:

$\text{pfu/ml} = \text{平板平均蚀斑数} \times \text{稀释倍数}$

灭活率计算:

$\text{灭活率}(\%) = \frac{\text{加入 pfu/ml} - \text{灭活后 pfu/ml}}{\text{加入 pfu/ml}} \times 100\%$

### 3. 注意事项

(1)为了便于计数,每个平板的蚀斑数以 30~300 pfu 为宜,最好为 50~150 pfu。

(2)如平板噬菌体过多,寄主菌菌膜全部被噬菌体“吃光”,易被误认为无蚀斑。

(3)上层营养琼脂中琼脂含量要合适,如上层太硬,蚀斑小,这时可适当减少琼脂用量。

### (六)水中脊髓灰质炎病毒灭活试验方法

水中脊髓灰质炎病毒 (poliovirus) 对一般消毒剂的抗力比甲型肝炎病毒的抗力强,而且它可以使细胞病变形形成蚀斑,容易定量计数,它的减毒株对人不致病。因此在评价饮水消毒剂对致病性肠道病毒的灭活效果时,可用脊髓灰质炎病毒进行试验。

#### 1. 材料与器材

(1)脊髓灰质炎病毒悬液:将脊髓灰质炎病毒悬液接种至 BGM 细胞,于 37℃培养 48~72 h。培养物经冻融三次和超声波处理 3 min,再用 10 000 g 离心 1 h,除去细胞残液,低温 (-20℃ 冰箱保存。

(2)单层 BGM 细胞:选用敏感的 BGM 传代细胞,在 25 ml 细胞瓶中培养成致密的单层细胞。

(3)细胞培养液:含 10%小牛血清的 Eagle 细胞培养液。

(4)0.8%琼脂细胞维持液:含 0.8%琼脂的 Eagle 细胞维持液(含小牛血清 1%)。

(5)消毒剂溶液:用双蒸水制成一定浓度消毒剂溶液,同时标定其含量。

(6)中和剂:根据消毒剂选择中和剂。

(7)无菌吸管、试管、三角烧瓶和生理盐水等。

#### 2. 操作步骤

(1)分装水样,将所试验的水样盛于 1 000 ml 灭菌三角烧瓶中。

(2)稀释病毒悬液:将病毒悬液用灭菌生理盐水按 1:10 倍稀释到每毫升含病毒颗粒  $10^6$ 。

(3)污染试验水样:将稀释的病毒悬液 1 ml 加到 1 L 水样中,混合后取样检测病毒污染量。

(4)准备无菌采样试管,按试验设计,将无菌采样试管编号,加入适量的灭菌中和剂溶液。

(5)灭活试验:将消毒剂加入含病毒的试验水样中,混匀,按设计接触时间(例如 30 s, 1、5、10、15、30 min)取样 10 ml 加入到无菌采样试管中。

(6)接种细胞:将致密的单层细胞中的培养液倾出,加入 1 ml 待测样品(如病毒浓度大时,应作适当的稀释),放置 37℃吸附 1~2 h,不断振摇,倾出水样,加入含 0.8%琼脂的细胞维持液 3 ml,冷却后翻转细胞瓶,放置 37℃培养 48~72 h。然后每瓶细胞加入 2 ml 甲醛溶液固定数分钟,用自来水冲洗后加结晶紫溶液染色数分钟,冲洗干净后计数。

(7)计数: 细胞瓶内圆形不着色的透明区即为一个蚀斑单位, 每毫升水样中的病毒含量计算:

$$\text{pfu/ml} = \text{平板平均蚀斑数} \times \text{稀释倍数}$$
$$\text{病毒灭活率}(\%) = \frac{\text{加入 pfu/ml} - \text{灭活后 pfu/ml}}{\text{加入 pfu/ml}} \times 100\%$$

### 3. 注意事项

(1)为了便于计数,病毒蚀斑数一般控制在每细胞瓶 10~30 pfu。

(2)若对大量水样进行病毒灭活试验,在病毒含量很少的情况下,可对水样进行浓缩后再检测。

(3)消毒试验的样品应及时接种到细胞中。

### (七)饮水中甲型肝炎病毒灭活试验方法

水是传播甲型肝炎的主要媒介之一。因此人们对水中甲型肝炎病毒(HAV)的灭活研究极为重视。70年代以前,由于缺乏HAV培养和检测方法,HAV灭活研究用人和敏感动物作试验,研究进展缓慢。用志愿者和实验动物作试验,所得结果难以与细胞培养的其他病毒的试验结果相比较。而且用人作试验有危险性,用动物作试验费用昂贵。80年代,建立了HAV细胞培养和检测方法,使饮水中甲型肝炎病毒灭活研究有了新的进展。现将饮水中HAV灭活的试验方法介绍如下。

#### 1. 材料和方法

(1)HAV的病毒株HAV灭活试验尚无标准毒株,采用较多的是HM175株也可采用自己实验室分离的毒株。

(2)细胞株:用于HAV培养的细胞株很多,例如FRhk4株、CR326株、BS-C-1株、PLC/PRF/5株、BGM株和HL细胞等。

(3)HAV接种和培养:以PLC/PRF/5细胞培养HAV为例,介绍HAV的培养方法。首先,将PLC/PRF/5细胞在100ml细胞瓶中用含有10%小牛血清的1640培养液(或Eagles培养液)培养3~4d成单层细胞。然后,在单层细胞上接种HAV,接种时先弃去生长液,加入用无小牛血清1640培养液稀释10倍的HAV悬液1ml,37℃吸附4h。最后,补加含1%~2%小牛血清1640培养液(即维持液)9ml。接种HAV的细胞置32℃孵箱培养,每2~3d换维持液,10~15d后,收集脱落细胞,经免疫荧光检验HAV阳性时,收获细胞。收获时,倒出维持液(维持液中含有感染HAV的脱落细胞不要弃去),加入4mlVersene消化液,待5~10min后,用吸管吹打使细胞脱落,将消化下来的细胞悬液和倒出的维持液合并,经2000r/min离心10min,弃上清,收集细胞沉淀物,加2mlPBS缓冲液(pH7.4),将细胞悬液经-30℃冻融3次,得HAV悬液。供传代和消毒试验用的HAV悬液经G5砂芯滤器过滤,去除细胞碎片和去除悬液中的细菌。

(4)免疫荧光试验:将收集到的HAV感染过的细胞悬液涂在载玻片上,自然晾干后浸入冷丙酮中10~15min,取出吹干或晾干,滴加稀释20倍已灭活的甲型肝炎病人恢复期血清,37℃放置30min,用pH7.4的0.01mol/LPBS缓冲液洗涤3~5次,再用蒸馏水洗一次,吹干或晾干,滴加与伊文斯蓝液等量混合的羊抗人IgG荧光抗体,37℃放置30min,再用0.01mol/L的PBS缓冲液洗涤3~5次,蒸馏水洗涤一次,吹干,用含50%甘油的PBS缓冲液封片,在荧光显微镜下观察,在细胞浆中有呈苹果绿沙粒状荧光颗粒者为HAV阳性。

(5)酶联免疫检测(ELISA)HAV抗体捕捉法:将40孔免疫检测板包被羊抗人IgM,置37℃

2 h,4℃过夜,次日甩干,用 0.1% BSA - PBS 封闭,4℃过夜,用 pH 值 7.4 的 0.01 mol/L PBS 缓冲液洗 3 次,分别加入抗 - HAV IgM 阳性血清和阴性血清(1:1 000 稀释)0.1 ml,置 37℃ 4 h 后,加待检 HAV 0.1 ml,4℃过夜,洗 3 次,加抗 - HAV IgG 酶结合物(抗 - HAV·HRP),置 40℃ 水浴 2 h 后洗 5 次,最后加邻苯二胺液显色,置 37℃ 30 min,加 2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 终止反应,用酶联免疫检测仪检测。

2. HAV 灭活试验 试验用水必须经过滤法灭菌。每次试验取 100 ~ 1 000 ml 已灭菌的水样,加 HAV 储液 1 ml,HAV TCID<sub>50</sub> 10<sup>5</sup>/ml 以上,加消毒剂后,按设计接触时间取试验水样 5 ml,加无菌的中和剂中止消毒作用。然后取 1 ml 接种于单层 PCL/PRF/5 细胞上,同时加 1 ml 双倍浓度的无血清的 1640 培养液,37℃ 吸附 4 h;然后再补加维持液 8 ml,32℃ 培养 10 ~ 15 d。每次实验设置 HAV 细胞培养对照和单独细胞对照。当 HAV 细胞培养对照经免疫荧光试验确定为阳性时,将全部细胞收获,收获的细胞在 - 30℃ 冻融 3 次,用 ELISA 检测,以试验水样接种的细胞培养物的 OD 值与空白对照的细胞培养物的 OD 值之比,计算 P/N 值,P/N 值 ≥ 2.1 为 HAV 阳性,< 2.1 为阴性,ELISA 检测为阴性的培养物可以进一步盲传,以进一步确认。

## 二、饮水消毒效果评价

### (一)卫生细菌学指标

评价饮水消毒效果的指标,主要以大肠杆菌和余留消毒剂浓度作指标。大肠杆菌对各种消毒剂的耐受力,一般都比肠道致病菌高(表 13-6)。

表 13-6 氯杀灭肠道细菌效果比较(个/L)

大肠杆菌	宋氏痢疾杆菌	副伤寒菌 B	钩端螺旋体	福氏痢疾杆菌	布氏杆菌	伤寒杆菌
0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
18	6	0	0	0	0	0
20	0	6	0	0	0	0
27	-	0	0	0	0	0
33	-	0	+	0	0	0
36	12	-		0	0	0
45	-	-		12	4	0
50	-	13		-	3	0
58	24			21	4	0
60						0
70						0
96						0
113						0
134						1

从表 13-6 中可知,消毒水中余留大肠杆菌 13 个/L 以下,水中伤寒杆菌、痢疾杆菌、布氏

杆菌和钩端螺旋体已全部被杀灭了。因此英美规定饮水消毒后水中余留大肠杆菌为 0 个/100 ml 水,我国《生活饮用水卫生标准》(GB5749-85)和前苏联规定为 3 个/L。2001 年中华人民共和国卫生部颁布的《生活饮用水卫生标准规范》规定:总大肠菌群:每 100 ml 水样中不得检出;粪大肠菌群:每 100 ml 水样中不得检出。

现在各国采用的饮用水微生物指标有 19 个以上,如:细菌总数、总大肠菌、粪大肠菌群、耐热大肠菌、埃希氏大肠菌、粪链球菌、肠道球菌、铜绿假单胞菌、沙门菌、军团菌、致病葡萄球菌、亚硫酸还原菌、梭状芽孢杆菌、粪型噬菌体、病毒、肠道病毒、兰氏贾第虫,还有用浊度和自由氯等。

肠道病毒对消毒剂的抵抗力比肠道细菌强,用大肠杆菌作指标,不能代表水中肠道病毒的杀灭。用何种指示物作水中肠道病毒的消毒指标,这是世界各国正在研究的问题,目前提出大肠杆菌噬菌体或粪链球菌等能作为一般肠道病毒的指标。

以余氯来评价饮水消毒效果是比较安全可靠的,由于大肠杆菌的常规检验需要 24 h。而自来水厂处理的水在 24 h 内已经把水送往用户,一旦发现消毒水的大肠杆菌不合格时,通知用户已无实际意义了。而水中余氯检测很快,而且能做到自动化。一般认为,在一定接触时间后,以水中余氯量作为评价自来水厂消毒水是否合格,较为可靠。

几个国家饮用水余氯标准列于表 13-7。表中的余氯标准量应为自由氯,而不是总余氯。

表 13-7 几个国家饮用水余氯标准

国 家	饮用水余氯标准(mg/L)
前苏联	> 0.3, < 0.5*
美国	0.05 ~ 0.1
日本	> 0.1 ~ 0.2
中国	0.3*
捷克	0.2 以下
墨西哥	0.2(结合氯 1.0)
西德	0.3(注入口处)
法国	0.1 以下

注:余氯标准,一般指接触时间 30 min 的自由氯。\* 在加压站附近采水样

近年来发现水中肠道病毒对氯的抵抗力较强。以前规定的饮水中余氯量 0.2 ~ 0.5 mg/L 不满足灭活肠道致病性病毒的要求,究竟规定多少才符合要求,目前尚无统一的认识,正在研究探讨中。1982 年英国“水污染研究和控制国际协会”(IAWPRC)邀请美、英、德、印等九国的专家学者讨论饮水中的病毒问题。近年来有人提到,要彻底灭活饮水中的甲型肝炎病毒,经净化的饮水,pH 值低于 8,浊度小于 1 度,自由性余氯 1 ~ 2 mg/L,接触时间 1 ~ 2 h,才能达到要求。

(梁增辉)



## 参考文献

- 1 蒋兴锦. 饮水的净化和消毒. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 163 - 179
- 2 梁增辉. 给水处理研究的新问题, 中国给排水, 1990; 4(4): 32 - 35
- 3 蒋保根, 姚军, 郑福寿. 甲型肝炎的主要传播因素分析. 中华流行病学杂志, 1991; 12(2): 91 - 94
- 4 Peterson DA, Hurley TR, Hoff JC, *et al*. Effect of chlorine treatment on infectivity of hepatitis A virus. *Appl Environment Microbiol*, 1983; 45(1): 223 - 227
- 5 钱宇平, 主编. 流行病学进展. 第五卷. 北京: 人民卫生出版社, 1998: 176
- 6 马学众, 曹学义, 刘占娥, 等. 戊型肝炎流行危险的研究. 中国公共卫生学报, 1991; 10(3): 172 - 174
- 7 夏学中, 尼亚孜, 赵国胜, 等. 一起戊型肝炎爆发的流行病学调查分析. 中华流行病学杂志, 1991; 12(5): 257 - 260
- 8 Grabow WOK, Gauss - Muller V, Prozesky OW, *et al*. Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl Environment Microbiol*, 1983; 46(3): 619 - 624
- 9 Hayes EB. Large community outbreak of cryptosporidiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N Engl J Med*, 1989; 320(21): 1372 - 1376
- 10 中华人民共和国国家标准. 生活饮用水卫生标准. GB 5479 - 85. 中华人民共和国卫生部, 1985
- 11 中华人民共和国国家军用标准. 军队饮用水卫生标准. GJB 651 - 89. 中国人民解放军总后勤部, 1989
- 12 中华人民共和国卫生部. 生活饮用水卫生规范, 2001. 9
- 13 White GC. Handbook of chlorination for potable water, wastewater, cooling water, industrial processes, and swimming pools. New York: Van Nostrand Reinhold Company, 1972: 1 - 39, 278 - 373
- 14 梁增辉, 牟友诚, 季金健, 等. 卤间化合物消毒效果的定量评价. 军事医学科学院院刊, 1986; 10(1): 41 - 45
- 15 Katz J(Editor). Ozone and chlorine dioxide technology for disinfection of drinking water. Rark Ridge, NJ: Noyes Data Corporation. USA, 1986: 4 - 9
- 16 侯悦, 主编. 军队卫生学. 北京: 人民军医出版社, 1998: 88 - 97
- 17 梁增辉, 马仪伦. 甲型肝炎感染性与抗原性消失的关系. 中国消毒学杂志, 1991; 8(3): 138 - 141
- 18 李平, 蔡心培, 秦思昌, 等. 储水缓释消毒药械的研究. 解放军预防医学杂志, 1996; 14(1): 20
19. Sobsey MD, Fuji T, Shields PA. Inactivation of hepatitis A virus in water by free chlorine and monochlorine. PB 88 - 180096, 1988
- 20 梁增辉, 王福玉, 杨宗芬, 等. 饮用水中甲型肝炎病毒灭活研究. 解放军预防医学杂志, 1997; 15(6): 398 - 402

## 第十四章 空气消毒

空气消毒,是指通过过滤或利用其他理化因子将空气中的微生物消除,使室内空气中微生物数量达到有关卫生标准,以减轻对物体的污染或对人员的危害。

一般认为,在下列情况下,应进行空气的消毒处理。

- 1.在有呼吸道传染病人存在时,应随时进行消毒。
- 2.手术室手术前和手术中应进行消毒,尽量减轻对手术野的污染。
- 3.新生儿室、早产婴儿室、烧伤病房、洁净病房应间断进行消毒,以保持有较洁净的空气。
- 4.药剂及生物制品生产车间,工作前或工作中应进行消毒,使达到卫生要求。
- 5.细菌实验室,工作前应进行消毒,以减轻对实验物品的污染。
- 6.空气中细菌数超过有关卫生要求的场所,应进行消毒,使达到卫生要求。

### 第一节 常用空气消毒方法

#### 一、紫外线照射

##### (一)紫外线灯

波长为 **253.7 nm** 的紫外线有较强的杀灭微生物的作用,国内消毒用紫外线灯光的波长绝大多数在 **253.7 nm** 左右。普通紫外线灯管由于照射时辐射部分 **184.9 nm** 波长的紫外线,故可产生臭氧,也称有臭氧紫外线灯。而低臭氧紫外线灯,由于灯管玻璃中含有可吸收波长小于 **200 nm** 紫外线的氧化钛,所以产生臭氧量很小。相反,高臭氧紫外线灯在照射时可辐射较大比例 **184.9 nm** 波长的紫外线,所以产生较大浓度的臭氧。

##### (二)使用方法

1.固定式照射 将紫外线灯悬挂或固定于天花板上,向下或侧向照射。该方式多用于需要经常进行空气消毒的场所,但不能用于人在时的空气消毒。当房间内每立方米空间所装紫外线灯管的功率达到 **1~1.5 W** 时,照射 **30 min** 以上,可达到一定的消毒效果。

2.移动式照射 将紫外线灯管装于活动式灯架上,适于不需要经常进行消毒或不便于安装紫外线灯管的场所。消毒效果依据照射强度不同而异,如达到足够的辐射度值,同样可获得较好的消毒效果。

##### (三)注意事项

1.消毒时,应关闭门窗。一般情况下人员应该离开房间,不要直接暴露与紫外线下,以免伤害眼睛和皮肤。消毒后待臭氧分解后再进入。

2.使用时,不要频繁开闭紫外线灯,以延长紫外线灯的使用寿命。

3.选用合适反光罩,增强紫外线灯光的辐照强度。

4.注意保持灯管的清洁,定期清洁灯管。

## 二、过滤除菌

用风机将室外的空气通过空气过滤器送入室内，稀释以至置换室内污染的空气，使室内空气达到洁净的水平。

过滤除菌的特点是消毒效果可靠，除了可消除空气中的细菌以外，还可去除空气中的尘埃粒子。其洁净程度随洁净级别而不同（表 14-1）。缺点是造价比较高，需经常更换滤器。

表 14-1 生物洁净室洁净级别

洁净级别	尘粒数(个/L)		生物粒子数(个/m <sup>3</sup> )	
	≥0.5	≥5	沉降菌	浮游菌
100	≤3.5	0	≤1	≤5
1 000	≤35	≤0.2	≤2	≤20
10 000	≤350	≤2	≤3	≤100
100 000	≤3 500	≤20	≤10	≤500
大于 10 万级	≤3 500	≤20	≤……	……

### （一）端流型空气过滤

多于室内顶部或侧面上部置一高效过滤送风口，以较大风量（< 8m/s）向下或侧向送入洁净空气，室内空气从下方（或对侧下方）排出。

端流型空气过滤方法可达到十万级空气洁净标准，且造价比较低。该方法多用于大输液灌装车间、针剂生产车间、手术室、新生儿室、早产儿室等的空气消毒。

### （二）层流型空气过滤

于室内顶部或一个侧面全部置以高效滤器，空气经分机通过高效滤器由上向下（或侧面向另一侧）全面地以同等速度（0.25 ~ 0.45 m/s）流动，室内空气从下方排出。该方法可达到百级空气洁净标准，但造价比较高。多用于洁净车间、洁净病房、洁净手术室及无菌实验室等的空气消毒处理。

### （三）洁净层流罩

于洁净层流罩的顶部置以高效滤器，四周装以透明围罩，气流经滤器自上向下，罩内空气保持正压，可达到较高的洁净度。多用于局部对空气质量要求较高的场所的空气消毒处理。

### （四）新风空气消毒器

由风机和中效过滤器组成，风机直接把室外空气吸入，通过滤器进入室内，稀释以至置换室内的空气，以保持室内空气新鲜，减少空气细菌数。可用于办公室、住家、车间、普通病房等场所的空气消毒。

## 三、空气消毒器

近年来市场上出现的空气消毒器，其消毒原理大多采用多种杀菌因子协同作用完成。依据其主要杀菌因子分类，大致可分为以下几类。

### （一）以紫外线为主的消毒器

大多由风机、初效滤器、高强度低臭氧紫外线灯组成，部分还加有负离子发生器。其消毒

原理是通过风机转动使室内空气经消毒器不断循环,经反复过滤、紫外线照射而达到消毒。该类消毒器除了有消毒作用外,还有消除空气中有害物质的效能。可用于人在时对空气进行连续的消毒。

## (二)以静电场为主的消毒器

由风机、初效滤器、多级线棒蜂巢静电场、浸渍型活性炭吸附器组成。其消毒原理是通过风机转动使室内空气经消毒器不断循环,经反复过滤、静电场及活性炭吸附而达到消毒和净化空气。该类消毒器同样有消除空气中有害物质的效能。可用于人在时对空气进行连续的消毒处理。

以上两类消毒器的种类较多,杀菌能力也不尽相同,可根据消毒场所及要求选用,通常开机 30~60 min 便可达到消毒要求。用于人在时的空气消毒,可间隔开关消毒器,也可连续开机进行消毒。

## (三)臭氧空气消毒器

臭氧发生器产生臭氧,经风机送于空气中,作用于空气中的微生物使其氧化而死亡,达到消毒。该类消毒器不能用于人在时的空气消毒。

臭氧浓度  $\geq 20 \text{ mg/m}^3$ ,在相对湿度  $\geq 70\%$  条件下,消毒时间  $\geq 30 \text{ min}$ 。消毒时人必须离开房间,消毒后待房间内闻不到臭氧气味时才可进入房间。

## 四、消毒剂喷雾

用气溶胶喷雾器将消毒剂喷于空气中,使消毒剂与空气中的微生物作用,以杀灭空气中的微生物。该方法消毒效果可靠,杀菌谱较广,但对物品有一定的腐蚀性,对人有一定的刺激性,不能用于人在时的空气消毒。

1.过氧乙酸喷雾消毒 0.8%过氧乙酸喷雾  $20 \text{ ml/m}^3$ ,作用 60 min 可杀灭空气中的细菌繁殖体、真菌、细菌芽孢和病毒等。用气溶胶喷雾器喷雾,0.05%过氧乙酸,喷雾  $20 \text{ ml/m}^3$ ,作用 30 min 可杀灭各种细菌繁殖体;0.8%过氧乙酸,喷雾  $20 \text{ ml/m}^3$ ,作用 60 min 对枯草杆菌黑色变种芽孢杀灭率可达 99.9% 以上。

2.过氧化氢喷雾消毒 用气溶胶喷雾器喷雾,1.5%过氧化氢,喷雾  $20 \text{ ml/m}^3$ ,作用 30~60 min 可杀灭空气中的细菌繁殖体、真菌和病毒等病原微生物。

3.过氧化氢复方空气消毒剂喷雾按  $50 \text{ mg/m}^3$  过氧化氢的喷雾量,在相对湿度为 60%~80% 时,室温下作用 30 min,可达到消毒要求。

## 五、消毒剂熏蒸

1.过氧乙酸熏蒸 将过氧乙酸稀释成 3%~5% 水溶液,过氧乙酸用量按  $1 \text{ g/m}^3$ ,加热熏蒸,在相对湿度 60%~80% 条件下,室温作用 2 h,可达到消毒效果。

2.乳酸熏蒸 用乳酸加热熏蒸可杀灭空气中的细菌,浓度高杀菌效果好。如对病房空气进行消毒,按  $10 \text{ ml/m}^3$ ,乳酸浓度达 15% 时,能得到较好的消毒效果。

3.中草药熏蒸 中草药加热熏蒸对空气中的细菌有一定杀灭作用。如用苍术加热熏蒸,用  $1 \text{ g/m}^3$  使室内空气中的细菌消亡率达 78.1%~79.6%。如熏蒸前对室内进行清洁处理,消亡率可达 86.8%~90.1%。

## 第二节 空气消毒效果评价方法

### 一、平皿沉降方法

1. 采样时间 选择消毒处理后于进行医疗活动之前采样。

2. 采样高度 与地面垂直高度 80 ~ 150 cm。

3. 布点方法 室内面积  $\leq 30 \text{ m}^2$ , 设一条对角线上取 3 点, 即中心一点、两端距墙 1 m 处各取一点; 室内面积  $> 30 \text{ m}^2$ , 设东、西、南、北、中 5 点, 其中东、西、南、北点均距墙 1 m。

4. 采样方法 消毒前、后分别用 9 cm 直径普通营养琼脂平板在采样点暴露 5 ~ 10 min 后送检培养。同时取 2 个未经采样的普通营养琼脂平板做阴性对照, 一同放在 37℃ 培养 48 h 后计数。

5. 结果计算

空气中总菌数( cfu/m<sup>3</sup>) = 50 000 N/AT

注: A = 平板面积( cm<sup>2</sup>)

T = 平板暴露空气中的时间

N = 平均菌落数( cfu)

消亡率 =  $\frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\%$

6. 消毒效果评价 3 次重复试验, 每次的自然菌消亡率均  $\geq 90\%$  者为合格。

### 二、筛孔式采样器采样法

1. 现场的选择: 根据使用时的实际情况, 选择有代表性的房间并在室内无人情况下进行消毒效果观察。

2. 采样点设置: 采样器置室中央 1.0 m 高处。房间大于 10 m<sup>2</sup> 者, 每超过 10 m<sup>2</sup> 增设一点。

3. 试验方法: 在消毒处理前用筛孔式采样器进行空气中自然菌采样, 作为消毒前样本( 阳性对照)。

按要求进行消毒处理, 作用一定时间。

再用同样方法作一次采样, 作为消毒后的试验样本。

4. 试验采样完成后, 应将未用的同批培养基, 与上述试验样本同时进行培养, 作为阴性对照。37℃ 培养 48 h 计数。如阴性对照组有菌生长, 说明所用培养基有污染, 试验无效, 更换后重新进行。

5. 试验重复 3 次或以上。计算出每次的消亡率。

6. 结果计算:

消亡率 =  $\frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\%$

7. 消毒效果评价: 除有特殊要求者外, 对无人室内进行的空气消毒, 每次的自然菌消亡率均  $\geq 90\%$  者为合格。此外, 还应使室内空气中细菌总数不超过国家容许标准 ( GB 15982 - 1995 )。

8. 注意事项：注意记录试验过程中的温度和相对湿度。所采样本应尽快送实验室进行微生物检验，以免影响结果的准确性。培养时间对试验结果影响很明显，每次应控制好培养时间。用消毒机消毒时，培养基中应加入相应的中和剂。

第三节 空气微生物卫生标准

一、世界卫生组织推荐的医院内各类房间空气细菌标准

见表 14-2。

表 14-2 医院各类房间室内空气细菌标准

要求类别	细菌数(个/m <sup>3</sup> )	房间类型
I 级	< 10	器官移植、心血管、矫形外科等手术室,保护性隔离病房等
II 级	< 200	急诊等手术室、供应室、中心灭菌单位、术后恢复室、早产儿室、重症监护病房
III 级	200 ~ 500	普通病房、治疗室、小手术室、按摩室、体疗室、无菌贮存室、实验室
IV 级	...	传染病病房、同位素科
V 级	...	卫生间、贮存室等

二、我国医院消毒卫生标准(GB 15982-1995)

见表 14-3。

表 14-3 我国医院各类环境空气洗菌菌落总数卫生标准

环境类别	范 围	标准(cfu/cm <sup>2</sup> )
I 类	层流洁净手术室、层流洁净病房	≤10
II 类	普通手术室、产房、婴儿室、早产儿室、烧伤病房、重症监护病房、供应室无菌区、普通保护性隔离区	≤200
III 类	儿科病房、妇产科检查室、注射室、换药室、治疗室、供应室清洁区、急诊室、化验室、各类普通病房	≤500

(姚楚水)

参考文献

1 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 年 11 月  
2 GB 15982-1995,医院消毒卫生标准,1995 年  
3 姚楚水,古希波,丁兰英,等.循环风消毒机与紫外线灯对空气消毒效果的比较.中国消毒学杂志,2001;18(2):111  
4 王卫霞.我国医院室内空气消毒方法研究进展.中国消毒学杂志,2000;17(4):222

## 第十五章 食饮具消毒

“食（饮）具”这一术语尚未见正式的条文解释，在《食品工具、设备用洗涤卫生标准》（GB14930.1-94）中对食品用工具、设备定义为“指食品生产经营过程中接触的机械、管道、传送带、容器、用具、餐具等”。在《食（饮）具消毒卫生标准》（GB14934-94）中规定该标准的适用范围是宾馆、饭店、餐厅、食堂等饮食企业的食（饮）具和个体摊点的食（饮）具。因此，食（饮）具的消毒管理主要是针对这些场所的食品加工机械、容器、用具、餐具和饮具，也包括进餐时使用的湿餐巾、餐巾纸、牙签、水果签等。当然，对食（饮）具的消毒管理除饮食企业和个体摊点外，还应注意一些临时性非营业性聚餐如结婚、生子、节口、丧事和交际性聚会的食（饮）具消毒和一些抗洪工地、水利工地和建筑工地临时性食堂的食（饮）具消毒。这些非营业性聚餐因时间、地点不易被卫生监督部门掌握，容易被忽视，这些场所常常受消毒人员技术水平低和消毒药械不足等因素的影响，又是食（饮）具消毒工作的薄弱之所在，很容易因此发生食物中毒和肠道传染病的流行。

一些经口传播的传染病如霍乱、伤寒、痢疾、甲型肝炎、戊型肝炎、肠结核和细菌性食物中毒等均可由食（饮）具直接将病原体传染给易感者使其发病，一些病原体也可污染食物后在食物中进一步生长繁殖，产生毒素，使进食者发病。因此，消毒食（饮）具就是要杀灭食（饮）具上可能存在的一切致病微生物，保证进食者的健康安全。我国的《食品卫生法》、《传染病防治法》及其实施方法都对饮食企业提出了严格的卫生要求。我国还在 1999 年发布了《食（饮）具消毒卫生标准》，《食品工具、设备用洗涤卫生标准》、《食品工具、设备用洗涤消毒剂卫生标准》等国家标准，非常明确、详细地规定了用于食（饮）具的洗涤剂、消毒剂和洗涤消毒剂的卫生要求和食（饮）具洗涤、消毒后感官指标、理化指标、细菌指标、采样与检验方法及食（饮）具消毒卫生管理规范等，我国卫生部 2000 年发布的《消毒技术规范 - 实验技术规范》详细地规定了食（饮）具消毒效果的监测方法。这些法规的公布实施，极大地促进了食（饮）具消毒工作的规范化进程，大大减少了食（饮）具传播肠道传染病的机会。

食（饮）具因其接触食品，易粘有有机物，为保证消毒效果，一般在消毒前先将食（饮）具清洗干净后再消毒。为避免消毒后残留的消毒剂对人体的潜在危害，一般首选无化学物残留的物理消毒方法或臭氧水消毒，使用消毒剂消毒时，消毒剂应通过安全性评价和消毒效果鉴定。

进行食（饮）具消毒时，应注意选择合适的消毒方法，执行食（饮）具消毒的卫生管理规范，做好消毒后效果评价。

### 第一节 常用消毒方法

食（饮）具消毒按消毒因子的不同可以分为物理消毒、化学消毒和混合消毒三种，物理消毒包括煮沸消毒、蒸汽消毒、红外线消毒、烧烫消毒和机械除菌等，化学消毒常用的消毒药剂有含氯消毒剂、高浓度臭氧水等，也可用碘伏、过氧乙酸、新洁尔灭等。混合消毒指几种消毒因子共同作用，如某些洗碗机既包括机械冲洗，也包括加温和使用消毒药剂，又如煮沸消毒时加入一

定量的碱等。

### 一、热水消毒

煮沸消毒所需设备简单,方法简便易操作,消毒效果可靠,只要沸水浸没消毒物品后煮沸一段时间即可。煮沸消毒本身尚有去油污的作用,可作为小型餐饮业食(饮)具消毒的首选,家庭中也常用此法。煮沸消毒时因水的沸腾使食(饮)具之间相互磨擦碰撞,瓷质餐具易破损,一些高档餐具消毒时多不用此法。为避免此缺点,有些消毒设备把水温控制在 **90℃**左右,既有很好的消毒效果,又不会因水沸腾时撞损餐具。由于水的体积太大时不易操作,且煮沸消毒时间较长,食(饮)具消毒量较多时多不选用煮沸法。一些常见细菌在沸水中很快死亡,一般煮沸 **3~5 min** 即可有效杀灭食(饮)具表面的细菌繁殖体。对于乙型肝炎,由于至今没有直接评价乙型肝炎病毒杀灭效果的实用方法,而 **HBsAg** 较耐热,**100℃** 短时间内不易破坏其抗原性。为保险起见,煮沸 **10 min** 以上较可靠。在《食(饮)具消毒卫生标准》中要求煮沸 **10 min**。有时,可在水中加些苛性碱,既增强消毒效果,也能去油污。虽然理论上讲,水温 **56℃** 以上作用半小时即可起到消毒作用,但此法对食(饮)具消毒既不实用也不可靠。如将消毒物品放在不连续加热的热水中,水温常因此下降,满负载时水温下降更明显。有人证明把金属网制的笼子内装满碗碟后放进约 **1 m<sup>3</sup>** 装满 **76.5℃** 热水的容器中,水温会下降至 **42~45℃**,在此温度下的热水起不到消毒作用。

洗碗抹布用煮沸消毒法消毒也非常简便、可靠。煮沸时间应在 **10 min** 以上。煮沸消毒时盆、碗、盘、碟应直立放置,最好设计专用的托架,使每件食(饮)具的表面均能迅速接触沸水,以保证消毒效果,而不可叠着平放,避免由于紧密叠合阻碍热交换使叠合部位升温过程迟缓。消毒完成后应迅速沥干水分,保持干燥,避免因潮湿而易于细菌生长,但不宜用抹布擦干以避免二次污染。

煮沸消毒一定量的食(饮)具后,水中可能会出现浮油和残渣,应酌情及时换水或定时、定量换水,以确保消毒后的食(饮)具表面光洁,无油浸,无水渍。

### 二、蒸汽消毒

蒸汽消毒与煮沸消毒一样,属于湿热消毒。设计合理的蒸汽消毒装置是进行蒸汽消毒的前提,应根据食(饮)具的数量,供汽量大小确定蒸汽消毒柜的容积,当食(饮)具少、供汽量小时应设计容积较小的消毒箱,反之,当食(饮)具多、供汽量大时可设计容量较大的消毒柜,如果供汽量小,蒸汽消毒装置的容积过大则会出现升温迟缓,甚至达不到消毒要求。

影响蒸汽消毒效果的因素主要是蒸汽消毒柜内的蒸汽温度和消毒作用时间。蒸汽温度与蒸汽压力和蒸汽供给量密切相关,消毒操作时适时排放冷气也有利于温度加速升高。

《食(饮)具消毒卫生标准》(GB14934-94)要求蒸汽消毒保持 **100℃** 作用 **10 min** 以上。消毒时应注意观察、记录消毒箱内的温度和作用时间。蒸汽箱上的温度计是显示箱内温度的测量设备,应定期校准,确保达到所需消毒温度。

蒸汽消毒柜的体积可大可小,适用于各种规模的餐饮业、食堂使用,蒸汽消毒升温较快,较煮沸消毒省时,且不损坏食(饮)具,适于一切耐热、耐温物品的处理。

蒸汽消毒需要一定的设备投入,蒸汽虽可自制但其供汽温度和供汽量不易掌握,最好有专用蒸汽锅炉供汽,蒸汽消毒时要按设计好的规程操作,人员应经过培训,消毒柜在使用前应通



过鉴定，使用期间应定期检测，评价消毒效果。蒸汽消毒柜及其供汽管线要及时维护，出现蒸汽滴、跑、漏时既影响周围环境也影响供汽质量和消毒效果。

### 三、红外线消毒

是利用红外线产生的热量杀灭食（饮）具上的微生物。市场上最常见的是红外线消毒柜，已大量进入普通居民家庭。一般认为，消毒柜各点的温度在  $120^{\circ}\text{C}$  以上，消毒作用时间  $15 \sim 20 \text{ min}$  即可起到可靠的消毒作用。但由于缺少有效的评价杀灭乙型肝炎病毒的方法，用 HBsAg 作为乙型肝炎病毒的标志物时，此消毒温度和作用时间很难破坏 99.9% 以上的 HBsAg，一些生产厂家因此将消毒柜的温度设置到  $150^{\circ}\text{C}$  左右，作用时间延长到  $30 \text{ min}$ 。消毒结束后待消毒柜的温度下降至  $80^{\circ}\text{C}$  以下再开启柜门，避免烫伤。

红外线消毒碗柜一般预置了一种或几种消毒程序，操作非常简单，有些消毒柜还附带其他功能如食品加热、保温等，适合普通居民家庭使用。通常，红外线消毒碗柜容积较小，能源消耗大，不适宜于大、中型餐饮单位使用。使用红外线消毒柜消毒的餐具，消毒前应清洗干净并沥干水分，以避免污物或水垢在食（饮）具上烧结、沉积后影响外观，也避免水珠滴溅在红外线灯管上缩短其使用寿命。易燃易爆物品如塑料餐盒、抹布等不可用此法消毒。

### 四、洗碗机消毒

洗碗机的种类、型号很多，有些洗碗机具有消毒能力。有消毒能力的洗碗机常通过加温、添加消毒剂（或洗涤剂同时也是消毒剂）达到消毒效果。这类洗碗机常有两个过程，首先是在  $50^{\circ}\text{C}$  左右的水中用洗涤剂冲洗，此过程约需  $1 \sim 2 \text{ min}$ ，再在  $85 \sim 90^{\circ}\text{C}$  的水中浸泡  $30 \sim 60 \text{ s}$ 。此热水中还加有一种表面活性剂，当食（饮）具出水时，能促使其表面附着的水结成珠落下，这类表面活性剂常称为催干剂，也有一定的杀菌作用。

这类洗碗机因洗消一体，周转快，洗消量大，在我国一些宾馆和餐饮业使用广泛，在西方国家也广泛应用。但国外有资料表示不能肯定此类洗碗机对结核杆菌的杀灭效果，我国肝炎患者较多，此类洗碗机能否杀灭甲型、乙型肝炎也需要进一步的实验。

### 五、臭氧消毒

臭氧因其杀菌速度快和无残留的特点，渐广泛使用于饮用水和污水的消毒处理，近些年也尚试着用于食（饮）具的消毒。臭氧消毒有臭氧气体消毒和臭氧水消毒二种，一般认为前者用于物体表面消毒的效果不理想。臭氧水在低浓度时也难有较好的消毒效果。臭氧水可通过臭氧水机直接生产，也可由臭氧机产生的臭氧气体通入水体中使其充分溶解于水而成。后一种方法生成臭氧水时，因有些臭氧来不及溶于水就进入了空气，易造成工作环境中的臭氧含量过高，影响人体健康。工作环境中臭氧量应  $< 0.1 \text{ mg/m}^3$ 。有资料显示，臭氧水机生产的臭氧水含氧量在  $12.5 \text{ mg/L}$  以上，流量在  $3 \text{ L}$  时，流动浸泡  $90 \text{ min}$  可消除食（饮）具上的所有大肠杆菌。如何缩短消毒时间，如何使臭氧水循环重复利用，避免水资源浪费，是臭氧水机能否广泛用于食（饮）具消毒的关键问题。

臭氧水用于食（饮）具消毒时，易受有机物的影响。实验中加入蛋白胨或小牛血清可明显影响臭氧水的消毒效果。实际应用时，消毒前应将食（饮）具清洗干净，减少有机物的影响，反复擦洗食（饮）具有利于保证消毒效果。擦洗下的微生物在臭氧水中很快死亡，一般不超过

1min。因臭氧易分解,无残留,用臭氧水消毒后可不再用清水冲洗,直接沥干即可。

## 六、其他消毒剂消毒

可用于食(饮)具消毒的消毒剂较多,如各种含氯消毒剂、碘伏、季铵盐等。应选择消毒能力和安全性被证实的消毒剂,消毒剂应获得相关部门的许可,一般只有在不能用煮沸、蒸汽、红外线、臭氧、洗碗机等进行消毒时,才选用消毒剂消毒。

含氯消毒剂是应用最广泛的消毒剂。其价格低,消毒效果可靠,常用于宾馆、饭店、食堂、家庭,特别是野外工地、灾区的食(饮)具消毒。用漂白粉、二氯异氰尿酸钠等含氯消毒剂时,有效氯 250 mg/L 的溶液作用 5 min 后一般可杀灭各类繁殖体,如要破坏 HBsAg 的抗原性,则需用有效氯含量 800 ~ 1 200 mg/L 的溶液作用 10 ~ 15 min。有机物能影响消毒效果,一般,消毒前应将食(饮)具清洗干净。有些含氯洗消剂是例外,清洗、消毒可同时完成。用漂白粉、次氯酸钠等含氯消毒剂时,要注意有效期,即使在有效期内,也要注意其是否因潮湿、包装破损而影响使用效果。消毒剂应现配现用,不可存放后反复使用。要注意温度对消毒效果的影响,温热溶液较凉冷溶液的消毒效果好。含氯消毒剂对皮肤有刺激作用,操作时应戴塑料手套,避免直接接触皮肤,要防止溶液溅入眼睛,为此可戴防护镜。食(饮)具用含氯消毒剂洗消后,应用清水冲洗干净,使其符合游离性余氯  $<0.3$  mg/L,烷基(苯)磺酸钠  $<0.1$  mg/100 cm<sup>2</sup> 的国家标准,避免对人体健康的可能影响。

过氧乙酸也可用于食(饮)具的消毒。其价格较贵,高浓度时对皮肤有强烈的刺激作用,并有很强的氧化能力。其消毒作用也易受有机物的影响。因此,操作时应戴塑料手套和防护眼镜,餐(饮)具消毒前应冲洗干净。过氧乙酸虽可自然分解和挥发,但为防止消毒剂所含杂质对人体健康的影响,餐(饮)具消毒后应用清水冲洗。

碘伏也可用于食(饮)具消毒,但因碘可与食(饮)具上残留的淀粉产生颜色反应。因此,碘伏用于消毒时不易被普遍接受。

季铵盐也曾用于食(饮)具消毒,但它不能杀灭结核杆菌,应用受到限制。

## 七、其他消毒方法

### (一)火烧

筷子、碗、勺在火焰上快速往返数次,可起到一定的消毒作用,此法可供外出旅行对餐具卫生不放心时选用,家庭用菜板、菜刀在切熟食前为消毒也可在火焰上往返数次。掌握好火烧时间的长短是既使消毒有效又不至于损坏物品的关键。

### (二)水烫

将碗、筷、杯、勺等在热水中浸烫数分钟,可起到一定的消毒作用。用此法消毒效果不可靠,只可供外出旅行时个人选用。

### (三)冲洗

冲洗是一种机械除菌作用。一般认为有效冲洗后可去除 90% 的微生物。此法用水量大,并要求水质清洁卫生且效果不可靠,一般少采用。

### (四)消毒餐巾

用浸有消毒液的一次性餐巾擦抹食(饮)具可起到一定的消毒作用,消毒后应用水清洗食(饮)具。

## 第二节食（饮）具消毒的卫生管理

对共用食（饮）具，其消毒效果的好坏直接关系到使用者的健康安全，而消毒效果不能通过肉眼直接判断，需要进行必需的微生物学检测，检测本身是抽样进行的，理论上讲，这并不能保证食（饮）具 **100%**安全，而且这种检测需要一定时间，常常是检测结果未出来而食（饮）具已经被使用。可见，加强食（饮）具消毒的卫生管理，确保消毒过程安全有效是非常必要的。食（饮）具消毒的卫生管理包括对操作环境的管理，操作人员资质的认可，消毒设备和消毒剂的许可，对消毒程序的要求，对水质的要求，消毒后与食（饮）具的保洁，定期进行消毒效果评价等内容。

### 一、操作环境

食（饮）具消毒间必须清洁、卫生，水源充足，远离厕所，无有害气体、烟雾、灰沙和其他有毒有害物品。应严格防止蚊、蝇、鼠进入和隐匿。垃圾桶、垃圾袋及时清运，熟食间的食（饮）具应单独清洗、消毒。

### 二、操作人员

操作人员应健康无传染病如肝炎、痢疾、伤寒与副伤寒、结核病和化脓性皮肤病，也不得为上述传染病病原体携带者。应定期（通常是每年一次）进行健康体检取得健康合格证，操作人员要注意个人卫生，做到勤洗澡、理发、剪指甲、洗衣服，上班前及大、小便后要洗手消毒。操作人员应接受食品卫生法及相关技能的培训，掌握消毒设施和消毒剂的使用方法和有关注意事项。

### 三、消毒设备与消毒剂

消毒设备使用前应通过能力鉴定，确保其具有消毒能力，批量生产的产品应获卫生主管部门的卫生许可。消毒设备上的温度计、压力计应定期检测校准，对消毒设备进行大修后可能影响消毒能力时应重新进行能力评价。消毒设备的说明书应告知可能影响消毒效果的因素。

消毒剂应有卫生主管部门的卫生许可，确保消毒剂的使用安全、可靠，消毒剂应标示配制方法，使用浓度，贮存条件，有效期及注意事项等。要尽量减少消毒剂对物品的损坏和对环境的破坏，要严格按照说明书贮存、配制和使用消毒剂。

### 四、消毒程序

要执行严格的消毒程序，建立一洗、二清、三消毒、四保洁的工作制度。对煮沸、蒸汽和红外线消毒一般按除渣→洗涤→清洗→消毒程序进行。洗碗机消毒一般先进行除渣、清洗后再将餐饮具放入洗碗机洗涤、清洗和消毒。化学消毒一般按除渣→洗涤→消毒→清洗程序进行，用洗消剂时可将洗涤、消毒合为一个步骤。用臭氧水时消毒后可以不冲洗。

### 五、水质

用于冲洗、煮沸食（饮）具的用水应符合生活饮用水卫生标准，确保食（饮）具不因此受到污染。

## 六、保洁

消毒后的食(饮)具沥干水分后应放在专门的存放柜,避免与其他物品混放。对存放柜应定期进行消毒处理,保持其干燥、洁净。存放柜应通风、防尘、防蝇、防鼠,确保食(饮)具清洁卫生。存放柜应置于干净卫生的场所,不可与去渣工序中使用的垃圾桶一同放置。

### 第三节食(饮)具消毒水平评价

食(饮)具消毒水平评价依实施阶段和目的的不同可分为对用于食(饮)具消毒的设备和消毒剂的能力评价和对食(饮)具消毒后的效果评价两种。对食(饮)具消毒的设备和消毒剂的能力评价多采用模拟现场实验的方法,常常是在食(饮)具表面涂一定量的菌液,消毒后再从涂菌部位采样,计算出消毒样品的杀灭率来评价消毒设备和消毒剂的消毒能力。这种方法实验条件控制较严,一般是模拟最难消毒条件下的消毒能力。对食(饮)具消毒后的效果评价用现场抽样的方法,观察食(饮)具消毒后有无大肠杆菌生长。这种方法需连续常年进行,以随时发现问题。这两种方法相辅相成,而常常被混淆。

#### 一、指示物

大肠杆菌常常被作为水体受粪便污染程度的指示菌。食(饮)具消毒主要是杀灭肠道传染病病原体,故与这些病原体相伴的大肠杆菌也被作为食(饮)具消毒的革兰阴性肠道杆菌指示菌。

因为一些食物中毒与金黄色葡萄球菌及其产生的肠毒素有关,金黄色葡萄球菌也是评价食(饮)具消毒效果的指示菌之一。在进行消毒设备和消毒剂的能力评价时,常用其作为革兰阳性球菌的指示菌。

进行消毒设备和消毒剂能力评价时,HBsAg 作为乙型肝炎病毒是否被灭活的指示物。虽然 HBsAg 对热和一些常见消毒剂不敏感,但因没有直接评价 HBV 灭活效果的方法,HBsAg 仍经常被用作指示物。

某些病毒和噬菌体如脊髓灰质炎病毒、疱疹病毒、甲型肝炎病毒、柯萨奇病毒、轮状病毒、F2 嗜菌体、M2 嗜菌体有时也被作为肠道病毒的代表,可用于食(饮)具消毒效果的评价。

#### 二、样本量与抽样方法

应根据不同目标确定样本量和抽样方法。进行能力评定时,用数理方法确定样本量受许多制约,不易推广,一般由有关专家综合各种条件,提出一个样本量,通过规范、标准等发布,在一定范围内实施。进行效果评定时,如何抽样,样本量如何确定有许多技巧,如为确保消毒效果,对热力消毒柜可选择每日首次使用时,在满载时抽样,应包括气温较低的部位,如靠近门、靠近排气口、靠近底层位置的样品,对消毒剂消毒样品应包括放置时间最短和最后消毒的样品,对洗碗机消毒则应包括洗碗机工作至最长时间换水前的样品。采样还要包括最不易被消毒的物品如热传导慢、阻碍蒸汽流通的容器,表面粗糙的物品如木筷、刀叉等,只有这些最不易消毒的样品有效消毒了,才能保证各消毒物品被有效消毒。我国《食(饮)具消毒卫生标准》(GB14934-94)规定每次采样量为 6~10 件。主要是考虑检测能力。

### 三、染菌与采样方法

#### (一)染菌方法

进行模拟现场试验时,常用碗(或盘)筷作为试验载体,染菌面积为  $25\text{ cm}^2$ ,染菌量为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6\text{ cfu/cm}^2$ ,菌液常加入 1%蛋白胨,也可加入小牛血清等。为保证菌液在餐具表面快速均匀干燥,菌液不宜滴加太多,一般是  $20 \sim 200\text{ }\mu\text{l}$ /件。

#### (二)采样方法

1.涂擦法 棉签头浸湿 PBS(化学消毒用中和剂)后在染菌区来回涂抹数次,剪下放入含 PBS 或中和剂的相应试管。

2.洗法 染菌碗或盘内加入适量 PBS 或中和剂,用尼龙棒在染菌区内来回刮洗  $1 \sim 2\text{ min}$ 。吸入试管内,筷子可直接在特制的试管内振打。

3.大肠菌群快速检验纸片 每件粘纸片两张,每张纸片面积  $25\text{ cm}^2(5\text{ cm} \times 5\text{ cm})$ ,用无菌生理盐水湿润大肠菌群检测用纸片后,立即贴于食具内侧表面,  $30\text{ s}$  后取下,置于无菌塑料袋内

### 四、检验方法

1.涂擦法和刮洗法采取的样品充分振打后取适当稀释度的液体接种,用胰蛋白胨大豆蛋白胨琼脂培养基(TSA)培养  $48\text{ h}$  进行菌落计数,或接种于胰蛋白胨大豆蛋白胨肉汤(TSB)培养  $48\text{ h}$ ,观察有无细菌生长。

2.对已采样的大肠杆菌快速检验纸片置  $37^\circ\text{C}$  培养  $16 \sim 18\text{ h}$ ,若纸片保持紫蓝色不变,为大肠菌群阴性,纸片变黄并在黄色背景上呈现红色斑点或片状红晕为阳性。

### 五、合格标准

一般要求消毒后大肠杆菌杀灭率达到 100%或食(饮)具上不得检出方为合格。对金黄色葡萄球菌、HBsAg 和病毒的消毒效果一般认为达到 99.9%~99.999%即为合格。

每件“食(饮)具上大肠杆菌不得检出”的要求非常严格,一些地方规定消毒合格率达到 80%以上即可。

(张流波)

### 参考文献

- 1 跃进,周明河,黄任.我国餐具消毒的一些情况.中国消毒学杂志,1992;9(3):176
- 2 白希尧,张宏,马安成等.臭氧溶液杀菌的研究.中国消毒学杂志,1993;10(1):7
- 3 杨信祯,胡善联,任世玲.二氯异氰尿酸钠对乙型肝炎消毒试验中所用指示物的比较.中国消毒学杂志,1993;10(3):136
- 4 林立辉.餐具含氯消毒剂研究近况.中国消毒学杂志,1994;11(3):168
- 5 江永忠,岳木生,喻允华等.远红外线消毒柜杀菌消毒效果及其影响因素的试验观察.中国消毒学杂志,1998;15(1):6

## 第十六章 血液及其制品的消毒

近十多年来,随着采血、贮血和输血技术的发展,从全血中分离制备出了各种成分制品,如冰冻血浆(FFP)、浓缩红细胞、浓缩白细胞、浓缩血小板、各种凝血因子、白蛋白、丙种球蛋白等,为临床合理应用提供了较为广泛的选择余地。同时,由于胸、心、颅等外科手术的广泛开展,使临床用量迅速增加,以致通过输血和应用血制品传播疾病的机会也相应增多。尽管对献血员进行了严格的筛选,但经输血传播的疾病,尤其是病毒性疾病,特别是输血后肝炎和艾滋病等仍难彻底避免。因此,保证输血的安全,减少疾病的医源性传播越来越受到各国的重视。同自身输血(即大手术前分次采集自身血液以便手术时输回体内)、全氟碳人造血和代血浆的研究一样,血液成分制品的消毒研究,近几年也取得了较大进展。

### 第一节 血液成分制品消毒的特点

1. 血液中携带的微生物多种多样,其存在的方式也不尽相同。有的存在于血浆中,形态结构完整并具有感染性,称自由形式。各种细菌和大量的病毒均有以自由的形式存在于血浆中,这也是消毒的主要目标所在。但某些病毒可在正常的血细胞中复制繁殖,其基因组多以游离的形式存在于细胞浆中,也可以整合到血细胞的核酸内成潜伏状态(称前病毒),如艾滋病病毒(HIV)、人T淋巴细胞1型病毒(HTLV-I)和巨细胞病毒(CMV)等,称血细胞相关形式。此外一些寄生虫,主要是疟原虫和巴贝虫(*Babesia*)有红细胞内期。在输血等传播的疾病中,尤以病毒性疾病为主,其中最常见的是输血后肝炎与艾滋病(表16-1)。

表 16-1 经血液传播的主要病毒

病毒种类	病毒特征	大小(nm)	正常人群 携带率(%)	正常人群 抗体阳性率(%)
HBV	环状双链 DNA 有胞膜	42	0.1 ~ 15	0.2 ~ 60
HCV	单股正链 RNA 有胞膜	45 ~ 50	0.5 ~ 1	2 ~ 3
HDV	单股负链 RNA 有胞膜	35 ~ 37	0 ~ 2	0 ~ 20
HIV	单股正链 RNA 有胞膜	110	0.0005	< 1
HTLV	单股正链 RNA 有胞膜	80 ~ 100	...	≤0.017
CMV	双链 DNA 有胞膜	200	14 ~ 19	40 ~ 100
EBV	双链 DNA 有胞膜	150 ~ 180	16.4	50 ~ 90
HPV	单链 DNA 无胞膜	18 ~ 26	...	50

注: HTLV 为人 T 淋巴细胞病毒; EBV 为 EB 病毒; HPV 为人细小病毒

2. 血液成分制品的消毒, 还需要注意以下原则: ①不能造成新的危险, 消毒因子本身或其与血液成分反应产物不能带有急、慢性毒性作用; ②不能因消毒而使血液成分发生变性, 从而产生新的免疫原, 使长期使用者发生免疫反应性疾病; ③要保持血液消毒后的终产品仍然具有

正常的生理活性;④消毒的方法要简便、经济、可行,无需大量人力、设备和空间。

3. 消毒研究技术上的难点。因为经输血传播的疾病,危害较大的主要是病毒性疾病,特别是乙型、丙型肝炎和艾滋病等。然而,目前 HBV 无培养系统,其试验须在灵长类动物中进行,丙型肝炎病毒(HCV)有待分离,HIV 工作还有一定的危险性。所以,消毒研究工作须用致病或不致病的指示病毒进行试验。其结果还需经动物试验和临床试验进行验证。但大量使用灵长类动物有经济和来源方面的困难,而在临床上使用未处理的有危险性的血制品也有伦理方面的问题。

## 第二节 物理消毒法

### 一、热力

血液成分中仅有小部分血浆蛋白在溶液中耐热,适于热力消毒。提高蛋白热稳定性的方法(加稳定性或改变其他条件)对病毒同样有稳定作用。由于变性和代谢的破坏,热力对全血或细胞成分的消毒是不可能的。对全血浆的消毒,仅有一种探索性的高温( $65 \sim 85^{\circ}\text{C}$ ),短时( $0.006\text{ s}$ )微波加热系统报告,初步结果表明,能杀灭  $\geq 4.4 \log$  HIV、疱疹性口炎病毒(VSV)和脊髓膜炎病毒(EMV),并能保证绝大部分蛋白的结构与活性。热力用于血浆蛋白制剂的消毒效果较好。人白蛋白加稳定剂后加热,从未报告过有病毒的传播。凝血因子制剂的热力消毒,现已证实 80 年代早期使用的冻干制品  $60 \sim 68^{\circ}\text{C}$ ,  $24 \sim 72\text{ h}$  干热处理不能完全灭活肝炎病毒和耐热 HIV。目前采用的是更强烈的热处理方式(冻干,  $80^{\circ}\text{C}$ ,  $72\text{ h}$ ),消毒后的产品,经 32 例临床使用,无一例发生乙型或丙型肝炎和艾滋病。目前英国 BPL 公司即用该方法消毒凝血因子 VIII 和因子 IX 浓缩物。最近还有将凝血因子冻干制剂进行  $100^{\circ}\text{C}$  处理的报告。有多家公司用巴斯德消毒法处理因子 VIII 浓缩物,经多年临床观察未发现 HIV 和 HCV 感染者,德国 Behringwerke 公司还用于因子 IX 浓缩物的消毒。Uemura 等还报告,在热稳定剂的保护下,液体  $60^{\circ}\text{C}$  加热 10 h 后再用聚乙二醇分离,可用于人免疫球蛋白的消毒。然而上述方法对耐热无脂壳的细小病毒相对无效。Alpha 公司曾将凝血因子制剂悬浮于  $n$ -庚烷,  $60^{\circ}\text{C}$  作用 20 h,但临床上仍有少量病例感染肝炎的报告。另外,将湿润的冻干浓缩物暴露于  $60^{\circ}\text{C}$ ,  $1\ 190\text{ mbar}$  热蒸汽作用 10 h,也是一种较为安全的方法 Immuno、Austria 等欧洲厂家已在使用。

### 二、辐射

单纯紫外线用于血液制品的消毒有一定的局限性。如 Rasheed 报告,紫外线照射可减少 HIV-1 细胞病变的形成,但对整合状态的前病毒形式作用较小,紫外线处理后仍有以内源性 RNA 为模板的 DNA 的形成。Prodouz 等用脉冲 XeCl 激光器产生的  $308\text{ nm}$  紫外线,在  $10 \sim 20\text{ J/cm}^2$  时,可使血小板制品中的脊髓灰质炎病毒减少 3~5 个对数值,但血小板和凝血酶原等功能变化已近 20%,且有部分凝集。然而, Hart 等报告,紫外线 ( $\leq 280\text{ nm}$ ) 照射对人工染于静脉注射用的免疫球蛋白和白蛋白中的脊髓灰质炎 2 型病毒、牛痘苗病毒、单纯疱疹病毒(VSV)和大肠杆菌 T4 噬菌体,作用  $5\text{ min}$  ( $5\ 100\text{ J/m}^2$ ),可减少 3.3~6.6 个对数值,并对产品中的活性成分影响不大。

电离辐射完全灭活病毒和细菌(减少 6 个对数值),约需 10 Mrad 的剂量,而使用该剂量对

血浆蛋白的结构与功能都会产生较大的破坏作用。电离辐射对全血和血细胞成分的照射主要用于减少其中的淋巴细胞,以降低各种免疫反应。Kitchen 等报告,冰冻血浆中 HIV 的灭活率  $[0.164 \text{ TCID}_{50}/(\text{ml} \cdot \text{kGy})]$  比凝血蛋白原的降解率  $0.00173 \text{ log}/(\text{ml} \cdot \text{kGy})$  大 2 个数量级,并认为在一定程度上使用该方法可行的。Hiemstra 等也报告,保留 80% ~ 85% 凝血酶原活性的辐照剂量( - 80℃)可灭活一定量的 HIV,但不能完全灭活。

### 三、过滤

血浆经过孔径较小( 40 nm)的滤器后,大部分病毒(如 HBV、逆转录病毒)即可分离,如 Hamamoto 等证实,纤维素滤膜可分离血浆中的艾滋病病毒。使用孔径较大的细胞滤器效果就不太理想,如 Bhupat 等在红细胞生产中通过滤除白细胞的方法,可彻底清除  $10^6/\text{ml}$  HIV/H9 细胞及其碎片,但不能去除自由存在的病毒。然而去除白细胞滤器的使用对减少血制品中细胞的污染有一定作用。如用醋酸纤维素滤膜和包被的聚酯滤膜等可去除其中的细菌达 50 个/ml。再人的病原体如丝虫病的微丝蚴或其他寄生虫也可通过滤除细胞成分的滤器得以清除。

用吸附的方法滤除血中的白细胞,可预防血小板等制品中巨细胞病毒的传播。用结合于柱子上的抗体吸附滤除病毒的方法,在理论上是成立的,但抗体及大量生产抗体的方法正有待发展。有人尝试用通常被病毒感染的细胞,作为吸附剂固定于柱子上以滤除病毒,但因有的病毒已经结合于血细胞上,以及血浆蛋白的干扰,该技术最多只能减少 1 个对数值的病毒量。

### 四、洗涤

洗涤技术主要是针对红细胞而言的,它是红细胞的冻存、融化、洗涤去甘油过程中的一个步骤。因大多数血库均有红细胞自动洗涤机,所以实施起来也较为方便。一个洗涤循环即可将病毒滴度减少到 1/25 ~ 1/35 倍。洗涤红细胞已在临床上大量使用。这对减少 HBV 的传播有一定意义。但是由于病毒对红细胞有吸附作用,而大量洗涤有损红细胞功能的恢复,甚至引起溶血,所以单纯洗涤不能保证产品的安全性。

## 第三节 化学消毒法

绝大多数化学消毒剂的作用机理都是与生物大分子起作用的。它们在杀灭微生物的同时也可破坏血液成分。所以对血液成分制品进行单纯化学消毒的进展较缓慢。

Aloisio 等报告,1% 甲醛可保持红细胞和血小板的功能,但不能有效灭活 HIV。Well 等试验证明,在 1% 白蛋白存在时,臭氧可有效灭活 HIV,且保持 90% 凝血因子 VIII 的活性。但当大量有机物如血浆存在或红细胞比容较高时,则其杀病毒作用显著降低。如提高其浓度以灭活 5 ~ 6 个对数值的病毒,则有 30% 红细胞将发生溶血。Rubinstein 报告,对贮存的红细胞,可用 0.23% 次氯酸钠、1.26% 乳酸和 0.9% 氯化钠溶液消毒( 10 ~ 50 s),以杀灭其中的 HTLV - III 和其他病毒,并认为经洗涤后可直接临床应用。Highsmith 等报告,正常人血清和去冷沉淀物血浆中的水泡性口炎病毒(VSV),可用交联聚乙烯吡咯烷酮碘(  $\leq 10 \text{ mg/ml}$ , 4℃ 或 24℃)进行灭活(  $\geq 5 \text{ log}$ ),处理后凝血因子 IX 和 C 蛋白的活性损失 < 10%。Feinstone 等用黑猩猩感染试验证明,血液制品中的 HBV 和非甲非乙型肝炎病毒(NANBHV)可用氯仿灭活其传染性。Rawal 等报告了一种杀菌剂 Nonoxynol - 9 可灭活 HIV,10% 浓度时能灭活  $10^6/\text{ml}$  HIV,经该处理,红细胞需



经洗涤才能贮存,但缺乏对红细胞损伤作用的资料。

Brinda 等发现,硫氰酸钠对血液制品中的病毒有一定灭活作用。对 2 ml 因子 IX 制剂中的 HIV,可用 1 ml 缓冲液(0.01 mol/L Tris-HCl 和 0.02 mol/L EDTA, pH 8)和 1 ml 6 mol/L 硫氰酸钠灭活。如再结合超滤(6.2 nm 孔径的滤膜),可保证产品的安全。该方法对各种血浆蛋白成分,如纤维蛋白原、免疫球蛋白、脂蛋白、血红蛋白和干扰素等的消毒均可使用。有人还报告,苯并茚二醇环氧化物可杀灭  $\geq 10^6$  TCID<sub>50</sub> 组织培养基中的 VSV,但在  $1 \times 10^9$ /ml 红细胞存在时,仅灭活 3 log TCID<sub>50</sub>,试验中未发现红细胞溶解或渗透性变化。甲基-双( $\beta$ -氯乙基)胺盐酸盐(MCA)是一种氮芥,可水解为无毒形式,MCA 0.3~0.5 mg/ml 可灭活  $10^6$  ID<sub>50</sub> 的 VSV,在血浆或全血中,0.45~0.6 mg/ml MCA 处理后,贮存性质不变,但对狗血有明显溶血作用。Shanbrom 发现,甘草三萜烯化合物(glycyrrhizic triterpenoid)可灭活血浆中的 VSV。Kempf 等报告,静脉注射免疫球蛋白生产中,在酸性(pH4)条件下,可用胃蛋白酶灭活 HIV、CMV、VSV、HSV 和 Semliki 森林脑炎病毒。

#### 第四节 免疫中和消毒法

相对于加入化学制剂来说,用免疫中和法除去血液或其成分中游离的病毒是一种合理的选择。自然产生的抗体或单克隆抗体,在攻击潜在病原体方面具有高度的特异性,而且不会产生新的抗原。Brummelhuis 等证明,用免疫中和法去除血浆制品中的 HBV 是有效的。Horowitz 认为,此法可使免疫球蛋白和白蛋白制剂中 HBV 的中和量达  $10^5$  黑猩猩感染剂量(CID<sub>50</sub>)。HIV-1 感染者体内也有中和抗体,而这些抗体虽然在黑猩猩体内试验中未发现中和作用,但在体外试验却呈现有中和作用。中和抗体对 HCV 的消毒作用还有待进一步研究。

#### 第五节 协同消毒法

因为单一因子用于血液制品的消毒总是存在这样或那样的不足,故将两种以上方法联合应用一直是人们研究的重点之一。

##### 一、有机溶剂加洗涤剂

有机溶剂和洗涤剂可溶解和去除病毒包膜的脂质而使病毒灭活,但对无脂质包膜的非甲非乙型肝炎病毒和细小病毒无效。较多文献报告,乙醚、氯仿、三正丁基磷酸酯(TNBP)等与洗涤剂(吐温 80、胆酸钠、Triton X-45、Triton X-100)结合,可灭活血浆蛋白制剂和全血浆中的各种脂质包膜病毒,而几乎不影响凝血因子的活性。通过大豆油和层析法去除,能使终产品中残留消毒剂含量低于 2  $\mu$ g/ml。Prince 等报告,HBV 和 NANB 肝炎病毒 Hutchinson 株,用血清稀释至终浓度为  $\geq 10^6$  和  $\geq 10^4$  CID<sub>50</sub>/ml 后,以 1%吐温 80 加 20%乙醚,4℃作用 18 h,在蒸发乙醚后注射两只黑猩猩,经 6 个月观察未发现血清学和生化方面发病的证据。用未处理的标本再攻击则发病。作者用该方法处理 2 批抗血友病因子制品,经检测,处理后各种活性成分无明显变化。Horowitz 等报告了有机溶剂(0.3% TNBP)和洗涤剂(0.01~1%吐温 80,0.01%~1%胆酸钠,0.01%~0.2%脱氧胆酸钠或 0.04~1% Triton X-100)对抗血友病因子(AHF)制品中指示

病毒(VSV, Sindbis, Sendai, EMC)的灭活效果。结果发现, TNBP加吐温灭活病毒的效果明显优于乙醚加吐温 80, 且 AHF 恢复 90% 以上, TNBP可用 Sephadex G25凝胶过滤去除, 但吐温 80 的去除较难, 即使用分级沉淀法也不太理想。用胆酸钠代替, 则灭活病毒效果相似, 而 AHF 恢复率为 80%, 但容易去除(同样的凝胶过滤)。除血浆脂蛋白外, 电泳法未发现蛋白迁移率的改变。Prince等进一步报告了 0.3% TNBP和 0.2% 胆酸钠结合(30℃, 6 h), 对 HBV、NANB 肝炎病毒和 HTLV - III 的灭活效果, 前两者实验均采用黑猩猩感染法, 后者用组织培养法。结果发现, 该方法可灭活  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/ml HBV 和 NANB 肝炎病毒、 $\geq 10^{4.2}$  TCID<sub>50</sub>/ml 的 HTLV - III。Edwards更就 0.3% TNBP 和 0.2% 胆酸钠处理, 对大范畴的血浆蛋白结构和功能的影响做了进一步测定。结果发现, AHF、因子 VII、因子 VIII、因子 IX、因子 X、纤维蛋白原、正常免疫血清球蛋白、 $\alpha$  干扰素、肿瘤坏死因子、自然或化学合成的血红蛋白等均未出现明显改变。Piszkiewicz等报告, 有机溶剂和洗涤剂结合对 HIV - 2 也有同样的灭活效果。

Piet 等报告了 TNBP 和洗涤剂(吐温 80 或 Triton - X 45)对血浆中病毒的灭活效果。结果发现, 30 ~ 37℃作用 4 h 即可灭活  $10^4$  指示病毒和  $10^6$  HBV。除因子 V 活性下降了 30%外, 各种血浆中凝血因子均保持 90% 以上的活性。最近, Horowitz等又报告, 1% TNBP和 Triton X - 100 30℃作用 4 h, 可灭活新鲜冰冻血浆(FFP)中的病毒, 如  $\geq 10^{7.5}$  ID<sub>50</sub> VSV,  $\geq 10^{6.9}$  ID<sub>50</sub> Sindbis 病毒,  $\geq 10^{6.2}$  ID<sub>50</sub> HIV,  $\geq 10^6$  CID<sub>50</sub> HBV,  $\geq 10^5$  HCV。用处理后的 FFP 免疫小鼠产生的抗血清作免疫反应试验, 证明无新的免疫原出现。

该方法现已被美国、欧洲和南美的许多厂家和公司用于凝血因子制剂的消毒。到 1991 年 2 月已有 170 万份用此方法消毒的凝血因子制剂用于临床, 未见发生肝炎和艾滋病的感染。为了克服其不能灭活无包膜病毒的缺点, Rubinstein 等将该方法灭活的凝血因子产品, 再用 100℃干热作用 10 ~ 30 min, 进一步提高其产品的安全性, 而且产品的活性损失不大。此外, 有人将贮存的血小板浓缩物悬于经该法灭菌的血浆 5 d 后, 与对照血浆比较, 未发现其结构和生理功能的改变, 完全可用于临床。但是该方法对全血浆的消毒, 有待进一步的研究和政府当局的审查与批准。

## 二、光化学消毒

以低能量的光激发某些光敏化合物, 使其产生活性基团, 如自由基、单态氧等, 再作用于生物分子(脂质、DNA、RNA 和多肽), 将其破坏。光敏剂本身一般无杀菌、灭活病毒的作用, 或作用较弱。选择具有特异性结合于病毒和细胞特定部位(如遗传物质等)能力的光敏剂, 有可能在不破坏血液成分的前提下, 灭活其中的微生物。此法目前正引起人们的注意。国外一些实验室已进行了探索性工作, 如补骨脂素类衍生物与长波紫外线结合, 血卟啉衍生物与 630 nm 波长的光结合, 酞菁类染料与红色光结合, 卟吩类染料与可见光结合, 吩噻嗪类化合物与可见光结合等。初步资料显示, 光化学消毒法可以灭活血浆中游离的或细胞内整合的病毒, 故可用于全血、血浆、血细胞等各种血液成分的消毒。

如 Morel 等探讨了甲氧补骨脂素和长波紫外线对血浆和血浆蛋白成分中的指示病毒的光化学灭活效果。结果, 在保证凝血因子蛋白功能的前提下, RNA 和 DNA 病毒均可灭活。Corash 等报告了 8 - 甲氧补骨脂素(8 - MOP)与 320 nm 波长紫外线对血小板制品的消毒作用。结果, 该方法可杀灭 25 ~ 30 对数值/h 的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 6 个对数值/h 的 fd 噬菌体, 0.9 个对数值/h 的 R17 噬菌体和 1.1 个对数值/h 的猫白血病病毒(FeLV)。处理 6 h 后, 血小板的

完整性和功能与对照相似。此外,该法还可在 30 min 内灭活产品中  $10^6$  无细胞小鼠 CMV, 10 min 内灭活猫鼻气管炎病毒(4.8 log)。制剂中加入人淋巴细胞,发现 1 kb DNA 中有 9.3~12.8 个 8-MOP 加合物。核酸片段多聚酶链反应(PCR)扩增受阻。Lin 等进一步评价了该方法对血小板制剂中 HIV-1 的灭活效果。在 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  8-MOP 和 17  $\text{mW}/\text{cm}^2$  紫外线作用 6 min 时,可灭活  $0.5 \times 10^6$  pfu/ml HIV-1,同时,有核细胞中 1 kb 核酸中有 15 个 8-MOP-DNA 加合物,PCR 扩增中止。此外,已经证明补骨脂素灭活的病毒可作为无传染性的抗原供免疫测定使用,并被成功地作为试验疫苗。

Matthews 等观察了血卟啉衍生物(HPD)、双血卟啉酯(DHE)、苯并卟啉衍生物(BPD)等多种光敏剂对病毒的灭活效果,结果发现,所试光敏剂都能不同程度地灭活组织培养基和血液中的 HIV-1, HSV-1 和 CMV 等,并对红细胞、补体、免疫球蛋白无明显影响。Neydorff 等报告,苯并卟啉衍生物在 2~4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  时,与 57.6  $\text{J}/\text{cm}^2$  的红色光(600~700 nm)作用于全血,可灭活其中的水泡性口炎病毒( $\geq 10^7$  TCID<sub>50</sub>),红细胞溶解率为 1%~2%。Worth 等进一步报告了苯并卟啉衍生物对猫白血病病毒(FeLV)和水泡性口炎病毒的灭活效果。发现该方法可灭活血制品中自由的病毒和试验感染的猫全血中的 FeLV。扫描电镜可见感染的淋巴细胞表面有小孔,并不断增大,直到膜消失。但红细胞膜未见损害。

Horowitz 等报告,10~25  $\mu\text{mol}/\text{L}$  酞青铝或其硫化物与 44~176  $\text{J}/\text{cm}^2$  可见光(670 nm)结合,可灭活全血或红细胞制剂中的自由的 VSV 和细胞相关的 HIV-1( $\geq 10^4$  TCID<sub>50</sub>)。处理中溶血率  $\leq 2\%$ 。对血小板制品,用 10  $\mu\text{mol}/\text{L}$  酞青铝四硫化物加 44  $\text{J}/\text{cm}^2$  可见光可杀灭  $\geq 10^{5.5}$  TCID<sub>50</sub> 的 VSV,但血小板的凝集率与程度均下降 50% 以上。同时该处理对因子 VIII 的活性也有明显影响,约下降 50%。

部花青是一种亲脂性染料,吸收可见光后能产生单态氧。部花青可快速灭活  $\geq 10^6$  指示病毒、CMV 和 HTLV-1。血清和白蛋白的存在可降低其灭活率。因与红细胞的光吸收峰接近,故红细胞的存在更使其效率降低 1 000 倍。用部花青 540 进行光灭活处理的红细胞损伤较小,但贮存时间稍长即有溶血和 ATP 的丢失;处理后的因子 VIII 制剂活性下降 50% 左右;尽管白蛋白能适当保护血小板的功能,但该方法对血小板制剂仍有较大的损伤作用。

Lambrecht 等报告,吩噻嗪类染料,如亚甲蓝和甲苯胺蓝等与可见光结合可用于灭活人血浆中的脂质包膜病毒,如 HIV-1。对非脂质包膜病毒无效。处理后的凝血因子和其他血浆蛋白含量仅少量下降。Wagner 等最近也发现,5  $\mu\text{mol}/\text{L}$  亚甲蓝加 1.8~3.2  $\times 10^4$   $\text{J}/\text{m}^2$  的红色光可杀灭  $10^6$  的 VSV,但红细胞中的 ATP 下降 30%,细胞表面发生改变,血浆血红蛋白升高 2 倍。

### 三、紫外线加乙型丙内酯

该方法又称冷灭菌处理,早在 50 年代初就已基本成熟,并最早应用于血浆成分消毒。由于乙型丙内酯对微生物的杀灭作用谱较广,能直接与核酸起反应,且对血浆蛋白和红细胞的损害作用较小,而且该药在血浆中很快水解为无毒的丙内酸,故认为是一种较理想的灭活血浆中病毒的方法。用黑猩猩感染试验证明,其灭活 HBV 的滴度可达  $10^7$ ,如果同时兼用吸附方法,则可灭活  $10^8$  HBV。该方法对 HCV 也有良好的灭活效果。但由于对乙型丙内酯致癌作用的担心,该方法有逐渐被其他方法取代的趋势。目前,德国 Biotest 公司仍在沿用该方法消毒凝血酶原复合物和免疫球蛋白制剂。

## 第六节 不同血液成分的消毒方法比较

由于对供血员进行筛选，血库常规供应的单人份血液是较安全的。但因筛选中检测指标和其灵敏度的局限性，以及人为因素和社会因素的影响，病毒的危险性虽然很小却依然存在。这对需要长期输血和免疫抑制的病人来说仍是个潜在的威胁。传统方法生产的凝血因子制剂，HBV、HCV 和 HIV 的污染率极高，几乎每个安瓶中均含有活的病毒，静脉注射用免疫球蛋白仍能传播 NANB 肝炎。而去除这些可能污染的病毒，有时必须依靠各种理化消毒方法的应用。

今天，通过消毒工作者的努力，血浆蛋白制品生产中的病毒灭活已有较安全的方法。如冻干加热 80℃ 72 h，巴氏消毒，紫外线加乙型丙内酯，以及有机溶剂加洗涤剂等。如再结合其他方法，已经使现代凝血因子制剂的安全得到可靠保证（表 16-2）。

表 16-2 凝血因子制剂的消毒方法与评价结果

处理方法	使用厂家	临床安全(发病数/观察数)		
		HBV	HCV	HIV
干热 80℃, 72 h	BPL, Cutter	0/38	0/32	0/32
干热 60℃, 72 h	停止使用	0/12	15/19	0/24
干热 60℃, 144 h	Baxter	...	...	...
巴氏消毒	Behringwerke	2/125	2/95	0/237
(60℃, 10 h)	Armour, Sclavo			
庚烷悬浮加热	Alpha	0/18	8/37	0/37
(60℃, 20 h)				
蒸汽加热	Immuno	4/78	1/78	0/50
(60℃ 10 h, 1 160 mbar)				
有机溶剂 + 洗涤剂	纽约血液中心、	0/117	0/45	0/115
(简称 S/D 法)	Alpha, cutter 等 11 家			
S/D 法 + 干热处理	AIMI, Novo Nordisk	(正在进行中)		
乙型丙内酯 + 紫外线	Biotest	0/11	0/11	0/6

全血浆的消毒，极有开发价值的是过滤和有机溶剂加洗涤剂法。尤其是有机溶剂加洗涤剂法，安全简便，对战时保证大量血浆制品的安全供应有极高的价值。血浆过滤法，现在研究还不多，而且可能损失少量大分子蛋白，但仍有一定的潜在价值。

血细胞成分的灭活处理正处于初步实验阶段，实际应用还有一定的困难。红细胞的协同处理，如使用过滤法去除白细胞，光敏法灭活自由病毒，最后用洗涤法去除残留的化合物，可能较有开发应用价值。血小板制剂，因其复杂的生理学和其成分在贮存中的破坏等，病毒灭活的实施较为困难，对其消毒有一定意义的方法是光敏剂，特别是补骨脂素，可能获得一定结果。但光敏剂灭活细胞内病毒的效果还有待进一步观察。已经报告和探索过的血细胞成分制品中微生物的灭活方法，其优缺点见表 16-3。

表 16-3 五种血液成分消毒方法的主要特点比较

主要特点	离心与过滤	免疫中和	化学消毒剂	光敏消毒	辐射消毒
胞内胞外病毒	均有效	均有效	均有效	均有效	均有效
脂、蛋白包膜病毒	均有效	均有效	均有效	脂包膜病毒	均有效
RBC、血小板制剂	均有效	均有效	均有效	均有效	均有效
试剂去除	不要	不要	要	要	不要
致癌性	无	无	有	未知	无
新免疫原	无	无	未知	未知	未知
成分活性的影响	小	无	中	中	大
费用	中~高	中	中	中~高	中

综上所述,虽有很多消毒方法,在实验室中具有一定的灭活病毒的作用,但距实际应用还有很大的距离。迄今尚无既能灭活血液成分制品中可能存在的各种致病微生物,又能保证各种血液成分的天然活性与功能不受影响的理想消毒方法。目前,能在生产中使用的方法还很少,现有方法本身还有不少缺点,如灭活水平不高(表 16-2),血液成分活性的丢失和对细胞功能的损害,以及潜在的毒性(表 16-3)等,有待进一步改进。

最后需要强调的是,消毒只能改进而不是替代现有的预防措施。例如,不能因为有消毒措施,而放松或取消对献血者的筛选等。现有消毒处理都有其优缺点,只有根据对象与要求,选择适宜的方法。

(张文福)

#### 参考文献

- 1 张文福.血液成分制品中微生物的灭活.中国消毒学杂志 1996;13:34-39
- 2 AuBuchon JP, Dodd RY. Inactivation of microbial contaminants of blood components. Clin Lab Med, 1992; 12: 787-803
- 3 Horowitz B, Wiebe ME, Lippin A *et al.* Inactivation of viruses in labile blood derivatives. II. Physical methods. Transfusion, 1985; 25: 525-527
- 4 Charn SE. High-temperature short-time heat inactivation of HIV and other viruses in human blood plasma. Vox Sang, 1992; 62: 12-20
- 5 Mannucci PM. Clinical evaluation of viral safety of coagulation factor VIII and IX concentrates. Vox Sang, 1993; 64: 197-203
- 6 Leitman SF, Holland PV. Irradiation of blood products, indications and guidelines. Transfusion, 1985; 25: 293-300
- 7 Hamamoto Y, Harada S, Kobayashi S *et al.* A novel method for removal of immunodeficiency virus: filtration with porous polymeric membranes. Vox Sang, 1989; 56: 230-236
- 8 Leikola J. Viral risks of blood transfusion. Rev Med Microbiol, 1993; 4: 32-39
- 9 Horowitz B. Inactivation of viruses found with plasma protein and cellular components. In: Goldstein J ed. Biotechnology of Blood. Boston: Butterworth-Heinemann, 1991; 417-450
- 10 Wells KH, Latino J, Gavalchin J *et al.* Inactivation of human immunodeficiency virus type 1 by ozone *in vitro*. Blood, 1991; 78: 1882-1890

- 11 Highsmith FA, Caple M, Walthall B *et al*. Viral inactivation of vesicular stomatitis virus in normal human serum by cross-linked polyvinylpyrrolidone. *J Infect Dis*, 1993; 167: 1027 – 1033
- 12 Palker TJ, Clark ME, Langlois AJ *et al*. Type specific neutralization of HIV with antibodies to env – encoded synthetic peptides. *Proc Nat Acad Sci USA*, 1988; 85: 1932
- 13 Prince AM, Horowitz B, Brotman B. Sterilization of hepatitis and HTLV – III viruses by exposure to tri(n – butyl) phosphate and sodium cholate. *Lancet*, 1986; I: 706 – 710
- 14 Horowitz B, Bonomo R, Prince AM *et al*. Solvent/detergent treated plasma: a virus inactivated substitute for fresh frozen plasma. *Blood* 1992; 79: 826 – 831
- 15 Morel P, Lin L, Wieseahn G *et al*. Photochemical inactivation of viruses and bacteriophage in plasma and plasma fractions. *Blood Cell*, 1992; 18: 27 – 42
- 16 Corash L, Lin L, Wieseahn G. Use of 8 – methoxypsoralen and long wavelength ultraviolet radiation for decontamination of platelet concentrates. *Blood Cell*, 1992; 18: 57 – 74
- 17 Hanson CV. Photochemical inactivation of viruses with psoralens: an overview. *Blood Cell*, 1992; 18: 7 – 25
- 18 Prince AM, Stephan W, Brotman B.  $\beta$  – Propiolactone/ultraviolet irradiation: a review of its effectiveness for inactivation of virus in blood derivatives. *Rev Infect Dis*, 1983; 5: 92 – 107
- 19 North J, Neyndorf H, King D *et al*. Viral inactivation in blood and red cell concentrates with benzoporphyrin derivative. *Blood Cell*, 1992; 18: 129 – 140
- 20 Lambrecht B, Mohr H, Hopf JK *et al*. Photoinactivation of viruses in human fresh plasma by phenothiazine dyes in combination with visible light. *Vox Sang* 1991; 60: 207 – 213
- 21 Wagner SJ, Storry JR, Mallory DA *et al*. Red cell alterations associated with virucidal methylene blue phototreatment. *Transfusion*, 1993; 33: 30 – 36

## 第十七章 生物战剂污染的消毒

生物武器是利用致病微生物或其毒素作为战剂的一种特殊武器,目的是制造“人工瘟疫”,伤害对方军队、居民、牲畜以及农作物。生物战剂的施放方法主要为喷洒生物战剂气溶胶,其次为投撒带生物战剂的昆虫或其他媒介物。此外,还可污染水源与食物,通过交通工具、普通邮件系统传播。生物武器的使用,特别当喷洒生物战剂气溶胶时,可造成环境、物品与人体等广泛污染。

随着生物技术的快速发展,生物战剂的大量生产也变得越来越容易,同时利用分子克隆与基因重组技术研发超级生物战剂成为可能。2001年发生在美国的邮件炭疽事件,充分说明了生物战剂已经成为恐怖活动的主要手段。现代生物战剂具有多样性的特点,有致死性、失能性、传染性与非传染性战剂等多种多样,标准的生物战剂在30种以上。2001年,联合国生物武器公约履约核查谈判专家组就将4大类10小类共50种战剂列入核查清单(表17-1)。

17-1 2001年列入生物战剂核查清单的战剂

类	亚 类	名 称	类	亚 类	名 称
人类疾病病原体和可传染人类的动物病原体	病毒	克里米亚—刚果出血热病毒	可导致人类与动物中毒的毒素	细菌毒素	肉毒毒素
		东方马脑炎病毒			产气荚膜梭菌毒素
		埃博拉病毒			葡萄球菌肠毒素
		辛农伯病毒			志贺菌毒素
		胡宁病毒			变性毒素
		拉沙热病毒		藻毒素	西加毒素
		马丘波病毒			石房蛤毒素
		马尔堡病毒			单端孢毒素
		裂谷热病毒		真菌毒素	相思豆毒素
		蜱传脑炎病毒			蓖麻毒蛋白
		重型天花病毒(痘疮病毒)	植物毒素	银环蛇毒素	
		委内瑞拉马脑炎病毒		动物毒素	
		西方马脑炎病毒	动物病原体	非洲猪瘟病毒	
		黄热病病毒		非洲马瘟病毒	
		猴痘病毒		蓝舌病病毒	
	细菌	炭疽芽孢杆菌		口蹄疫病毒	
		羊肉鲁氏菌		牛瘟病毒	
		猪布鲁氏菌	植物病原体	咖啡刺盘孢致病变种	
		鼻疽假单胞菌		松座囊菌	
		类鼻疽假单胞菌		解淀粉欧文氏菌	
		土拉热弗朗西斯氏菌		烟草霜病菌	
		鼠疫耶尔森菌		茄罗尔斯顿氏菌	
		伯氏考克斯体		甘蔗斐济病毒	
		普氏立克次体		印度腥黑粉菌	
		立氏立克次体		白纹黄单胞菌	
	原生生物				

生物战剂的消毒又称生物战剂的洗消（**biological decontamination**），即指用物理或化学方法杀灭和清除污染的生物战剂以达到无害化处理。当发生生物战时，除对污染区加强平时的预防性消毒和对疫区采取相应的消毒措施外，对一切污染对象必须进行适当的洗消处理，以防止疾病的发生与传播。实质上，洗消也即是针对敌投生物战剂的一种特殊消毒处理。生物战剂的洗消往往具有下列特点：①情况紧迫；②规模庞大；③地区广阔；④对象众多；⑤条件复杂。因此，开展对生物战剂洗消工作应做到事先确定有关原则，做好组织、训练以及药品、器材供应等的准备事宜。

## 第一节 消毒的任务与原则

由于全面彻底的消毒，人力、物力与时间花费很大，所以一般认为将生物战剂的消毒局限于使人员得以继续执行任务或能恢复保障工作即可，尽量避免全面消毒作业。至于何时需开展洗消作业，洗消的范围应有多大，如何将洗消分类等，虽各国具体规定不尽相同，但所遵循的原则均大同小异。

一般认为应尽量采取封锁使生物战剂自净的办法。通过风、雨和日光的自然消毒作用，在室外的大多数生物战剂可在1d内死亡。在日光晒不到的地方，特别在低温条件下，污染可存在较久，但往往也不超过数天。由繁殖体类微生物气溶胶云团造成的污染地段，在数小时到1~2昼夜后即可失去对人的危害作用；至于细菌芽孢的污染，则有害时间持续较长。有鉴于此，当发生生物战剂污染时，可参考下列任务与原则做出是否进行洗消的安排。

### 一、消毒的任务

在敌人进行生物战时，消毒工作的主要任务有两点：(1)对生物战剂污染对象的洗消，清除或消灭敌人施放的生物战剂，以切断传染病的传播途径，防止人畜受感染发病，保障军民的健康，保证作战任务的完成；(2)当人或动物由于感染战剂而发病时，要消灭这种疫源地，防止传染病继续发生和流行。

反生物战中消毒基本上与平时消毒相同，但也有其不同的特点，主要有以下几点：

1. 所要杀灭的病原体的种类常不明确 因为目前尚缺乏理想的快速检验方法，而消毒工作常需在鉴定战剂微生物的种类之前立即进行。

2. 所要杀灭的病原微生物的抵抗力都比较强 敌人生产的生物战剂，往往是抵抗力比较强的病原微生物，或用保护剂保护着，因而常用的消毒方法往往难以消毒彻底。

3. 需要同时消毒的对象复杂 因目前敌人研究的主要生物战剂是以气溶胶方式散布的，气溶胶战剂可污染各种物品，故不仅要对水和食物进行消毒，还要对人员及牲畜进行消毒，不仅要对器械、兵器、仪器、运输工具和地面消毒，有时还要对空气进行消毒。

4. 需要同时消毒的面积广 因微生物气溶胶战剂可同时污染广大面积，特别是有风时，且污染的范围不易很快划定。故消毒的工作量大，所需的药材也多。

### 二、洗消的时机

发生一些可疑迹象，但尚不足以做出是否为生物战剂的初步判断，可只采取医学观察与暂时封锁等措施，一般不进行洗消。经采样检测，初步断定是生物战剂时，应立即发出信号，使污



染人员进行局部卫生处理，并封锁可疑污染地区。对污染点应组织人员进行消毒处理。经过标本检验和流行病学调查，确定有生物战剂时，如果施放的是生物战剂气溶胶，并在发生有关情况后 **24 h** 以内，而污染区人员尚未进行局部卫生处理时，应发出信号，进行局部卫生处理，并在条件允许时组织进行污染人员的全面卫生处理以及污染环境和物品的消毒。如果在发生情况 **24 h** 以后，人员局部卫生处理的意义已不大，此时可根据检验结果对污染人员进行全面卫生处理与环境、物品的消毒。如投放的是带菌的媒介昆虫或小动物时，在发现后立即结合杀虫、灭鼠，对现场进行消毒处理。

### 三、洗消的范围

重点应放在污染严重并具有军事或经济意义的地区、人员、装备与物品。洗消地域的大小，处理对象的多少等，应根据污染现场的实际情况确定。尽可能按照微生物学检验与流行病学调查结果以划定洗消范围。如：以气溶胶的方式施放后，曾下暴雨或中雨（地面形成流水），污染的生物战剂已被冲掉的地方，可不必消毒。经日光直接曝晒的地点，**48 h** 后大部分生物战剂已被杀灭（芽孢类战剂除外），可不消毒的重点对象。对无重要军事意义或很少有人进入的地区，可武装警戒或标志封锁，待其自净；对重要地区，则应尽快实施消毒处理。在洗消中，可根据污染轻重排出缓急次序。缩小洗消范围，减少工作量。

### 四、洗消注意事项

1. 尽量穿戴全套保护器材（如防毒面具、防毒衣、防毒手套及靴套），特别注意保护呼吸道，工作完毕后，必须进行卫生整顿，在此前不得饮食及吸烟。
2. 消毒者在消毒时应处于被消毒对象的上风方向，尽可能避免与污染物品直接接触，避免扬起灰尘。
3. 在方法上要尽量采取综合性措施。战剂种类未确定前，必须进行消毒时，应按抗力最强的芽孢类战剂消毒方法处理。
4. 工作结束后对使用过的器材应彻底消毒，无用者应焚毁或深埋之。

## 第二节 人员与各类物品的消毒方法

### 一、人员的洗消

人员停留在或通过生物战剂气溶胶污染区时，战剂可附着在身体表面造成污染。如果皮肤有汗水，则附着得更牢。通常，毛发多的暴露部位以及耳窝、鼻孔等处容易积存污垢，腿、脚、手、面部则污染较严重，洗消时对这些部位应特别注意。人员的卫生处理可分为局部的（暂时的）与全面的（彻底的）两种。局部卫生处理，由战士自己或相互进行。全面卫生处理，在指挥员统一组织下，撤出污染区进行。

#### （一）局部卫生处理

主要是消毒暴露部位的皮肤、个人器材及必须使用的装具。对于皮肤，可用布块沾以消毒药物擦抹污染部位。以蜡状杆菌芽孢代表芽孢类战剂，以白色葡萄球菌代表细菌繁殖体类战剂进行的试验证明，使用皮肤可以耐受浓度的消毒液擦拭，均可达到 **90%** 以上的灭除率。常

用消毒液有:0.5% 过氧乙酸、1.0% 三合二、0.5% 苯扎溴铵(新洁尔灭)、0.5% 氯己定(洗必泰)、2.0% 煤酚皂溶液。

没有使用消毒剂条件的可用肥皂水冲洗,没有冲洗条件的还可用干毛巾擦拭。人体污染表面用干毛巾擦抹,可去除 60%~80% 污染的生物战剂。消毒时应注意:①有次序地自上而下进行,以防遗漏和再次污染;②干擦时,要顺一个方向擦,每擦一遍即将布块的污染面折叠起来,用清洁面再擦;③在污染区内冲洗时,禁止使用已污染的水(可利用水壶中的水)。

## (二)全面卫生处理

一般在划定的人员洗消场进行。处理时,先经洗鞋池将鞋底污染的生物战剂杀灭,然后到服装表面消毒处对着装表面与随身所带装具进行消毒,以减少行走或脱卸时对环境的污染。最后,卸下随身所带装具,脱衣清洗。换下的服装装具等,污染轻微的经喷雾消毒处理即可,严重的则应送服装装具洗消场经再次消毒后才得穿用。

清洗身体,最好用淋浴方式,每人耗水量不少于 50 L,冲洗 10~15 min。淋浴中用清水冲洗,可去除污染的生物战剂 90%左右,如结合用肥皂搓洗,清除率可达 99%以上。

为便于穿着橡胶防化服人员的洗消,可使用消毒池浸洗法。消毒池为一塑料水池,深 1 m,内盛 0.6 m 消毒液。池口与地面平。消毒时,污染人员不脱防化服,进入池内浸泡 1~5 min。浸泡时,用毛巾沾药液周身擦拭,以使药物能较好地作用到防化服表面各处。对于芽孢类战剂可用 1% 次氯酸钙溶液浸洗。

对于呼吸道防护做得不好的人员,还可使用过氧乙酸(0.02%)、过氧化氢(0.3%)、硼酸(3%)或洗必泰(0.05%)等溶液含漱。对眼睛防护做得不好的人员,可使用硼酸(3%)、高锰酸钾(0.02%)或新洁尔灭(0.02%)等溶液洗眼。用过氧乙酸(0.02%)或洗必泰(0.05%)溶液滴眼,亦可达到一定的消毒作用。

洗消时应注意:①不要在浴池、浴盆或死水塘中进行清洗,②清洗身体时,先用肥皂洗头、脸、颈部 2~3 次,然后再由上至下洗涤全身,③手指甲过长要剪掉,甲中污垢要仔细洗去,④有伤口的人员应注意防止伤口进水,清洗后要重新包扎。

## 二、军马军犬等的洗消

对军马、军犬与其他牲畜,一般多只在必要时进行全面洗消处理。为顺利进行有关洗消,最好设立专门的洗消场。处理时,可单纯用清水与表面活性剂冲刷,亦可兼用消毒药物喷洒、擦抹。所用消毒剂与人员处理相同。以军马为例,其处理具体步骤如下。

1. 消毒前,卸下鞍具或挽具,将马头迎风系好。戴上嘴兜以防啃咬,系牢马尾防止甩动扩大污染。如马身上有汗,要等汗干了再进行卫生处理。

2. 消毒按下列顺序进行:头、颈、前肢、身、尾、后肢。污染严重的部位,如颈、尾、四肢、蹄等要重点处理。刺激性大的消毒剂勿用于嘴、眼、鼻等部位附近,并防止消毒液流入其内。药物消毒后,应以清水仔细冲净全身并擦干。

3. 单纯冲洗,每匹马耗水量需 100~150 L。冲洗时切勿将水灌入马耳。

4. 冬季最好在室内用温水进行。

5. 鞍具、挽具应消毒、洗净后再配用,方法同服装与装具。药物处理较为彻底。

### 三、服装与装具的消毒

在生物战剂气溶胶污染区,服装装具暴露的表面污染较严重;贮存于箱柜中的物品,一般都不会污染或污染轻微。

环氧乙烷、甲醛或过氧乙酸熏蒸适用于处理各种质料的服装与装具,是比较好的消毒方法。在野战条件下,环氧乙烷消毒可使用简易密闭容器进行。甲醛或过氧乙酸可在特制的熏蒸柜或塑料篷幕中进行。过氧乙酸可采用气溶胶喷雾熏蒸或加热蒸发法,前者用气溶胶喷雾器喷洒 2% 溶液  $8 \text{ ml/m}^3$ ,作用 30 min( $18^\circ\text{C}$ ),后者加热蒸发过氧乙酸  $1 \sim 3 \text{ g/m}^3$ ,作用 60 ~ 90 min( $20^\circ\text{C}$ )。甲醛除用福尔马林进行气溶胶喷雾 ( $30 \text{ ml/m}^3$ ,作用 16 h)或加热蒸发 ( $37 \sim 125 \text{ ml/m}^3$ ,在  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ 下作用 45 ~ 165 min)外,也可用化学反应法产生。例如,在  $35 \sim 70 \text{ g/m}^3$ 三合二中倒入福尔马林  $40 \sim 80 \text{ ml/m}^3$ ,作用 1 ~ 2 h( $18^\circ\text{C}$ )。此外,也可加热多聚甲醛以产生甲醛蒸气 ( $10 \sim 20 \text{ g/m}^3$ ,作用 12 ~ 24 h)。如果不具备熏蒸消毒条件,对不同质料的服装与装具还可选用其他一些消毒方法。

#### (一)棉织品

使用煮沸、流通蒸汽消毒与压力蒸汽灭菌等方法处理较为彻底。药物消毒,可根据战剂种类选用 1% 漂白粉活性溶液浸泡 1 ~ 2 h;0.3% 过氧乙酸溶液、5% 煤酚皂溶液或 1% 氢氧化钠溶液浸泡 30 min 以上。使用药物浸泡,消毒后应尽快用清水漂洗,以免被腐蚀。在没有适宜的消毒药物时,用肥皂、清水搓洗或刷洗,亦可达到一定的消毒要求。搓洗或刷洗最好在流水下进行。如用热水、肥皂、洗衣粉或热碱水洗涤物品,不但能将生物战剂除去,并可杀灭一部分细菌繁殖体、病毒或破坏一部分毒素战剂。实验证明,普通洗衣法可去除污染的枯草杆菌黑色变种芽孢 85% ~ 99%,若在洗衣液中加入次氯酸盐(含 2 000 ppm 有效氯),可使灭除率达 99% ~ 99.999%。搓洗或刷洗时,要做好个人防护以防感染。污染的水事后应进行消毒处理。

#### (二)毛织品

污染严重的可按棉织品消毒的方法处理;污染轻微的在表面喷以消毒液即可。处理后需用水将药物漂洗干净。

#### (三)棉衣、棉被

在表面喷一层消毒液,以润湿为度,然后折叠放置 1 h,再晾晒直至干燥和气味消除。使用药物以气味较小、易于挥发或刺激性不大的为宜。有条件的可在消毒后进行拆洗。

#### (四)皮毛、皮革制品

皮毛制品的洗消方法与棉衣、棉被相同。皮革制品可用药物擦抹消毒,然后冲洗,亦可直接用肥皂、清水刷洗。

#### (五)合成纤维织品与塑料、橡胶制品

可用药物浸泡、喷洒或用肥皂清水刷洗、搓洗等方法处理,使用药物与棉织品同。橡胶制品还可使用热力消毒处理。

#### (六)金属物品

可煮沸或用消毒剂擦试、浸泡、喷洒。药物选择无腐蚀性者用之。消毒后,应将药物洗净,必要时涂油以防生锈。没有消毒剂时,用肥皂、清水刷洗亦可。

### 四、食物和餐具的消毒

污染严重的少量食物以销毁为宜。需要消毒的食物与餐具可按下列情况分别处理。

### (一)有外包装的食物

密封在罐头、螺口瓶、细口瓶、塑料袋、蜡封纸盒中的食物,生物战剂气溶胶无法透入,仔细消毒容器表面即可。耐水浸的容器可直接浸于消毒液中,不耐水浸的,可用消毒液反复擦拭2~3次(用药)。食用前,以经消毒的水将容器外粘附的药物冲洗干净再打开。

### (二)能加热的食物

尽量使用加热法消毒。能洗的,洗净后再加热。一般需煮沸 30 min 以上。实验证明,面包经 204℃烘烤 40 min,外层的污染(枯草杆菌黑色变种芽孢)可减少 99%,内层可减少 100%。

### (三)蔬菜、水果

可根据战剂种类选用过氧乙酸(0.2%),二氯异氰尿酸钠(1%)或高锰酸钾(0.1%)等溶液浸泡 30 min 消毒。消毒后,用经消毒的水将粘附的药物冲净。可以去皮的,应在食用前去皮。实践证明,将蔬菜水果浸于含 2 000 ppm 有效氯的次氯酸盐溶液内 5 min,可杀灭表面污染的枯草杆菌芽孢 99.8%~100%。

### (四)大批的粮草与食品

污染的大批粮草与食品,消毒前不得挪动。消毒时,最好根据包装情况使用过氧乙酸喷洒或熏蒸法处理。条件不具备时可暂时封存以待生物战剂自然消亡。不论是用药物消毒还是留待自净,都得由专门机构检验合格后才得动用。

### (五)餐具

最好用热力消毒,不能加热的可用消毒液浸泡,方法与食物消毒同。

## 五、饮水消毒

在污染区用水时,如无防护好的水源,应尽量选择大的流动水源取水。无论水取自何种水源,均须经消毒处理后才得饮用。

目前美、英、苏、法等国军队均配有较完善的大、中、小系列野战净水装备。较先进的美军反渗透净水单元虽集混凝、氯化、过滤与反渗透处理于一体,既可消除水中化学、生物、放射性战剂的污染,又可用于海水淡化,但对于生物战剂来说,最根本的还是混凝、过滤与氯化处理。反渗透处理主要针对化学、放射性战剂的清除与海水淡化,而以大肠杆菌 12 噬菌体进行试验,该种处理只能将噬菌体去除 93%~99%。此外,关于饮水消毒药物的研究,报道亦较多,诸如臭氧、二氧化氯、非溶性季铵盐、高铁酸盐、银离子以及各种卤素化合物等等,但目前能在野战中广泛使用的仍以含氯消毒剂为主。

根据以上情况,对染有生物战剂水的处理,除使用较可靠的煮沸法(15 min)外,主要仍应以混凝、过滤与氯化为主。

对于化学、生物与放射性战剂混合污染的水,应先用混凝剂沉淀,然后加含氯消毒剂消毒,经以活性炭吸附余氯后过滤即可。若有条件可使用“三防净水袋”。净水袋每份药物可处理 50 L 水,其中含次氯酸钙、活性炭、磷酸钙与 6801 型浑水澄清剂(由聚丙烯酰胺与明矾组成)。处理步骤如下:①就地取表层 5 cm 以下的土(20 g/L,用以吸附放射性战剂)与次氯酸钙(按有效氯计算,400 mg/L)一起放入水内,搅拌 15 min;②加入活性炭(3 g/L)、磷酸钙(2 g/L)与 6801 型浑水澄清剂(0.2 g/L),沿一个方向搅拌 5 min,沉淀 3 min 后经特制布袋过滤。

对于单独生物战剂污染的水,使用“三防净水袋”处理时,可免去加土一步。没有三防净水袋时,可加入其他含氯消毒剂。对于芽孢类战剂污染的水,有效氯用量为 300 mg/L,作用

15 min。对于非芽孢类战剂污染的水,加氯量可酌情减少,一般 8~16 mg/L,作用 30 min 即可。用氯浓度较高时,消毒后可用活性炭末(3 g/L)吸附余氯,再混凝、沉淀、过滤,以去除余氯气味。少量余氯气味亦可用硫代硫酸钠或亚硫酸钠脱氯。

## 六、房屋消毒

### (一)外部表面

除特殊情况外,一般可不必消毒。经风、雨和日光的作用,大多数生物战剂可在 1~2 d 内死去。如需快速处理,可随战剂种类选用次氯酸钙(5%~10%)、三合二(5%~10%)、漂白粉(10%~20%)或氢氧化钠(1%)等溶液喷洒。喷洒时,用药量约为 200 ml/m<sup>2</sup>,根据墙壁吸水能力酌情增减。作用时间一般为 30~60 min。

### (二)室内表面

可以关严的房间,最好使用各种熏蒸消毒剂。甲醛与过氧乙酸杀菌效果虽好,但蒸发时需专门热源与容器,使用不便,处理大量污染房舍困难更多。酸氯烟熏消毒剂与醛氯合剂在蒸发时不需专门热源与容器,适合用于大量污染房舍的消毒。

用消毒液进行气溶胶喷雾亦是消毒室内表面的一种较好方法。该法虽需专门的喷雾器械,但药物损耗少,更可处理不能密闭的房间(直接向污染表面喷雾),有其独到之处。消毒剂可随污染战剂种类选择,过氧乙酸、过氧化氢、含氯消毒剂、福尔马林、戊二醛、新洁尔灭、度米芬、石炭酸甚至醋酸等均有报告。我国研制的消毒杀虫车配有专用于室内表面的气溶胶喷雾器。

消毒时若不能使用熏蒸与气溶胶喷雾等方法时,对于油漆墙面、木器家具等光滑表面可用消毒液擦拭;对于粉刷的粗糙墙面,可用普通喷雾器喷洒消毒液。消毒液,除处理房屋外部表面使用的种类外,还可使用煤酚皂溶液(5%)、季铵盐类消毒剂(0.5%)或过氧乙酸(1%)等溶液,作用 30~60 min。

没有条件使用药物时,可通过打扫和擦拭去除沉着在物体表面的生物战剂。在打扫时,防止生物战剂被扬起,再次悬浮于空气中,最好使用湿性处理。例如,用湿扫帚扫地,用湿拖把擦地,用湿抹布擦拭物品等等。使用吸尘器时,在物面上刷吸 1~2 次,可消除污染在表面的 97.5%的生物战剂。

### (三)室内空气

室内空气的消毒必须与室内表面消毒结合进行。单独处理空气,由于污染的表面可不断产生再生性气溶胶,难以彻底。

空气消毒最好是待室外空气中生物战剂消失后,打开门窗彻底通风。在进行室内表面喷洒消毒的同时,向空中喷以消毒液,对悬浮的生物战剂亦有杀灭作用,雾粒愈细效果愈好。室内表面熏蒸消毒的同时,空气中的生物战剂亦随之而被杀灭。

## 七、室外地面消毒

大多数情况下可不予处理留待自净,必要时可对局部地区或通道进行消毒。消毒可用药物处理、铲除与火烧等法。

### (一)药液处理

多用含氯消毒剂。喷洒次氯酸钙、三合二或二氯异氰尿酸钠溶液(0.5%~10%),每平方

米 1 000 ml,作用时间从 15 min 至 16 h,可杀灭各种生物战剂。对肉毒杆菌毒素,还可喷洒氢氧化钠溶液(1%)。

喷洒时,可用洗消车,亦可用城市中的洒水车或改装的清洁车进行。路面较宽需两辆车(或两次)喷洒时,喷洒间距应有 0.5 m 的重叠,以防漏喷。

对于面积较小或车辆无法通行的地区,可利用洗消车、洒水车、改装清洁车上的喷枪进行喷洒。没有上述车辆时,可使用各型喷洒农药的器械,甚至还可用扫帚、刷子等沾洒药液来消毒。严寒条件下,可在药液中加入抗冻剂。

#### (二)药粉处理

喷洒药粉可不需水源,但在空气潮湿相对湿度  $>80\%$  或有露水时,效果才较理想。

使用药物为含氯消毒剂原粉。喷洒次氯酸钙、三合二或二氯异氰尿酸钠,每平方米 10 ~ 50 g,作用时间 2 ~ 24 h,可杀灭各类生物战剂。

喷粉最好在气温逆增和风速 2 m/s 以下时进行。喷洒工具可使用各型农业喷粉器。联有长塑料薄膜喷管的机动喷粉器,一次处理宽度可达 20 m 左右。对于面积较小的地区,没有喷粉器械,可用铁锹扬洒。

美军关于洗消的技术手册(TM3-220)提出使用串联爆破的方法在上风向将每隔 10 m 桶的漂白粉分散成药粉雾团随风漂落于污染区地面。

#### (三)铲除处理

适用于污染的土质地面和雪层,通常多用在开辟污染区通路。铲除厚度是:4 cm 左右,雪 10 ~ 20 cm。铲除时,可用推土机或铁锹。作业尽量从上风方向开始。两辆推土机同时作业时,如顺风向作业,可齐头并进,如侧风向作业,应根据风向采用梯次队形,以防再生性气溶胶的污染。

#### (四)火烧处理

可铺以柴草、锯末点燃进行消毒。用量 1 ~ 2 kg/m<sup>2</sup> 污染的草地,点燃表面杂草,只能杀灭沾染在草叶上的微生物,地面仍不能得到较好的消毒。必要时可在地面浇以汽油或煤油,待吸入土层后点燃焚烧。使用火烧法消毒地面时,一定要注意防止引起火灾。

### 八、武器与技术装备的洗消

武器与技术装备污染后,除必要时由使用人员对经常接触部位用布块沾以消毒剂进行局部消毒外,一般多在洗消场进行全面处理。全面处理中最好使用药物消毒的方法。熏蒸消毒可用以处理大批的小型武器和技术装备。环氧乙烷熏蒸的穿透力强,对武器和技术装备,特别是电子与光学器材,损坏轻微,是一种比较好的方法。

除熏蒸消毒外,还可使用药液喷洒或擦拭,这种方法更适用于大型武器和技术装备。消毒后应尽快将沾附的药物冲洗干净,金属部分还应擦干,涂油防锈。过氧乙酸与含氯消毒剂腐蚀性强,不宜用于消毒武器与技术装备的金属部分。

车辆、坦克等通过污染区时,一般是车外比车内污染重、车后半部比前半部污染重,靠近车轮处和车底部比其他部位污染重,后车比前车污染重。消毒中应根据对象的污染情况,确定重点消毒部位。

没有适宜的消毒剂时,可直接用水冲洗。冲洗最好用洗消车上的喷枪或摩托洗消器进行。喷枪喷出水柱的压力在 2 ~ 3 kg/cm<sup>2</sup>,用之冲洗受染表面 2 ~ 3 遍,可去除武器和技术装备上污

染的大部分生物战剂。冲洗时,喷枪口到喷出的水柱落点之间的距离应在 2~3 m 左右,喷枪与物体表面的角度约为 30°~60°。距离过近或角度太大,水容易向四处飞溅,使人员和已冲洗的表面再污染;距离过远或角度太小,则水柱冲力减小,影响消毒效果。使用喷枪时,脚要站稳,夹紧胶管,对准目标,根据武器、技术装备的外形,灵活运用点、线、面的冲洗方法。对点冲洗时,快压快松喷枪手柄,使水柱短促有力;对线冲洗时,应使水柱均匀平稳地移动,移动的速度为 60~80 cm/s 左右;对面冲洗时,应按线冲洗的方法有顺序地由上向下移动线位,移动时要注意适当交错,避免出现空隙。

冲洗时,如提高水温可增强效果。美军试验证明,用加压热水冲洗,可将橡胶轮胎表面的生物战剂去除 99.98%,对涂有氨基甲酸乙酯或醇酸树脂的金属表面,可去除污染 99.999% 以上,但对粗糙表面,如布类或木制品,效果较差。如使用流通蒸汽冲洗,亦可杀灭大量生物战剂。蒸汽可由专门的装备产生,亦可就便利用淋浴车产生。淋浴车产生的蒸汽压力可达 4 kg/cm<sup>2</sup>。

不具备上述消毒与冲洗条件时,两人一组互相配合,用刷子、肥皂(或洗涤剂)与水,边刷边冲,亦可将大部分污染的生物战剂去除。冲洗后,对武器与技术装备的金属部分应及时擦干,涂油防锈。

近年来,苏、美、捷等军队先后研制出利用喷气式发动机产生高速热气流冲洗污染车辆的装置,并指出可用于生物战剂的洗消。但 Harstad(1981)以试验证明,用高速热气流处理车辆表面,经 5~10 min 始将污染的生物战剂去除 99%,并且在处理时产生的再生性气溶胶还可对附近造成新的污染。

## 九、敌投昆虫与其他媒介物的消毒

### (一)放投昆虫

尽量集中浇以汽油、煤油或混以柴草焚烧,亦可将之埋于 1m 左右深的坑内。掩埋前,坑底与坑内昆虫表面都应洒以漂白粉或其他含氯消毒剂干粉。

### (二)捕杀的敌投鼠类与其他动物

在拾取前先用药物处理,以杀灭体外寄生虫(喷以 2% 倍硫磷粉剂或 1% 敌敌畏乳剂等杀虫剂)。集中后,按敌投昆虫处理方法焚烧或掩埋。

### (三)敌投杂物

收集后,按敌投昆虫处理方法焚烧或掩埋。

## 十、生物弹与弹坑的消毒

敌投生物弹的残骸或碎片,应就地处理。可用火焚烧,亦可喷以漂白粉溶液(10%~20%)或过氧乙酸(1%)后掩埋。如需留作罪证,经上述消毒处理,作用 60 min,用清水冲净药物,待其干后装于密封的塑料袋内。当运抵适宜地点,即按武器与技术装备的消毒方法,再进行一次最终的彻底消毒。

弹坑可按室外地面消毒法进行处理,然后填平。

(张文福)

## 参考文献

- 1 刘育京.生物战剂的洗消.见:陈宁庆,主编.生物武器防护医学.北京:人民军医出版社,1991:287-314
- 2 薛广波.实用消毒学.北京:人民军医出版社,1986:516-523
- 3 US Department of Defence. Annual report to Congress,2001



# 第十八章 灭菌与消毒效果的监测技术

为正确进行灭菌与消毒并取得应有的效果，必须加强有关的监测工作。实践证明，做好监测工作，可及时发现问题，使灭菌与消毒工作踏踏实实展开，技术水平不断提高；反之，所进行的灭菌与消毒处理极易流于形式，更谈不到有针对性的改进。为做好这方面的工作，除给以应有的重视外，还需要掌握监测的重点问题和相关技术理论，使用正确和先进的方法，否则将事倍功半，有时甚至因误导而造成似是而非的安全感。

早在 1750 年，Pringle 即试图用药物系数法监测对牛肉的防腐效果。1874 年 Semmelweis 在用漂白粉液洗手预防产褥热中，以其病死率的升降监测洗手消毒的效果。在 19 世纪后期，灭菌与消毒方法进入科学阶段后，经众多微生物学家的努力，建立起了一系列直接测定微生物存活进行监测的方法。20 世纪中期，因灭菌与消毒应用的迅速扩大，工作中迫切需要简易、快捷、准确并在现场即可施行的监测方法，随之产生了化学指示器材、生物指示器材、微机监测设备、各类检测仪表和程序监测法等等。各种有关器材的研制和程序监测法的出现，特别是微机的利用，为现代化监测技术的发展提供了良好的基础。

## 第一节 通用的监测方法

对灭菌与消毒效果监测的通用方法，随使用技术的不同，基本可分为 5 个方面：①微生物学监测法；②化学指示器材监测法；③生物指示器材监测法；④模拟包装监测法；⑤程序监测法。

### 一、微生物学监测法

微生物学监测法系以检测灭菌或消毒后样本中是否有微生物（细菌与真菌）存活来判断处理是否合格。本类方法是最为经典的方法，也是最准确的方法。

在灭菌处理中，最常用的是无菌试验，即在灭菌后抽取一定量样本进行培养，观察有无细菌和真菌（自然菌）生长。在规定条件下无菌生长者，可以判为灭菌合格。该试验程序繁琐，需专职微生物检验人员进行，且当日无法出结果（细菌需培养 5 d，真菌需培养 7 d），不便于被处理物品的随后使用，但因结果准确可靠，很多国家药典仍将之编入，我国亦然。该监测法在程序监测前设定灭菌剂量和程序，以及工业灭菌生产监测中多有使用。

在消毒方面，微生物学监测多用于对现场效果的测定，或对消毒剂可疑杀菌效果的实验室验证。现场消毒效果的监测多以自然菌的存活情况为准，实验室验证则以规定的标准试验菌株为准。

### 二、化学指示器材监测法

化学指示器材（chemical indicator）监测法，一般用于医疗器材灭菌和工业生产灭菌效果的监测。使用时，根据要求可将指示器材粘贴于物品包装表面，或置包装的中心部位，或单独置

于灭菌柜最难达到灭菌的部位，尔后与物品同步进行灭菌处理。通过化学物质在处理过程中的变化,以测定有关参数(表 18-1)是否达到要求，从而间接判断灭菌的效果。

表 18-1 常用灭菌方法监测用主要参数

灭菌方法	主要参数
压力蒸汽灭菌	温度、作用时间、蒸汽饱和度
干热灭菌	温度、作用时间
环氧乙烷灭菌	浓度、作用时间、相对湿度
电离辐射灭菌	射线总吸收量
蒸汽-甲醛灭菌	浓度、作用时间、相对湿度

注：“蒸汽-甲醛灭菌”指在专用灭菌柜中,预先抽真空,后通入甲醛气体与蒸汽,并于一定温度和相对湿度下协同作用的灭菌方法

(表内资料取自国际标准 ISO 11140-1)

化学指示器材最早用于压力蒸汽灭菌的监测，曾使用过的有硫磺管和苯甲酸管。硫磺和苯甲酸达到熔点,很快即熔化,能够表示达到的温度(119~122℃),但无法包括持续的时间(压力蒸汽灭菌一般需持续 15~20 min)，故现已不再使用。虽曾有以留点温度计代替上两种指示管对热力灭菌进行的监测，并可获知达到的最高温度，但因同样不能表达持续的时间，现亦仅限于只需了解灭菌中温度的观察。

新一代化学指示器材,多将对杀菌因子敏感并产生颜色变化的涂料(指示剂)印于纸片或塑料膜上制成。指示剂颜色的变化应是可调的，成品颜色变化的终点与相应参数的灭菌有效值(表 18-2)须相一致。所谓“终点”(end point)即指对指示器材规定“灭菌合格”时颜色的变化程度。监测时，根据指示剂颜色变化判断是否达到终点，以判断灭菌是否合格。少数亦有用指示剂外形变化程度表达所接受到的剂量多少，如晶体变为非晶体，或粉剂熔为块状。需要强调的，即使是此类新一代的化学指示器材，仍只是以灭菌方法规定的参数值来间接表达灭菌效果,其准确度有一定的局限性。

表 18-2 各种灭菌方法主要参数灭菌有效参考值<sup>(1)</sup>

灭菌方法	温度(℃)	作用时间(min)	气体浓度(mg/L)	相对湿度(%)	蒸汽饱和度(%)
压力蒸汽下排气式灭菌	121	15~20	...	...	85~100
压力蒸汽预真空式灭菌	132	3~4	...	...	85~100
干热灭菌	160	60	...	...	...
环氧乙烷灭菌	50~60	60	600~900	60~70	...
蒸汽-甲醛灭菌	50~80	60	270 <sup>(2)</sup>	60~90	85~100

注：(1)在实用中,各种灭菌方法条件变化较多,为适应此情况,在设计化学指示器材时所用的主要参数灭菌有效值亦会有所不同；(2)按灭菌实用福尔马林量(8 ml/0.03 m<sup>3</sup>)折算的约数,非为甲醛气体浓度

国际标准组织(International Organization for Standardization, ISO)根据化学指示器材的功能,将其分为 6 类：①第 1 类：过程指示器材(process indicators)，用于单个物品包或容器,可表示是否经过了灭菌处理过程。②第 2 类：特殊试验指示器材(indicators for use in specific tests),为有

关灭菌器和灭菌标准要求进行的特殊试验所用指示器材。③第 3 类:单参数指示器材( single parameter indicators), 设计中只考虑符合某单项参数要求的指示器材。④第 4 类:多参数指示器材( multi – parameter indicators) 设计中考考虑符合某灭菌程序多项关键参数要求的指示器材。⑤第 5 类:积分指示器材( integrating indicators), 设计中综合考虑符合所有参数要求的指示器材。一般以微生物灭活的 D 值或 z 值表达。⑥第 6 类: 仿真指示器材( emulating indicators, cycle verification indicators), 用于针对灭菌周期特定范围所有关键性参数的监测。参数值是以灭菌周期所设定的有关数值为准, 故又称周期确认指示器材。

(一)第 1 类过程指示器材

目前使用最为普遍的是指示胶带。指示胶带专用于粘贴在拟灭菌物品包（或容器）外，既有助于固定物品包，又可根据颜色变化标示该物品包是否已经经过灭菌处理过程，以防与未经灭菌处理的物品包相混，是目前使用量最多的化学指示器材。应该注意的是，指示胶带只在物品包的外面，无法表达包内中心部位是否达到所需参数值，因此其变色达到终点并不能表示包内物品灭菌合格。此外，由于只需表示物品是否经过灭菌处理，对参数终点值的要求较低（表 18 - 3), 因此不可用其代替对参数终点值要求较高的第 2 ~ 6 类指示器材（如指示卡、指示图）使用。

表 18 - 3 过程指示器材对主要参数的要求

灭菌方法	主要参数	
	不出现终点变化	全部出现终点变化
压力蒸汽灭菌(下排气式)	121 ~ 124℃(蒸汽), < 3 min	121 ~ 124℃(饱和蒸汽), ≤ 10 min
压力蒸汽灭菌(预真空式)	134 ~ 137℃(蒸汽), < 30 s	134 ~ 137℃(饱和蒸汽), ≤ 2 min
干热灭菌	160 ~ 165℃, < 20 min	160 ~ 165℃, 40 min
环氧乙烷灭菌	30 ± 1℃, RH(60 ± 10) %	30 ± 1℃, RH(60 ± 10) %
	环氧乙烷(600 ± 30)mg/L, < 5 min	环氧乙烷(600 ± 30)mg/L, ≤ 30 min
电离辐射灭菌	< 1 kGy	≥ 1 kGy
蒸汽 - 甲醛灭菌	70 ± 2℃,	70℃ ± 2℃,
	甲醛(10 ± 2)mg/L, < 5 min	甲醛(10 ± 2)mg/L, ≤ 20 min

(表内数据取自国际标准 ISO 11140 - 1)

(二)第 2 类特殊试验指示器材

目前使用较普遍的为预真空压力蒸汽灭菌中所专用的蒸汽穿透测试图（ indicator for steam penetration), 又称 BD 试验测试图( Bowie and Dick test sheet)。测试图以纸为底，大小相当于测试包横切面面积，全纸正面有用浅黄色指示剂印成的图案。使用时，将其夹于标准敷料测试包中心层，灭菌处理后取出，观察指示剂所印全图，如呈均匀黑色表示蒸汽穿透正常；变色不匀或有局部区域未变色，说明该部位蒸汽穿透不良，敷料包中心受热不匀，灭菌柜功能不正常，需进行检修。国际标准 ISO 11140 - 3 中规定，在灭菌器工作正常情况下，此类检测图在预真空压力蒸汽灭菌时的干燥饱和蒸汽下，134 ~ 135.5℃作用 3.5 min ± 5 s, 或 121 ~ 122.5℃作用 15 min ± 5 s, 皆应均匀变色至终点。

(三)第 3 类至第 6 类单参数、多参数、积分指示与仿真指示器材

主要用于在不同要求下对物品包灭菌效果的监测，现多将指示剂印于小卡片纸条上制成，

以便使用时置于物品包(或容器)的中心部位。在第 3 类至第 6 类指示器材之间,有关参数变化终点出现的上下限之间,可分为 3 档,第 3、4 类较宽,第 5 类其次,第 6 类最窄。以压力蒸汽灭菌指示卡为例,其具体规定见表 18-4。从表中可见,对积分与仿真指示器材制作的要求显然较单参数或多参数指示器材为严。

表 18-4 预真空压力蒸汽灭菌不同类别化学指示器材变化反应的要求

指示器材类别	开始有达到终点的变化	变化全部达到终点
第 3、4 类	132℃作用 2.7 min	134℃作用 3.5 min
第 5 类	133℃作用 3.0 min	134℃作用 3.5 min
第 6 类	133℃作用 3.3 min	134℃作用 3.5 min

注:蒸汽饱和度为 85%~100%;终点参数值为 134℃作用 3.5 min

(表内数据取自国际标准 ISO 11140-1)

三、生物指示器材监测法

生物指示器材通过对菌片上所染细菌芽孢在灭菌处理后存活的情况来指示所处理物品是否达到灭菌要求。之所以选用细菌芽孢,因其在微生物(不包括朊病毒)中对常用杀菌因子耐受力最强。此类器材对灭菌效果的监测最为准确,近年虽在设计与制造方面不断有所改善,却仍因经济、方便、快速等方面之不足,只能作为加强监测措施之一,未能完全取代化学指示器材的应用。目前,生物指示器材主要可分为以下三大类:①细菌菌片;②自含式生物指示管;③快读生物指示管。

(一)细菌菌片

灭菌监测所用细菌菌片是将规定指标菌的芽孢涂染于纸片上制成。所用芽孢杆菌菌种随灭菌时所用杀菌因子而异,一般规定为其芽孢耐受力较强者。最常使用的有嗜热脂肪杆菌(*Bacillus stearothermophilus*, ATCC 7953)和枯草杆菌黑色变种(*Bacillus subtilis var. niger*, ATCC 9372)两种。其中,嗜热脂肪杆菌芽孢对压力蒸汽和甲醛的耐受力较强,故在该两种灭菌处理中以其为指标菌;枯草杆菌黑色变种芽孢对干热和环氧乙烷的耐受力较强,可作为该两种灭菌的监测指标菌(表 18-5)。

表 18-5 灭菌监测常用指标菌芽孢对不同杀菌因子的耐受力

杀菌因子	温度(℃)	浓度(mg/L)	相对湿度(%)	D <sub>10</sub> (min)	
				嗜热脂肪杆菌芽孢	枯草杆菌黑色变种芽孢
干热	160	...	0	0.4	1.5
蒸汽	121	...	100	2.2	0.7
环氧乙烷	55	500	50	2.7	6.6
蒸汽-甲醛	73	14	100	4.0	1.4

(洁定公司提供资料,2000)

细菌芽孢即使同为一菌种,对杀菌因子的耐受力仍可有所不同。为使所用菌种的耐受力

接近一致，我国和国际标准组织分别对压力蒸汽灭菌监测所用菌片的耐受力作出了相应规定（表 18-6）。美国药典（第 24 版）发表了在美国典型生物指示器材对杀菌因子的耐受力（表 18-7）。

表 18-6 压力蒸汽灭菌常规监测用生物指示器材染菌量与热抗力的规定

规范或标准	载体染菌量	D 值	Z 值	存活时间	杀灭时间
消毒技术规范 (第 3 版,第 1 分册)	$5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$	1.3 ~ 1.9 min	...	3.9 min	3.9 min
国际标准 (ISO 11138-3)	$1 \times 10^5 (+0.1 \times 10^5)$	$1.5 \pm 0.5$ min	7℃	...	...

表 18-7 美国灭菌监测典型指标菌芽孢对不同杀菌因子的耐受力

细胞芽孢	杀菌因子	D <sub>10</sub> (min)	存活时间(min)	杀灭时间(min)
枯草杆菌黑色变种	干热(160℃)	1.9(1.0 ~ 3.0)	4.0 ~ 12.0	10.0 ~ 30.0
	(121℃)	5.0(2.0 ~ 15.0)	8.0 ~ 60.0	20.0 ~ 150.0
	环氧乙烷(600 mg/L, 54℃,60%RH)	3.0(2.6 ~ 5.8)	10.4 ~ 23.2	26.0 ~ 58.0
嗜热脂肪杆菌	蒸汽(121℃)	1.9(1.5 ~ 3.0)	6.0 ~ 12.0	15.0 ~ 30.0

注：(1)典型 (typical)系指市场常见者，与所谓标准 (standard)者不同；(2)载体含菌量为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  芽孢/载体；(3)D<sub>10</sub>括弧内数字为其最高值与最低值；(4)存活时间 (survival time)指经规定处理后，所试样本均有菌存活(定性)的最长处理时间(min)；(5)杀灭时间 (kill time)指经规定处理后，所试样本均无菌存活(定性)的最短处理时间(min)。  
(表内数据取自 US Pharmacopeia 24th ed. vol.3)

每菌片染菌量应随 D<sub>10</sub>值不同而异。D<sub>10</sub>值小，染菌量需大；D<sub>10</sub>值大，染菌量则减少。例如，D<sub>10</sub>值为 1.5 min 者，每菌片应染细菌芽孢  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  个；若 D<sub>10</sub>值为 0.8 min，则染细菌芽孢  $5 \times 10^8$  个。美国药典（第 24 版）规定，染菌量最小不低于 10<sup>4</sup> 个芽孢，最多不超过 10<sup>9</sup> 个芽孢。

出售或使用中的菌片应封装于特制的纸袋内。测试时，将菌片袋直接置物品包中央部位，灭菌处理后连袋取出送细菌检验室培养检测。嗜热脂肪杆菌芽孢培养于 56 ~ 60℃，枯草杆菌黑色变种芽孢培养于 35 ~ 37℃ 条件下。72 h(或按指示器材说明书规定的时间)观察结果。无菌生长表明灭菌成功，否则说明灭菌失败。

(二) 自含式生物指示管

为简化生物指示器材的使用，近年大量推广使用自含式生物指示管。该指示管系将细菌菌片与装有相应的液体细菌恢复培养基的小玻璃安瓿共封于一塑料管中制成，顶盖留有通气小孔，孔下隔以滤纸防止污染。为便于结果的观察，利用细菌生长产酸的原理，培养液中加入 pH 指示剂（如溴甲酚紫），以其颜色变化指示有无细菌生长。当无菌生长时，培养液呈清澈紫色，有菌生长时则变为浑浊黄色，肉眼即可判断。

监测时，将指示管直接置物品包中央。灭菌处理后，将指示管取出，弄破指示管内盛有液体培养基的玻璃安瓿，使该液体浸透菌片，尔后培养于温箱，或专用的自含式生物指示管现场培养罐中(分 56℃与 37℃两种，分别用于培养嗜热脂肪杆菌芽孢和枯草杆菌黑色变种芽孢指

示管)。各种指标菌培养所需温度与最终观察时间同细菌菌片。

(三)快读生物指示管

为快速了解灭菌效果，现已有用于压力蒸汽灭菌监测的快读生物指示管（**rapid readout biological indicator**）。该指示管利用嗜热脂肪杆菌芽孢生长中所产生的荧光物质来判断灭菌是否成功。其荧光的产生与嗜热脂肪杆菌芽孢结合的  $\alpha$ - 葡糖苷酶有关。该酶参与嗜热脂肪杆菌芽孢的生长，并可使无荧光基质 4- 甲基伞形基 -  $\alpha$  - D - 葡糖苷（**4 - methylumbelliferyl -  $\alpha$  - D - glucoside**）转化产生荧光。检测荧光，可证明酶的存在与否，酶的存在又证明细菌的存活和生长。由于荧光的产生较易察觉，从而在培养 3 h 后即可获得结果。检测时，在荧光观测器下观察，荧光阳性者，表明仍有嗜热脂肪杆菌生长，灭菌失败；荧光阴性则表明无菌生长，灭菌成功。在快读生物指示管所贴的标签上印有化学指示色条，若灭菌处理后色条未变色，已说明灭菌失败，不必再进行培养检测。

四、模拟包装监测法

在监测灭菌器或灭菌程序是否达到设计效果时，往往需要将化学指示器材和生物指示器材放于敷料包中或其他容器中进行检测。这些包装物品的大小、数量和取材，均会对灭菌效果有所影响。为求得统一，并方便使用，现有将化学指示器材与生物指示器材放于标准模拟包装中代替常用的真正物品包。

(一)Attest 1276 压力蒸汽灭菌测试盒（**steam test pack**）

结构简单，以一自含式生物指示管夹放于边长为 13.3 cm 见方的 40 张特制多孔卡纸中央，外用纸盒包装即成。总厚度为 2.5 cm。蒸汽对其穿透的情况与对医疗仪器促进协会（**Association for the Advancement of Medical Instrumentation, AAMI**, 美国）规定用 16 块手术巾组成的标准测试包相同（表 18-8, 18-9）。使用时，直接将该测试盒代替自制测试包置于灭菌柜内规定的具有代表性处即可。灭菌后，取出其中生物指示管进行培养检测。卡纸间夹有记录纸一张，可将结果记录其上备存。

表 18-8 下排气压力蒸汽灭菌测试盒与 AAMI 标准测试包灭菌监测结果比较

测试包装	作用不同时间(min)灭菌不合格率(%)		
	16	18	20
AAMI 标准测试包	100	60	5
3M 压力蒸汽灭菌测试盒(1276)	100	65	5

注:压力蒸汽灭菌测试盒中的生物指示管为 Attest 1262 型；下排气压力蒸汽灭菌温度为 121℃

（表内数据取自 3MT echnical Report

(二)Incheque 1233 BD 试验测试盒（**Bowie - Dick typetest pack**）

设计基本与压力蒸汽灭菌测试包相同，只是卡纸中央夹放的是蒸汽穿透测试图（**BD 试验测试图**），不放置生物指示管。使用时，将测试盒置于灭菌柜内规定的具有代表性的地方，灭菌后取出观测图面指示剂变黑是否均匀，以判断预真空压力蒸汽灭菌器工作是否正常。

表 18-9 预真空压力蒸汽灭菌测试盒与 AAMI 标准测试包灭菌监测结果比较

测试包装	作用不同时间(min)灭菌不合格率(%)			
	1	2	2.5	3
AAMI 标准测试包	70	35	15	5
3M 压力蒸汽灭菌测试盒(1276)	80	35	20	5

注：压力蒸汽灭菌测试盒中的生物指示管为 Attest 1262 型。预真空压力蒸汽灭菌温度为 133℃  
(表内数据取自 3M Technical Report)

(三)Attest 1278 环氧乙烷灭菌测试板(EO test pack)

用于环氧乙烷灭菌监测。因环氧乙烷灭菌对象多为医疗器材，其中较难穿透的是导管类物品。为此,本类测试器材设计为一塑料板状,板上注塑有一约长 45 cm 的小直径 1 mm 塑料管道,往返盘绕 7 个拐弯，代表拟灭菌的盘弯的导管。塑料管末端为一小室，内置有一自含式生物指示管和—化学指示卡。灭菌时，环氧乙烷由上方开口处进入，经多次弯绕进入末端小室作用于化学与生物指示器材。灭菌后除观察化学指示卡颜色变化外，并自小室取出生物指示管培养观察。

五、程序监测法

化学和生物指示器材的使用虽然较之取样做无菌检测为简单，但仍不能满足大规模工业生产灭菌工作监测的需求。近年推行的程序监测法( process monitoring )在这方面为一突破。该法先通过化学和生物学的反复检测，确认所设定的灭菌程序（包括必要参数合格值）足以在规定条件下使产品达到灭菌要求，尔后即根据每次处理程序和有关参数的记录，判断是否达到了灭菌的要求。这种方式的监测，开始制定有效程序时的难度和工作量虽较大，但随后的常规监测可以简单而快速，极适用于工业和医院中日常大量物品的灭菌处理。

由于影响各种灭菌或消毒方法效果的因素多少不一（表 18-10）,要求控制的参数项目随之不同，从而开展程序监测的难度亦不一样，一般情况下影响因素愈多，进行程序监测难度愈大。电离辐射灭菌与消毒的影响因素最少，因此使用程序监测者最多。

表 18-10 各种灭菌与消毒方法要求控制的影响因素

要求控制的影响因素	化学气体	化学液体	蒸汽	干热	过滤	电离辐射
作用时间	+	+	+	+	+	+
温度	+	+	+	+	-	-
包装法	+	+	+	+	-	-
体积和密度	+	-	+	+	-	+
压力/真空度	+	-	+	-	+	-
湿度	+	-	+	-	-	-
浓度	+	+	-	-	-	-
pH 值	-	+	-	-	-	-

(资料取自 DeRisio, 1986)

程序监测最重要的是对有关参数的测定，因此必须配备良好的仪表和记录设备。随传感

器技术（如热电偶、化学因子敏感探头）的发展，对各种参数的测定设备不断得到改进，记录仪亦逐步达到了自动化，尤其使用电脑直接控制和管理后，更使程序监测的可靠性达到了新的高点，不仅能够准确记录灭菌时有关参数数据，更可随时从显示图中了解灭菌程序进行的情况。随有关技术的进步，程序监测法将为今后发展的主要方向之一。

## 第二节 常用灭菌与消毒方法监测项目和注意事项

灭菌与消毒的成败将会严重影响健康甚至生命,同时也是一项技术含量较高的工作,因此有关监测工作既要求有高度责任心,亦需具备丰富的专业知识。在执行之中,除认真贯彻规定的工作制度和程序,正确进行必要的微生物学试验和检测,坚持做好各项有关记录外,还需注意各种灭菌与消毒方法中的特殊要求。

### 一、压力蒸汽灭菌

压力蒸汽灭菌在医院中的使用始于 19 世纪 80 年代左右,应该说已具有悠久的历史并积累了丰富经验,但由于影响灭菌效果的因素过多,特别是下排气式压力蒸汽灭菌,所以至今灭菌失败事例仍时有发生。

压力蒸汽灭菌欲取得良好的灭菌效果,首先应使蒸汽能顺利穿透包装并接触被处理物品上的微生物。蒸汽具有热负载高,冷凝时体积缩小,灭菌时热穿透快,相比之下空气对热的传导效果就相差很远。因此在压力蒸汽灭菌时,必须保证蒸汽的饱和度(85%~100%),并为蒸汽的穿透和空气的排出创造良好条件,否则易导致灭菌的失败。

由于压力蒸汽灭菌的成功与否在于所达到的温度(间接指标为蒸汽压力)、作用时间和热穿透的条件等是否合乎要求,故对灭菌的监测不应只观察化学或生物指示器材结果,而需进行以下较全面的观察和检测。

- 1.蒸汽的饱和度是否达到要求(85%~100%)。
- 2.物品的包装与摆放是否利于空气的排除和蒸汽的穿透(见第二章,压力蒸汽灭菌部分)。
- 3.灭菌器上的仪表(压力计、温度计)是否齐全和准确。灭菌时,温度和时间是否达到规定的要求。
- 4.由电脑控制的灭菌设备,工作开始时应核查原存程序与参数值有无变化。
- 5.预真空压力蒸汽灭菌在开始工作前是否进行了 BD 试验。
- 6.是否按规定使用化学和生物指示器材,灭菌结果是否达到合格要求。监测中不得使用硫磺管或苯甲酸管。留点温度计监测热力灭菌效果,虽然可获得达到的具体温度,但亦同样不能表达持续的时间,仅能在只需了解温度情况时使用。
- 7.必要时,对灭菌后物品抽样作无菌检查试验,以观察有无细菌生长。
- 8.所有的灭菌操作和检测记录是否齐全和实事求是(应设专用的记录簿)。
- 9.设备维修或新设备安装完毕,使用前是否对仪表的准确性和灭菌效果进行了检测验证。
- 10.新设计的程序,使用前是否对灭菌效果进行了检测验证。
- 11.灭菌难度较大,且没有处理经验的物品或特殊包装的物品,处理前是否对所选程序灭菌效果进行了检测验证,是否使用了化学与生物指示器材。



## 二、气体灭菌与消毒

气体灭菌与消毒为利用化学气体进行杀菌处理的方法，常用的有环氧乙烷和蒸汽—甲醛两类，此外曾报告的还有过氧化氢、过氧乙酸、二氧化氯和臭氧等。此类灭菌处理除所用药物不同外，均在一定容器中进行，步骤亦大致相同，一般包括：预抽真空、调节温度和湿度、送入所用气体、作用至规定时间、抽除作用气体并做无害化处理等。对此类灭菌与消毒监测应进行以下的观察和检测：

1. 物品的包装与排放是否适于空气的排除和消毒剂气体的穿透。
2. 灭菌器上的仪表(压力计、温度计)是否齐全和准确。
3. 核定所用消毒剂原液浓度。
4. 灭菌时,温度、相对湿度、消毒剂气体浓度和作用时间是否达到规定的要求。
5. 由电脑控制的灭菌设备，工作开始时应核查原存程序和参数值有无变化。
6. 物品的包装和摆放是否合乎要求。
7. 物品是否经过预温和预湿。因在气体灭菌与消毒中温度和湿度往往对其效果影响较大，一般要求物品在送入灭菌柜前进行预温和预湿，特别在气候寒冷或干燥时。
8. 核定送入灭菌柜内消毒剂的量。
9. 是否按规定使用化学和生物指示器材，灭菌结果是否达到合格要求。目前市售仅有环氧乙烷与甲醛灭菌监测用的指示器材。
10. 必要时，对灭菌后物品抽样做无菌检查试验，以观察有无细菌生长。
11. 所有的灭菌操作和检测记录是否齐全和实事求是（应设专用的记录簿）。
12. 设备维修或新设备安装完毕，使用前是否对仪表的准确性和灭菌效果进行了检测验证。
13. 新设计的程序，使用前是否对灭菌效果进行了检测验证。
14. 灭菌难度较大，且没有处理经验的物品或特殊包装的物品，处理前是否对所选程序灭菌效果进行了检测验证，是否使用了化学与生物指示器材。

## 三、化学消毒液的应用

化学消毒液使用方法简易方便，为人们所乐于接受，但其不足之处为：杀菌效果除与药液浓度和作用时间密切相关外，还受诸多因素影响，其本身更可被微生物所污染。为此，欲使化学消毒或灭菌取得应有效果，监测中应重点考虑以下项目。

### （一）消毒剂的选择

消毒剂可分为高效消毒剂、中效消毒剂和低效消毒剂三大类(见第 1 章),选用时必须与处理的对象和目的相适应,既不可将中、低效消毒剂用于灭菌处理,亦不宜将高效消毒剂取代中、低效消毒剂,用于所有对象的消毒处理。所谓高效、中效、低效,是对其杀菌能力的区分,不是对产品好坏档次的分类。应该说三类消毒剂各有其特点(表 18-11),均有其适宜的用途,不能以一代全。在使用中选择不当,不仅达不到灭菌与消毒要求,甚至可造成新的污染,如用低效消毒剂浸泡保存无菌器械;有时还可造成器物的损坏或对人体的伤害,又如使用具有腐蚀性的高效消毒剂处理不耐腐蚀物品,或用刺激性强的消毒剂涂擦或浸泡皮肤和黏膜。

表 18-11 各级消毒剂主要特性的比较

性 能	高效消毒剂	中效消毒剂	低效消毒剂
杀菌能力	+++	++	+
毒性	+++	++	+
刺激性	+++	++	+
腐蚀性	+++	++	+

注: +++ 强, ++ 中等, + 弱

## (二) 消毒剂溶液的浓度

市售消毒剂浓度多不统一,加以有的消毒剂如过氧乙酸、二氧化氯和次氯酸钠等有效成分极不稳定,因此在配制溶液时,对于浓度的计算一律应以杀菌有效成分为准,而不应以原药为 100% 计算。常用消毒剂的杀菌有效成分见表 18-12。

表 18-12 常用消毒剂的杀菌有效成分

消毒剂	有效成分	消毒剂	有效成分
含氯消毒剂	有效氯	碘伏	有效碘
过氧乙酸	过氧乙酸	戊二醛	戊二醛
福尔马林	甲醛	医用乙醇	乙醇
苯扎溴铵	苯扎溴铵	氯己定	氯己定

对浓度的检测,可用我国卫生部颁布的《消毒技术规范》(第三版)中规定的化学测定法,亦可用试纸测定法。现市售已有用于测定稳定性较差的含氯消毒剂、过氧化物类消毒剂与戊二醛等溶液浓度的试纸。该类试纸测定结果虽较粗放,但使用方便,仍不失为现场监测的实用方法之一。

## (三) 作用的时间

一般认为,在消毒液的使用中浓度是主要的,作用时间可忽略不计,其实不然。仅以 2% 强化中性戊二醛溶液为例,在实验室试验条件下将枯草杆菌黑色变种芽孢全部杀灭需作用 5 h (表 18-13)。时间与浓度共为使用剂量两个组成成分,缺一不可。浓度和时间虽可互相补偿,但均有一定限度,浓度过低或时间过短均不能达到杀菌的要求。在同样浓度下作用时间的长短,其杀菌效果明显不同。

表 18-13 2% 强化中性戊二醛对枯草杆菌黑色变种芽孢的杀灭作用

作用时间(h)	杀灭率(%)
1	95.80
2	99.83
3	99.99
4	99.99
5	100.00

(表内数据取自沈伟等, 1987)

#### (四)影响效果的因素

化学消毒液的杀菌效果可受多种因素影响,例如:温度、有机物、化学拮抗物质、酸碱度、微生物污染量、药物穿透条件等等。监测时,应注意有关条件是否超出正常范围,必要时加以检测、纠正。

#### (五)消毒剂污染的检测

消毒剂本身亦可受到污染,从而使灭菌与消毒失败。污染的原因除来自外界抗力较强微生物的进入外,还可能因消毒剂本身杀菌能力差,消毒液配制浓度过低,有效成分衰减,有机物污染过多等引起。为此监测时,应将此作为一重要问题加以注意,必要时进行微生物检测。

消毒剂污染检测,应为医院化学消毒液使用的常规监测项目。该检测由 Kelsey与 Maurer倡导,其基本检测方法如下:①吸取药液样本 1 ml。②加 9 ml 含相应中和剂的肉汤。③取 2 营养琼脂平板,各份滴 10 滴混合液,每滴 0.02 ml。④一平板作细菌培养(37℃),2 d 观察最后结果;一平板作真菌培养(20℃),7 d 观察最后结果。⑤计数菌落。⑥以两平板平均菌落数计算每毫升所含菌落形成单位量(cfu/ml)。

原 Kelsey与 Maurer 规定,若消毒剂含菌 > 250 cfu/ml 即不宜继续使用。在制定我国《医院卫生标准》(GB 15982 - 1995)时,考虑从严要求,改为使用中的消毒剂含菌量应 < 100 cfu/ml,并不得检出病原微生物。含菌量未超过容许标准并未检出病原微生物的消毒液可用于外科洗手后的浸泡消毒,医疗器材用后的消毒,和病房环境消毒等方面,但不能用于灭菌处理,或对无菌器材的浸泡保存。

#### (六)微生物学监测

化学消毒液杀菌效果的微生物学监测,多用于对现场效果的测定或对可疑杀菌效果的实验室验证。由于试验中,细菌转种时所粘附的消毒剂可继续对微生物起抑制作用,所以不论在现场对消毒效果的监测,或在实验室中对杀菌效果的确认,必须将残留于细菌表面消毒剂的抑菌作用消除,否则可导致结果的失真。特别是在测定涂抹、喷雾和浸泡消毒效果时。

因为消毒处理与灭菌的要求不同,只需达到无害化即可,不需全部杀灭,因此在监测时,应进行定量培养计算杀灭率以判定是否达到消毒所要求的标准。

### 四、紫外线消毒

紫外线使用方便,杀菌谱广,但穿透能力差,只能作用于物品表面,阴影部位无效,故多只限于对光滑表面,或空气和水等流动物质的消毒,极少用于灭菌处理。对其消毒效果的监测,使用辐照度值测定法较为方便。必要时,才进行微生物杀灭试验。因紫外线肉眼看不见,辐照度值的测定须使用紫外线照射强度测定仪或化学指示卡进行。

此外,紫外线反射率低、照射强度随灯管质量、使用时间(愈长愈差)、距离(愈远愈差)以及电压(最佳为 220 V)、所用镇流器电阻(愈小愈好,一般应  $\leq 37 \Omega$ )和室温(最佳  $\geq 15^\circ\text{C}$ )而异,对各种微生物杀灭所需照射剂量亦不同,因此在确定可否达到应有消毒效果,应全面考虑上述问题进行综合判断。对紫外线消毒应用中的监测主要需考虑以下几点:

- 1.紫外线灯使用的管理(清洁、维修、使用时间的记录等)。
- 2.室内灯管装置的数量是否合乎要求(室内空气消毒时,平均每  $10 \text{ m}^2$  至少安装 30 W 灯管 1 支)。
- 3.照射时的电气条件是否为最佳条件(电压、镇流器电阻)。

4. 室温是否在 15℃ 或以上。
5. 灯管装设的位置是否适宜, 关键部位是否可受到足量紫外线的直接照射。
6. 灯罩的质量 (以光滑铝表面最佳)。
7. 使用场所条件 (空气中灰尘、相对湿度、人员活动情况等)。
8. 灯管的辐照度值  $\geq 70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。
9. 消毒对象受到的照射剂量 (随微生物而异)。
10. 拟灭活的微生物种类和污染程度。

## (二) 辐照度值的测定

辐照度值测定可用于对灯管性能的了解, 以及确定消毒照射所需时间。对该值的测定, 国内大医院多以辐照度值测定仪进行, 而中、小医院则多使用较简便的化学指示卡。国产辐照度值测定仪可使紫外线经光电管变为电能, 而后通过安培表显示结果。用化学指示卡测定, 较粗放, 不如辐照度值测定仪测定的结果准确, 但足以将合格和不合格的灯管分开。

对灯管的评价, 一般应以距灯管 1 m 的中心处所测值为准。按《消毒技术规范》(第三版) 规定, 新购 30 W 灯管辐照度值应  $\geq 90 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 使用中灯管则应  $\geq 70 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。

## (三) 杀菌效果的测定

对细菌杀灭的验证, 一般使用枯草杆菌黑色变种芽孢或真菌黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 孢子, 如拟了解对某特殊菌种的杀灭效果, 可直接用该菌种进行验证。用细菌测定的结果, 不能代表对真菌的杀灭情况, 因为后者对紫外线的抗力较强。

试验应选用载体定量法。一般多用玻璃、金属、塑料等具有硬性光滑表面物质制成的载体。每片载体的染菌量应为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu}$ 。因紫外线难以穿透至载体的背面, 故染菌时要防止菌液流到载体背面而导致错误结果。不宜用纸片或布片等表面粗糙和吸水性强的载体, 因表面粗糙易影响紫外线的杀菌效果, 吸水性强的载体易使菌液透至载体的背面。此外, 亦不宜将菌液直接滴于琼脂平板上进行照射试验, 因为菌悬液可被吸入琼脂内, 而紫外线不易穿入其中, 细菌周围的微小环境, 如湿度和光滑性等, 与消毒的实际情况相差亦较远。

空气消毒试验宜使用筛孔式采样器采样, 现场消毒的监测限于条件时, 亦可用平板沉降法进行。

监测工作中有不少是行政性的管理, 但要在监测中依据科学原则, 发现问题, 解决问题, 不从主观臆测出发, 仍需从事大量的技术性调查和检验工作。目前, 已有一些检测的设备和技術常规, 但仍远未满足要求, 需待进一步改进。此外, 医院中灭菌与消毒的检验工作多由从事临床检验工作人员兼顾, 往往满足不了数量和技术上的特殊要求。如何理顺此关系, 亦为完善医院中灭菌与消毒自我监测工作的一个重要环节。只有由专门的技术人员甚或实验室长期系统从事有关检验, 才能不断提高监测质量, 为灭菌与消毒工作的改进提出有力的依据。

(刘育京)

## 参考文献

- 1 国家技术监督局、中华人民共和国卫生部. 医院消毒卫生标准 GB15982 - 1995). 中华人民共和国卫生部, 1996

- 2 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.中华人民共和国卫生部,1999
- 3 沈伟,孙玉卿,夏立人.强化中性戊二醛与亚硝酸钠混合溶液消毒作用的观察.消毒与灭菌,1987.4(1):15
- 4 United States Pharmacopeial Convention, Inc. The United States Pharmacopeia XXIV, Vol. 3, 2000
- 5 ISO. Sterilization of health care products – chemical indicators – Part 1: General requirements (ISO 11140 – 1). 1995
- 6 ISO. Sterilization of health care products – chemical indicators – Part 3: Class 2 indicators for steam penetration test sheets (ISO 11140 – 3). 2000
- 7 ISO. Sterilization of health care products – biological indicators – Part 3: biological indicators for moist heat sterilization (ISO 11138 – 3). 1995
- 8 3M Health Care. Rapid readout technology. London: 3M Canada Inc, 1996: 2 – 10
- 9 3M Canada Inc. 3M Attest 1276 steam pack technical report. 3M Technical Report, 1993
- 10 DeRisio RJ. Sterilization concepts and methods of sterilization employed by the hospital and industry. In: Sterilization of medical products. Montreal, Canada: Polyscience Publications Inc, 1986: 17 ~ 31



### 第三篇 消毒学试验、研究方法

第十九章	常用消毒剂含量测定 .....	(269)
第二十章	细菌消毒试验 .....	(281)
第二十一章	真菌消毒试验 .....	(323)
第二十二章	病毒灭活试验 .....	(329)
第二十三章	残余消毒剂的去除 .....	(342)
第二十四章	灭菌器械微生物鉴定试验 .....	(354)
第二十五章	消毒剂对金属腐蚀性试验 .....	(364)
第二十六章	消毒剂稳定性试验 .....	(367)
第二十七章	消毒机理研究方法 .....	(372)
第二十八章	消毒剂毒理试验 .....	(380)





# 第十九章 常用消毒剂含量测定

## 第一节 概述

杀菌有效成分的测定,是鉴定消毒剂质量的基本措施之一。测定消毒剂有效成分实际含量,可用于检查消毒剂原药是否合格,或所配消毒液中杀菌有效成分的含量是否准确。此外,还可在配制所需浓度消毒液时作为计算稀释倍数的依据。

### 一、测定要求

1.测定时,滴定液用量不宜超过滴定管所标识量。半途添加滴定液可影响滴定的准确性。文内规定滴定时所取样本的容量(包括浓度),均根据此原则设定。若所测消毒剂浓度过高,可适当减少取样量或经稀释后取样测定,但以滴定液用量不少于滴定管标识量的一半为度,以减少测定结果的误差;若消毒剂浓度过低,可增加取样量或将滴定液稀释后测定。

2.本测定中,溶液或消毒剂的百分比有下列3种含义:①%(g/ml)表示溶液100 ml中含溶质若干克,消毒剂100 ml中含有效成分若干克;②%(g/g)表示溶液100 g中含溶质若干克,消毒剂100 g中含有效成分若干克;③%(ml/ml)表示溶液100 ml中含溶质若干毫升,消毒剂100 ml中含有效成分若干毫升。

3.所规定取固体药物的量为参考值。测定中实际取值可略低或略高,但均需精确至称量值的千分之一。如称取1 g与0.1 g,分别精确至0.001 g与0.0001 g。按规定的精确度,结果的有效数字均取4位数。

4.每瓶样液浓度的滴定,均重复3次。每次重复滴定前,均需将滴定管中滴定液补足至全量。3次间的误差率不得超过0.5%。

5.方法中所用试剂的纯度涉及基准、分析与化学等3级。未作专门说明者,一般采用分析纯。有的配制滴定液试剂(如硫代硫酸钠)因配制后尚需经专门处理,亦可用化学纯。

6.本测定中,“滴定液”是指经过标定,浓度准确至0.001~0.0001 mol/L的溶液,未经浓度标定者则称“溶液”,以示区别。摩尔(mole, mol)为物质质量的单位,当分子、原子或其他粒子等的个数约为 $6.02 \times 10^{23}$ 时即为1 mol。本测定中滴定液浓度的计算,除碘滴定液按原子量计算外,其他滴定液均按分子量计算。

7.本测定方法主要用于单一消毒剂。对复方消毒剂中某一成分含量的测定,可采用其他标准方法;若以该复方中不含本成分的其他成分混合液作空白对照可以排除干扰,亦可采用本方法测定。

8.碘化钾溶液宜当天现配。配制的碘化钾溶液及所用碘化钾易被空气氧化,每次取后应及时加盖。一旦变成黄色即不可再用。

9.用硫代硫酸钠溶液滴定需加淀粉溶液时,一定待溶液至淡黄色再加。过早加淀粉,溶液中多量的游离碘易与淀粉生成过多的碘淀粉吸附产物,影响终点的准确。

10. 所用器材均需洗干净, 再用蒸馏水冲洗 3 遍。
11. 所用量器不能随意加热。量瓶严禁加热。

## 二、测定器材

1. 移液管 1 ml、5 ml、10 ml、25 ml)。
2. 滴定管 25 ml、50 ml 及 < 25 ml, 酸式与碱式)。
3. 毛细滴管。
4. 碘瓶 100 ml、250 ml)。
5. 量瓶 50 ml、100 ml、250 ml、1 000 ml)
6. 锥形瓶 250 ml、500 ml)。
7. 称量杯(瓶)。
8. 吸球。
9. 分液漏斗 250 ml)。
10. 量筒。
11. 烧杯。
12. 研钵。
13. 垂熔玻璃滤器。
14. 比重计。
15. 天平(感量 0.1 mg)。

## 第二节 含量测定方法

### 一、有效氯含量的测定

1. 方法原理 采用碘还原滴定法(碘量法的一种)。该法是在酸性溶液中有效氯氧化碘化钾, 释放出游离碘, 再以硫代硫酸钠滴定液与游离碘反应。根据硫代硫酸钠滴定液用量, 计算有效氯含量。

2. 试剂的配制 配制 2 mol/L 硫酸、10%(g/ml)碘化钾与 0.5%(g/ml)淀粉等溶液。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

3. 取样 对含有效氯 5%~8%(g/ml)的液体含氯消毒剂, 吸取 10.0 ml 放入 100 ml 量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 混匀。对含有效氯 50%~80%(g/g)的固体含氯消毒剂, 称取 1 g 精确至 0.001 g 置烧杯中(难溶者置研钵中, 研磨后)以蒸馏水溶解, 转入 100 ml 量瓶中。称量杯及烧杯或研钵需用蒸馏水洗 3 次, 洗液全部转入量瓶。

4. 测定步骤 向 100 ml 碘瓶中加入 2 mol/L 硫酸 10 ml、10% 碘化钾溶液 10 ml 和混匀的消毒剂稀释液 10.0 ml。此时, 溶液出现棕色。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘瓶盖缘, 置暗处 5 min。打开盖, 让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液(装于 25 ml 滴定管中)滴定游离碘, 边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 0.5% 淀粉溶液 10 滴, 溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失, 记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量, 并将滴定结果用空白试验校正。若空白试验中有硫代硫酸钠消耗, 则将滴定用去硫代硫酸钠毫升数减去空白试验消耗数, 代入公式计

算。重复测 3 次,取 3 次平均值进行以下计算。

5.计 算 因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 ml 相当于 0.03545 g 有效氯,故可按下式计算有效氯含量:

$$\text{有效氯含量(g/g或 g/ml)} = \frac{C \times V_{st} \times 0.03545}{m \text{ 或 } V} \times 100\%$$

C 为硫代硫酸钠滴定液浓度 (mol/L);  $V_{st}$  为滴定用去硫代硫酸钠滴定液毫升数; m 为碘瓶中所含消毒剂原药克数, v 为碘瓶中含液体消毒剂原液毫升数。

## 二、有效碘含量的测定

1.方法原理 属于碘氧化滴定法之反滴定。在弱酸性溶液中,用硫代硫酸钠滴定液(还原剂)滴定碘消毒液。根据硫代硫酸钠滴定液用量,计算有效碘含量。

2.试剂的配制 配制 0.5% (g/ml) 淀粉溶液。备 36% (g/g) 醋酸溶液。配制并标定 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

3.取 样 向 100 ml 碘瓶中精确加含有效碘 3% ~ 6% (g/ml) 的含碘消毒剂样液 5.0 ml。

4.测定步骤 向加有样液的碘瓶中加入醋酸 1 滴。用 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液滴定(用 25 ml 滴定管,若预计含有效碘 6% ~ 12% (g/ml) 时用 50 ml 滴定管),边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 0.5% 淀粉溶液 10 滴(溶液立即变蓝色),继续滴定至蓝色消失,记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量,并将滴定结果用空白试验校正。重复测 3 次,取 3 次平均值进行以下计算。

5.计算 由于 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 ml 相当于 0.1269 g 有效碘,故可按下式计算有效碘含量:

$$\text{有效碘含量(g/g 或 g/ml)} = \frac{C \times V_{st} \times 0.1269}{m \text{ 或 } V} \times 100\%$$

C 为硫代硫酸钠滴定液浓度 (mol/L);  $V_{st}$  为滴定用去硫代硫酸钠滴定液毫升数; m 为碘瓶中所含消毒剂原药克数, v 为碘瓶中含液体消毒剂原液毫升数。

## 三、过氧乙酸( $C_2H_4O_3$ )含量的测定

1.方法原理 属于修改的碘还原滴定法。在酸性溶液中,用高锰酸钾将混于过氧乙酸溶液中的过氧化氢氧化分解;再以碘还原滴定法测定过氧乙酸含量。

2.试剂的配制 配制以下溶液: 2 mol/L 硫酸、10% (g/ml) 碘化钾、0.01 mol/L 高锰酸钾、10% (g/ml) 硫酸锰、3% (g/ml) 钼酸铵与 0.5% (g/ml) 淀粉。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

3.取 样 取 4.0 ml 含量为 12% ~ 22% (g/ml) 的过氧乙酸样液,于 100 ml 量瓶中用蒸馏水稀释至刻度,混匀。

4.测定步骤 向 100 ml 碘瓶中加入 2 mol/L 硫酸 5 ml, 10% 硫酸锰 3 滴,混匀的过氧乙酸稀释液 5.0 ml,摇匀并用 0.01 mol/L 高锰酸钾溶液滴定至溶液呈粉红色。随即加 10% 碘化钾溶液 10 ml 与 3% 钼酸铵 3 滴,摇匀并用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液(装于 25 ml 滴定管中)滴定至淡黄色。加入 0.5% 淀粉溶液 3 滴(溶液立即变蓝色),继续用硫代硫酸钠滴定至蓝色消失,记录硫代硫酸钠滴定液的总用量。重复测 3 次,取 3 次平均值进行以下计算。

5.计算 由于 1 mol/L 硫代硫酸钠 1 ml 相当于 0.03803 g 过氧乙酸,故可按下式计算过氧

乙酸含量:

$$\text{过氧乙酸含量 (g/ml)} = \frac{C \times V_{st} \times 0.03803}{V} \times 100\%$$

$C$  与  $V_{st}$  分别为硫代硫酸钠滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数;  $V$  为碘瓶中所含过氧乙酸样液毫升数。

#### 四、过氧化氢( $H_2O_2$ )含量的测定

1. 方法原理 采用氧化还原滴定法。在酸性溶液中过氧化氢遇到高锰酸钾时起还原剂作用, 被氧化分解。根据与过氧化氢反应的高锰酸钾滴定液用量, 计算过氧化氢含量。

2. 试剂的配制 配制 2 mol/L 硫酸与 10% (g/ml) 硫酸锰等溶液。另外配制并标定 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液。

3. 取样 取 1.0 ml 含过氧化氢 21% ~ 40% (g/ml) 的样液, 于 100 ml 量瓶中用蒸馏水稀释至刻度, 混匀。

4. 测定步骤 取过氧化氢稀释液 10.0 ml, 置 100 ml 碘瓶中, 加入 2 mol/L 硫酸 20 ml 与 10% 硫酸锰 3 滴, 摇匀。用 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液(装于 25 ml 滴定管中) 滴定至溶液呈粉红色, 记录高锰酸钾滴定液用量。重复测 3 次, 取 3 次平均值进行以下计算。

5. 计算 因 1 mol/L 高锰酸钾滴定液 1 ml 相当于 0.08505 g 过氧化氢, 故可按下式计算过氧化氢含量:

$$\text{过氧化氢含量 (g/ml)} = \frac{C \times V_{pp} \times 0.08505}{V} \times 100\%$$

$C$  与  $V_{pp}$  分别为高锰酸钾滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数;  $V$  为碘瓶中所含过氧化氢样液毫升数。

#### 五、臭氧( $O_3$ )含量的测定

1. 方法原理 采用碘还原滴定法。臭氧氧化碘化钾, 释放出游离碘。

2. 试剂的配制 配制 3 mol/L 硫酸、20% (g/ml) 碘化钾与 0.5% (g/ml) 淀粉等溶液。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

3. 取样 检测含量为 100 ~ 590 mg/L 的臭氧水 (臭氧水溶液) 浓度时, 吸取样本 100.0 ~ 300.0 ml 于 500 ml 带塞锥形瓶中, 加 20% 碘化钾溶液 20 ml, 混匀。再加 3 mol/L 硫酸 5 ml, 瓶口加塞, 静置 5 min。

检测臭氧气体(含量为 6 ~ 11 mg/L) 浓度时, 将采样液(蒸馏水 350 ml 与 20% 碘化钾溶液 20 ml) 装于 500 ml 带塞锥形瓶中。从臭氧发生器排气管处采臭氧气体 5 L 以上入瓶内, 使经采样液并溶于其中。再加 3 mol/L 硫酸 5 ml, 瓶口加塞, 静置 5 min。

4. 测定步骤 将上述两种样本均用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液(装于 50 ml 滴定管中, 检测含量少于 100 mg/L 的臭氧水或含量少于 6 mg/L 的臭氧气体浓度时, 用 0.01 mol/L 硫代硫酸钠滴定液, 装于  $\leq 25$  ml 滴定管中) 滴定至溶液呈淡黄色时加 0.5% 淀粉溶液 1 ml, 继续滴定至无色。记录用去硫代硫酸钠滴定液总量, 并将滴定结果用空白试验校正。重复测 3 次。

5. 计算 取 3 次测试平均值计算臭氧浓度。因 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 ml 相当于 24.00 mg 臭氧, 故臭氧含量可按下式计算:

$$\text{臭氧含量 (mg/L)} = \frac{C \times V_{st} \times 24.00}{V} \times 100\%$$

$C$  与  $V_{st}$  分别为硫代硫酸钠滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数;  $V$  为臭氧水升数或其气体采样升数。

## 六、二氧化氯 ( $\text{ClO}_2$ ) 含量的测定

1. 方法原理 采用加丙二酸的碘还原滴定法。

2. 试剂的配制 配制 2 mol/L 硫酸、10% (g/ml) 碘化钾、0.5% (g/ml) 淀粉等溶液与 10% (g/ml) 丙二酸溶液 (10 g 丙二酸加无离子水溶解成 100 ml)。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液。

3. 取样 取二氧化氯样液 1.0 ml 对含量为 8 000 ~ 16 000 mg/L 者, 置于含 100 ml 无离子水的碘瓶中, 加 10% 丙二酸溶液 2 ml, 摇匀。静置反应 2 min。

4. 测定步骤 向丙二酸反应后的样液中加 2 mol/L 硫酸 10 ml, 10% 碘化钾溶液 10 ml。盖上盖并振摇混匀后加蒸馏水数滴于碘瓶盖缘, 置暗处 5 min。打开盖, 让盖缘蒸馏水流入瓶内。用硫代硫酸钠滴定液 (装入 25 ml 滴定管中) 滴定游离碘, 边滴边摇匀。待溶液呈淡黄色时加入 0.5% 淀粉溶液 10 滴, 溶液立即变蓝色。继续滴定至蓝色消失, 记录用去的硫代硫酸钠滴定液总量, 并将滴定结果用空白试验校正。重复测 3 次, 取 3 次平均值进行以下计算。

5. 计算 由于 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 ml 相当于 13.49 mg 二氧化氯, 故可按下式计算二氧化氯含量:

$$\text{二氧化氯含量 (mg/L)} = \frac{C \times V_{st} \times 13.49}{V} \times 1\,000$$

$C$  与  $V_{st}$  分别为硫代硫酸钠滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数;  $V$  为碘瓶中所含二氧化氯样液毫升数。

## 七、甲醛 ( $\text{CH}_2\text{O}$ ) 含量的测定

1. 方法原理 采用碘氧化滴定法 (碘量法的一种)。在碱性溶液中过量碘滴定液与甲醛反应完成后, 将溶液调至酸性, 再以硫代硫酸钠滴定液与剩余碘反应。根据碘滴定液与硫代硫酸钠滴定液用量, 计算甲醛含量。

2. 试剂的配制 配制 5% (g/ml) 氢氧化钠溶液、稀盐酸溶液 (1 份盐酸加 2 份蒸馏水) 与 0.5% (g/ml) 淀粉溶液。配制并标定 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液与 0.05 mol/L 碘滴定液。

3. 取样 取 1.0 ml 含量为 20% ~ 40% (g/ml) 的甲醛溶液样液置于 100 ml 量瓶中, 用蒸馏水稀释至刻度, 混匀。

4. 测定步骤 向碘瓶中加 5% 氢氧化钠溶液 10 ml 和混匀的甲醛稀释液 5.0 ml, 再自 50 ml 滴定管缓慢加入 0.05 mol/L 碘滴定液约 40 ml, 边加边摇匀, 至溶液呈鲜黄色, 精确记下用去的碘滴定液毫升数。将碘瓶盖盖紧并加蒸馏水于盖缘。放置 20 min 后再加入 25 ml 稀盐酸, 并用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 (装入 25 ml 滴定管中) 滴定至溶液呈淡黄色。加入 0.5% 淀粉溶液 10 滴 (溶液立即变蓝色), 继续用硫代硫酸钠滴定液滴定至蓝色消失。记录硫代硫酸钠滴定液总用量。重复测 3 次, 取 3 次的平均值进行以下计算。

5. 计算 因 1 mol/L 碘滴定液 1 ml 相当于 0.01501 g 甲醛, 故可按下式计算甲醛含量:

$$V_{\text{IS}} = \frac{C_{\text{st}} \times V_{\text{st}}}{C_{\text{I}}}; V_{\text{IF}} = V_{\text{I}} - V_{\text{IS}}$$

$$\text{甲醛含量 (g/ml)} = \frac{C_{\text{I}} \times V_{\text{IF}} \times 0.01501}{0.05} \times 100\%$$

$V_{\text{IS}}$ 为与硫代硫酸钠反应的碘滴定液毫升数;  $C_{\text{st}}$ 与  $V_{\text{st}}$ 分别为硫代硫酸钠滴定液的浓度 (mol/L)与滴定中用去的毫升数;  $C_{\text{I}}$ 与  $V_{\text{I}}$ 分别为碘滴定液浓度 (mol/L)与滴定中用去的毫升数;  $V_{\text{IF}}$ 为与甲醛反应消耗的碘滴定液毫升数; 0.05为碘瓶中所含甲醛样液毫升数。

## 八、戊二醛 ( $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ )含量的测定

1. 方法原理 采用酸碱滴定法。盐酸羟胺与戊二醛反应生成盐酸, 盐酸全部被过量三乙醇胺反应完, 再以硫酸滴定液与剩余三乙醇胺反应。根据硫酸滴定液用量, 计算戊二醛含量。

2. 试剂的配制 配制 6.5% (ml/ml) 三乙醇胺溶液、0.04% (g/ml) 溴酚蓝乙醇溶液与盐酸羟胺中性溶液 (17.5 g 盐酸羟胺加蒸馏水 75 ml 溶解, 并加异丙醇稀释至 500 ml, 摇匀。加 0.04% 溴酚蓝乙醇溶液 15 ml, 用 6.5% 三乙醇胺溶液滴定至溶液显蓝绿色)。配制并标定 0.25 mol/L 硫酸滴定液。

3. 取样 取含量约 2% (g/ml) 的戊二醛消毒剂样液 10.0 ml 置 250 ml 碘瓶中。

4. 测定步骤 向加有戊二醛样液的碘瓶中精确加 6.5% 三乙醇胺溶液 20.0 ml 与盐酸羟胺中性溶液 25 ml, 摇匀。静置反应 1 h 后, 用 0.25 mol/L 硫酸滴定液 (装于 25 ml 滴定管中) 滴定。待溶液显蓝绿色, 记录硫酸滴定液用量。同时, 以不含戊二醛的三乙醇胺、盐酸羟胺中性溶液重复上述操作 (空白对照, 若所测样品为碱性戊二醛溶液, 则作为空白对照的前述溶液中应含与样品中同量的酸碱调节剂)。重复测 3 次, 取 3 次的平均值进行以下计算。

5 计算 由于 1mol/L 硫酸滴定液 1 ml 相当于 0.1001 g 戊二醛, 因此可按下式计算戊二醛含量:

$$\text{戊二醛含量 (g/ml)} = \frac{C \times (V_2 - V_1) \times 0.1001}{V} \times 100\%$$

$C$  为硫酸滴定液浓度 (mol/L);  $V_1$  与  $V_2$  分别为样品与空白对照滴定中用去的硫酸滴定液毫升数;  $V$  为戊二醛样品毫升数。

## 九、环氧乙烷 ( $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}$ )含量的测定

1 方法原理 采用酸碱滴定法。在氯化镁催化下, 用过量盐酸将环氧乙烷全部反应掉, 再以氢氧化钠滴定液与剩余盐酸反应。根据氢氧化钠滴定液用量, 计算环氧乙烷含量。

2. 试剂的配制 配制 0.5% (g/ml) 甲基橙溶液及盐酸 - 氯化镁溶液 (在 0.2 mol/L 盐酸中加入  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  120 g, 溶解并稀释至 100 ml)。配制并标定 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液。

3. 取样 取 20 ml 盐酸 - 氯化镁溶液放入 40 ml 称量瓶中, 盖上瓶盖, 称重。于冰瓶中取出装有环氧乙烷样品的容器, 吸取 3~4 滴含量 > 14% (g/g) 的环氧乙烷样品 (30~40 mg) 尽快放入称量瓶中, 重新盖上瓶盖, 混匀, 称重。两次重量差即为环氧乙烷样品重量。

4. 测定步骤 向上述样本中加 0.5% 甲基橙溶液 1 滴作为指示剂, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液 (装入 25 ml 滴定管中) 滴定。当红色溶液变成黄色时, 记录氢氧化钠滴定液用量。同时以蒸馏水代替环氧乙烷重复上述操作 (空白对照)。重复测 3 次, 取 3 次的平均值进行以下计

算。

5. 计算 由于 1 mol/L 氢氧化钠滴定液 1 ml 相当于 0.04405 g 环氧乙烷,故可用下式计算其含量:

$$\text{环氧乙烷含量(g/g)} = \frac{C \times (V_2 - V_1) \times 0.04405}{m} \times 100\%$$

C 为氢氧化钠滴定液浓度(mol/L);  $V_1$  与  $V_2$  分别为样品与空白对照滴定中用去的氢氧化钠滴定液毫升数; m 为环氧乙烷样品的克数。

## 十、乙醇( $C_2H_6O$ )含量的测定

1. 方法原理 采用比重法。在一定温度下某一浓度乙醇溶液有相应的比重。用比重计测出乙醇含量。

2. 测定步骤 于约 20℃ 在量筒中加入适量乙醇样液,其量以使比重计放入后能充分浮起为准。将比重计下按后,缓慢松手,当其上浮静止且溶液无气泡时,读取液面处比重计刻度即为其百分含量。

## 十一、醋酸氯己定(醋酸洗必泰, $C_{22}H_{30}Cl_2N_{10} \cdot 2C_2H_4O_2$ )含量的测定

1. 方法原理 采用复分解反应、酸碱指示滴定法。当酸性氧化剂高氯酸将氯己定反应完时,溶液呈酸性,用甲基橙指示。根据高氯酸滴定液用量,计算醋酸氯己定含量。

2. 试剂的配制 配制甲基橙的饱和丙酮溶液 0.1 g 甲基橙加约 50 ml 丙酮,振摇使其溶解为饱和溶液。备丙酮和冰醋酸。配制并标定 0.1 mol/L 高氯酸滴定液。

3. 取样 取含量 > 78%(g/g) 的醋酸氯己定 0.5 g 精确至 0.0001 g,于 100 ml 碘瓶中加丙酮 30 ml 与冰醋酸 2 ml,振摇使溶解。

4. 测定步骤 向上述样本中加甲基橙的饱和丙酮溶液 1.0 ml,用高氯酸滴定液(装入 25 ml 滴定管中)滴定。待溶液显橙色,记录高氯酸滴定液用量。同时以不含氯己定的丙酮与冰醋酸溶液重复上述操作(空白对照)。重复测 3 次,取其平均值进行以下计算。

5. 计算 因为 1 ml 的 1 mol/L 高氯酸滴定液相当于 0.3128 g 醋酸氯己定,故可按下式计算醋酸氯己定含量:

$$\text{醋酸氯己定含量(g/g)} = \frac{C \times (V_1 - V_2) \times 0.3128}{m} \times 100\%$$

C 为高氯酸滴定液浓度(mol/L);  $V_1$  与  $V_2$  分别为样品与空白对照滴定中所用高氯酸滴定液毫升数; m 为醋酸氯己定样品克数。

若为醋酸氯己定溶液,则取合适量(精确到 0.1 ml),置于预先称重的洁净玻璃蒸发皿(重量为  $G_1$ )中。置水浴上加热蒸干,称重( $G_2$ )。以  $G_2$  减去  $G_1$  即得醋酸氯己定重量。然后,用 30 ml 丙酮与 2 ml 冰醋酸,分 3 次将蒸发皿上不挥发物洗入碘瓶中。待不挥发物全部溶解后,按上述测定步骤测定其含量。亦可以溶液毫升数代入公式分母,计算醋酸氯己定的含量(g/ml)。必要时,将不含氯己定的该溶液蒸干,作为空白对照进行测定,以空白对照终点显色作为所测样本终点显色的标准。

## 十二、苯扎溴铵(新洁尔灭, $C_{22}H_{40}BrN$ )含量的测定

1. 方法原理 采用复分解反应、酸碱指示滴定法。在苯扎溴铵氯化物碱性溶液中,溴酚蓝显

蓝色, 与四苯硼钠反应的生成物不溶于氯仿。根据四苯硼钠滴定液用量, 计算苯扎溴铵含量。

2. 试剂的配制 配制氢氧化钠试液(4.3 g 氢氧化钠加蒸馏水溶解成 100 ml 溶液), 溴酚蓝指示液(0.1 g 溴酚蓝加 0.05 mol/L 氢氧化钠溶液 3 ml, 溶解, 再加蒸馏水至 200 ml)。备氯仿。配制并标定 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液。

3. 取样 取含量 > 79% (g/g) 的苯扎溴铵样品 0.25 g (精确至 0.0001 g, 若为约 5% (g/ml) 溶液, 取 5.0 ml), 置 250 ml 碘瓶中。加蒸馏水 50 ml 与氢氧化钠试液 1 ml, 摇匀。

4. 测定步骤 向上述样本中加溴酚蓝指示液 0.4 ml 与氯仿 10 ml。用四苯硼钠滴定液(装入 50 ml 滴定管中)滴定, 边滴边摇匀, 接近终点时须强力振摇。待氯仿层的蓝色消失, 记录四苯硼钠滴定液用量。重复测 3 次, 取 3 次的平均值进行以下计算。

5. 计算 因 1 mol/L 四苯硼钠滴定液 1 ml 相当于 0.3984 g 苯扎溴铵, 故可按下式计算其含量:

$$\text{苯扎溴铵含量(g/g 或 g/ml)} = \frac{C \times V_{\text{sp}} \times 0.3984}{m \text{ 或 } V} \times 100\%$$

C 与  $V_{\text{sp}}$  分别为四苯硼钠滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数; m 为碘瓶中苯扎溴铵样品克数, V 为碘瓶中含苯扎溴铵原液毫升数。

### 十三、苯扎氯铵(洁尔灭, $\text{C}_{22}\text{H}_{40}\text{ClN}$ )含量的测定

1. 方法原理 采用氧化还原反应滴定法。碘酸钾难溶于水, 而溶于稀酸中, 故在盐酸溶液中滴定。在过量碘酸钾(氧化剂)氧化作用下析出游离碘而显棕色。根据碘酸钾滴定液用量, 计算苯扎氯铵含量。

2. 试剂的配制 配制 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液、5.0% (g/ml) 碘化钾溶液。备氯仿、盐酸。配制 0.05 mol/L 碘酸钾滴定液。

3. 取样 取含量 > 88% (g/g) 的苯扎氯铵 0.5 g (精确至 0.0001 g), 置烧杯中, 用蒸馏水 35 ml 分 3 次洗入 250 ml 分液漏斗中。

4. 测定步骤 向上述样本中加 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 10 ml 与氯仿 25 ml, 精密加入新配制的 5.0% 碘化钾溶液 10 ml, 振摇, 静置使分层。水层用氯仿提取 3 次, 每次 10 ml。然后, 弃去氯仿层, 水层移入 250 ml 具塞锥形瓶中, 用蒸馏水约 15 ml 分 3 次淋洗分液漏斗, 合并洗液与水液。加盐酸 40 ml, 放冷, 用碘酸钾滴定液(装于 25 ml 滴定管中)滴定至淡棕色, 加氯仿 5 ml, 继续滴定并剧烈振摇至氯仿层无色, 记录碘酸钾滴定液用量, 并将滴定结果用空白试验校正。重复测 3 次, 取 3 次的平均值进行以下计算。

5 计算 因 1 mol/L 碘酸钾滴定液 1 ml 相当于 0.7080 g 苯扎氯铵, 故可按下式计算其含量:

$$\text{苯扎氯铵含量(g/g)} = \frac{C \times V \times 0.7080}{m} \times 100\%$$

C 与 V 分别为碘酸钾滴定液的浓度 (mol/L) 与滴定中用去的毫升数; m 为苯扎氯铵样品克数。



### 第三节 滴定液的配制及其浓度标定

下列滴定液浓度标定,精确度要求至 0.001 ~ 0.0001 mol/L。

#### 一、硫代硫酸钠 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液时,称取  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  26 g,加无水碳酸钠 0.20 g,用蒸馏水溶解成 1 000 ml,摇匀。装于棕色玻璃瓶中,置暗处,30 d后经过滤并标定其浓度。

2. 浓度的标定 称取经 120℃烘干至恒重的基准重铬酸钾 0.15 g(精确到 0.0001 g),置于 250 ml 碘瓶中,加蒸馏水 50 ml 溶解。加 2 mol/L 硫酸 15 ml 和 20%碘化钾溶液 10 ml,盖上盖并混匀,加蒸馏水数滴于碘瓶盖缘,置暗处 10 min 后再加蒸馏水 90 ml。在室温 20 ~ 25℃,用装于 50 ml 滴定管中的硫代硫酸钠滴定液滴定至溶液呈淡黄色,加 0.5% 淀粉溶液 10 滴(溶液立即变蓝),继续滴定到溶液由蓝色变成亮绿色。记录硫代硫酸钠滴定液总毫升数,并将滴定结果用空白试验校正。若空白试验中有硫代硫酸钠消耗,则将滴定用去的硫代硫酸钠滴定液毫升数减去空白试验中其用量,得校正后的硫代硫酸钠滴定液毫升数。

3. 计算 因为 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液 1 ml 相当于 0.04903 g 重铬酸钾,故可按下式计算硫代硫酸钠滴定液浓度:

$$\text{硫代硫酸钠滴定液浓度 (mol/L)} = \frac{\text{碘瓶中重铬酸钾克数}}{0.04903 \times \text{校正的硫代硫酸钠滴定液毫升数}}$$

用 0.05 mol/L 硫代硫酸钠滴定液时,在临用前于量瓶中加蒸馏水稀释 0.1 mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

#### 二、碘(I)滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.1 mol/L 碘滴定液时,称取 13 g 碘片、36 g 碘化钾,加 100 ml 蒸馏水溶解后,再加浓盐酸 3 滴与蒸馏水使成 1 000 ml。混匀,装于带玻璃塞的棕色玻璃瓶中,保存于暗处备用。

2. 浓度的标定 向 100 ml 碘瓶中加已知浓度为 0.05 ~ 0.09 mol/L 的硫代硫酸钠滴定液 25.0 ml,0.5% 淀粉溶液 2 ml,摇匀。用装于 25 ml 滴定管中的碘滴定液滴定至溶液变成蓝色,记录用去的碘滴定液毫升数。

3. 计算 因 1 mol/L 碘滴定液相当于同容量的 1 mol/L 硫代硫酸钠滴定液,故可按下式计算碘滴定液浓度:

$$\text{碘滴定液浓度 (mol/L)} = \frac{25 \times \text{硫代硫酸钠滴定液浓度 (mol/L)}}{\text{碘滴定液毫升数}}$$

用 0.05 mol/L 碘滴定液时,在临用前于量瓶中加蒸馏水稀释 0.1 mol/L 该液制成。必要时可标定其浓度。

#### 三、高锰酸钾 $\text{KMnO}_4$ 滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.02 mol/L 高锰酸钾滴定液时,称取 3.2 g 高锰酸钾,溶于 1 000 ml

蒸馏水中,煮沸 15 min。冷后装于玻璃瓶中(若煮沸中水分损失过多,可加煮沸过的蒸馏水补足 1 000 ml 并混匀),严密塞上塞子。静置 2 d 后,用垂熔玻璃滤器滤过,将滤液混匀,装瓶保存。

2. 浓度的标定 称取经 105℃烘干至恒重的基准草酸钠 0.2 g(精确到 0.0001 g),置烧杯中,加蒸馏水 250 ml 与硫酸 10 ml,搅拌使溶解。自 50 ml 滴定管中迅速加入高锰酸钾滴定液约 25 ml,待褪色后,置水浴上加热至 65℃。继续用高锰酸钾滴定液滴定至溶液显微红色并持续 30 s 不褪色时(此时液温仍> 55℃) 记录用去的高锰酸钾滴定液毫升数。

3. 计算 因 1 mol/L 高锰酸钾滴定液 1 ml 相当于 0.3350 g 草酸钠,故可用下式计算其浓度:

$$\text{高锰酸钾滴定液浓度(mol/L)} = \frac{\text{草酸钠克数}}{0.3350 \times \text{高锰酸钾滴定液毫升数}}$$

#### 四、硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ )滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.25 mol/L 硫酸滴定液时,取硫酸 15 ml,沿盛有蒸馏水的烧杯壁缓缓注入水中。待溶液温度降至室温,再加蒸馏水稀释至 1 000 ml,摇匀。

2. 浓度的标定 称取经 270 ~ 300℃烘干至恒重的基准无水碳酸钠 0.8 g(精确到 0.0001 g),置 250 ml 碘瓶中,加蒸馏水 50 ml 使溶解。加甲基红 - 溴甲酚绿混合指示液〔0.1%(g/ml)甲基红乙醇溶液 20 ml 与 0.2%(g/ml)溴甲酚绿乙醇溶液 30 ml 混匀〕10 滴,用配制的硫酸滴定液装入 50 ml 滴定管中)滴定。待溶液由绿色转变为紫红色时,煮沸 2 min。冷却至室温后,继续滴定至溶液由绿色变为暗紫色,记录用去的硫酸滴定液总毫升数。

3. 计算 因 1 mol/L 硫酸滴定液 1 ml 相当于 0.1060 g 无水碳酸钠,故可按下式计算硫酸滴定液浓度:

$$\text{硫酸滴定液浓度(mol/L)} = \frac{\text{无水碳酸钠克数}}{0.1060 \times \text{硫酸滴定液毫升数}}$$

#### 五、氢氧化钠( $\text{NaOH}$ )滴定液

1. 滴定液的配制 称取 37 g 氢氧化钠,加蒸馏水振摇,使溶解成 50 ml 饱和溶液。冷却后,置聚乙烯塑料瓶中,静置数日待澄清。配制 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定液时,取澄清的氢氧化钠饱和溶液 5.6 ml,加蒸馏水成 1 000 ml,摇匀。

2. 浓度的标定 称取经 105℃烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.6 g(精确到 0.0001 g),置 250 ml 碘瓶中。加蒸馏水 50 ml 溶解,加 2 滴酚酞指示液(1 g 酚酞,加乙醇溶解成 100 ml 溶液),用氢氧化钠滴定液(装于 50 ml 碱式滴定管中)滴定。待溶液呈红色时,记录用去的氢氧化钠滴定液毫升数。

3. 计算 因 1 mol/L 氢氧化钠滴定液 1 ml 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾,故可按下式计算其浓度:

$$\text{氢氧化钠滴定液浓度(mol/L)} = \frac{\text{邻苯二甲酸氢钾克数}}{0.2042 \times \text{氢氧化钠滴定液毫升数}}$$

#### 六、高氯酸( $\text{HClO}_4$ )滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.1 mol/L 高氯酸滴定液时,取冰醋酸 750 ml,缓缓加入高氯酸(浓

度为 70%~72%者)8.5 ml, 振摇使混匀。在室温下缓缓滴加醋酐(边加边摇)23 ml 后, 摇匀。待冷却后, 加冰醋酸使成 1 000 ml 溶液, 摇匀, 放置 24 h 后标定浓度。

2. 浓度的标定 称取经 105℃ 烘干至恒重的基准邻苯二甲酸氢钾 0.4 g(精确到 0.0001 g), 置 100 ml 碘瓶中, 加冰醋酸 20 ml 使溶解, 加结晶紫指示液(0.5 g 结晶紫用冰醋酸溶解成 100 ml 溶液)1 滴, 用配制的高氯酸滴定液(装于 25 ml 滴定管中)滴定。待溶液由紫色变成蓝色时, 记录用去的高氯酸滴定液毫升数。同时, 使用不含邻苯二甲酸氢钾的冰醋酸重复上述操作(空白对照)。

3. 计算 因 1 mol/L 高氯酸滴定液 1 ml 相当于 0.2042 g 邻苯二甲酸氢钾, 故可用下式计算其浓度:

$$\text{高氯酸滴定液浓度 (mol/L)} = \frac{\text{邻苯二甲酸氢钾克数}}{0.2042 \times \text{样本组与空白组用去高氯酸滴定液毫升数差值}}$$

### 七、四苯硼钠 [(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>BNa] 滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.02 mol/L 四苯硼钠滴定液时, 称取四苯硼钠 7.0 g, 加蒸馏水 50 ml, 振摇使溶解。加入新配制的氢氧化铝凝胶(取三氯化铝 1.0 g, 溶于 25 ml 蒸馏水中。在不断搅拌下缓缓滴加氢氧化钠试液至 pH 8~9)与氯化钠 16.6 g, 充分搅拌均匀。然后, 加蒸馏水 250 ml, 振摇 15 min。静置 10 min, 过滤。取滤液, 并滴加氢氧化钠试液至 pH 8~9, 再加蒸馏水稀释至 1 000 ml, 摇匀。

2. 浓度的标定 精确量取本液 10.0 ml, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(取无水醋酸钠 20 g, 加蒸馏水 300 ml 溶解。加溴酚蓝指示液 1 ml 与冰醋酸 60~80 ml, 至溶液从蓝色变为纯绿色, 再加水稀释至 1 000 ml。pH 3.7)10 ml 与溴酚蓝指示液 0.5 ml。用 0.01 mol/L 烃铵盐滴定液滴定至蓝色。同时做不含本液的空白试验滴定。

3. 计算 因 1 mol/L 四苯硼钠滴定液 1 ml 相当于 1 mol/L 烃铵盐滴定液 1 ml, 故可按下列式计算其浓度:

$$\text{四苯硼钠滴定液浓度 (mol/L)} = \frac{\text{样本组与空白组用去烃铵盐毫升数差值} \times \text{烃铵盐滴定液浓度 (mol/L)}}{10}$$

### 八、烃铵盐 (C<sub>22</sub>H<sub>40</sub>ClN) 滴定液

1. 滴定液的配制 配制 0.01 mol/L 烃铵盐滴定液时, 取氯化二甲基苄基烃铵 3.8 g, 加蒸馏水使溶解。再加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.7)10 ml, 并加蒸馏水稀释成 1 000 ml, 摇匀。

2. 浓度的标定 称取经 150℃ 烘干 1 h 的分析纯氯化钾 0.18 g(精确到 0.0001 g), 置 250 ml 量瓶中, 加醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 3.7)使溶解并稀释至刻度, 摇匀。精确取稀释液 20.0 ml, 置 50 ml 量瓶中, 精确加 0.02 mol/L 四苯硼钠溶液 25.0 ml, 再加蒸馏水至刻度, 摇匀后经干燥滤纸过滤。弃去初滤液, 精确取续滤液 25.0 ml, 置 250 ml 碘瓶中, 加溴酚蓝指示液 0.5 ml, 用配制的烃铵盐滴定液滴定。待溶液呈蓝色时, 记录用去的烃铵盐滴定液毫升数。同时, 用不含氯化钾的醋酸-醋酸钠缓冲液重复上述操作(空白对照)。

3. 计算 因 1 mol/L 烃铵盐滴定液 1 ml 相当于 0.07455 g 氯化钾, 故可用下列式计算烃铵盐滴定液浓度:

$$\text{烃铵盐滴定液浓度 (mol/L)} = \frac{\text{氯化钾克数}}{0.07455 \times \text{样本组与空白组用去烃铵盐滴定液毫升数差值}}$$

## 九、碘酸钾( $\text{KIO}_3$ )滴定液

配制  $0.05 \text{ mol/L}$  碘酸钾滴定液时，将基准碘酸钾在  $105^\circ\text{C}$  干燥至恒重后，精密称取  $10.700 \text{ g}$ ，置  $1\,000 \text{ ml}$  量瓶中。加适量蒸馏水使溶解，再稀释至刻度，摇匀，即得。

(袁朝森)

## 参考文献

- 1 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (2000 年版二部). 北京: 化学工业出版社, 2000: X II - X III, 360 - 362, 530 - 531, 1035 - 1036, 附录 177 - 182.
- 2 袁朝森 (消毒剂)有效成分含量测定. 见: 消毒技术规范. 第一分册实验技术规范. 北京: 中华人民共和国卫生部, 1999: 71 - 79

# 第二十章 细菌消毒试验

## 第一节 基本实验技术

细菌是自然界中分布最广、数量和种类最多的单细胞原核生物。也是威胁人类健康的重要微生物之一。细菌的营养要求不高，呈二分裂繁殖，增殖的速度呈指数增长。细菌芽孢还是所有微生物中对各种理化因子抵抗力最强的代表。因此，细菌消毒试验在微生物消毒效果的评价、鉴定中，具有十分突出的地位和作用。细菌消毒实验的基本技术，也是其他微生物杀灭试验的基础。因此有必要在此作一介绍。

### 一、细菌的培养

细菌可用人工的方法培养，即将细菌接种在人工制备的培养基中，放在适宜的条件下，可以快速生长繁殖。

#### (一)人工培养细菌的条件

主要有营养物质、酸碱度、湿度、温度、气体、光线等。

1. 营养物质 一般培养基所需要的营养物质，应含有可被迅速利用的碳源、氮源、无机盐类及其他营养成分，适量的水分等要素。

2. 酸碱度 大多数细菌的培养最适酸碱度为  $\text{pH}6.8 \sim 7.6$ 。

3. 湿度 培养细菌时应保持相当湿度，以使养料渗透到菌体内，干燥对细菌生长有害。

4. 温度 一般致病菌的最适生长温度与人的体温相同，为  $37^{\circ}\text{C}$ ，低温使细菌发育停止，高温则能杀灭细菌。有许多生活于海洋深处的细菌可在  $0 \sim 30^{\circ}\text{C}$  生长；嗜热脂肪杆菌最适生长温度则为  $56 \sim 60^{\circ}\text{C}$ 。

5. 气体 细菌需要的气体主要有氧和二氧化碳等，随各种细菌的需要而定。需氧菌在有充分空气供给时发育良好；厌氧菌必须培养在含有二氧化碳的环境中。

6. 光线 日光与紫外线均有杀菌作用。因此细菌培养宜在黑暗或避光的地方。

#### (二)细菌培养基

培养基的基本材料包括蛋白胨、肉膏、酵母膏、无机盐、水分、琼脂等，它们能提供微生物生长所必需的营养成分和环境，它们各有特点。

1. 蛋白胨 是用胰蛋白酶、木瓜蛋白酶、胃蛋白酶等蛋白质水解酶，水解酪蛋白（又称酪素）、大豆蛋白、兽类肉蛋白等制成。主要成分各种氨基酸、肽类等可溶性氮化合物。因此，依所用原料和水解酶的不同，其构成也有所不同。酪素经胰蛋白酶水解制成的蛋白胨，称为胰蛋白胨（tryptone）。木瓜蛋白酶水解大豆蛋白制成的蛋白胨，称为大豆蛋白胨（soya peptone）。混合蛋白胨是由多种蛋白胨混合而成。蛋白胨的质量对微生物的生长、代谢产物的产生有很大的影响，所以配制培养基时必须根据培养微生物的种类、试验的目的来选择合适的蛋白胨。

2. 肉膏 肉膏是兽肉浸出液的浓缩物。肉中的可溶性氮化合物、维生素等生长促进因子

以及无机盐类都很丰富，用于各种细菌培养。由于缺乏统一的质量标准，使用量正在减少。

3. 酵母粉 是啤酒酵母或面包酵母在低温下的浸出汁经低温干燥而成。含有氨基酸、维生素、无机盐类。可用于各种微生物培养。近年来有取代肉膏的趋向。

4. 无机盐 包括主要元素和微量元素。参与细胞结构物质的组成、能量转移、控制原生质胶态等，需要量很少。

5. 琼脂 原来由石花菜制成，最近差不多都以青丝菜为原料制备。应特别注意，琼脂内所含的不纯物质有时会显著地影响微生物的生长。

6. 水分 是培养基必不可少的成分。微生物的新陈代谢必须在有水的条件下才能进行。

日前，市场上还有各种复合培养基销售，适合不同的用途。几种消毒学实验中常用的培养基成分及配制要求，参见附录。

培养基的灭菌，一般采用压力蒸汽灭菌。如使用下排气式压力蒸汽灭菌器，对不含糖类的培养基需  $121^{\circ}\text{C}$ ,  $30\text{ min}$ 。对含糖培养基一般为  $115^{\circ}\text{C}$ ,  $45\text{ min}$ 。亦可将糖单独过滤灭菌后加入培养基内。培养基的灭菌必须在中性条件下进行，因为在酸性条件下，压力蒸汽灭菌会使琼脂因水解而不凝固。培养基灭菌后  $\text{pH}$  值会降低一些，故灭菌前调节  $\text{pH}$  时应考虑这一情况，可适当调高一点。

### （三）细菌的接种

常用的接种器材有两类。第一类是用白金丝或镍铬合金丝制备的接种针、接种环或接种钩。该类金属丝耐高温、传热快、烧之即红、离火即冷。可用于接种固体和液体培养基。第二类是用玻璃棒高温下弯曲制成的涂布接种器，如 L 棒、三角形涂布器等。用于琼脂平板的涂布接种。几种常用培养基的接种方法如下。

1. 分离纯菌的接种方法 用平板划线法。目的是将混有多种细菌的培养物或标本中的细菌区分开来。原理是通过划线使平板上形成单个菌落，根据菌落的形态或颜色特点挑出所需菌株。接种的方法有两种：一是分段划线法，接种时以右手持接种环，左手持平板，将接种环在火焰上烧红，沾取少量菌液或标本，先涂布于平板培养基的一角，作为第一段划线（划线时接种环和平板表面呈  $45^{\circ}$ ），然后将接种环在火焰上烧红灭菌，待冷却后（可用接种环接触平板试之，如琼脂不熔化则已冷却），作第二段划线。开始划时与第一段划过的线接触数次，以后不再交接。划完后再按上法对接种环灭菌，再划第三段、第四段。培养后在第 3~4 段划线区可能长出单个菌落。二是曲线划线法，用于接种材料中含菌量不太多的标本或培养物的接种。方法是先用接种环沾取标本或培养物，涂于平板表面一角，然后自此处开始，向左右两侧划开并逐渐向下滑动，连续划成若干分散的平行线。接种后，盖好平板盖，倒置于温箱内培养。

2. 斜面接种法 用于细菌的增殖培养，使其增殖后用于鉴定或保存菌种。先将接种环在火焰上灭菌，然后挑取培养物。左手取斜面培养管，以右手小指和无名指拔取棉塞，夹持于手指间。立即将斜面管口在火焰上灭菌，移离火焰后，将接种环伸入斜面管内。先从斜面底部到顶端拖一条接种线，再由下而上蜿蜒划线涂布，或不拖接种线，直接从底部向上涂布。涂完后再次将试管口灭菌，并用棉塞塞牢。带有培养物的接种环应再灭菌，此时应先从杆烧起，逐渐至环，目的是先使接种环上的培养物干燥，再烧红灭菌，这样可防止环上的培养物突然爆炸而造成污染。

3. 液体培养管的接种 从斜面移种液体培养管时，先用灭菌后的接种环在斜面上取少许菌苔，移至液面和管壁之间，然后在管壁上轻轻摩擦，同时与液面反复接触，使菌苔均匀地分散

到液体内部。从液体移种液体时，先用灭菌白金耳在菌液中取菌一环，然后移至新的液体培养管。操作必须在火焰旁进行，打开试管塞时应烧管口灭菌。接种后烧白金耳时应从杆到环，而不可先烧带有菌液或菌苔的环。

**4. 穿刺接种** 消毒实验室的穿刺接种主要用于菌种保存，接种的培养基为半固体管。接种时先用灭菌后的白金接种针取菌，然后从直立半固体培养管中央垂直播入，并从原插孔退出，勿使培养基破裂。接种后加入少量液体石蜡密封，放温箱内培养。

**5. 琼脂平板涂抹培养** 用于涂布接种的平板预先应在温箱内烘干琼脂表面的水分。将菌悬液作适当稀释后（含菌数少时可不作稀释），用 **0.1 ml** 或 **0.5 ml** 吸管，吸取菌液 **0.05 ~ 0.1 ml**，移种于平板中琼脂表面中央，用灭菌的 **L** 棒涂抹均匀。一边转动平板一边涂布，直至涂干为止。然后盖上平板盖，倒置放于温箱培养。

**6. 倾注平皿培养** 先将菌液（一般为 **0.5 ml**）接种于无菌平皿内，然后将冷至 **45℃** 左右的琼脂倾注于平皿，摇匀，凝固后倒置，于温箱培养。一般每皿倾入琼脂 **15 ml** 左右。

## 二、细菌的染色方法

在消毒学实验中，有时需要从形态和染色方面对实验用微生物进行鉴别。此处仅介绍消毒学实验中常用的革兰染色和芽孢染色方法。

### 1. 革兰染色

（1）染色液及其配制：共有 4 种染色液。

第 I 液，即结晶紫液：取结晶紫酒精饱和液（结晶紫 **13.8 g** 溶于 **95%** 酒精 **100 ml**）**10 ml**，**1%** 草酸铵水溶液（草酸铵 **0.9 g** 加蒸馏水 **90 ml**）；混合均匀配成，然后装入瓶内，**24 h** 以后，用滤纸过滤。该染液可长期保存。

第 II 液，即碘液：取碘化钾 **2g** 溶于 **10 ml** 蒸馏水中，再加入碘片 **1 g**，充分摇动使溶解，再加蒸馏水 **290 ml** 即成，贮存于褐色瓶中备用。

第 III 液，**95%** 酒精溶液，用于脱色。

第 IV 液，即复红染液：碱性复红饱和酒精液 **5 ml**，加蒸馏水 **100 ml**。

（2）细菌涂片制备：取 1 小滴生理盐水或蒸馏水，置于 **46 mm × 25 mm** 载玻片中央，用接种针或接种环移入少量细菌生长物，使成乳状，涂布 **1 ~ 2 cm<sup>2</sup>**，置空气中干燥，或在酒精灯火焰上挥动使之干燥，载片的温度以不超过手背的耐受力为限。然后将涂片的菌膜向下通过火焰 1 次，进行固定。这样可凝固细菌蛋白，杀死细菌，并在染色时不致冲损菌膜。染色后，倾去水分，用滤纸吸干，并在火焰上微微加温使之干燥。

目前应用的革兰染色法，除经典的方法之外，尚有一些改良的方法。细菌经革兰染色后为红色者，称为革兰阴性菌；为紫色者，称为革兰阳性菌。

（3）染色方法：用第 I 液染 **1 min**，水洗；加第 II 液，待 **1 min** 后水洗；用第三液脱色，当紫色不再流出时即可水洗；用第 IV 液染色 **0.5 min**，水洗。晾干后镜检。

**2. 芽孢的染色方法** 染色液的配制：**5%** 孔雀绿水溶液；**5%** 复红水溶液（即革兰第 IV 液）。

染色方法：制备涂片，用火焰固定后，用孔雀绿水溶液滴染。滴染液后加 1 片滤纸于其上。加热蒸染 **10 min**。加热过程中要注意随时滴加染色液，使其保持一定的量，以达到均匀干燥。或者置于 **56℃** 温箱内 **30 min**。水洗 **30 s** 后用 **5%** 复红复染 **1 min**，水洗，待其自然干燥后镜检。

结果：芽孢染成绿色，细菌繁殖体染成红色。

### 三、实验菌株的选择

在进行消毒效果评价时,为使结果可靠,首先须对试验菌株加以选择。一般应符合以下条件:于普通培养基上生长良好,培养特性稳定;菌落与菌体形态典型;芽孢菌应易于形成芽孢;对人、畜无毒或弱毒;对理、化因子的抵抗力应不低于所代表的病原微生物,以便所得结果安全可靠。

由于各菌株对不同杀菌因子的敏感性均不一致,因此不能将一株菌用于所有的试验之中。在评价消毒效果时,必须根据杀菌因子的种类选择适宜的试验菌株。所用菌株一般来说是对这种消毒方法或消毒剂的抵抗力最强的。如检查湿热消毒时,用嗜热脂肪芽孢杆菌,用纸条或圆纸片作细菌载体,消毒后用肉汤培养,56℃培养 1~2 d 后观察结果。检查环氧乙烷及其他烷基化消毒剂的消毒效果,用枯草杆菌黑色变种芽孢,以布片、玻璃片、金属片等为载体,消毒后用肉汤培养,37℃ 培养 5 d 观察结果。检查  $\gamma$  射线辐射消毒效果,用短小芽孢杆菌作指示菌来检查,以纸条或纸片作载体,消毒后用肉汤培养37℃培养 5 d 观察结果。化学液体消毒剂,可用金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、牛结核杆菌、白色念珠菌、黑曲霉、枯草杆菌黑色变种芽孢等,作为试验菌株。

所用菌株,应尽量选用国际上通用的消毒学试验标准菌株,以便相互比较和国际交流。在无法获得国际标准菌株时,或者国内有更好的消毒菌株时(如我国保存的大肠杆菌 8099,对化学消毒剂的抵抗力就大于国际标准菌株大肠杆菌 ATCC10536),就可以采用国内标准的消毒实验菌株。常用的国际标准菌株及应用领域,参见附录。

### 四、实验菌株的鉴定

消毒实验菌株的鉴定,应含有两个方面:一是微生物学常规鉴定;二是对某些理化因子的抗力的鉴定。下面就其中一些具体的方法简介如下。

#### (一)常规微生物学鉴定

一般,须按照形态、染色、培养特性、生理、生化、血清反应、致病性等综合分析后才能鉴定。

1. 菌落形态 一般细菌,生长在一种固体培养基上,形成的菌落都有一定特征。如炭疽杆菌,在普通营养琼脂平板上形成大而隆起、表面呈毛玻璃状的,不透明灰白色菌落,其边缘不规则,如毛发状;白色葡萄球菌则呈白色而光滑的菌落等等。根据菌落特征和色素的产生,有经验的检验人员往往可作出初步诊断。

2. 菌体形态 细菌染色后经显微镜检查,亦各有特征。如炭疽杆菌为革兰阳性长形大杆菌,两端呈竹节状。葡萄球菌为革兰阳性圆或卵圆形,由多个菌体排列成不规则的巢堆。大肠杆菌是两端钝圆的革兰阴性短杆菌。根据以上这些特征,如白色葡萄球菌在普通营养琼脂平板上呈白色而光滑型的菌落,显微镜检查为革兰阳性球菌,排列成不规则的巢堆,可以初步诊断为白色葡萄球菌。几种常用菌株的形态特征见表 20-1。



表 20-1 几种常用消毒菌株的形态特征

菌株	革兰染色	菌体形态	菌落特征
大肠杆菌	阴性	两端钝圆短杆菌	无色半透明、光滑型,SS培养基呈红色
金黄色葡萄球菌	阳性	葡萄状球菌	圆形,凸起,光滑湿润,金黄色
白色葡萄球菌	阳性	葡萄状球菌	圆形,凸起,光滑湿润,无色透明
灵杆菌	阴性	短杆菌	圆形,有光泽,30℃培养呈粉红色
绿脓杆菌	阴性	杆菌,成双或短链	产生水溶性色素,使培养基呈绿色, 菌落带金属光泽
枯草杆菌黑色变种	阳性	杆菌,单个或链状	圆形,大而凸起,黑色
嗜热脂肪杆菌	阴性	大杆菌	圆形,有光泽,透明棕黄色,使用含葡萄糖 与溴甲酚紫培养基,由紫色变成棕黄色

### (二)抗力的鉴定

抗力鉴定的方法很多,这里就择其具有代表性的作一介绍。

1. 菌株对流通蒸汽耐受力的鉴定 在专门设计的流通蒸汽耐受性测定装置上进行。先加适量蒸馏水于蒸汽发生器内,加热,使其出气口喷出蒸汽。当温度计指示的温度达到 100℃ 时,取下上部样片架,先用酒精棉球擦拭,然后于火焰上烧灼,待冷后,用灭菌镊子夹取染菌试验片 2 片,并列放于架上。将样片架仍放在原来位置,观察温度并记录作用时间。达到规定时间后,立即取出样片架,将菌片分别投入营养肉汤管,于 37℃ 下培养 24 h,观察结果,以肉汤管无菌生长的最短时间为该菌对流通蒸汽的耐受时间。同时设阳性对照和阴性对照。阳性对照为肉汤加试验菌片,阴性对照为空白肉汤管。

2. 菌株抗煮沸试验 取 1 个 100 ml 的小三角烧瓶,制备芽孢悬液(取 1 ml 浓度为  $2 \times 10^8 \sim 3 \times 10^8$  cfu/ml 芽孢悬液,加入 20 ml 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液中,振荡混匀)。然后与 1 个同样大小的盛装有 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液 20 ml 的三角烧瓶,内插 1 只温度计,一起煮沸。当水温达到 100℃ 后,于不同时间从菌液瓶内吸取 0.5 ml 菌液,接种于肉汤管内,在 37℃ 下培养 24 h,观察结果。同时设肉汤管加菌液 0.5 ml 的阳性对照和不加菌液的空白肉汤对照。以肉汤管无菌生长的最短时间为菌株抗煮沸时间。

3. 菌株对热抵抗力的测定 以测定白色葡萄球菌(繁殖体)对温度 60℃ 的抵抗力为例,其试验方法如下:先制备菌片(含菌量为  $1 \times 10^5 \sim 3 \times 10^5$  cfu/ml)。再取大试管 8 支,分别加入无菌蒸馏水 1 ml,并在每一试管中加入菌片 2 片。另取一试管加入 1 ml 蒸馏水并插入 1 支温度计,以便随时观察温度变化。将上述各试管插入 60℃ 水浴中,当试管内水温升至 60℃ 时,开始记录时间。分别在不同时间,各取出 1 支试管,取出其中的菌片,每片接种一支肉汤培养管。另外取 1 个于室温下在无菌蒸馏水试管中浸泡 45 min 的菌片,接种于肉汤管中作阳性对照,并取 1 支肉汤管作空白对照,然后将肉汤管放 37℃ 温箱内,培养 24 h 观察结果。以肉汤管无菌生长的最短时间为该菌株对加热 60℃ 的耐受时间。

4. 菌株对化学杀菌剂抵抗力的测定 以测定金黄色葡萄球菌对新洁尔灭溶液的抵抗力为例,方法如下。先制备金黄色葡萄球菌染菌样片,再按下列各组进行试验。

(1) 试验组:取 0.003% 新洁尔灭溶液 30 ml,放于小烧杯内,投入 9 片试验菌片,记录时间。于第 5、10、15、20、25、30、35、40、45 min 时,分别取出菌片 1 片投入 5 ml 含 1% 吐温 80 的 0.03 mol/l 磷酸盐缓冲液中,中和 2 min,以去除残留药物。然后将菌片转种于 5 ml 肉汤管内,

并将接种的肉汤管放 37℃ 温箱内培养 24 h 观察初步结果, 3 d 后观察最终结果。

(2) 对照组: 本试验应设下述三种对照。①中和液对照, 目的是观察中和剂有无杀菌作用。取一菌片放入 5 ml 含 1% 吐温 80 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液中, 于 45 min 后取出, 接种于肉汤管。培养条件同试验组。②阳性对照, 取一菌片于 5ml 灭菌蒸馏水中浸泡 45 min, 取出接种肉汤管, 培养方法同前。③阴性对照, 取 1 支肉汤管在同样条件下培养, 以观察肉汤有无污染。

记录实验结果: 以无菌生长的最短时间为菌株的耐受时间。

王瑛等(1984) 对我国消毒试验中常用的细菌芽孢菌株, 如枯草杆菌黑色变种芽孢、蜡样杆菌芽孢、类炭疽杆菌芽孢等, 均进行了系统的检测和鉴定。

## 五、菌株的保存和使用

保存实验菌株过程中, 应注意防止菌株死亡和菌株抵抗力变化。菌株保存的方法很多, 消毒实验室常用的方法有下述几种。

1. 琼脂斜面保存法 用白金耳将菌株划线接种于琼脂斜面上, 培养后放冰箱保存。用时可随时刮取菌苔转种。保存时间长短视菌种而异, 一般仅可保存数月。

2. 半固体培养基保存法 用白金耳穿刺接种, 培育后冰箱保存。保存时间视菌的种类而异, 亦与试管口是否密封有关, 如用胶塞或将液体石蜡封于半固体表面上, 则可延长保存时间至 1 年以上。

3. 悬液保存法 对细菌芽孢、霉菌、放线菌、酵母菌、假单胞菌属, 可用蒸馏水保存, 分装于灭菌的螺帽小瓶内, 或用胶塞密封的试管内, 置于 4℃ 或室温下可保存数年; 细菌芽孢还可用含 50% (v/v) 甘油的蒸馏水保存, 病毒株也可用甘油液冷藏法; 冻干保存法适合于所有微生物, 是一种常用的方法。其原理是, 在含菌介质快速冷冻时形成细致冰晶。由于不形成大的冰晶, 避免了对细菌的损伤。冻结后立即抽气减压, 使冰晶中的液体挥发, 制品很快干燥成型为疏松状物体, 细菌存在于其中, 不至于死亡。一般冰冻在 -80 ~ -40℃ 进行, 冷冻 1 ~ 2 h 后, 真空干燥 8 ~ 12 h。干燥菌种管的装量一般为 0.2 ml。冻干的菌种在 4℃ 可保存 5 ~ 10 年。

在菌株的培养和使用方面, 一个必须予以重视的问题是, 保持试验菌株抵抗力的稳定性。因为培养方法能影响菌株的抵抗力, 使用菌量的多少对试验结果也有直接的影响, 故在菌株的培养和使用中应注意下边问题:

1. 培养成分要合理选择 使用培养基的成分对菌株的抵抗力有明显的影响, 尤其是蛋白胨和牛肉膏。它们的型号不同, 测出的石炭酸系数亦不同。因此消毒试验必须明确规定所用的培养基成分。为了减少对菌株抵抗力的影响, 应尽量使用同来源的培养基成分。

2. 明确规定菌株使用的代数 菌株在传代培养过程中, 其抵抗力会发生改变, 因此正式进行消毒试验前最好重新打开一支干燥菌种管或保存的菌种管, 移种于肉汤, 连续传 3 代, 一般从第 4 代开始用于试验, 到第 14 代为止不再使用。这主要是考虑到在 4 ~ 14 代之间菌株抵抗力比较稳定。

3. 选择合理的培养温度 各种细菌适宜的生长温度不同。细菌在不适宜的或变化较大的温度下生长, 其抵抗力往往发生改变。一般实验菌株适宜的培养温度为  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , 而嗜热脂肪杆菌芽孢在  $56^\circ\text{C}$  下生长较好。有人认为, 一般细菌受伤之后, 在  $32^\circ\text{C}$  下易于复苏。

4. 培养时间要适当 一般来说, 幼龄菌株抵抗力弱, 老龄菌株抵抗力强。消毒实验所用菌株一般应培养 18 ~ 24 h。为了得到稳定的能经得起重复的结果, 菌株的培养时间应相对固定。

5. pH 值要稳定 一般消毒实验菌株适宜的 pH 范围为 6.8~7.4。对各种菌株,确定了 pH 之后就要相对固定, pH 变化太大对实验结果也有影响。

6. 选择适当的菌量 菌量的多少与消毒所需时间呈正比,菌量越多消毒时间越长,菌量越少消毒时间越短。消毒试验必须明确所用菌量,选择的菌量应能代表物体上实际污染情况。一般认为以  $10^6 \sim 10^{10}$  cfu/ml 为宜,平均为  $10^8$  cfu/ml。国外载体试验要求每个菌片染有  $1 \times 10^6$  cfu(指回收菌数)。消除率达到 99.999%时,表示原有 100 万个菌/片,消毒后留有 10 个菌/片,大部分菌已被杀灭,留有少数菌则不导致人的感染。看来  $10^6$  个菌数量很大,但在污染物上还是可以达到这样多的,对实际情况有代表性。

## 六、试验菌液的制备

### (一)细菌繁殖体菌悬液的制备

1. 取冻干菌种管,在无菌操作下打开,以毛细吸管加入适量营养肉汤,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5.0~10.0 ml 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18~24 h(第 1 代)。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,于 37℃ 培养 18~24 h(第 2 代)。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于营养琼脂斜面,于 37℃ 培养 18~24 h,即为第 3 代培养物。

2. 取菌种第 3~14 代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物(18~24 h),用 5.0 ml 吸管吸取 3.0~5.0 ml 稀释液加入斜面试管内,反复吹吸,洗下菌苔。随后,用 5.0 ml 吸管将洗液移至另一无菌试管中,用电动混合器混合 20 s,或在手掌上振敲 80 次,以使细菌悬浮均匀。

3. 初步制成的菌悬液,如含有琼脂成分,应使用灭菌脱脂棉过滤去除。再用电子浊度计,或细菌浓度比浊管,粗测其含菌浓度,然后以稀释液稀释至所需使用的浓度。

4. 细菌繁殖体悬液应保存在 4℃ 冰箱内备用。当天使用不得过夜。

5. 怀疑有污染时,应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

### (二)细菌芽孢菌液的制备

1. 取冻干菌种管,在无菌操作下打开,以毛细吸管吸加适量营养肉汤培养基,轻柔吹吸数次,使菌种融化分散。取含 5~10 ml 营养肉汤培养基试管,滴入少许菌种悬液,置 37℃ 培养 18~24 h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液,划线接种于营养琼脂培养基平板上,于 37℃ 培养 18~24 h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落,接种于营养肉汤培养基,于 37℃ 培养 18~24 h,即为第 3 代培养物。

2. 用 5.0 ml 吸管吸取 5.0~10.0 ml 第 3~5 代的 18~24 h 营养肉汤培养物,接种于罗氏瓶中营养琼脂培养基表面,将其摇动使菌液布满营养琼脂培养基的表面,再将多余肉汤培养物吸出,置于 37℃ 温箱内,培养 5~7 d。

3. 用接种环取菌样少许涂于玻片上,固定后以芽孢染色法染色,并在显微镜(油镜)下进行镜检。当芽孢形成率达 95% 以上,可进行以下处理。否则,可再在室温下放置一定时间,直至达到上述芽孢形成率后再进行以下处理。

4. 对罗氏瓶培养物,用 10.0 ml 吸管加 10.0 ml 无菌蒸馏水于每一罗氏瓶中,以 L 棒轻轻推刮下菌苔。吸出第一批洗下的菌悬液,再向瓶内吸加 5.0 ml 无菌蒸馏水,重复洗菌一遍。将第一和第二批洗下的菌悬液集中于一含玻璃珠的无菌三角烧瓶中,振摇 5 min,打碎菌块,使成均匀的芽孢悬液。

- 5.必要时,将盛装菌悬液的三角烧瓶置 45℃水浴中 24 h,使菌自溶断链,分散成单个芽孢。
- 6.用无菌棉花或纱布过滤芽孢悬液,清除其中的琼脂凝块。
- 7.将过滤后的芽孢悬液置无菌离心管内,以 3 000 r/min 速度离心 30 min。弃上清液,加蒸馏水吹吸使芽孢重新悬浮。再离心和重新悬浮清洗,先后共 3 遍。
- 8.将洗净的芽孢悬浮于三角烧瓶内蒸馏水中,并加入适量小玻璃珠。
- 9.将芽孢液放于 80℃水浴中 10 min(或 60℃,30 min),以杀灭残余的细菌繁殖体。待冷至室温后,保存于 4℃冰箱中备用。有效使用期为半年。
- 10.芽孢悬液在使用时,应先进行活菌培养计数。

## 七、试验载体的制备

在实验室测定各种消毒方法对不同物品上微生物的杀灭作用,常用有代表性的材料制备染菌样片,用于消毒试验。比较常用的有纸片、布片、不锈钢片、玻璃片、铝片、陶瓷片、塑料片、线圈(外科缝线)等。其制备和染菌方法如下。

### (一)制备方法

- 1.纸片 一般应采用厚的滤纸,如新华一号滤纸,用切纸刀裁成 0.5 cm×1 cm 或 1.0 cm×1.0 cm 大小,压力蒸汽灭菌后备用。
- 2.布片 一般选用棉布或亚麻布。并应进行脱脂处理。脱脂方法如下:①将布放在含肥皂的水中煮沸 30 min;②以自来水洗净;③用蒸馏水煮沸 10 min;④用蒸馏水漂洗至 pH 呈中性;⑤晾干(或熨平)备用。布片的大小一般为 1.0 cm×1.0 cm。先按要求大小将经纬纱各抽去一根,然后按照抽纱线剪开。将剪好的布片用纸包好,或放入平皿内,经压力蒸汽灭菌后备用。
- 3.其他菌片的制备 不锈钢片、玻璃片、铝片、陶瓷片、塑料片等。亦应进行脱脂处理,方法同上。经压力蒸汽灭菌后备用。
- 4.线圈的制备 选用直径为 0.8~0.9 cm 的毛笔杆,在其末端刻一个三角形缺口,将外科用的 3 号缝线在笔杆末端绕 3 圈,把线头末端经缺口插入,与另一端打成一死结,在离结约 0.2 cm 处剪断线头,取下线圈,高压灭菌后备用。线的粗细和线圈的大小均对染菌量有影响,制作时务必统一。

### (二)染菌方法

常用的染菌方法有 3 种:滴染、浸染和喷染法。每个载体染菌量通常以回收菌数表示,菌量范围为每载体  $(1 \sim 5) \times 10^6$  cfu。

- 1.滴染法 将灭菌后的样片平放于无菌平皿内,每个样片之间间隔一定距离。用每滴 0.01~0.02 ml 的滴管吸取稀释至  $10^8$  个/ml 的菌液,每个样片滴 1 滴,菌片可放 37℃温箱内烘干或晾干,放冰箱备用。细菌繁殖体菌片应现用现制备。
- 2.浸泡法 用细菌肉汤培养物,直接将样片或线圈放于其中,使菌液浸湿全部样片为度。浸泡 5 min 后,用无菌镊子取出样片或线圈,移至另一垫有无菌滤纸的平皿内,于 37℃温箱烘干(约需半小时左右)或放室温下晾干、备用。
- 3.喷雾染菌法 染菌操作可在喷雾柜或气体消毒实验柜内进行,先染菌前先将载体平放于无菌平皿内。先将喷雾柜开紫外灯灭菌后,向柜内喷入菌液,同时开电扇,以使菌液雾粒在柜内均匀分布,一般用 1.5 kg/cm<sup>2</sup> 压力,喷数分钟。喷雾完毕后静候 1 min,待大粒子沉降后,

将摆好载体的平皿送入喷雾柜内,染菌 15 min,取出后晾干备用。

在空气消毒试验中,为了观察消毒剂或消毒方法对空气中微生物的杀灭作用,可用喷雾染菌法将微生物喷入消毒实验柜内,使空气染菌。

在表面消毒试验中,亦可直接将菌液污染在物体表面。先在物品上划出 1 个方格,大小为 5 cm × 5 cm 或 10 cm × 10 cm。然后将菌液滴在方格内,用无菌玻璃棒涂均匀,待干后即可进行消毒试验。

## 八、细菌计数方法

细菌计数是消毒学实验中常用的一项基本技术。在制备菌液和染菌载体及评价消毒效果上,都需用细菌计数技术。消毒试验中具有实用意义的细菌计数方法,主要有比浊管法、电子浊度计法、活菌计数法三种。

### (一)比浊管法

是一种简单、方便的常用方法。比浊管有两种:一种是一组逐渐增加浊度的标准管,每管上标有相当的菌液浓度。比浊时将制备的菌液吸入与标准管直径相同的试管内,再与各种浓度的标准管比浊,与菌液管浊度相同的标准管所代表的浓度即为菌液浓度。另一种比浊管是只有一种浊度的标准管,它所代表的菌液浓度因菌而异,查表可得。比浊时将菌液稀释至与标准管相同的浊度。以稀释的倍数乘以标准管所代表的该菌浓度,即得制备的菌液每毫升中的菌数。

### (二)电子浊度计法

电子浊度计的型号很多,但其工作原理是相似的。先用标准浊度的溶液,对电子浊度计进行校正,然后测定各种试验菌悬液的系列浊度,按活菌技术法测定其实际菌液浓度,得到该菌液的浊度与菌液浓度的对照表。不同的细菌有不同的对照表。将该对照表贴于仪器的近处,供以后测定时查对。以后的实际测定,可按同样的方法,校正仪器,测定浊度,就可查出相应的菌液浓度,并可进行适当的稀释、调整,直到获得所需的浓度。

### (三)活菌计数法

可测定细菌与真菌悬液(包括菌片或采样棉拭洗液)样本中含有活菌的数量。测定时,以 10 倍递减法稀释细菌悬液,定量吸取稀释液,用倾注法或涂抹法接种于琼脂平板。经培养后,计数生长的菌落数,乘以稀释倍数,换算成每毫升(每载体)活菌数。

#### 1. 操作步骤

(1)对菌悬液可直接进行培养计数。对菌片、采样棉拭与小型固体样本等,应将其上的细菌洗下成为菌悬液后进行培养计数。洗菌时,一般以蒸馏水、生理盐水、0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液、细菌稀释液(取胰蛋白胨 1.0 g,氯化钠 8.5 g,先用 900 ml 以上蒸馏水溶解,并调节 pH 值在  $7.0 \pm 0.2$ ,最终用蒸馏水加至 1 000.0 ml 刻度,经压力蒸汽灭菌后使用)等为洗液。具体方法如下:取含 5.0 ml 稀释液无菌试管,对菌片或小型固体样本直接投入即可,对棉拭则将其采样端剪入管内,每管一份样本。而后,用电动混合器混合 20 s(或在手掌上用力振敲 80 次),将菌洗下形成菌悬液。以上操作应严格按无菌要求进行。

(2)将试管按需要数量分组排列于试管架上,每管加入 4.5 ml 稀释液。各组由左向右,逐管标上  $10^{-1}$ 、 $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ ... 等。

(3)将菌悬液样本用电动混合器混合 20 s(或在手掌上用力振敲 80 次),随即吸取 0.5 ml

加至  $10^{-1}$  管内。

(4) 将  $10^{-1}$  管依前法用电动混合器混合 20 s 或在手掌上用力振敲 80 次, 混匀, 再吸取出 0.5 ml 加入  $10^{-2}$  管内。如此类推, 直至最后一管。必要时, 还可作某稀释度的 1:1 或 1:4 稀释。

(5) 选择适宜稀释度试管 (以预计生长菌落数每平板为 30~300 cfu 者为宜), 吸取其中混合均匀的悬液 0.5 ml 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 3 个平皿。一般, 需接种 2~3 个不同稀释度。平皿加样前, 应先按组编号, 以免弄混。

(6) 将冷至  $40 \sim 45^{\circ}\text{C}$  的熔化营养琼脂培养基, 倾注于已加入样液的平皿中, 每平皿 15~20 ml。

(7) 将平皿盖好, 即刻轻轻摇动混匀, 平放于台上。待琼脂凝固后, 翻转平皿, 使底向上, 置  $37^{\circ}\text{C}$  温箱内培养。

(8) 每日观察细菌生长情况。培养至规定时间 (细菌繁殖体为 48 h, 白色念珠菌与细菌芽孢为 72 h), 计数最终结果的菌落数。

(9) 对菌片和采样棉拭洗液的活菌培养计数, 先按各试验要求处理 (如去除残留消毒剂等), 而后取其最终样液按上法进行培养计数。

(10) 计数菌落时, 一般以肉眼观察, 必要时用放大镜检查。以菌落数在 30~300 的平板为准, 每个稀释度 3 个平板生长菌落数全合乎上述标准, 则以该 3 个平板的菌落平均值作为结果; 若有 2 个符合上述标准, 则以该合格的两个平板菌落的平均值为结果。

对估计菌量极少的样本 (如消毒处理后样本), 在培养计数时可不作稀释, 即使平板菌落数未达 30 个时, 亦可用其计算最终结果。菌量单位为 cfu。

2. 活菌计数中技术操作误差的计算 试验者在活菌计数中因技术操作而引起的菌落数误差率 (平板间、稀释度间) 不宜超过 10%。误差率可按以下公式计算。

(1) 平板间误差率的计算公式:

设:  $N_i$  为各平板菌落数,  $n$  为平板数,  $\bar{N}$  为平板间菌落平均数,  $S$  为平板间菌落数平均差,  $P$  为平板间误差率。

$$\text{则: } P = \frac{S}{\bar{N}} \times 100\%, \text{ 式中 } \bar{N} = \frac{\sum N_i}{n}, S = \frac{\sum |N - N_i|}{n}$$

(2) 稀释度间误差率计算公式:

设:  $N_i$  为各稀释度平均菌落数,  $n$  为稀释度数,  $\bar{N}$  为稀释度间菌落平均数,  $S$  为稀释度间菌落数平均差,  $P$  为稀释度间误差率。

$$\text{则: } P = \frac{S}{\bar{N}} \times 100\%, \text{ 式中 } \bar{N} = \frac{\sum N_i}{n}, S = \frac{\sum |\bar{N} - N_i|}{n}$$

(张文福)

## 第二节 定性杀菌试验

### 一、消毒器载体定性杀菌试验

1. 设计原理 将染有指标微生物的载体,经消毒因子作用一定时间后,取出接种于液体培养基中,培养后观察有无微生物生长。

#### 2. 试验主要器材

- (1)试验菌: 枯草杆菌黑色变种芽孢、嗜热脂肪杆菌芽孢等菌片。
- (2)无菌蒸馏水。
- (3)培养基: 营养肉汤培养基、溴甲酚紫蛋白胨培养液或含中和剂的营养肉汤培养基。
- (4)磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)。
- (5)无菌试管。
- (6)吸管(1.0 ml、5.0 ml、10 ml)。
- (7)超净工作台或层流实验室。
- (8)恒温水浴箱、恒温培养箱。

#### 3. 操作步骤

- (1)将染菌载体按要求放于消毒器指定位置, 关门。
- (2)设定消毒强度和作用时间。
- (3)启动消毒器或加入相应浓度的消毒剂。
- (4)消毒作用一定时间后, 开启消毒器门。
- (5)于无菌条件下将菌片取出, 接种于相应培养基中。
- (6)将培养基放 37℃或 56℃(嗜热脂肪杆菌芽孢)温箱中培养 3~7 d。观察是否有菌生长。
- (7)阳性对照组, 将菌片加入上述培养基中。随同试验组放入温箱中培养。同时测定阳性对照菌片的回收菌数(cfu/片)。
- (8)阴性对照组, 将上述培养基随同试验组放入温箱中培养。
- (9)试验重复 5~10 次。

#### 4. 结果判断

- (1)阳性对照有菌生长, 且回收菌数应在  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片范围内。
- (2)阴性对照无菌生长。
- (3)培养有菌生长为阳性, 无菌生长为阴性。各点重复试验全部菌片均无菌生长可判该剂量为灭菌合格剂量。

#### 5. 注意事项

- (1)严格无菌操作, 防止污染。
- (2)在重复试验中, 每次均应设置阴性和阳性对照, 不可省略。
- (3)试验指标菌不同, 所用培养基及培养温度不同。
- (4)消毒器与消毒剂联合使用时, 培养基中应含有相应中和剂。

## 二、消毒剂载体定性杀菌试验

1. 设计原理 将染有指标微生物的载体,经消毒剂作用一定时间后,取出接种于液体培养基中,培养后观察有无微生物生长。

### 2. 试验主要器材

- (1)试验菌:枯草杆菌黑色变种芽孢、嗜热脂肪杆菌芽孢等菌片。
- (2)无菌蒸馏水。
- (3)含相应中和剂的培养基:营养肉汤培养基、溴甲酚紫蛋白胨培养液等。
- (4)磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)。
- (5)无菌试管。
- (6)刻度吸管(1.0 ml、5.0 ml、10 ml)。
- (7)超净工作台或层流实验室。
- (8)恒温水浴箱、恒温培养箱。

### 3. 操作步骤

- (1)取一无菌平皿,按每片 5.0 ml 的量加入消毒液。
- (2)将盛有消毒剂平皿置  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴箱内 5 min 后,用无菌镊子放入预先制备的菌片,并使之浸透于消毒液中。

(3)待消毒至预定时间后,用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0 ml 中和剂的培养基中。将试管在手掌上敲打后,放入温箱中培养。

(4)阳性对照组。另取一平皿注入 10.0 ml PBS 代替消毒液,放入 2 片菌片,其随后的试验步骤同上述试验组。同时测定阳性对照菌片的回收菌数(cfu/片)。

(5)阴性对照组。将同次试验未接种的培养基随试验样本一起放入温箱中培养。

(6)所有试验样本均在  $37^\circ\text{C}$  或  $56^\circ\text{C}$  (嗜热脂肪杆菌芽孢)温箱中培养 3~7 d,观察是否有菌生长。

(7)试验重复 5~10 次。

### 4. 结果判断

- (1)阳性对照有菌生长,且回收菌数在应在  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/片范围内。
- (2)阴性对照无菌生长。
- (3)培养有菌生长为阳性,无菌生长为阴性。各组重复试验全部菌片均无菌生长为灭菌合格。

### 5. 注意事项

- (1)严格无菌操作,防止污染。
- (2)在重复试验中,每次均应设置阴性和阳性对照,不可省略。
- (3)试验温度应控制在  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  范围内。
- (4)所用中和剂需经中和剂鉴定试验证明为合格中和剂。

## 三、悬液定性杀菌试验

1. 设计原理 试验细菌悬液与不同浓度消毒剂溶液作用后,接种于含中和剂的液体培养基中,培养后观察有无菌生长,以确定消毒剂的杀菌能力。



## 2. 主要器材

- (1) 试验菌：枯草杆菌黑色变种芽孢等菌悬液。
- (2) 无菌蒸馏水。
- (3) 培养基：含相应中和剂的营养肉汤培养基、营养肉汤培养基。
- (4) 磷酸盐缓冲液 PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)。
- (5) 无菌试管。
- (6) 吸管( 0.1 ml、1.0 ml、5.0 ml)。
- (7) 超净工作台或层流实验室。
- (8) 恒温水浴箱、恒温培养箱。

## 3. 操作步骤

- (1) 取 10 支中号试管排于试管架上，标明消毒剂稀释度。
- (2) 每个试管中加入 2.5 ml 无菌蒸馏水，将试管置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中。
- (3) 于第 1 支试管中加消毒液原液或稀释液 2.5 ml，敲打混匀后，另取 1 支无菌吸管由第 1 支试管中取 2.5 ml 加入第 2 支试管，敲打混匀后再从第 2 支试管中吸取 2.5 ml 加入第 3 支试管，以此类推，直至第 9 支试管，混匀后弃去 2.5 ml，第 10 支试管不加消毒液作为阳性对照。
- (4) 以每半分钟加 1 管的速度加菌液 2.5 ml 于每支试管内，使含菌量达  $10^6$  cfu/ml，敲打混匀。
- (5) 另准备 50 支试管，分别加入 4.5 ml 含足量中和剂的营养肉汤管，标明消毒剂稀释度。
- (6) 上述消毒液试管在加菌后分别于 5、10、15、30 和 60 min，从每个试管中取出 0.5 ml 加入 4.5 ml 含足量中和剂的营养肉汤管内，敲打摇匀；或从每个试管各取出 0.5 ml 加入 1.5 ml 中和液试管内，敲打摇匀，再取出 0.5 ml 加入 4.5 ml 营养肉汤管内。
- (7) 阳性对照应同时做活菌培养计数，以确定试验菌数。
- (8) 将接种细菌的含中和剂的营养肉汤管、肉汤管同未接种细菌的含中和剂的营养肉汤管（阴性对照）放  $30^{\circ}\text{C}$  培养箱中，培养 24 h，观察是否有菌生长。
- (9) 若肉汤管发生混浊即表示有菌生长，必要时，转种营养琼脂，观察菌落形态，或再取菌苔涂片染色镜检，判断生长的是否为试验菌，以排除污染。
- (10) 如肉汤管不变混，应继续培养至第 7 d，若仍不混浊则判为无菌生长。
- (11) 试验重复 3 次。

## 4. 结果判定

- (1) 阳性对照菌数应达  $10^6$  cfu/ml。阴性对照应无菌生长。
- (2) 以各次试验均无菌生长的消毒液最低浓度为最低杀菌有效浓度，各次试验均无菌生长的最短消毒时间为该浓度杀菌最快有效时间。

## 5. 注意事项

- (1) 严格无菌操作，防止污染。
- (2) 试验温度应控制在  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  之间。
- (3) 所用中和剂应经中和剂鉴定试验证明为合格中和剂。

（姚楚水）

### 第三节 细菌定量杀灭试验

细菌定量杀菌试验,是在实验室内测定消毒剂或消毒方法杀灭悬液中或载体上细菌繁殖体和细菌芽孢的剂量效应关系。用定量的方法测定消毒效果的各种规律性。以便指导消毒实践,并作为制定实用消毒剂量的依据。其原理是:将一定量的细菌悬液或载体,暴露于设计浓度的消毒液中,作用至规定时间后,采取细菌与消毒液的混合物,或取出载体,终止消毒剂的继续作用,并接种于营养琼脂平板,培养之后,计算菌落数。以存活的菌落数与最初加入的菌数比较,计算出杀灭率,或杀灭效果(germicide effect,GE)。

定量杀灭试验,应含有以下各组(1)试验组,按所试菌种和消毒剂对该菌的杀灭能力,选定若干个消毒剂浓度和多个作用时间进行试验。(2)阳性对照组,根据各种试验的规定,用细菌稀释液(如蒸馏水、PBS等)代替消毒剂溶液,按试验组中相同的步骤进行试验,所得结果代表菌液的原有浓度,以其作为基数进行杀灭效果的计算;(3)阴性对照组,以试验中同批次的细菌稀释液、中和剂、培养基作为阴性对照,以确定所用上述试液和培养基有无污染。

杀灭率与杀菌效果的计算公式为:

$$\text{杀灭率}(\%) = \frac{N_c - N_d}{N_c} \times 100$$

$$\text{杀菌效果}(\text{GE}) = \log N_c - \log N_d$$

式中: $N_c$ 为试验前或阳性对照组样品生长菌落数; $N_d$ 为消毒组生长菌落数。

#### 一、试验条件

1.按第一节方法制备菌悬液或菌片。

2.配制试验用消毒剂溶液。除有特殊规定者外,应使用无菌硬水配制。消毒剂溶液浓度应以所含有效成分为准。例如,含氯消毒剂以所含有效氯浓度为准,碘伏以所含有效碘为准,过氧乙酸以所含过氧乙酸量为准,复方消毒剂浓度以主要杀菌有效成分的量为准。各组消毒剂溶液有效成分浓度的计算,应以菌药混合液中有效成分的最终浓度为准。

3.经试验验证有效的去除残留消毒剂的中和剂或设备。

4.消毒剂稀释用的硬水。先配制贮存液(A、B液)。A液:取 19.84 g  $\text{MgCl}_2$ , 46.24 g  $\text{CaCl}_2$ , 用蒸馏水溶解,至 1 000 ml。B液:取 35.02 g  $\text{NaHCO}_3$ , 用蒸馏水溶解,至 1 000 ml。再配制使用浓度的硬水:取 1 000 ml 容量瓶,先加入至少 600 ml 蒸馏水,再依次加入 6.0 ml A液, 8.0 ml B液,再加蒸馏水至 1 000 ml。过滤除菌后使用。4℃冰箱保存,有效期为 1个月。

5.有机干扰物质。可根据试验设计,决定是否加入。如仅为筛选抗菌药物,可考虑不加,但应加入等体积的无菌蒸馏水代替。悬液试验采用 3%牛血清白蛋白溶液,用蒸馏水配制,滤膜过滤除菌,4℃冰箱保存备用。载体试验直接采用 TSB 营养肉汤。营养肉汤培养基(TSB):由 1.5%胰蛋白胨、0.5%大豆蛋白胨、0.5%氯化钠,用蒸馏水配制而成,调节 pH 为  $7.2 \pm 0.2$ ,灭菌后使用。

6 营养琼脂培养基(TSA):由 1.5%胰蛋白胨、0.5%大豆蛋白胨、0.5%氯化钠和 1.6%琼脂,用蒸馏水配制而成,调节 pH 为  $7.2 \pm 0.2$ ,灭菌后使用。

7.细菌稀释液,可任选下列两种配方之一。①胰蛋白胨生理盐水溶液(TPS)。取胰蛋白胨

(tryptone)1.0 g,氯化钠 8.5 g,先用 900 ml 以上蒸馏水溶解,并调节 pH 值在  $7.0 \pm 0.2(20^{\circ}\text{C})$ ,最终用蒸馏水加至 1 000.0 ml 刻度,经压力蒸汽灭菌后使用。②胰蛋白胍磷酸盐缓冲液(TPBS)在磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH7.2)中加入 0.1%(w/w)胰蛋白胍,经压力蒸汽灭菌后使用。

8.其他试验条件。如恒温水浴箱、喷雾器(用于喷雾消毒试验)、电动混合器、秒表等。

## 二、悬液定量杀菌试验

1.先按要求配制消毒液,无特殊说明者,一律使用无菌硬水配制,配制的浓度为待测浓度的 1.25 倍(例如要评价的消毒液浓度为 200 mg/L,则应配制 250 mg/L),置  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴备用。再配制实验用菌悬液,浓度为  $(1 \sim 5) \times 10^8$  cfu/ml。然后取消毒试验用无菌大试管,先加入 0.5 ml 有机干扰物质,再加入 0.5 ml 试验用菌悬液,混匀,置  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,用无菌吸管吸取上述浓度消毒液 4.0 ml 注入其中,迅速混匀并立即记时。

2.待菌药相互作用至各预定时间,分别吸取 0.5 ml 菌药混合液加于 4.5 ml 经灭菌的中和剂中,电动振荡混匀。

3.各管菌药混合液经加中和剂作用 10 min 后,分别吸取 0.5 ml 或 1.0 ml 样液,按活菌培养计数方法测定存活菌数,每管样液接种 2 个平皿。

4.同时用细菌稀释液代替消毒液,进行平行试验,作为阳性对照。

5.吸取同次试验用中和剂和细菌稀释液各 0.5 ml,分别用倾注法接种于营养琼脂培养基中,放温箱中培养,作为阴性对照组。

6.所有试验样本均在  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中培养,对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果;对细菌芽孢需培养 72 h 观察最终结果。

7.试验重复 3 次。计算各组的活菌浓度(cfu/ml),计算杀灭效果。

## 三、载体浸泡定量杀菌试验

1.取 3 个无菌平皿,标明所注入消毒液的浓度。按每片 5.0 ml 的量,吸取相应浓度的消毒剂溶液注入平皿中。

2.将盛有消毒剂平皿置  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴箱内 5 min 后,用无菌镊子分别放入预先制备的菌片 4 片,并使之浸透于消毒液中。

3.待菌药相互作用至各预定时间,用无菌镊子将菌片取出分别移入一含 5.0 ml 中和剂试管中。将试管电动振荡混合,使菌片上的细菌被洗脱进入中和液中。吸取 0.5 ml 上述洗液,按活菌培养计数方法测定存活菌数,但每管接种 2 个平皿。

4.另取一平皿,注入 10.0 ml 细菌稀释液代替消毒液,放入 2 片菌片,作为阳性对照组。其随后的试验步骤和活菌培养计数与上述试验组相同。

5.吸取同次试验用中和剂和细菌稀释液各 0.5 ml,分别用倾注法接种于营养琼脂培养基中,放温箱中培养,作为阴性对照组。

6.所有试验样本均在  $37^{\circ}\text{C}$  温箱中培养,对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果;对细菌芽孢需培养 72 h 观察最终结果。

7.试验重复 3 次。计算各组的活菌量(cfu/片),计算杀灭效果。

#### 四、载体喷雾定量杀菌试验

1. 选定消毒剂的浓度与作用时间。每种菌所染菌片应分开进行试验。试验时，每种载体菌片各取 3 片，以方形或近似方形阵列，均匀排布于一个未沾有任何消毒剂的清洁无菌玻璃板上(如无菌平皿内)。

2. 每批试验以同一浓度消毒剂溶液对上述排列的菌片进行均匀喷雾。每次喷雾的距离和压力保持一致，尽量使喷到菌片上的雾粒大小和数量一致。喷雾量以不使菌片湿透、流液为度。

3. 待菌药相互作用至各规定时间，取每种载体菌片 1 片，各放入一支含 5.0 ml 中和剂的无菌试管中。将试管用电动混合器混合，使菌片上细菌被洗脱进入中和液中。

4. 吸取 0.5 ml(或 1.0 ml)上述洗液，按活菌培养计数方法测定存活菌数，每管接种 2 个平皿。

5. 每批试验均应换一块未沾有任何消毒剂的清洁无菌玻璃板。喷雾器换装新浓度消毒剂前，应将原残留消毒剂洗净，再换装新浓度消毒剂。

6. 用蒸馏水代替消毒液，按同样的喷雾方法进行处理，作为阳性对照组。

7. 吸取同次试验用中和剂和细菌稀释液各 0.5 ml，分别用倾注法接种于营养琼脂培养基中，放温箱中培养，作为阴性对照组。

8. 所有试验样本均在 37℃温箱中培养，对细菌繁殖体培养 48 h 观察最终结果；对细菌芽孢需培养 72 h 观察最终结果。

9. 试验重复 3 次。计算各组的活菌量(cfu/片)，计算杀灭效果。

#### 五、空气定量杀菌试验

空气定量杀菌试验，可在一对近似球形的空气消毒柜(1 m<sup>3</sup>)和一对 15~20 m<sup>3</sup> 空气实验室内进行。喷菌装置，包括空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶喷雾器等，喷出细菌微粒的直径，90% 以上应在 1~10 μm 之间。空气采样装置，包括多级筛孔空气撞击式采样器(又称 Anderson 采样器)、液体撞击式采样器、抽气设备、气体流量计等。

化学消毒后的空气采样可使用液体撞击式采样器，非化学因子试验可用 Anderson 采样器采样。采样液中应加入相应浓度的中和剂和抗泡沫剂(如辛醇或橄榄油)。

1. 试验阶段 在进行正式空气消毒前，应先进行预备试验，以了解所测药械是否对试验菌具有杀灭作用(一般用悬液杀菌试验法)。此预备试验意义有二，一是证明所测空气消毒剂或器械对细菌是否有杀灭作用，以便决定是否进行随后的正式试验；一是了解其杀菌能力，以便设定正式试验的剂量分组。

当预备试验证明所试药械有可能用于空气消毒时，即可依次进行随后的正式试验。由于空气消毒试验远较试管杀菌试验难度大，且其消毒范围愈大，难度愈大，故最好由小到大逐步进行，以免造成试验的反复，耗费人力、物力和时间。空气消毒正式试验可分为实验室试验、模拟现场试验与现场试验。3 个阶段试验的特点见表 20-2。

表 20-2 各阶段空气消毒试验的特点

项 目	实验室试验	模拟现场试验	现场试验
目的	测定最低有效剂量	测定最低有效剂量	验证实用消毒效果
试验柜室	1 m <sup>3</sup> 柜	10 ~ 20 m <sup>3</sup> 柜	≥20 m <sup>3</sup> 房间
采样器	液体撞击式	筛孔式	筛孔式
菌株	非致病菌	非致病菌	空气中自然菌
试验菌雾粒	1 ~ 10 μm	1 ~ 10 μm	不定
温度	20 ~ 25℃	20 ~ 25℃	自然条件
相对湿度	50% ~ 70%	50% ~ 70%	自然条件
中和剂	加于采样液中	加于采样培养基中	加于采样培养基中
对照	需有自然消亡对照	需有自然消亡对照	不需自然消亡对照
结果计算	杀灭率	杀灭率	消亡率

## 2. 实验室试验与模拟现场试验操作程序

(1)取试验菌悬液经无菌脱脂棉过滤,用营养肉汤培养基稀释成所需浓度。

(2)将两气雾柜(或室)同时调至试验所需同一温、湿度。

(3)将使用的器材一次放入气雾柜(或室)内,将门关闭。此后,直至试验结束,始可将门打开。一切操作和仪器设备的操纵均在柜(或室)外,或通过带有密封袖套的窗口进行。

(4)按预试验确定的压力、气体流量及喷雾时间喷雾染菌。边喷雾染菌边用风扇搅拌。喷雾完毕,继续搅拌 5 min,尔后静置 5 min 采对照样本。气雾柜(或室)内空气细菌浓度应达  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$  cfu/m<sup>3</sup>(按消毒前阳性对照样本检测结果计)。

(5)喷雾 10 min 后,按预试验确定条件,同时对对照组和试验组气雾柜(或室)进行消毒前采样。在模拟现场试验时,用筛孔式采样器采样,采样器置室中央 1 m 高处(采样方法按产品使用说明书进行)。在实验室试验时,气雾柜内用采样量较小的液体撞击式采样器采样,采样器置柜中央处。

(6)按产品规定方法和根据预备试验结果所设计的用量,在试验组柜(或室)内进行消毒。

(7)作用至规定时间,对试验组和对照组气雾柜(或室)按前述要求同时进行采样。待作用至第二个预定消毒时间,再次进行采样。如此按作用时间继续分段采样,直至到达规定的最终作用时间为止。

(8)在实验室试验阶段,于气雾柜中用液体撞击式采样器采得的样本,进行活菌培养计数,在 37℃ 温箱内培养 48 h,观察最后结果。

(9)在模拟现场试验阶段,于气雾室中用筛孔式采样器采样时,采菌后的平板直接放入 37℃ 温箱中培养 48 h,观察最后结果,计数生长菌落。

(10)全程试验采样完毕,对表面和空气中残留的细菌做最终消毒后,打开通风机排风,抽除柜(或室)内滞留的污染空气,为下一次试验作好准备。

(11)在完成试验组与阳性对照组采样和样本接种后,应将未用的同批培养基、采样液和 PBS 等(各取 1 ~ 2 份),与上述两组样本同时进行培养或接种后培养,作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长,说明所用培养基或试剂有污染,试验无效,更换无菌器材重新进行。

(12)同一条件试验重复 3 次,每次均分别计算其杀灭率。3 次结果的杀灭率均 ≥99.90% 时,可判为消毒合格。

### 3. 现场试验

(1)根据使用时的实际情况,选择有代表性的房间并在室内无人情况下进行消毒效果观察。观察时,在消毒处理前用筛孔式采样器进行空气中自然菌采样,作为消毒前样本(阳性对照)。消毒处理后,再作一次采样,作为消毒后的试验样本。

(2)采样时,采样器置室中央 1.0 m 高处。房间大于 10 m<sup>2</sup> 者,每超过 10 m<sup>2</sup> 增设一点。

(3)因现场试验环境条件变化较多,难以统一,无法测定准确的自然沉降率,故只按所得消亡率(自然沉降和消毒处理中杀菌的综合效果)做出验证结论。

(4)试验采样完成后,应将未用的同批培养基,与上述试验样本同时进行培养或接种后培养,作为阴性对照。阴性对照组若有菌生长,说明所用培养基有污染,试验无效,更换后重新进行。

(5)试验重复 3 次或以上。计算出每次的消亡率。除有特殊要求者外,对无人室内进行的空气消毒,每次的自然菌消亡率均  $\geq 90\%$  者为合格。此外,还应使室内空气中细菌总数不超过国家容许标准 (GB15982-1995)。

### 4. 杀灭率的计算方法

$$N_t = \frac{V_o - V_t}{V_o} \times 100\%$$

$$K_t = \frac{V'_o(1 - N_t) - V'_t}{V'_o(1 - N_t)} \times 100\%$$

式中:  $N_t$  为空气中细菌的自然消亡率,  $V_o$  与  $V_t$  分别为对照组试验开始前和试验过程中不同时间的空气含菌量,  $K_t$  为消毒处理对空气中细菌的杀灭率,  $V'_o$  与  $V'_t$  分别为试验组消毒处理前和消毒过程中不同时间的空气含菌量。

### 5. 消亡率的计算按下式进行

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前样本平均菌数} - \text{消毒后样本平均菌数}}{\text{消毒前样本平均菌数}} \times 100\%$$

(张文福)

## 第四节 能量试验

测定连续加入细菌悬液对消毒剂杀菌作用的影响,以确定该消毒剂用于多次消毒污秽物品(含较多有机物,如浸洗拖布的消毒液、浸泡污染医疗器械的消毒液、洗手消毒液等等)实用浓度的参考。

### 一、试验器材

1.可在金黄色葡萄球菌(ATCC6538)和大肠杆菌(8099)中,选对所试消毒剂抗力较强者作试验菌。前者可作化脓菌代表,后者可作肠道菌代表。

2.能量试验用菌悬液配制。先用标准硬水配制酵母液(含酵母粉 50 mg/L, pH6.9~7.1)灭菌后备用。然后,吸取试验菌新鲜营养肉汤 24 h 培养物 6.0 ml,加于含 4.0 ml 酵母液试管中,混匀。依此配制成的菌悬液,所含菌量应为  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml。

3.磷酸盐缓冲液(PBS, 0.03 mol/L, pH7.2~7.4)。

- 4.标准硬水(硬度为 342 mg/L)
- 5.含中和剂营养肉汤培养基（所用中和剂应为经试验鉴定合格者）。
- 6.细菌定量杀灭试验器材。

## 二、试验程序

所有试验均在  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中进行。

1. 将待测消毒剂用硬水稀释成 A(1.5x)、B(x)、C(0.5x)等 3 个浓度的药液（括弧中的“x”代表杀菌试验所得有效浓度），各取 3.0 ml 分装于无菌试管内。

2. 第 1 次，取试验菌悬液 1.0 ml 加入到第 1 管 A 浓度消毒剂溶液内，立即混匀。

3. 在 A 管加菌悬液后 8 min，分别吸取 A 管内混合液 20  $\mu\text{l}$  移种至 A 组的第 1 批 5 支盛有 5.0 ml 含中和剂营养肉汤培养基管中。

4. 在第 1 次加菌悬液后 10 min，第 2 次取 1.0 ml 菌悬液加入到 A 浓度消毒剂管内，立即混匀。

5. 在第 2 次加入菌悬液后 8 min（即第 1 次加菌悬液后 18 min）时，分别吸取 A 管内混合液 20  $\mu\text{l}$  移种至 A 组的第 2 批 5 支盛有 5 ml 含中和剂营养肉汤培养基管中。

6. 在第 2 次加入菌悬液后 10 min（即第 1 次加菌后 20 min），取 1.0 ml 菌悬液加入到 A 浓度消毒剂管内，振摇混匀。

7. 在第 3 次加入菌悬液后 8 min（即第 1 次加入菌液后 28 min）时，分别吸取 A 管内混合液 20  $\mu\text{l}$  移种至 A 组的第 3 批 5 支盛有 5 ml 含中和剂的营养肉汤培养基管中。

8. B(x)、C(0.5x) 两浓度药液的试验内容和操作程序，与上述 A 浓度者相同。3 个稀释度消毒药液同一批进行操作时，可按表 20-3 规定的时间和顺序进行。

9. 以两支含 5 ml 中和产物（用同次试验所用消毒剂与中和剂配制）的营养肉汤培养基管，加入 5  $\mu\text{l}$  试验菌液，作为阳性对照。

10. 以两支含 5 ml 与上相同的中和产物的营养肉汤培养基管作为阴性对照。

11. 将以上各试验组和对照组样本管，置  $37^{\circ}\text{C}$  培养箱中培养 48 h，观察是否有菌生长。

12. 重复上述试验，每日 1 次，以连续取得 3 次同一评价结论者为准。

13. 试验中应将试验用菌悬液进行活菌培养计数，其菌量应在  $10^6 \sim 10^7$  cfu/ml。阳性对照管应变浑浊，阴性对照不应有菌生长。

对照组结果不符合要求时，应检查原因，改正后重新进行试验。

表 20-3 能量试验操作时间

加菌与移种次序	各浓度组操作时间(第 X min)		
	A	B	C
第 1 次加菌	0	1	5
第 1 次移种(5 管)	8	9	13
第 2 次加菌	10	11	15
第 2 次移种(5 管)	18	19	23
第 3 次加菌	20	21	25
第 3 次移种(5 管)	28	29	33

三、评价规定

当阳性对照管有细菌生长(混浊),阴性对照管无菌生长(透明)时,第 1 次和第 2 次移种的 5 管样本中,有 2 管或 2 管以上不长菌的浓度组,作为合格浓度组。如 3 个浓度组均合格,应降低消毒药液浓度继续试验;反之,3 个浓度组均不合格,则增加消毒剂浓度,直至找到最低合格浓度。连续 3 次重复试验,得到同样最低合格浓度,该最低合格浓度可作为设定反复浸泡用消毒液实用浓度的依据。

例如某消毒剂能量试验结果如表 20-4,则可判定该消毒剂的最低合格浓度为 1.2%。

表 20-4 某消毒剂能量试验结果

试验序号	消毒剂浓度(%,v/v)	3 次加菌后移种 5 管肉汤中细菌生长情况		
		(1)	(2)	(3)
1	0.6	- - - - -	+ + + + +	+ + + + +
	1.2	- - - - -	- + + + -	+ + + + +
	1.8	- - - - -	- - - - -	- - - - -
2	0.6	+ - + + +	+ + - - +	+ + + + +
	1.2	- - - - -	- - - + +	+ + + + +
	1.8	- - - - -	- - - - -	- - - - -
3	0.6	- - + + +	+ + - + +	+ + + + +
	1.2	- - - - -	+ - - - -	+ + + + +
	1.8	- - - - -	- - - - -	- - - - -

注:“+”表示有菌生长,“-”表示无菌生长

(张文福)

第五节 抑菌试验

抑菌试验是指测定抗菌剂或整合抗菌剂的抗菌产品,阻止正常生长的细菌、酵母菌和霉菌等微生物群体繁殖能力的试验方法。

用于测定抑菌效果的方法有:最小抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)测定法、抑菌环试验、振荡烧瓶试验(shake flask test)、奎因试验(Quinn test)、沉积试验(deposition test)、琼脂斑贴试验(agar patch technique)、刮杯试验(cup scrub test)、多盆洗手试验(multiple basin hand wash test)、浸渍试验以及滞留抑菌效力试验(residual efficacy test, RET)等。沉积试验适用于检测产品使用后残留于皮肤上活性成分的量,但不能测试其抑菌活性。琼脂斑贴试验适用于检测抑菌剂的持续抗菌活性。试验时,双侧臂分别在对应部位用已知的试验样品或对照样品消毒处理,作用至规定时间后,将已种菌的琼脂培养基与试验部位接触一定时间(如 30 min)。将平板培养后计数存活菌数。比较试验区与对照区存活菌数的差别,可直观地反映出抑菌剂对皮肤上微生物的抗菌作用。但琼脂斑贴试验不适用于非水溶性抑菌剂抑菌效果的测定。刮杯



试验主要适用于检测产品对皮肤常居菌群及暂居菌群即时抑制效果的测定。而在刮杯试验基础上改良的滞留抑菌效力试验则适用于检测产品对皮肤暂居菌群的持续抗菌效果。实际工作中最小抑菌浓度测定法、琼脂扩散试验、振荡烧瓶试验、奎因试验和滞留抑菌效力试验等较为常用。现将几个常用的抑菌试验方法介绍如下。

## 一、最小抑菌浓度测定

### (一)基本原理

将系列稀释的抗菌剂溶液与等量双倍浓度的营养肉汤培养基或等量双倍浓度的琼脂培养基混合,加入菌悬液并使其均匀分布,培养后,肉眼观察有无细菌或真菌生长,以抑制细菌或真菌生长繁殖的最低浓度为 MIC 值。MIC 值越小,抗菌效果越好。常用的 MIC 值测定方法为试管稀释法和琼脂稀释法。

### (二)试管稀释测定法

1. 试验菌菌悬液的制备 将经 37℃(或特定温度)培养 18~24 h 的金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC10231)和其他特定细菌和真菌新鲜斜面培养物,先用 5 ml 0.1% 胰蛋白胍生理盐水洗下菌苔,混匀,再用作适当稀释,置 4℃ 冰箱中当日使用。

#### 2. 试验操作程序

(1)用无菌蒸馏水将受试抑菌剂依对倍稀释至少 5~6 个浓度。

(2)将各浓度的抑菌剂溶液 5 ml 分别与等量双倍浓度的普通营养肉汤或其他双倍浓度的特定营养肉汤混匀。

(3)各管分别接种 0.1 ml 试验菌菌悬液,使含菌量达  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml。

(4)阳性对照组以无菌 0.1% 胰蛋白胍生理盐水代替抑菌剂溶液,余同(2)和(3)操作。

(5)接种后,大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌置 37℃ 恒温培养箱内,培养 24 h,其他特定细菌或真菌置生长繁殖最佳温度下,培养 24 h,观察有无细菌或真菌生长。

(6)试验同时设不接种细菌或真菌的抑菌剂与营养肉汤或其他特定营养肉汤阴性对照。

(7)试验同时对受试细菌或真菌悬液进行活菌计数,观察菌悬液含菌量是否达要求浓度。

3. 结果判定 当所用菌悬液浓度达  $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml,阴性对照无菌生长,阳性对照全部有菌生长时,抑制受试菌生长繁殖的最低浓度即为 MIC 值。

### (三)琼脂稀释测定法

1. 试验菌菌悬液的制备 将经 37℃(或特定温度)培养 18~24 h 的金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC10231)和其他特定细菌和真菌新鲜斜面培养物,先用 5 ml 0.1% 胰蛋白胍生理盐水洗下菌苔,混匀,再用作适当稀释,置 4℃ 冰箱中当日使用。

#### 2. 试验操作程序

(1)用无菌蒸馏水将受试抑菌剂对倍系列稀释至少 5~6 个浓度。置 45~50℃ 水域恒温备用。

(2)将各浓度的抑菌剂溶液 10 ml 分别与等量双倍浓度的琼脂培养基混匀,倾注于无菌平皿内制成含抗菌剂琼脂平板。

(3)同时作单倍琼脂培养基倾注无菌平皿,制成对照琼脂平板。

(4)用加样器接无菌吸头,吸取菌悬液 2  $\mu$ l(含菌量约为  $5 \times 10^7 \sim 10^8$  cfu/ml)。接种于含抗菌液培养基的平板表面,接种后形成菌悬液圈,直径约 5~8 mm(菌量约为  $10^4$  cfu/点)。

(5) 试验同时对单倍浓度的琼脂平板接种试验菌菌悬液  $2\ \mu\text{l}$ , 作为阳性对照, 以不接种菌悬液的平板作为阴性对照。

(6) 将接种后的平板置规定温度下培养  $18\sim 24\ \text{h}$ , 观察细菌或真菌的生长情况。

### 3. 结果判定

单倍琼脂平板阳性对照菌生长良好, 阴性对照平板无菌生长时, 试验组平板菌落生长繁殖被完全抑制的最低浓度为受试样品对试验菌的 MIC 值。若仅有单一菌落生长时可忽略不计。

### 4. 注意事项

(1) MIC 值测定仅用于可溶性抑菌剂或加有可溶性抑菌剂的可溶性产品抑菌效果的测定。

(2) 在试管稀释法中, 若对培养物疑有细菌或真菌污染时, 可作镜检观察或作其他检测验证。

(3) 在琼脂稀释法中, 向平板表面接种菌悬液时, 应由低浓度平板向高浓度平板依次接种, 最后接种阳性对照平板。

(4) 为保证平板受热均匀, 倾注琼脂时, 平板堆放不得超过 4 个。

## 二、抑菌环试验法

### (一) 基本原理

抑菌环试验法是利用抑菌剂溶液, 或含有抑菌剂的试验样片、膏剂、霜剂及其他产品中的抗菌剂在琼脂表面溶出, 并可扩散的原理, 测定溶出性抑菌剂与含有溶出性抑菌剂的产品或试验样品, 阻止琼脂表面受试菌生长繁殖能力的试验。抑菌环试验中, 抑菌剂在琼脂中扩散至受试菌, 从而阻止其生长繁殖, 由于抗菌剂在扩散中形成浓度梯度, 并逐渐减少至失去阻止受试菌生长的能力, 因此围绕含抑菌剂的样片而形成抑菌环。

抑菌环试验与挖沟平板法、梯度平板法、杯碟琼脂法及纸片法等亦称琼脂扩散试验法。但目前应用较多的仍为抑菌环试验。

### (二) 试验菌菌悬液的制备

将经  $37^{\circ}\text{C}$  或特定温度培养  $18\sim 24\ \text{h}$  的金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)、大肠杆菌 (8099)、白色念珠菌 (ATCC10231) 和其他特定细菌和真菌新鲜斜面培养物, 先用  $5\ \text{ml}\ 0.1\%$  胰蛋白胨生理盐水洗下菌苔, 混匀, 再用作适当稀释, 置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱中当日使用。

### (三) 试验操作程序

1. 对液体抑菌剂, 取无菌 ( $120^{\circ}\text{C}$ , 干烤  $2\ \text{h}$ ) 并干燥的滤纸片 (直径为  $5\ \text{mm}$ ) 作试验载体, 每 4 片一叠, 滴加使用浓度的抑菌剂溶液  $20\ \mu\text{l}$ 。滴加抑菌剂后, 将滤纸片分开, 平放于清洁的无菌平皿内, 开盖置温箱 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 中烤干, 或置室温下自然干燥后备用。对含溶出性抑菌剂的抑菌产品, 直接制成直径为  $5\ \text{mm}$ , 厚度不超过  $4\ \text{mm}$  圆片 (块), 每 4 片 (块) 一组。分别制成含抑菌剂的试验样片。

2. 制备无菌干燥滤纸阴性对照样片时, 取无菌干燥滤纸 4 片, 叠加在一起, 滴加无菌蒸馏水  $20\ \mu\text{l}$ 。滴加无菌蒸馏水后, 将滤纸片分开, 平放于清洁的无菌平皿内, 开盖置于温箱 ( $37^{\circ}\text{C}$ ) 中烤干, 或置室温下自然干燥后备用。用于液体抑菌剂抑菌试验的阴性对照。溶出性抗菌产品阴性对照样片为不含抑菌成分的同种材质制成与试验组大小相同的样片 (块), 用于抗菌产品抑菌试验的阴性对照。

3. 用无菌棉拭子蘸取浓度为  $5\times 10^5\sim 5\times 10^6\ \text{cfu/ml}$  试验菌菌悬液, 在营养琼脂平板表

面均匀涂抹 3 次,每徐抹 1 次,平板应转动 60°。最后将棉拭子绕平板边缘涂抹一周(达到近融合生长)。或用 L 棒涂抹法接种,接种时,取试验菌菌悬液 0.1 ml 分散滴加在琼脂平板表面,用无菌 L 棒涂布均匀。盖好平板置室温放置 5 min。

4.贴放抑菌剂样片时,每次试验贴放 1 个染菌平板,每个平板贴放 4 片试验样片,1 片阴性对照样片,共 5 片。贴放时,用无菌镊子先取 1 片阴性对照样片贴放于平板表面中心处。再取 4 片试验样片,分别贴放于垂直中心点,距平板周缘相距 15 mm 处。贴放好后,用无菌镊子轻压样片,使其紧贴平板表面。盖好平板,平放于 37℃培养箱,培养 16~18 h。用游标卡尺测量抑菌环的直径(包括样片)。试验重复 3 次。测量抑菌环直径时,应以抑菌环外沿为界。

#### (四)结果判定

- 1.抑菌环直径大于 7 mm 者,判为有抑菌作用。
- 2.抑菌环直径小于或等于 7 mm 者,判为无抑菌作用。
- 3.3 次重复试验均达有抑菌作用者,判为抑菌试验合格。
- 4.阴性对照组应无抑菌环产生。否则试验无效。

#### (五)注意事项

- 1.试验时,每个平板均应设置阴性对照。
- 2.接种用试验菌菌悬液的浓度应符合要求,平板表面试验菌的生长应达完全融合状态。试验菌浓度过低,菌量少,抑菌环可能增大;试验菌浓度过高,可行,抑菌环则可变小。
- 3.应保持琼脂浓度的准确性,否则可影响抑菌药剂的扩散,导致抑菌环大小不一致。
- 4.培养时间不得超过 18 h。培养过久,部分细菌可恢复生长,抑菌环变小。
- 5.抑菌环直径可受抑菌剂用量、抑菌能力和样片干湿度影响。故抑菌剂滤纸片应在试验当天制备。

### 三、浸渍试验法

#### (一)基本原理

将受试抗菌样品和不含抗菌剂的同质对照样品分别置三角瓶中,用含有肉汤培养基的试验菌悬液接种于受试抗菌样品和对照样品上,接种后,将不含抗菌剂的同质对照样品上的试验菌立即洗下,并测定活菌数量,作为阳性对照菌数;而受试抗菌样品组,则在接种试验菌后,在规定温度下培养 2 h,再将试验菌洗下,并测定活菌数量,然后计算受试抗菌样品组试验菌减少百分率。

浸渍试验法多适用于吸水性强,含可溶性抗菌剂织物抑菌效果的定量测定。

#### (二)菌悬液的制备

试验菌选用金黄色葡萄球菌(ATCC6538)和肺炎球菌(81008)。用接种环将保存的受试菌种以划线法接种到营养琼脂平板上,在 37℃培养箱中培养 18~24 h,取典型的菌落移种到含肉汤培养基试管中,在 37℃条件下培养 18~24 h,用营养肉汤进行系列稀释,使菌悬液的含菌量为  $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  cfu/ml。

#### (三)试验操作程序

1.向装有受试抗菌样品(直径 5 cm 的圆形样片,经 121℃,15 min 压力蒸汽灭菌)和不含抗菌剂的同质对照样品(直径 5 cm 的圆形样片,经 121℃,15 min 压力蒸汽灭菌)的三角瓶中,各加入 1 ml 受试菌营养肉汤培养物,并确保其分布均匀,不留多余液体,封口,待用。

2. 向盛装接种受试菌的受试抗菌样品和接种受试菌的同质对照样品的三角瓶中, 各加入 100 ml PBS, 即刻剧烈摇动 1 min, 洗下细菌, 适当稀释后, 取样液以琼脂倾注法接种平皿, 在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温箱培养  $48 \pm 2\text{ h}$ , 计数存活菌数。分别作为“0”接触时间受试抑菌样品(B)和同质对照样品(C)上的存活菌数。

3. 取装有受试抑菌样品的三角瓶, 接种 1 ml 受试菌营养肉汤培养物, 放  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温箱中, 作用至规定时间后, 即刻加入 100 ml PBS, 剧烈摇动 1 min, 洗下细菌, 适当稀释后, 取样液以琼脂倾注法接种平皿, 置  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  培养箱培养  $48 \pm 2\text{ h}$ , 计数存活菌数, 作为受试抑菌样品与受试菌接触不同时间后残留存活菌数(A)。

4. 取装有受试样品的三角烧瓶, 加入 100 ml PBS, 即刻剧烈摇动 1 min, 洗下细菌, 取洗涤液以琼脂倾注法接种平皿, 在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温培养箱培养  $48 \pm 2\text{ h}$ , 观察有无菌落生长。作为受试抑菌样品阴性对照。

5. 取同质对照样品, 接种受试菌营养肉汤培养物后,  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温培养箱培养 20 h, 然后按“2”, 要求计数存活菌数。作为同质对照样品阳性对照。

抑菌率计算公式:

$$\text{抑菌率} = \frac{(B + C)/2 - A}{(B + C)/2} \times 100\%$$

A: 作用不同时间后受试抑菌样品上存活菌数;

B: “0”接触时间时受试抑菌样品上存活菌数;

C: “0”接触时间时, 同质对照样品上存活菌数。

#### (四) 结果判定

1. 以抑菌率表示受试抑菌样品的抑菌能力。

2. 受试抑菌样品阴性对照组应无菌生长。

3. 同质对照样品阳性对照组菌数比“0”接触时间同质对照样品存活菌数明显增加。

### 四、振荡烧瓶试验

#### (一) 基本原理

振荡烧瓶试验是利用抑菌剂或含有抑菌剂的抑菌产品, 通过在液体(或溶液)中快速震荡, 增加试验菌与抑菌剂或抑菌产品接触, 以显示其阻止悬液中试验菌生长繁殖能力的试验。

试验根据抑菌率高低判断其是否有抑菌能力。本试验既可用于溶出性抑菌剂, 也可用于非溶出性抑菌产品抑菌能力的测定。

#### (二) 试验菌悬液的制备

将经  $37^\circ\text{C}$  (或特定温度) 培养 18 ~ 24 h 的金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC10231)和其他特定细菌和真菌新鲜斜面培养物, 先用 5 ml 0.1% 胰蛋白胍生理盐水洗下菌苔, 混匀, 再用作适当稀释, 置  $4^\circ\text{C}$  冰箱中当日使用。

#### (三) 试验操作程序

##### 1 非溶性抑菌产品抑菌效果的鉴定

(1) 将抗菌物品剪切成  $10\text{ mm} \times 10\text{ mm}$  样片, 称取 0.75 g 分装包好。

(2) 将 0.75 g 重样片放入装量为 250 ml 的三角烧瓶中, 分别加入 70 ml PBS 和 5 ml 菌悬液, 使菌悬液在 PBS 中的浓度达  $(1 \sim 5) \times 10^4\text{ cfu/ml}$ 。

(3)将三角烧瓶固定在恒温震荡摇床上,在 20~25℃条件下,以 300 r/min 震荡 1 h。

(4)取 0.5 ml 震荡后的样液,或用 PBS 作适当稀释后的样液,以琼脂倾注法接种平皿,一式两份,进行活菌培养计数。

(5)阳性对照组,取 5.0 ml 菌悬液和 70 ml PBS 加入装量为 250 ml 的三角烧瓶中,混匀,并分别于 0 时间(振荡前)和振荡 1 h 后(振荡后),各取 0.5 ml 菌悬液与 PBS 的混合液,适当稀释后取样液作琼脂倾注接种平皿,一式两份,进行活菌计数。振荡前(0 时间)与振荡后(1 h)存活菌数的差值不得大于 10%,试验以振荡后平均菌数作为阳性对照平均菌数。

(6)不含抗菌剂的同质样品对照,以不含抗菌剂的材质、大小相同的样片代替抗菌产品样片或试验抗菌样片。其他操作程序均与试验组相同,同样振荡后平均菌数作为阳性对照平均菌数,计算不含抗菌剂的同质样品的抑菌率。

(7)试验重复 3 次。按下列公式计算抑菌率:

$$\text{抑菌率} = \frac{\text{阳性对照平均菌落数}(\text{cfu/ml}) - \text{样本振荡后平均菌落数}(\text{cfu/ml})}{\text{阳性对照平均菌数}(\text{cfu/ml})} \times 100\%$$

## 2. 溶出性抑菌产品抑菌效果的鉴定

(1)向无菌三角烧瓶(装量为 250 ml)中,先后加入 5.0 ml 试验菌菌悬液和 70 ml PBS,混匀,使含菌量达  $(1 \sim 5) \times 10^4$  cfu/ml。

(2)向含试验菌的三角烧瓶中,加入规定浓度的抑菌剂或其溶液(使终浓度达要求浓度)。

(3)阳性对照,取 5.0 ml 试验菌菌悬液,加入含 70 ml PBS 的三角烧瓶中,混匀,使含菌量达  $(1 \sim 2) \times 10^4$  cfu/ml,并分别于 0 时间(振荡前)和振荡 1 h 后(振荡后),各取 0.5 ml 菌悬液与 PBS 的混合液,适当稀释后,取样液作琼脂倾注接种平皿,一式两份,进行活菌计数。振荡前与振荡 1 h 后存活菌数的差值不得大于 10%,试验以振荡后平均菌数作为阳性对照平均菌数。

(4)不含抗菌剂的同质样品对照,以不含抗菌剂同质样品或溶液代替抗菌剂或其溶液。其他操作程序均与试验组相同。同样以振荡后平均菌数作为阳性对照平均菌数,按本节(三) 1、(7)公式计算不含抗菌剂的同质样品的抑菌率。

(5)试验重复 3 次。

## 3. 结果判定

(1)阳性对照存活菌数在  $(1 \sim 2) \times 10^4$  cfu/ml,且对照组振荡前(0 时间)与振荡 1 h 后平均存活菌数差值在 10% 以内。

(2)试验样品的抑菌率与不含抑菌剂同质样品的抑菌率差值 > 26%,可认为该样品具有抗菌作用。

## 4. 注意事项

(1)应及时对振荡前(0 时间)样品采样计数存活菌数;

(2)振荡前须将试验用三角烧瓶牢固地固定在振荡摇床上,以免碰破。

## 五、奎因试验

### (一)基本原理

将菌悬液直接滴于抗菌产品上,覆盖以半固体琼脂培养基,加强受试菌和抑菌剂的接触,以便显示其抑菌作用。试验根据抑菌率大小判断其是否具有抑菌能力。本试验多用于对非溶出性抗菌产品抑菌效果的测定。

## (二) 试验菌悬液的制备

将经 37℃(或特定温度)培养 18~24 h 的金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、大肠杆菌(8099)、白色念珠菌(ATCC10231)和其他特定细菌和真菌新鲜斜面培养物,先用 5 ml 0.1% 胰蛋白酶生理盐水洗下菌苔,混匀,再用作适当稀释,置 4℃冰箱中当日使用。

## (三) 试验操作程序

1. 倾注琼脂培养基平板。

2. 将测试的抗菌产品剪切成 25 mm × 25 mm 大小样片。逐片平放于无菌平皿内,用 0.1 ml 菌悬液( $10^5 \sim 10^6$  cfu/ml)滴染于样片中央,涂匀。置 37℃温箱内干燥 30~60 min,作为染菌的抗菌样片备用。

3. 将染菌的抗菌样片平贴于无菌琼脂平板表面。

4. 用半固体琼脂 1.0~5.0 ml(视样片厚度而定)均匀覆盖于染菌样片表面,置 37℃温箱培养 18~24 h,计数存活菌数。

5 另将菌悬液作  $10^2$  倍稀释,取 0.1 ml( $10^3 \sim 10^4$  cfu/ml)菌悬液滴染于不含抗菌剂的同质样片上,涂匀,与试验组样片做同样处理后,放同一平板内,用半固体琼脂覆盖,培养,作为阳性对照。

6. 试验同时,对试验菌悬液作活菌计数,以观察不含抗菌剂的对照样片是否影响对受试菌的培养计数。

7. 试验重复 3 次。

## (四) 评价规定

阳性对照生长菌数  $\geq 100$  cfu/片,试验组无菌生长,判为有抑菌作用。

## (五) 注意事项

1. 样片滴染菌悬液时,勿溢出片外。

2. 覆盖用琼脂的温度应在 45~50℃间为宜,不可过热。

# 六、滞留抑菌效果测定试验

## (一) 基本原理

通过用抗菌肥皂擦洗皮肤后,可使肥皂上的抗菌物质滞留在皮肤表面,在其表面涂染试验菌,作用至规定时间,采样测定皮肤表面残留菌数,并与不含抗菌剂同质安慰皂比较,可计算出抗菌肥皂的抑菌效果。本试验是模拟适合细菌生长、繁殖和可能产生感染的皮肤条件下,使用随机性、双盲的、配对比较的方法,可检测抗菌香皂和抗菌沐浴露 12 h 的滞留抑菌效果。

## (三) 试验操作程序

1. 菌悬液的制备 试验菌为金黄色葡萄球菌 ATCC27217,该菌株属低毒性,对青霉素敏感,对四环素有抗药性的色素株)。试验时,取典型的金黄色葡萄球菌菌落移种到胰蛋白酶 TSB 肉汤培养基中,在 37℃条件下培养 18~24 h,用 TSB 肉汤培养基进行系列稀释,使菌悬液的含量为  $1 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$  cfu/ml。

## 2. 试验操作程序

(1) 试验开始前,受试者使用不含抗菌成分的香皂、洗发水和沐浴液进行日常的洗手、洗澡。这个阶段持续至少 7 d,但不超过 14 d。

(2) 皮肤清洗,清洗共 3 d。受试者每天用抑菌皂清洗一只前臂,而用对照皂清洗另外一只

前臂。每日清洗前臂 3 次,每次间隔至少 1 h,第 9 次洗完前臂以后,受试者不能洗澡,淋浴或洗净前臂,直到试验结束。在最后一次清洗后 12 h 之后,进行随后的滞留效果检测。接受试验的志愿人员,在试验期间,可以使用不含抑菌剂的香皂洗澡和淋浴。但是,需告知受试者不能清洗前臂。

清洗过程如下:

- ①用流动的水(水温应保持在  $35 \sim 37^{\circ}\text{C}$ )打湿前臂内侧;
- ②用香皂从手腕至臂肘上下摩擦 15 s;
- ③放下香皂,用手上下摩擦泡沫 45 s;
- ④用流动的清水冲洗前臂 15 s,不要搓擦;
- ⑤用纸巾沾干前臂,不要搓擦;
- ⑥先清洗一只手臂,再重复以上步骤清洗另一只手臂。

(3)第 4 天(最后一次清洗后 12 h),在受试者每条前臂中间部位(不要手腕和肘皱褶处)上,用带有印墨的直径为 3.0 cm 的玻璃筒扣在皮肤上,划出 3 个圆形试验区,这 3 个圆形试验区应均匀地分布在每只前臂的中间部位,不要手腕和肘皱褶处。

(4)使用加样器取  $10 \mu\text{l}$  金黄色葡萄球菌营养肉汤培养物分别接种于 3 个圆形试验区,使每个试验区的菌落数为  $10^6 \sim 10^7 \text{ cfu/ml}$ ,用无菌接种环将菌悬液在试验区中间,均匀涂布成一个圆环,圆环外缘应距试验区边缘  $4 \sim 5 \text{ mm}$ 。

(5)接种后立即用小塑料碗(碗高 25 mm)封包试验区,并将其用粘胶布牢牢地固定在皮肤上,记录封包时间。

(6)分别于接种后  $30 \sim 35 \text{ min}$ 、 $2 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$  和  $5 \text{ h} \pm 5 \text{ min}$  进行采样。①采样使用一个直径为 2.2 cm 的玻璃筒,放置于试验区中间部位,不要接触到盖有印墨的边缘。②将 1 ml 0.1% Triton X100 的 0.075 mol/L PBS 加适当中和剂的溶液吸至玻璃筒(直径 2.2 cm)内。③用塔夫纶(Teflon policeman)按摩、擦洗玻璃筒内皮肤 60 s。④将玻璃管内液体吸至空灭菌试管内。⑤再加入 1 ml 的缓冲液,对皮肤进行第二次 30 s 的擦洗按摩,并将其注入到含第一次擦洗液体的试管内。

(7)在采样后的 4 h 内,对 6 个试验区的每一个取样进行平皿接种,以 0.03 mol/L 的 PBS 将样品做适当稀释(必要时用中和剂稀释),每个样本取适当稀释度 0.1 ml,接种 3 个 TSA/B(胰酶大豆琼脂加入 5% 羊血)平板表面,用玻璃棒涂布均匀。置  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养箱内培养 48 h,计数菌落数。

(8)试验区采样之后,需用 70% 的酒精或其他皮肤消毒剂 4% 葡糖酸氯己定进行清洗消毒。

#### (四)结果判定

用威尔科克森配对排列(Wilcoxon Signed Rank)检验方法,将试验样品组存活菌数与对照样品组存活菌数进行比较,经过 12 h 滞留抑菌试验后,试验样品组存活菌落数与对照样品组存活菌落数进行比较,如果  $P$  值小于 0.05,且抑菌率大于 50%,则判定该产品有滞留抑菌作用。

#### (五)注意事项

1. 受试志愿人员前臂及手部皮肤健康无损伤和皮肤病。在试验观察期间,淋浴时不用抗菌微生物香皂(液状或固状)及去头屑洗发水,避免洗热水盆浴和游泳,不得使用其他个人清洁产品,避免接触湿油漆、涂料或者其他溶剂等。

- 2.在第 9 次洗完前臂以后,不洗澡不淋浴或洗净前臂,直到试验结束。
- 3.在试验观察期间,不能按试验要求配合者,应及时排除。

(王太星)

## 第六节 影响因素试验

### 一、原理

于一定的试验条件下,观察消毒剂在不同试验温度或 pH 或有机物含量等时的杀菌效果,从而了解其对消毒效果的影响规律。

### 二、主要试验器材

- 1.菌片与菌悬液。
- 2.温度可调的恒温试验装置。
- 3.pH 计(经检定合格)。
- 4.温度计(经检定合格)。
- 5.中和剂(经中和剂试验鉴定合格)。
- 6.小牛血清(勿含防腐剂)。
- 7.氢氧化钠(用无菌蒸馏水配制)。
- 8.盐酸(用无菌蒸馏水配制)。

### 三、试验微生物的选择

一般情况下,细菌繁殖体选择人肠杆菌或金黄色葡萄球菌一种进行试验即可;高效消毒剂可用枯草杆菌黑色变种芽孢。

### 四、消毒液浓度和作用时间的设定

以杀灭相应微生物试验所得最低有效浓度,和 4 个作用时间进行杀灭试验。以该最低有效浓度所需的最短有效时间为第 1 时间( $T$ ),其后的第 2 时间为第 1 时间的一倍( $2T$ )。依此,第 3 时间为  $3T$ ,第 4 时间为  $4T$ 。

必要时,可根据需要调整消毒剂浓度或作用时间。

若第 1 时间较长( $> 30 \text{ min}$ ),可根据情况适当缩短作用时间的组距。对第 1 时间较短者( $< 5 \text{ min}$ ),可根据情况适当延长作用时间的组距。

### 五、有机物对杀灭微生物效果影响的测定

1.以小牛血清为有机物代表,设置无小牛血清组,含 25% 小牛血清组和含 50% 小牛血清组等 3 组。也可根据需要,调整有机物的浓度间隔和增加有机物的组数。

2.以加有 1% 蛋白胨的微生物悬液与无菌小牛血清,按 1:1 与 3:1 比例混合,分别配成含 50% 与 25% 小牛血清的微生物悬液。此含小牛血清的微生物悬液,可用于悬液定量杀菌试



验，亦可滴染菌片进行载体定量试验。阳性对照组活菌培养计数的结果应在  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml(片)。

3. 试验中根据需要，选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。

4. 试验重复 3 次。

## 六、温度对杀灭微生物效果影响的测定

1. 设置  $10 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $30 \pm 2^\circ\text{C}$  等 3 个试验温度组，也可根据需要，调整温度间隔和增加温度的组数。

2. 把温度可调的恒温试验装置调至要求温度后，放入装有试验样液的试管(或平皿)，同时放入一含与试验样液等量蒸馏水并插有温度计的试管(或平皿)。待温度计指示到达试验所需温度时，开始随后的试验。

3. 根据需要，选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。

4. 试验重复 3 次。

## 七、pH 对杀灭微生物效果影响的测定

1. 本项试验根据所测消毒剂使用溶液的 pH 值，分为以下 3 组进行：

第 1 组 pH 值  $x - 2$

第 2 组 pH 值  $x$

第 3 组 pH 值  $x + 2$

例如，所测消毒剂使用溶液的 pH 值为 7.8，则 3 组的 pH 值应为：第 1 组 5.8，第 2 组 7.8，第 3 组 9.8。

也可根据需要，调整 pH 值间隔和增加 pH 值的组数。

2. 对消毒液 pH 的调节，先用 pH 计测定原消毒剂的 pH，在偏酸时慢慢滴加氢氧化钠溶液，偏碱时慢慢滴加盐酸溶液以调整。随时用 pH 计测定消毒液的 pH。当达到所要求的 pH 后，进行随后的试验。必要时，在 pH 调整后可测定有效成分含量以观察是否受到 pH 变化的影响。

3. 根据需要，选择悬液定量杀灭试验或载体浸泡定量杀灭试验之一进行测定即可。

4. 试验重复 3 次。

## 八、评价规定

评价时，有机物影响试验应以不含小牛血清组的结果为对照；温度影响试验应以  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  组的结果为对照；pH 影响试验应以消毒剂使用溶液 pH 组的结果为对照。

(1) 该组第 1~4 个作用时间的试验对所试微生物杀灭效果均合格，判为该组所试因素无影响。

(2) 该组第 2~4 个作用时间的试验对所试微生物杀灭效果合格，判为该组所试因素有轻度影响。

(3) 该组第 3~4 个作用时间的试验对所试微生物杀灭效果合格，判为该组所试因素有中度影响。

(4) 该组只第 4 个作用时间的试验对所试微生物杀灭效果合格，判为该组所试因素有重度

影响。

(5)全部试验对所试微生物杀灭效果均不合格，判为本试验所试因素有严重影响。

## 九、注意事项

1.为使试验结果更具可比性和可重复性,非观察因素应保持稳定不变。例如,在观察有机物的影响时,除有机物浓度根据需要改变外,其他如温度和 pH 等因素均应先后一致。

2.在研究工作中,应根据消毒剂的性能及其应用要求决定做哪些影响因素观察,除了上述介绍的三种影响因素试验可供选择外,还可选做相对湿度、水的硬度等影响因素。

3.与检测工作不同,研究工作中每一影响因素应尽量多设几个试验组,缩短组间间距。以求获得较可靠的影响规律。

4.实验时确定消毒剂的浓度和作用时间很重要,如消毒剂浓度过高或作用时间过长,在观察因子对消毒剂影响较轻微时,不易得到准确、客观的结果,容易掩盖消毒剂的真实性质。

(姚楚水)

## 第七节 模拟现场和现场试验

大家知道,实验室内进行的悬液或载体试验等消毒试验,可测出消毒剂浓度与时间或物理消毒方法的强度与时间的关系,各种因素对消毒效果的影响规律等。而模拟现场或现场试验则是在近似实际应用或实际应用条件下进行试验,用于测定消毒剂或物理消毒方法实用消毒的安全使用剂量。

### 一、模拟现场试验

模拟现场试验是在实验室内,用人工方法向模拟实用消毒对象污染指示微生物,测定受试消毒剂或物理消毒方法所需安全消毒或灭菌使用剂量的试验方法。

#### (一)应用稀释试验

应用稀释试验是由官方分析化学家协会(AOAC)建立,该试验以人工方法污染指示微生物的试验载体(如青霉素不锈钢杯、金属片、橡胶片、木片、布片、医用导管或陶瓷片等)为消毒对象,用浸泡法进行消毒处理,用于测定消毒剂表面消毒时的最低安全使用浓度。

1.试验菌悬液的制备 AOAC方法应用的菌株为猪霍乱沙门菌(*Salmonella cholerae - suis*, ATCC10708)、金黄色葡萄球菌(ATCC6538)和绿脓杆菌(ATCC15442),其菌悬液均为37℃培养48~54 h的营养肉汤培养物。必要时可选用或增用其他特定指示微生物。

2.染菌载体的制备 AOAC方法应用青霉素不锈钢杯(外径 $8 \pm 1$  mm,内径 $6 \pm 1$  mm,高 $10 \pm 1$  mm)为试验载体,染菌时,将灭菌试验载体置试验菌营养肉汤中,浸泡15 min,然后无菌操作取出,置含滤纸的无菌平皿中,37℃培养箱干燥30~40 min。

试验载体可根据需要选用金属片、布片、涂漆木片、玻璃片、氯丁基橡胶片和沥青块等。经清洁去污后,压力蒸汽灭菌备用。

### 3. 试验操作程序

(1)依据实验室试验结果选 4~5 个消毒剂稀释度,每个稀释度分装 10 只试管,每只 5 ml。分装后置  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温条件下,保温至消毒液温度达  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

(2)向含消毒剂溶液的 10 只试管中,每隔 1 min,分别加入 1 个染菌载体,浸泡作用 10 min (亦可依据需要延长作用时间),达作用时间后,立即取出载体,移入营养肉汤管中,振荡洗涤,置  $37^\circ\text{C}$  培养箱内培养 48 h, 观察细菌生长情况。一次试验中, 各稀释度消毒液应同时平行进行试验。

(3)阳性对照以无菌蒸馏水代替消毒液, 余同试验组。阴性对照则为同次试验用营养肉汤管。

4.结果判定 某一稀释度接种的 10 只营养肉汤管培养后均无菌生长, 阳性对照管有菌生长阴性对照无菌生长, 则该稀释度消毒液的浓度可判为消毒剂安全使用浓度; 10 只营养肉汤管中有一管有菌生长, 则判该浓度低于消毒剂安全使用浓度。若试验中未能测出安全使用浓度则应提高浓度重新进行试验。

### (二)实用器械载体试验

实用器械载体试验以枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)芽孢(下称芽孢)为指示微生物,人工方法污染实用器械样本,用于测定医疗器械消毒或灭菌时,消毒剂的最低安全使用剂量。以作为确定对医疗器械消毒或灭菌处理时实用剂量的参考。

1.试验菌悬液的制备 试验菌为枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)芽孢(制备方法按本章第一节规定进行)。芽孢悬液配制时,我国规定用 1%蛋白胨或 3%牛血清白蛋白磷酸盐缓冲液(PBS,0.03 mol/L,pH 7.2)为稀释液,AOAC 则应用含 5%牛血清白蛋白或 20% 小牛血清的 PBS(0.03 mol/L,pH7.2)为稀释液。

2.实用器械染菌样本制备 我国规定应用截断的止血钳轴至齿端部分为实用器械样本(经脱脂处理后,压力蒸汽灭菌,烤干备用)。染菌时,用无菌镊子将止血钳样本两齿分开,使其一侧齿面朝上,并固定无菌支撑物上。用 0.1 ml 无菌吸管或装有无菌吸头量程为 100  $\mu\text{l}$  的移液器,吸取 0.02 ml 芽孢悬液滴染于止血钳齿部,再用无菌 L 形铂金丝涂匀,置  $37^\circ\text{C}$  温箱内干燥备用。

AOAC 则用标准的橡胶软管在菌悬液中浸泡 1 min,然后置  $37^\circ\text{C}$  温箱内干燥备用。

### 3. 试验操作

(1)依据实验室定量杀菌试验结果,设定 1 个消毒剂浓度,4 个作用时间。

(2)以止血钳轴至齿端部分为实用器械样本时,取无菌平皿,按每个载体 10 ml 用量加入消毒液,以橡胶软管为实用器械样本时,消毒液用量以完全浸没样本为度,置  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴中保温 5 min。

(3)将染菌样本浸于消毒液中(每个剂量组 3 个样本),在  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴条件下进行消毒处理。

(4)作用至规定时间,消毒试验时,取出样本,各个分别移入含 10 ml 中和剂溶液或含中和剂肉汤的塑料试管内。洗下实用器械样本残留微生物,取样液 1.0 ml 接种无菌平皿,每一样本接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置  $37^\circ\text{C}$  温箱培养 72 h,计数菌落数。灭菌试验时,取出样本(每个剂量组 3 个样本),分别放入含 10 ml 中和剂肉汤的试管内,振荡洗涤,置  $37^\circ\text{C}$  培养箱内培养,7 d 后观察最终结果。有菌生长者,肉汤培养基呈轻度浑浊,有皱褶状菌膜,轻轻

振摇可见絮状沉淀；无菌生长者肉汤清澈透明。

(5)阳性对照组以无菌蒸馏水代替消毒液，同样条件处理，消毒试验时，进行活菌培养计数。阳性对照样本检测回收菌量应达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 样本。灭菌试验时，分别设定量和定性阳性对照组，定性阳性对照同试验组样本一样接种中和剂肉汤、培养、观察结果。定量阳性对照组则另取染菌样本 3 个，分别放入含 10 ml 中和剂溶液的塑料试管内。振荡洗下残留微生物，取样液进行倾注接种，每一样液接种 2 个平皿，每皿 0.5 ml，37℃ 温箱培养 72 h，计数菌落数。回收菌量应达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 样本。

(6)试验应同时设置同次试验用中和剂、中和剂肉汤和培养基等阴性对照。若有污染，更换有关试剂或培养基，重新进行试验。

(7)试验重复 5 次。

#### 4. 结果评价

(1)消毒试验时，各次试验中各个样本上芽孢的杀灭率均  $\geq 99.90\%$  的剂量组为合格组，合格组所用最小有效剂量可作为消毒剂的最低安全消毒使用剂量。

(2)灭菌试验时，每次试验中各剂量组 3 个样本中有 1 个有菌生长，即作为该剂量组未达灭菌要求。在 5 次试验中，某剂量组各次试验的所有样本均无菌生长，同时阳性对照组均有菌生长，活菌计数达到规定的回收菌量，而阴性对照组均无菌生长时，该剂量组可认为达到了灭菌合格。合格组所用最小有效剂量可作为该消毒剂对医疗器械最低安全灭菌使用剂量。

#### 5. 注意事项

试验时，应严格无菌操作，否则可能将灭菌合格误判为失败。

#### (三)模拟载体试验

模拟载体试验是在实验室内，用人工方法将模拟试验载体污染指示微生物，测定消毒器械或消毒剂用于医疗器械消毒或灭菌的最低安全使用剂量。以作为对医疗器械消毒或灭菌处理时，消毒器械或消毒剂最低安全使用剂量。

1. 试验微生物及其染菌载体制备 模拟载体灭菌试验时，以枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372)芽孢为试验微生物，菌悬液中含有 1% 蛋白胨或 0.3% 牛血清白蛋白。

模拟载体消毒试验中，用于医疗器械消毒时，以枯草杆菌黑色变种 (ATCC9372)芽孢为试验微生物，用于其他物品消毒时，则可以金黄色葡萄球菌 (ATCC6538)、大肠杆菌 (8099)、绿脓杆菌 (ATCC15442)、白色念珠菌 (ATCC10231)、黑曲霉菌 (ATCC16404) 等菌或孢子为试验微生物。菌或孢子悬液中含有 1% 蛋白胨或 0.3% 牛血清白蛋白。

染菌载体制备采用滴染法或喷雾沉降法。

环氧乙烷灭菌器模拟载体灭菌试验时，以布片 (10 mm × 10 mm) 为染菌载体，菌量要求为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片 (按菌片活菌培养计数结果计)。在环氧乙烷量为  $600 \pm 30$  mg/L，温度为  $54 \pm 2^\circ\text{C}$  相对湿度为  $60\% \pm 10\%$  条件下，菌片上芽孢存活时间应  $\geq 7.5$  min，杀灭时间  $\leq 58$  min，D 值为 2.5 ~ 5.8 min。

干热灭菌柜模拟载体灭菌试验时，以玻璃片 (10 mm × 10 mm) 为染菌载体，要求回收菌量达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片 (按菌片活菌培养计数结果计)。菌片上的细菌芽孢，在  $160 \pm 5^\circ\text{C}$  条件下存活时间  $\geq 3.9$  min，杀灭时间  $\leq 19$  min，D 值为 1.3 ~ 1.9 min。

微波灭菌柜模拟载体消毒与灭菌试验和红外线消毒柜模拟现场消毒试验以玻璃片 (10 mm × 10 mm) 为染菌载体，菌量要求为  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片 (按菌片活菌培养计数结果

计)。

必要时可增用或改用其他载体。

## 2. 试验操作程序

(1)根据试验要求,制备枯草杆菌黑色变种芽孢悬液和染菌样片。环氧乙烷灭菌试验时,将染菌样片放入双层聚乙烯塑料袋内密闭包装,每袋 2 片;干热和微波灭菌或微波与红外线消毒试验时,则将染菌样片放入无菌平皿中,每皿 2 片。

(2)将灭菌或消毒器柜室内按要求分隔层装放物品至满载,每层内、中、外各设一点。每点物品中间布放 1 袋(2 片)菌片或一只装有染菌样片的平皿。另将 2 片菌片放置在灭菌或消毒器外作为阳性对照。

(3)环氧乙烷灭菌时,按使用说明书所规定的环氧乙烷浓度、作用时间、柜室内的温度和相对湿度,在满载条件下进行灭菌处理。干热和微波灭菌或微波与红外线消毒试验时,按灭菌或消毒柜设计程序进行灭菌处理。满载用物品,随用途而定。

(4)灭菌或消毒处理完毕,取出菌片,测定灭菌效果时,分别将试验组菌片移种于 5 ml 营养肉汤培养基中,振荡洗涤,置 37℃ 培养箱内培养,7 d 后观察最终结果(定性培养检测)。

对难以判断结果的营养肉汤管,取其中 0.2 ml 悬液接种营养琼脂平板,用无菌 L 棒涂匀,置 37℃ 培养箱内培养。48 h 后观察菌落形态,涂片染色镜检,或进一步做其他试验,判断有无细菌生长或生长的细菌是否为试验菌。若为非试验菌,则应重新进行试验。

测定消毒效果时,则分别将试验组菌片移入含 5 ml 洗涤液或含中和剂的洗涤液中,洗下残留的微生物,取样液进行倾注接种,每一样液接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置 37℃ 培养箱内培养,细菌芽孢培养 72 h,细菌繁殖体培养 48 h,观察最终结果。

(5)测定灭菌效果时,应同时设立定性和定量阳性对照组(菌片对照)与阴性对照组(培养基对照)。测定消毒效果时,应设立定量阳性对照组(菌片对照)与阴性对照组(培养基对照)。

(6)定量阳性对照组,以同批试验用菌片置室温下,待消毒或灭菌试验组达规定作用时间后,立即将该批菌片 2 片分别放入含 5.0 ml PBS 试管中,振荡洗下载体上的微生物。取样液进行倾注接种,每一样液接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置 37℃ 培养箱内培养 72 h,计数菌落数。

(7)定性阳性对照组,以试验用的同批菌片置室温下,待灭菌试验组达规定作用时间后,立即将该批菌片 2 片,分别接种于 5.0 ml 营养肉汤培养基,振荡洗涤,置 37℃ 培养箱内培养,7 d 后观察细菌生长情况。

(8)阴性对照组,以同次试验用未染菌样片 2 片,分别接种于 5.0 ml 营养肉汤培养基,同时将未接种过的营养肉汤培养基放入培养箱内作定性培养,观察有无细菌生长。

(9)试验重复 5 次。

4. 结果判定 测定灭菌效果时,在 5 次试验中,每次试验的定量阳性对照组检测回收菌量均达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片,定性阳性对照组细菌生长良好,阴性对照组无菌生长。所有试验组染菌样片全部无菌生长时,可判为灭菌合格。灭菌合格的最低剂量可作为消毒器械或消毒剂用于医疗器械灭菌的最低安全使用剂量。

测定消毒效果时,在 5 次试验中,每次试验中的定量阳性对照组,检测回收菌量均达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu / 片,阴性对照组应无菌生长。所有试验组染菌样片各次试验杀灭率均达 99.90% 以上,可判为消毒合格。消毒合格的最低剂量可作为消毒器械或消毒剂用于医疗器械

消毒的最低安全使用剂量。

## 5. 注意事项

(1) 温度和相对湿度对环氧乙烷气体杀菌效果影响较大, 故应严格控制试验条件。

(2) 环氧乙烷液体可溶解聚乙烯、聚氯乙烯等, 不可将其液体滴落于此类物品上。环氧乙烷不论液体或气体, 均可损坏赛璐珞制品, 试验时应予注意。

(3) 环氧乙烷易燃易爆, 操作现场应采取防火防爆措施, 不得有明火作业及电火花发生。

(4) 吸入过多环氧乙烷气体可引起头痛、呕吐等中毒症状, 严重者可致肺水肿等。工作环境中应有良好的通风。在每日 8 h 工作中, 环氧乙烷浓度应不超过 1 ppm(1.82 mg/m<sup>3</sup>), 15 min 工作中暴露浓度不超过 5.0 ppm(9.1 mg/m<sup>3</sup>)。如出现中毒症状, 需迅速离开现场。轻者呼吸新鲜空气, 直到症状消除; 重者应及时送医院治疗。

(5) 微波强弱受电压影响很大。试验时, 应注意电压是否符合说明书规定值。跳动较大时, 应使用稳压电源。

(6) 微波杀菌效果与样本的含水量密切相关。在使用中规定需预湿者, 试验时亦必须预湿, 以防止物品烧焦, 提高其杀菌效果。

(7) 微波消毒金属物品时, 需用适宜含水量的湿布将其包裹, 特别是对金属器械的尖端部分, 以防因尖端放电损坏磁控管。

(8) 测试人员长时间受微波照射, 对健康有害。试验时必须穿戴专用的防护用具。测试的灭菌柜应事先用微波漏能测试仪检测有无微波泄漏。

## (四) 模拟食(饮)具污染消毒试验

模拟食(饮)具污染消毒试验以人工方法污染指示微生物于实用食(饮)具表面, 进行消毒处理, 测定消毒剂对食(饮)具消毒时的最低安全使用剂量。以作为对食(饮)具消毒处理时安全消毒使用剂量。

1. 试验菌及染菌样本的制备 试验菌为大肠杆菌(8099), 其菌悬液的制备按本章第一节所示方法进行。制备染菌样本时, 用无菌规格板在试验用灭菌的瓷盘(平底)内侧面中部标出染菌区(5.0 cm × 5.0 cm)。取无菌吸管吸取菌悬液, 滴加于染菌区, 每区 0.2 ml, 用无菌 L 棒在区内涂抹均匀, 置 37℃ 温箱干燥。

对筷子(圆周长应约达 2.0 cm), 取前端约 12.5 cm 长度(总面积 25 cm<sup>2</sup>), 蘸染预定量菌悬液, 置 37℃ 温箱干燥。

必要时, 可增用其他微生物作为指示微生物。

## 2. 试验操作程序

(1) 以人工方法将瓷盘(平底)和竹、木筷污染大肠杆菌。每个剂量组每类食(饮)具污染 3 个样本。

(2) 依据实验室定量杀菌试验结果, 选 1 个消毒剂浓度, 设 4 个作用时间, 分别进行杀灭试验。必要时, 可调整试验剂量(包括浓度和时间)直至观察到消毒所需最低剂量为止。

(3) 将染菌盘、筷缓缓放入含消毒剂溶液的容器中, 使完全浸没。待作用至规定时间后, 对盘用浸有含中和剂采样液的无菌棉拭, 涂抹染菌区(规格板标定区)采样, 以每只盘子作为一份样本; 对筷子, 轻轻提出, 用浸有含中和剂采样液的棉拭, 由前端进行涂抹采样至 12.5 cm 处(面积约 25 cm<sup>2</sup>)。以每支筷子作为一份样本。

(4) 将采样棉拭样本放回含 5.0 ml 采样液试管内, 测定残留存活菌数(cfu/cm<sup>2</sup>)。测定时,

每一样液接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置 37℃培养箱内培养 48 h,计数菌落数。

(5) 试验中,应设阳性与阴性对照组。阳性对照组的食(饮)具与试验组同法染菌,置同样条件下,将染菌盘、筷浸泡于含有 PBS 的容器中。待试验组消毒处理完毕后,与试验组同时进行采样和检测。所得细菌定量检测结果作为消毒前菌量,用于杀灭率计算。杀灭率可按下式计算:

$$\text{每件食具样本生长菌落数 (cfu/cm}^2\text{)} = \frac{\text{样本上平均菌落数} \times \text{检测时样本洗液稀释倍数} \times 2}{25}$$

“25”为规格板限定的采样面积( $\text{cm}^2$ ),也是一支筷子(圆周约为 2 cm)由头向上采样至 12.5 cm 处的面积。“2”为取 0.5 ml 样液进行活菌培养的计算系数。

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{阳性对照样本平均菌落数} - \text{消毒试验组样本平均菌落数}}{\text{阳性对照样本平均菌落数}} \times 100\%$$

阳性对照组所测得的菌量应达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2$ ,未达此菌量时,应增加染菌量,重新进行试验。

试验时应将未用过的同次试验用中和剂、PBS 和培养基等,与上述两组样本同时进行培养,作为阴性对照。若有菌生长,更换培养基 PBS 或中和剂,重新进行试验。

(7) 试验重复 3 次。

3. 结果判定 阳性对照组所测得的菌量达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6 \text{ cfu/cm}^2$ ,阴性对照无菌生长,各次试验中对大肠杆菌杀灭率均达 100%,所用消毒剂的最低剂量为消毒剂食(饮)具安全消毒使用剂量。

#### 4. 注意事项

(1) 试验操作过程必须采取严格的无菌技术。直接或间接接触样本的器材必须经灭菌后使用。

(2) 每次试验必须设置阳性和阴性对照。

(3) 消毒前后不得在食(饮)具同一采样区内重复采样。

(4) 棉拭涂抹采样较难标准化,为此应注意棉拭大小、用力均匀、吸量准确和洗菌时敲打轻重的一致。

#### (五) 模拟手污染消毒试验

模拟手污染消毒试验以人工方法向手部皮肤污染指示微生物,测定消毒剂消毒手时的最低安全使用剂量。以作为对手消毒处理时的实用剂量。

1. 试验菌悬液的制备 我国推荐使用大肠杆菌(8099),欧洲标准委员会(CEN)则推荐使用大肠杆菌(NCTC1058),对尚需用于杀灭其他特定细菌目的者,可增用该特定非致病性细菌进行试验。菌悬液制备时,取 2 支在 37℃培养箱中培养 18~24 h 的大肠杆菌胰蛋白胨肉汤(TSB)培养物分别接种于含 1 L TSB 的三角瓶中,在 37℃培养箱中培养 18~24 h,制成 TSB 菌悬液。

#### 2. 试验操作程序

(1) 将受试志愿者随机分为两组,第一组使用参考消毒剂〔卫生手消毒时使用 60%(v/v)正丙醇(propan-2-ol),外科手消毒时使用 60%(v/v)异丙醇(propan-1-ol)],第二组使用试验消毒剂。

(2) 使用液体肥皂洗手 1 min,去除手表面污染的自然菌,然后用无菌纸巾将手擦干。

(3)将  $2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^9$  cfu/ml 大肠杆菌或其他特定的非致病菌菌悬液放入一无菌容器中。

(4)将手掌中间到指尖部位浸入菌悬液中,手指分开,停留 5 s,将手离开菌悬液,自然晾干 (3 ~ 5 min)。

(5)晾干后,将一只手的手指指尖在含 10 ml TSB 的平皿中搓洗 1 min,取洗液或适当稀释的样液进行倾注接种,每一样液接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置 37℃培养箱内培养 72 h,计数菌落数,作为试验前菌数对照。

(6)然后将受试志愿者随机分为两组,一组按实验室试验结果,选定消毒剂浓度、用量和消毒作用时间,以图 20-1 所示的洗手方法搓擦双手,喷雾或擦拭消毒时,可参照图示的洗手方法进行消毒处理。卫生手消毒时,搓擦消毒时间一般为 30 s,最长为 1 min;外科手消毒时,搓擦消毒时间一般为 3 min,最长 5 min。

(7)消毒后,用流动自来水冲洗 5 s,抖掉手上残留的水滴。

(8)将手指指尖在 10 ml 含中和剂的胰蛋白胍肉汤的平皿中搓洗 1 min,取洗液或适当稀释的样液进行倾注接种,每一样液接种 2 个平皿,每皿 0.5 ml,倾注琼脂,置 37℃培养箱内培养 72 h,计数菌落数,作为消毒试验后菌数。

(9)另一组用参考消毒剂,卫生手消毒时,取 3 ml 正丙醇(欧洲药典)滴入手心中,按图 20-1 的洗手方法用力搓擦 30 s。以确保手的所有部位均匀受药。必要时可再次加入 3 ml 正丙醇,以保持搓擦作用时间为 60 s。对于外科手消毒,则取 3 ml 60% (v/v) 异丙醇滴入手心中,按图示的洗手方法用力搓擦,当接近干燥时,再加 3 ml 异丙醇搓擦。以保持搓擦时间达 3 ~ 5 min。

(10)消毒后,用流动的自来水冲洗 5 s,抖掉手上残留的水滴。

(11)其余步骤与试验样品组相同。

(12)分别计算参考消毒剂组和试验消毒剂组的菌数减少的对数值。

(13)受试志愿者人数不得少于 20 人次。

### 3. 判定标准

(1)试验消毒剂的菌数减少对数值不明显小于参考消毒剂的菌数减少对数值为消毒合格。如果试验消毒剂的菌数减少对数值小于参考消毒剂的菌数减少对数值,应进行统计学处理以确定差异是否显著。两者菌数减少对数值无显著性差异时,亦判为消毒合格。合格的最小剂量可用于对手消毒最低安全使用剂量。

(2)如果试验消毒剂的菌数减少对数值显著小于参考消毒剂的菌数减少对数值,表明该试验消毒剂不符合手消毒要求。

### 4. 注意事项

(1)本试验需有志愿者参与,重复人次较多,一人可多次受试,但不得在一批试验或同日中反复参与,否则可影响结果的准确性。

(2)受试者接受试验时,不得触摸任何表面,以免使手的试验部位沾染杂菌。

(3)应注意采样用力均匀,吸量准确和洗菌时敲打的轻重一致。

(4)涂药量要适宜,涂抹要均匀。

(5)模拟现场样本须及时检测,室温存放不得超过 30 min。





图 20-1 标准的洗手方法

#### (六)模拟物体表面污染消毒试验

模拟物体表面污染消毒试验以人工方法污染指示微生物于实用消毒物体表面，测定消毒剂对物体表面喷雾或擦拭消毒时的最低安全使用剂量。以作为对物体表面消毒处理时的实用剂量。

1. 试验菌悬液的制备 试验菌为大肠杆菌（8099）与金黄色葡萄球菌（ATCC6538）。菌悬液制备按本章第一节所示方法进行。对尚需用于杀灭其他特定微生物者，可增用该特定微生物进行试验。

#### 2. 试验操作程序

(1)用无菌棉拭蘸取大肠杆菌（8099）、金黄色葡萄球菌（ATCC6538）或其他特定微生物悬液，均匀涂抹于被试木制桌面或其他特定物体表面的6个区块（各为25 cm<sup>2</sup>）。待自然干燥后进行试验。3个区块作为阳性对照区，3个区块为试验区。

(2)染菌时，选表面较平的部位，以规格板（5 cm × 5 cm）中央空格为准。

(3)消毒前，将无菌棉拭于含5 ml 稀释液（含中和剂）试管中浸湿，并于试管壁上挤压使无水滴流下，分别对3个对照组区块涂抹采样，每区块横竖往返各8次。采样后，以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内，作为阳性对照组样液。

(4)消毒时，选定消毒剂浓度、用量、作用时间和消毒处理方法进行消毒。每次试验，各类物品每个剂量组测试3个样本。

(5)消毒后，将无菌棉拭于含5 ml 采样液试管中浸湿，并于试管壁上挤压使无水滴流下，

分别对 3 个消毒区块进行涂抹采样, 每区块横竖往返各 8 次。采样后, 以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原采样液试管内, 作为消毒组样液。

(6)将阳性对照组和消毒组样液做琼脂倾注接种, 每个样本接种 2 个平皿, 每皿 0.5 ml, 置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。阳性对照组检测菌量应达  $(5 \sim 6) \times 10^5 \text{ cfu/cm}^2$ 。

(7)试验同时设同次试验用中和剂、稀释液和培养基阴性对照。若有污染, 更换中和剂、稀释液或培养基, 重新进行试验。

(8)试验重复 3 次。

3 结果判定 阳性对照组检测菌量应达  $(5 \sim 6) \times 10^5 \text{ cfu/cm}^2$ , 阴性对照无菌生长, 试验组各次试验各个样本的杀灭率均  $\geq 99.90\%$  的剂量组为合格组。合格组消毒剂剂量为物体表面喷雾或擦拭消毒时的最低安全消毒使用剂量。

#### (七)模拟空气污染消毒试验

空气模拟现场消毒试验以喷雾气溶胶的方法使受试空气污染指示微生物, 测定消毒器械或消毒剂用于空气消毒的最低安全使用剂量。

1. 试验菌悬液的制备 试验菌为灵杆菌 (8039) 或白色葡萄球菌 (8032) 等非致病性细菌, 试验时, 取经 37℃培养 18 ~ 24 h 的新鲜斜面培养物, 用 PBS 洗下菌苔, 振荡混匀, 无菌脱脂棉过滤, 用营养肉汤培养基稀释成所需浓度。

2. 消毒试验用气雾室 气雾室应以铝合金或玻璃等光洁、耐腐蚀和易清洗的材料相邻建造一对, 一室用于消毒试验, 另一室用于对照试验。两个气雾室所处环境(包括温度、湿度、光照、密闭性、和通风条件等)应一致。其内可设调温和调湿装置, 建造过滤通风、排气和排水管道, 此外, 还应开有气溶胶喷雾染菌、给药、采样等管道出入口、袖套操作和样本传递窗口。

3. 喷雾染菌装置 主要包括: 空气压缩机、压力表、气体流量计、气溶胶喷雾器等。喷出细菌微粒的直径 90% 以上应在 1 ~ 10 μm 之间。

#### 4. 试验操作程序

(1)将相邻两个气雾室同时调室内温度 (℃) 和相对湿度 (%) 达试验要求。

(2)将所需设备、用品或器械等一次放入气雾室内, 将门关闭。此后, 一切操作和仪器设备的操纵均在室外通过带有密封袖套的窗口或摇控器进行。直至试验结束, 始可将门打开。

(3)按预备试验确定的压力、气体流量及喷雾时间喷雾气溶胶染菌。边喷雾染菌边用风扇对空气进行搅拌。喷雾染菌完毕, 继续搅拌 5 min, 尔后静置 5 min, 接着对对照组和消毒试验组气雾室同时进行采样, 分别作为对照组试验开始前和试验组消毒处理前阳性对照。气雾室内空气细菌浓度应达  $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5 \text{ cfu/m}^3$  (按试验组消毒处理前阳性对照样本检测结果计)。

(4)按实验室试验结果所设计的用量, 在试验组气雾室内进行喷雾、熏蒸或滤除等消毒处理。

(5)消毒作用至规定的第一个时间, 即刻对对照组和消毒试验组气雾室同时进行采样。待消毒作用至规定的第二个时间, 再次分别进行采样。如此每作用至一个规定时间采样一次, 直至到达规定的最终作用时间进行最后一次采样。

(6)试验用多级筛孔空气撞击式采样器采样, 采样时, 将采样器置气雾室中央 1.0 m 高处。采样流量为 28.3 L/min (可用一个 0 ~ 35 L/min 量程的转子流量计进行校对), 采样时间为 1 min。采样后, 无菌操作取下平板, 置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。检测消毒剂对空气的消毒效果时, 采样平板用琼脂内应含有足量鉴定合格的中和剂。

(7) 试验应同时设未用的同批培养基、采样液和 PBS 等阴性对照。阴性对照组若有菌生长,说明所用培养基或试剂有污染,试验无效,更换无菌器材重新进行。

(8) 试验重复 3 次。

5. 结果判定 3 次重复试验中,各次试验的杀灭率均  $\geq 99.90\%$  时,可判为消毒合格。消毒合格的最低剂量为消毒器械或消毒剂用于空气消毒的最低安全使用剂量。

杀灭率按下式计算:

$$N_t = \frac{V_0 - V_t}{V_0} \times 100\%$$
$$K_t = \frac{V_0'(1 - N_t) - V_t'}{V_0'(1 - N_t)} \times 100\%$$

式中:  $N_t$ : 空气中细菌的自然消亡率;

$V_0$  与  $V_t$ : 分别为对照组试验开始前和试验至不同时间时空气含菌量;

$K_t$ : 消毒处理对空气中细菌的杀灭率;

$V_0'$  与  $V_t'$ : 分别为试验组消毒处理前和消毒至不同时间时空气含菌量。

消毒前后空气中含菌量按下式计算:

$$\text{空气中菌数 (cfu/m}^3\text{)} = \frac{\text{六节平板上总菌数 (cfu)}}{28.3 \text{ L/min} \times \text{采样时间 (min)}} \times 1000$$

## 6. 注意事项

(1) 试验中,因控制统一的条件较难,故每次均需同时设置试验组与对照组。两组条件尽量保持一致。消毒前、后及不同次数间的环境条件亦应尽量保持一致。

(2) 注意记录试验过程中的温度和相对湿度,以便分析对比。

(3) 试验时,气雾室必须保持密闭,排出的空气需经过过滤装置,以防染菌空气外逸,污染环境。

(4) 每次试验完备,对气雾室内表面和空气中可能残留的细菌做最终消毒处理。

(5) 应用多级筛孔空气撞击式采样器采样时,平板中的培养基要保持水平,平板上的菌落数以 50~300 cfu/平板为宜,大于或小于此菌落数范围,应酌情减少或增加采样时间。

(6) 气雾室排风过滤装置中的滤材应定期更换,换下的滤材应经灭菌后再作其他处理。

## 二、现场试验

现场试验是在实用现场,以自然菌为指示微生物,对实际消毒对象进行消毒处理,测定受试消毒剂或物理消毒方法所需安全消毒使用剂量的试验方法。

### (一) 消毒剂对物体表面现场消毒试验

依据实验室或模拟现场试验的结果选定消毒剂浓度、用量、作用时间和消毒处理方法,按下列操作程序对目标物体表面进行消毒。

#### 1. 试验操作程序

(1) 随机取物体表面(如桌面、台面、门或物品等),用规格板(5 cm × 5 cm)标定 2 块面积各为 25 cm<sup>2</sup> 的区块,一块供消毒前采样,一块供消毒后采样。

(2) 消毒前,将无菌棉拭于含 5 ml 中和剂稀释液(下称稀释液)的试管中蘸湿,对标定区块涂抹采样,横竖往返各 8 次。采样后,以无菌操作方式将棉拭采样端剪入原稀释液试管内,作

为阳性对照组样液。

(3)将消毒剂溶液喷雾或涂擦物体表面或浸泡物品进行表面消毒，消毒后同消毒前采样，作为消毒组样液。

(4)取阳性对照组和消毒组样液做琼脂倾注接种，每个样本接种 2 个平皿，每皿 0.5 ml，置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。

(5)试验同时设同次试验用中和剂、稀释液和培养基阴性对照。若有污染，更换中和剂、稀释液或培养基，重新进行试验。

(6)试验检测样本数应  $\geq 30$  份。

2. 结果判定以 30 份试验样本消毒后对自然菌的平均杀灭率  $\geq 90.00\%$  为合格。

### 3. 注意事项

(1)在现场试验中，自然菌的种类较复杂，平板上常出现大面积霉菌生长，导致无法计数菌落。此时，在两个平行的平板中如有一个平板可数清菌落数，即按该平板菌落数计算结果。如两平板均有大面积霉菌生长，应重新进行试验。

(2)试验操作必须采取严格的无菌技术。

(3)消毒前后采样（阳性对照组和消毒试验组）不得在同一区内进行。

(4)棉拭涂抹采样较难标准化，为此应尽量使棉拭的大小，用力的均匀，吸取采样液的量，洗菌时敲打的轻重等等先后一致。

(5)现场样本须及时检测。室温存放不得超过 2 h，否则应置 4℃冰箱内，但亦不得超过 4 h。

### (二)空气现场消毒试验

空气现场消毒试验以自然菌为指示微生物，对试验场所（如病房、寝室、办公室以及仓库、救护车、火车车厢等可密闭的场所）空气进行消毒或清除处理，测定受试消毒器械或消毒剂对空气消毒或清除所需安全使用剂量的试验方法。

#### 1. 试验操作程序

(1) 试验场所选择：根据消毒器械或消毒剂使用要求，选择有代表性的试验场所（如病房、寝室、办公室以及仓库、救护车、火车车厢等可密闭的场所），并确定是否在室内无或有人等情况下进行试验。

(2) 采样：消毒前后均应进行空气自然菌采样。采样有多级筛孔空气撞击式采样器采样法和自然沉降采样法。

用多级筛孔空气撞击式采样器采样法采样时，将采样器置试验场所中央 1.0 m 高处。试验场所大于 10 m<sup>2</sup> 者，每超过 10 m<sup>2</sup> 增设一点。采样流量为 28.3 L/min(可用一个 0 ~ 35 L/min 量程的转子流量计进行校对)，采样时间为 1 min。无菌操作取下平板，置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。检测消毒剂对空气的消毒效果时，采样平板用琼脂内应含有足量鉴定合格的中和剂。

自然沉降采样法采样时，室内面积  $\leq 30$  m<sup>2</sup>，设内、中、外对角线 3 点，内、外点布点部位距墙壁不小于 1.0 m；室内面积  $\geq 30$  m<sup>2</sup> 时，设 4 角及中央 5 点，4 角布点部位距墙壁不小于 1.0 m。采样时，将营养琼脂平板(直径为 9 cm)摆放在各采样点 1.5 m 高处，将平板盖打开，扣放在平板旁，暴露 5 min，盖好平板，置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。

(3) 消毒处理：根据消毒器械或消毒剂使用要求进行喷雾、熏蒸、滤除等消毒处理，消毒作

用至规定时间后,作消毒后采样,计数残留菌数。

(4)空气中菌数计算:多级筛孔空气撞击式采样器采样时,空气中菌数( $\text{cfu}/\text{m}^3$ )计算按本节“一(七)”所示方法进行。

自然沉降采样法采样时,按下式计算。

$$\text{空气中菌数}(\text{cfu}/\text{m}^3) = \frac{5\,000\,N}{A \times T}$$

式中:  $A$  为平板面积( $\text{cm}^2$ )

$T$  为平板暴露时间( $\text{min}$ )

$N$  为平均菌落数( $\text{cfu}$ )

(5)消亡率计算:因现场试验环境条件变化较多,难以统一,无法测定准确的自然沉降率,故只按所得消亡率(自然沉降和消毒处理中杀菌的综合效果)做出验证结论。消亡率的计算按下式进行:

$$\text{消亡率} = \frac{\text{消毒前空气中菌数平均数} - \text{消毒后空气中菌数平均数}}{\text{消毒前空气中菌数平均数}} \times 100\%$$

(6)阴性对照:试验同时设同次试验用培养基与采样液阴性对照。阴性对照组若有菌生长,说明所用培养基有污染,试验无效,更换后重新进行。

(7)试验重复 3 次或以上。

2. 结果判定 除有特殊要求者外,对室内进行的空气消毒,每次试验的自然菌消亡率均  $\geq 90\%$ 、且室内空气中细菌总数不超过国家允许标准(GB15982-1995)者为合格。达合格的最小有效剂量为消毒器械或消毒剂对空气消毒或清除所需安全使用剂量。

### 3. 注意事项

(1)试验中,因控制统一的条件较难,故每次均需同时设置试验组与对照组。消毒前、后及不同次数间的环境条件亦应尽量保持一致。

(2)应用多级筛孔空气撞击式采样器采样时,平板中的培养基要保持水平,平板上的菌落数以 50~300  $\text{cfu}/\text{平板}$  为宜,大于或小于此菌落数范围,应酌情减少或增加采样时间。

(3)注意记录试验过程中的温度和相对湿度,以便分析对比。

(4)所采样本应尽快送实验室进行微生物检验,以免影响结果的准确性。

### (三)手现场消毒试验

手现场消毒试验以自然菌为指示微生物,对志愿人员的手进行消毒或清除处理,测定受试消毒剂消毒或清除手上致病微生物所需安全使用剂量的试验方法。

#### 1. 试验操作程序

(1)在使用现场,随机选定手部皮肤健康、无伤损的志愿人员作为受试者。

(2)受试者用流水肥皂洗手 1 min,抖掉手上残留的水滴,用无菌纸巾将手擦干。

(3)消毒前,在受试者双手相互充分搓擦后,任选一只手进行自然菌采样,作为阳性对照样本。对另一只手消毒后,进行自然菌采样,作为消毒试验样本。采样方法为棉拭涂擦法。采样时,受试者五指并拢,用无菌棉拭于含 10 ml 采样液(使用消毒剂时,应加有经鉴定合格的中和剂)的试管中浸湿,并于试管壁上挤压使无水滴流下,然后在五指屈面指尖到指跟处,往返涂擦 2 遍,每涂擦一遍,将棉拭转动一次。采样后,以无菌操作方式将棉拭采样端剪入采样液的试管中。

(4)消毒时,按选定的消毒剂浓度和施药方法向手部皮肤施加消毒剂,然后按图 20-1 所示方法进行消毒。消毒至规定作用时间后及时进行消毒试验样本采样。

(5)消毒前阳性对照样本和消毒试验样本经振荡洗涤后,进行琼脂倾注接种培养,每一样本接种两个平皿,每皿 1.0 ml,倾注琼脂后,置 37℃培养箱培养 48 h 进行活菌培养计数。

(6)试验时应设同次试验用培养基、采样液和棉拭等阴性对照,以检测所用试剂与用品是否有污染。若有污染,则应更换器材重新进行试验。

(7)试验观察不应少于 30 人次。

(8)手上自然菌菌量与杀灭率按下式计算:

每只手样本菌数(cfu/手)=平板上平均菌落数×检测时样液稀释倍数

杀灭率 =  $\frac{\text{阳性对照样本平均菌落数} - \text{消毒试验样本平均菌落数}}{\text{阳性对照样本平均菌落数}} \times 100\%$

2. 结果判定 每人每次检测,手上自然菌杀灭率均  $\geq 90.00\%$ ,且手上残留的自然菌菌数不超过国家卫生标准允许量(GB15982-1995)。

(王太星)

#### 参考文献

- 1 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
- 2 薛广波,主编.灭菌消毒防腐保藏.北京:人民卫生出版社,1993:25-29
- 3 于渠华,车凤翔.现代空气微生物学及采检鉴技术.北京:军事医学科学出版社,1998:95-98
- 4 AATCC. Assessment of antibacterial finishes on textile materials. AATCC Test Method, 100-1993
- 5 ASTM Committee. Standard test method for evaluation of antibacterial washes by the agar patch technique. E 1882-97:1-3
- 6 ASTM Committee. Standard test method for assessment of an antibacterial handwash product by multiple basin wash technique. E 1883-97:1-4
- 7 ASTM Committee. Standard test method for evaluation of antibacterial washes by cup scrub technique. E 1874-97:1-4
- 8 Reybrouck C. Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. eds. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 2th ed. London: Blackwell Scientific Publication, 1992:114-133
- 9 European Standard Committee. Chemical disinfectants and antiseptics - hygienic handrub test method and requirements. EN 1500, 1997:1-14
- 10 Environmental Protection Agency. Products performance test guidelines. Products for use on hard surfaces - basic efficacy data requirements. EPA 712-c-97-056, OPPTS 810.2100, 1997:1-20

# 第二十一章 真菌消毒试验

## 第一节 概述

测定消毒剂杀真菌作用的试验一般可分为三期。第一期试验为早期消毒剂筛选试验,在严格控制的实验室条件下进行,以初步确定所选消毒剂是否具有杀真菌作用。第二期试验是测定消毒剂特定用途的应用 – 稀释试验( use – dilution tests),在模拟现场的环境条件下进行。该类试验是检验消毒程序而非消毒剂,目的是测定该消毒剂在什么情况下和应用何种稀释度是有效的。第三期试验为现场消毒试验,包括在现场进行的应用试验和用户试用试验,以评价该消毒剂在实用中对自然菌的杀灭效果。经过三期试验之后,才能对一种消毒剂杀真菌作用的实用价值作出正确评价。

到目前为止,曾经报道过的测定消毒剂杀真菌作用的试验有很多,在不同的国家以及不同的行业也略有不同。例如,《消毒、灭菌、保藏》(Czerkowiez, 1983)一书中阐述了对于预防和降低环境中病原性真菌传播的理化试验方法。其他的还有对木头、纸张、纸板、涂料、皮革、织物以及塑料制品等保藏方法的阐述。目前尚没有一个统一的可覆盖所有行业的杀真菌剂评价方法。评价杀真菌剂效果的试验程序一般包含下列因子:培养物、稀释液、杀真菌剂、暴露时间、暴露的环境条件以及中和剂等。通过这些因子可区分上述三期试验。因实际条件下(如医院环境)的消毒试验影响因素众多,难于控制,且花费较大,各国杀真菌试验大多尚停留在第一、二期试验的基础上,包括悬液、能量和载体试验。

### 一、悬液试验

较早的涉及真菌的评价试验有 Dutch Committee on Phytopharmacy(1974)评价医院用消毒剂的 Dutch 标准悬液实验,又称 5 – 5 – 5 试验, Van Klingeren 等在 1977 年也曾论及,该试验依据在不同行业中的应用,使用不同的试验真菌,例如在食品工业采用 *Saccharomyces cerevisiae*,在畜牧业采用烟曲霉和白色念珠菌,在评价医院用消毒剂的时候则采用白色念珠菌。其菌药作用时间为 5 min;评价标准是至少要降低 5 个 Log。在法国, The Association Francaise de Normalisation (1981)建议采用 AFNOR 试验 NFT 72 – 200 及 NFT 72 – 201,属定量悬液实验,采用四种试验菌: *Aspergillus cervicolor* CNCM 1187 – 79、*Cladosporium cladosporioides* CNCM 1185 – 79、*Penicillium verruculosum* var. *cyclopium* CNCM 1186 – 79 和 *Candida albicans* CNCM 1180 – 79(ATCC 2091)。两试验所采用的试验菌以及菌药接触时间皆相同,仅仅接种的菌量和中和方式不同,前者采用中和剂溶液中和,而后者采用的是膜滤方式。1987 年, Bohdan Terleckyj 和 David A. Axler 共同建立了一个杀真菌剂的定量中和试验,为消除残余消毒剂的影响使用了 Dey – Engley 中和平板,菌 – 药混合液作用 15、30、60 min,包含的试验真菌有 11 种之多。以 Dutch 5 – 5 – 5 试验为基础的欧洲悬液实验 (European Suspension Test, EST) (Anon, 1998)以白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC10231 株(或黑曲霉 *Aspergillus niger*)为试验菌,试验包括两个方面:菌悬液中加入 0.03% 牛

白蛋白以模拟清洁条件；加入 1% 牛白蛋白以模拟脏的条件，以标准硬水配制消毒溶液，5 min 内微生物杀灭效果 ME 值( $ME = N_c - N_d$ ,  $N_c$  = 对照组菌数的对数,  $N_d$  = 消毒组菌数的对数)应大于 5。目前，西欧国家消毒标准几乎均采用 CEN 标准, 尤其 1997 年欧共体成员国共同建立的欧洲标准 EN 1257:1997 以及 1998 年的 EN 1605:1998, 对上述试验各因子进行了标准化。而在美国，一直都被广泛采用的是官方分析化学家协会 (Association of Official Analytical Chemists, AOAC) 以测定酚系数为基础的杀真菌试验，为定性悬液实验 (1995)。

## 二、能量试验

在实际应用中，往往是每过一段时间将一个或几个污染的物品放入消毒剂溶液中（同时带入了污物和杂菌），在不断增加负担的情况下，消毒剂溶液保持杀菌活力的能力，称为消毒剂的能量 (capacity)，本试验就是为测定消毒剂的能量 - 应用稀释度而设计的。在英国及其他欧洲国家，应用最广泛的能量试验为凯尔西 - 塞克斯 (Kelsey - Sykss) 试验 (Kelsey - Maurer 修订版, 1974)。它以白色念珠菌和烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*) 为试验菌，清洁条件下试验菌由无菌蒸馏水配成悬液，脏的条件下由无菌酵母配成悬液，菌液浓度为  $(1 \sim 5) \times 10^7$  cfu/ml，消毒剂用无菌蒸馏水稀释，最初用量 3 ml，作用时间 8 min，采样接种肉汤之后 2 min，加入新菌液 1 ml，重复测定。

## 三、载体试验

DGHM Guidelines (Borneff *et al.*, 1981) 使用白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231 作为试验菌，而 DGHM (1984) 的表面消毒效果检测中，白色念珠菌 ATCC10231 及须发毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) ATCC9533 株被用作试验菌，5 mm × 20 mm × 2 mm 的山毛榉小木片被用作载体，暴露时间 15、30 min、1、2 及 4 h 之后以影印法接种至沙保氏营养琼脂，生长情况被半定量评估。为克服影印法接种平板生长菌数过多难于计数的缺点，近来法国标准协会 (Association Francaise de Normalisation, AFNOR) 及荷兰植物药剂学委员会 (Dutch Committee on Phytopharmacy) 建议采用洗菌技术。另外，国内常用的试验有 Kruse 等建立的气溶胶法，目的是测定消毒剂对实验室表面污染的致病真菌的杀灭作用：三种致病真菌皮炎芽生菌 (*B. dermatitidis*) 灰酪球孢子菌 (*C. immitis*)、荚膜组织胞浆菌 (*H. capsulatum*) 被用作试验菌；使用的载体为 1 平方英寸的涂漆木片、玻璃片、不锈钢片、氯丁橡胶片和沥青块等；气溶胶法使载体染菌；菌 - 药作用时间为 1、5、10、20、30 和 60 min；除荚膜组织胞浆菌于 27 ~ 30 °C 培养外，其他均放 37 °C 培养 10 d。

## 第二节 美国 AOAC 杀真菌试验

这里主要介绍 1995 年美国 AOAC 出版的杀真菌试验 (1955.17)。适用于评价可与水混合且应用于无生命物体的杀真菌剂的消毒效果。

### 一、试验菌株

本试验采用须发毛癣菌 (*Trichophyton mentagrophytes*) ATCC 9533 株 (替代菌株可以为 ATCC 640 株)，该菌分离自皮癣病患者的足。菌株用人工合成的葡萄糖琼脂培养基培养，培养 10 d



后在琼脂表面出现大量呈粉状的分生孢子，并经镜检确定，而且，生有分生孢子的菌丝体应当容易从琼脂表面刮取。孢子对酚的抵抗力为：在 20℃ 时，1:70 的酚溶液处理 10 min 仍存活而在 1:60 的酚溶液被灭活。

## 二、培养基

菌种保存于下列成分琼脂斜面：葡萄糖 2%，新胨 (Difco No. 0119) 1%，琼脂 2%，调节 pH 值在 6.1 ~ 6.3。使用相同成分的液体培养基(无琼脂)。

## 三、试验菌株的培养及保存方法

菌种保存于葡萄糖琼脂斜面，放于 2 ~ 5℃，每小于 3 个月转种一次斜面，在 25 ~ 30℃ 培养 10 d 后，放冰箱内，直至下一次转种。不能用在室温或室温以上温度存放 10 d 以上的培养物转种菌种，但若每 10 d 转种一次的话，这样的存放于室温以上温度的菌种也是可以用的。

## 四、分生孢子悬液的制备

将试验真菌培养物接种于琼脂斜面的中央，于 25 ~ 30℃ 培养 10 ~ 15 d。使用无菌刮刀从 5 个平板上刮取菌丝丛，放入经热力灭菌的组织研磨器内，加入 25 ml 无菌生理盐水，或放入带有玻璃珠的三角烧瓶内，加入 25 ml 无菌生理盐水。研磨或充分振荡后，用脱脂棉过滤，以除去菌丝，用血球计数器计算悬液内孢子的浓度，最好使其浓度为  $(125 \sim 155) \times 10^6$  cfu/ml。贮存于 2 ~ 10℃。这样制备的悬液可用 4 周，使用时以无菌生理盐水调节孢子浓度为  $5 \times 10^6$  cfu/ml。

## 五、试验程序

配制使用浓度的杀真菌剂稀释液，稀释度范围应包括该消毒剂在 5 ~ 15 min 内能杀灭真菌的临界浓度；分别取不同浓度的稀释液以及酚对照溶液 5 ml 置于 25 mm × 150 mm 试管中，并将试管按浓度逐渐升高的顺序排列于试管架上，并放于 20℃ 水浴内；待温度达到 20℃ 后，吸取真菌悬液 0.5 ml，放入消毒剂稀释液第一管内，30 s 后加 0.5 ml 菌液于第二管内，每个稀释度以 30 s 的时间间隔加菌，直至最后一管；作用 5、10、15 min 之后，用直径 4 mm 接种环从每管取一环混合物放入 10 ml 葡萄糖肉汤内。为了排除在恢复培养物中消毒剂对真菌的抑制作用，在培养前再用 4 mm 直径接种环从上述葡萄糖肉汤管内各取一环，接种于另一管葡萄糖肉汤内，或在回收培养的葡萄糖肉汤内加入相应的中和剂。接种后的肉汤在 25 ~ 30℃ 培养，10 d 后观察结果。

注意：在 10 min 内杀灭真菌孢子的最高稀释度，一般可认为是用于消毒被真菌污染的生命表面的最高期望稀释度。

# 第三节 欧洲标准杀真菌试验

这里主要介绍 1997、1998 年出版的欧洲杀真菌试验标准方法。试验以悬液定量方法为基础。适用于医疗、食品、工业、家庭以及科研机构领域所用化学消毒剂和防腐剂杀真菌效果的评价。

## 一、第一期试验(欧洲标准 EN 1257:1997)

### (一)试验菌株

本试验采用白色念珠菌 (*Candida albicans*) ATCC10231 株繁殖体以及黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ATCC16404 株孢子。根据特殊的用途,也可加选下列菌种: *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763 或 DSM1333 或 *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* DSM70487。

### (二)培养基及稀释液

#### 1. 菌种保存于下列成分的麦芽浸膏琼脂 (MEA)斜面

麦芽浸膏            30.0 g  
大豆蛋白胨        3.0 g  
无菌蒸馏水至 1 000.0 ml

经压力蒸汽灭菌之后,应调节 pH 值在  $5.6 \pm 0.2$  ( $20^{\circ}\text{C}$ )。

#### 2. 稀释液——胰蛋白胨氯化钠溶液

胰蛋白胨            1.0 g  
氯化钠              8.5 g  
无菌蒸馏水至 1 000.0 ml

经压力蒸汽灭菌之后,应调节 pH 值在  $7.0 \pm 0.2$  ( $20^{\circ}\text{C}$ )。

### (三)试验菌株的培养

1. 白色念珠菌 将白色念珠菌培养物划线接种至 MEA 斜面,  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 42 ~ 48 h。

2. 黑曲霉 将黑曲霉培养物接种至盛有 MEA 的罗氏瓶内,  $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$  培养 7 ~ 9 d。

### (四)实验菌悬液的制备

#### 1. 制备白色念珠菌悬液

(1) 吸取 10 ml 稀释液置于装有 10 g 玻璃珠的 100 ml 三角烧瓶内,取白色念珠菌斜面新鲜培养物(42 ~ 48 h)数环加入稀释液。

注意:取菌环应浸入稀释液,并于烧瓶壁处研磨以使菌分离。之后以振荡器振摇 3 min,吸取悬液转移入另一无菌试管中。

(2) 将制成的菌悬液,通过血细胞计数板快速计数,按其结果以稀释液调节悬液菌数至  $(1.5 \sim 5) \times 10^7$  cfu/ml 之间。

(3) 菌悬液保存在  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴内备用。2 h 内使用。

#### 2 制备孢子悬液

(1) 刮取黑曲霉活化培养物表面分生孢子混悬于 0.05% (v/v) 吐温 80 水溶液中,将悬液移入装有玻璃珠的锥形瓶中,轻轻振摇 1 min 后,通过磁熔滤器滤过。

(2) 于悬液制备之后以及实验之前即行 400 倍镜检,视是否存在菌丝或孢子是否出芽。

若孢子已出芽,弃之不用;

若见菌丝须行下列离心洗涤程序:将滤液移入离心管,2 000 g 离心 20 min,分生孢子至少应离心两次,镜检,若悬液中菌丝依然存在,须再离心。

(3) 以稀释液调节悬液孢子数量至  $(1.5 \sim 5) \times 10^7$  cfu/ml 之间。

(4) 该悬液在  $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$  储存不能超过 2 d,用前须混悬。

### (五)杀真菌效果定量悬液评价实验程序

1.实验前,水浴使所有试剂(包括消毒液、蒸馏水、真菌试验悬液、中和剂等)温度平衡在  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 。

2.吸取 8.0 ml 消毒液至大试管,加入 1.0 ml 蒸馏水,1.0 ml 真菌试验悬液(包含  $(1.5 \sim 5) \times 10^7$  cfu/ml),立即开启秒表,混匀,置于  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴。接触时间包括:  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ ,  $15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ ,  $30 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  或  $60 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ 。

3.待菌药相互作用至预定时间,分别吸取 1.0 ml 菌药混合液加于含 8.0 ml 中和剂以及 1.0 ml 蒸馏水的试管内,混匀,置于  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴。经  $5 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$  中和作用之后,立即吸取 1.0 ml 样液加入平板,即刻倾倒入 12~15 ml 已融化并已冷却至  $45 \pm 1^\circ\text{C}$  的相应培养基,摇匀。

4.于  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  培养:白色念珠菌 24 h,黑曲霉 42~48 h。计数。

5.结果:

$$\text{杀灭指数} = N \times 10^{-1} / N_a$$

其中:真菌试验悬液菌量记为  $N(\text{cfu/ml})$

经消毒剂作用之后存活菌量记为  $N_a(\text{cfu/ml})$

所测消毒剂杀灭指数在  $20^\circ\text{C}$ , 60 min 或更短的时间内应至少为  $10^4$ ,才获通过该试验。

注意:通过了本试验的消毒剂被认为拥有杀真菌作用。但要评价其特定的杀真菌作用还应使用其他相应的标准试验。

### 二、第二期试验(欧洲标准 EN 1605:1998)

试验程序与第一期试验基本相同,不同点在于:

1.以 1.0 ml 的 0.3% 和 3.0% 的小牛白蛋白取代 1.0 ml 的无菌蒸馏水,分别模拟清洁环境和脏的环境。

2.以标准硬水代替无菌蒸馏水作为消毒剂的稀释液。

3.在上述环境中所测消毒剂应获得至少  $10^4$  的生存力降低值( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $15 \text{ min} \pm 10 \text{ s}$ )才被认为通过本试验。

本试验可提供足够的该消毒剂在特定用途下的杀真菌参数,可不必进行相应的表面消毒试验。

(徐军)

### 参考文献

- 1 Dutch Committee for Phytopharmacy(Comisie voor Fytofarmacie.). Waardebepaling van disinfectie – middelen voor materiaal – ontsmitting in ziekenhuizen. Wageningen, 1974
- 2 Van Klingeren G, Lensink AB, Wyngaarden LG. A collaborative study on the repeatability and the reproducibility of the Dutch Standard Suspension Test for the evaluation of disinfectants. Zentralbl Bacterial Mikrobiol Hyg(B), 1977; 164: 521 ~ 548
- 3 AFNOR(Association Francaise de Normalisation). Reeneil de Normes francaise des antiseptiques et desinfectants. In: Antisetiques et Desinfectants. 1<sup>st</sup> Ed. Paris Bilingual. AFNOR, 1981
- 4 Terlecky JB, Axler DA. Quantitative neutralization assay of fungicidal activity of disinfectants. Antimicrob Agents Che-

mother, 1987; 31(5): 794 – 798

- 5 Anon. Chemical disinfectants and antiseptics – Basic fungicidal activity – Test method and requirements (phase 1). EN1275; London: British Standards Institution, 1997
- 6 Anon. Chemical disinfectants and antiseptics – Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic and institutional, domestic and institutional, areas – Test method and requirements (phase 2, step1). EN1650; London: British Standards Institution, 1998
- 7 Reybrouck G, Evaluation of the antibacterial and antifungal activity of disinfectants. In: Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. 2th ed. London: Blackwell Scientific Publication, 1992; 114 – 133
- 8 Official Methods of Analysis. 14th ed. AOAC, Arlington, VA, Chapt. 4, Disinfectants, 1984
- 9 Official Methods of Analysis. 15th ed. AOAC, Arlington, VA, Chapt. 6, Disinfectants, 1995
- 10 Betty Croshaw. Disinfectant testing – with particular reference to the rideal – Walker and Kelsey – Sykes Tests. In: Collins Allwood, Bloomfield fox. Disinfectants; Their use and evaluation of effectiveness. London: Academic Press Inc. LTD, 1981; 1 – 14
- 11 薛广波. 杀真菌试验. 见: 薛广波, 主编. 灭菌消毒防腐保藏. 北京: 人民卫生出版社, 1993: 57 – 59
- 12 Reybrouck G. International standardization of disinfectant testing; is it possible? J Hospital Infect, 1991; 18(Supplement A): 280 – 288

## 第二十二章 病毒灭活试验

病毒是危害人类健康的重要微生物之一。由于病毒的特效治疗进展极为缓慢,其重要性有时甚至超过细菌。造成人类感染的主要病毒有上百种。近年来,随着实验室病毒分离、培养技术的进步,绝大部分病毒均可在实验室获得分离和培养,这为病毒的灭活研究提供了技术条件。

本章所介绍的病毒灭活,是指活体之外或无生命物体之上的病毒灭活。病毒治疗制剂不是本文的范畴。

虽说病毒是专一性的细胞内寄生物,但仍然在很多环境中被发现,如尘埃、水和无生命物体表面,虽不能繁殖但仍可存活。在病毒高度污染的环境中,如医院病房、动物厩舍、病毒实验室、乳品工厂等,污染病毒的数量可达到一定的数量水平。因此,消除污染,也应使病毒的灭活达到适宜的数量级。

病毒灭活试验涉及的因素很多。试验方法的选择,应尽可能模拟实际使用条件。按照物质存在的状态,可将文献报道的各种病毒灭活试验方法分为三种:悬液试验法、载体试验法、气溶胶试验法。

### 第一节 病毒灭活试验中涉及的因素

病毒灭活试验,应能反映实际使用条件下的效果,并有一定的精度和可重复性。因此试验中必须考虑多种因素,并加以严格控制。如指示病毒株的选择、初始病毒数量与灭活水平、有机干扰物质的种类与浓度、干燥处理对病毒存活的影响、试验温度、病毒感染性的测试方法(试验的程序)、消毒剂的浓度与作用时间、消毒剂对病毒宿主系统的毒性的去除方法等。下面重点介绍其中的几个关键因素。

#### 一、指示病毒株的选择

美国一项调查发现,1975~1976年,全美国共有21个实验室开展了病毒灭活试验(其中,独立实验室9个、工业实验室7个、大学实验室3个、政府实验室2个),所使用的病毒株共39种,分属于8个病毒科(虫媒病毒、腺病毒、疱疹病毒、粘液病毒、乳多孔病毒、小RNA病毒、痘病毒、鼻病毒)。因此,没有一家实验室能够具有各方面的技术与经验开展如此广泛的病毒灭活试验。同时,测试所有消毒剂对全部已知病毒的灭活作用,也是很难进行的。故选择参考病毒或指示病毒就是一种合理的途径。

那么,什么样的病毒才能作为指示病毒呢?

Klein与DeForest通过研究后发现,大多数病毒对消毒剂的抗力,与其病毒颗粒的大小及外壳的化学组成有很大的关系。据此,他们将病毒划分为三大类:第一类为亲水病毒,由内部核酸和外部蛋白壳组成,小RNA病毒科属于此类,如脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、ECHO病毒等,并发现对消毒剂有一定的抗力,且大于细菌繁殖体。第二类由亲脂病毒组成,外膜含有脂

类或脂蛋白;例如疱疹病毒、痘病毒、流感病毒等。对消毒剂易感,其抗力水平相当于细菌繁殖体。原因可能与其外膜脂质的存在、与消毒剂的反应性以及消毒剂进入胞内有关。第三类又称中间类,如腺病毒,中等大小,无包膜、无脂类,应该与肠道病毒抗力相似,但实验发现其抗力与脂包膜病毒相似。可能的解释是,这类病毒外壳结构松散,可吸附脂类,但没有通常所说的亲脂病毒的结构与性质。

Vasington 报告,只同意上述病毒分类法中的亲水病毒部分,而亲脂病毒至少可以再分为 3~4 亚类。亲水病毒的可能代表株为 ECHO II,可以获得较高的滴度。亲脂病毒亚类的可能代表之一,为新城疫病毒,既有高滴度,又可容易在鸡胚中生长。中等大小的腺病毒组的可能代表是鸡胚致死孤儿病毒(CELO),与腺病毒有很多相似性,并可在鸡胚中生长。

选择指示病毒株时,还应考虑下列基本原则:①在环境中,对人和动物的危害相对较小。②所选病毒株应能代表所属科的所有其他病毒。③选择的病毒株应稳定、易于操作、可获得高滴度。④选择的病毒株,可在易于操作的培养介质上生长。⑤虽然病毒的化学组成极为复杂,但所选病毒株应具有已知特性。

此外,还需要了解指示病毒与致病病毒抗力的关系,根据病毒对消毒剂的易感性,来确定测试病毒。全面的考虑还应包括噬菌体。如在低危险性病毒无法获得时,则只能使用致病株,此时需要适当的设备和必要的防护。

## 二、病毒灭活水平的确定

在多数情况下,病毒灭活率与细菌的死亡相似,灭活曲线呈常规指数型,也就是说在规定时间内病毒存活数与初始浓度有直接关系。灭活规律的偏差常出现在消毒的末尾,在消毒过程快结束时,灭活率通常降低。其原因可能是残留的活病毒,存在不同程度的凝集,处于凝集颗粒之中的病毒受到保护。

为精确地测出消毒剂灭活病毒的程度,可以使用斑点法(一个斑点能够揭示单一病毒的作用)和终点稀释法(可以观察各滴度的致病效应,而不是单一病毒颗粒)。前者为定量观察,后者为定性观察。相对来说,斑点法具有更好的精度或更低的标准差。

消毒体系中,病毒的初始滴度,一般选择病毒污染环境中的最高滴度。根据对象不同,会有一定的差异。但最低不应小于  $10^4$ 。也就是病毒的灭活水平,应达到 4 个对数滴度以上。

然而,必须指出,病毒悬液的彻底灭活往往是不能测定的。因为最后具有感染性的活病毒的消灭无法准确测定,而且在不同宿主体内引起感染的病毒颗粒数量是不同的,而前期暴露常常影响宿主的敏感性。所以,“完全灭活”一词常用于说明不再有感染性。

病毒灭活试验的目的,在于精确测定感染率的下降水平,以及合理数量的样品不再引起感染的条件。

## 三、消毒剂对病毒培养系统的毒性

测定病毒灭活,经常遇到的一个主要问题,就是消毒剂的毒性问题。通常可用中和、稀释、离心、超滤等方法去除。对某些消毒剂还可采用特殊的方法,如透析、离子交换、分子筛过滤、电泳等。

例如测定甲醛产品时,由于细胞对甲醛非常敏感,有人就曾使用透析法,可以有效去除混悬液中的甲醛,使其不再干扰细胞的生长。但是,如果病毒的暴露时间为 1 min 或 10 min,而混

悬液的透析要过夜,就会出现消毒时间如何确定的问题,因为在透析过程中仍然有暴露,虽说甲醛浓度很快下降。

使用 **Sephadex** 的方法,可以去除一些病毒与消毒剂混悬液的细胞毒性。其原理是 **Sephadex** 经溶解、成浆、膨胀、层叠成多孔的分子筛,低分子颗粒(水、消毒剂分子、盐)可机械地吸附进入分子筛中,大分子颗粒(蛋白质、病毒)则分离在外。实际使用时,可直接用商业化的产品,如 **Pharmacia Biotech** 公司的 **MicroSpin S400HR** 柱,或 **Sephadex LH20** 柱。

比较而言,细胞培养受消毒剂的毒性影响较多。相反,鸡胚可支持少数病毒的生长,而受残留消毒剂的影响较小。

#### 四、病毒培养宿主系统

作为一般规则,宿主系统对测试病毒具有很大的易感性,即可选用于病毒灭活试验。常用的有组织培养、鸡胚、小鼠等动物模型。当今的组织培养系统,几乎对所有测试病毒易感。故最为常用,但也极易出现细胞毒性。对复制较慢的病毒,结果差异很大。鸡胚对病毒的易感谱有限,可用于正粘和副粘病毒的选择宿主系统。与细胞培养相比,较少出现毒性作用。小鼠可用于病毒灭活试验,特别是不能用细胞培养或鸡胚时,如乳鼠检测伪狂犬病毒、成鼠检测脑心肌炎病毒等。

有时可能出现一种病毒可以选择多种宿主系统。此时应从病毒的增殖滴度、操作的简捷性、宿主的易感性等综合考虑。如测试流感病毒灭活时,不能用猴肾组织培养,原因是干燥处理导致较低的滴度,以及消毒剂的较高毒性作用,毒性水平甚至高于病毒滴度。采用鸡胚系统可以克服上述问题。

#### 五、干燥处理对病毒存活的影响

不同类型的病毒在细胞外的存活能力是不一样的。有些致病力可以维持数周,另外一些则对普通干燥很快失去感染力。而病毒灭活试验中,病毒培养物干燥于无生命物体表面是常用的方法。有人发现单纯疱疹 2 型、流感 A2 病毒的滴度,在培养皿表面,经 37℃ 干燥 60 min,显著降低,分别由  $10^{6.89}$ 、 $10^{7.30}$  下降为  $10^{4.47}$ 、 $10^{5.40}$ 。还有人报道,柯萨奇 B3 病毒,在 37℃, pH7 时干燥 24 h,感染性下降率可达 99.95%。

#### 六、有机物的影响

消毒实践中常常遇到有机物,大量的有机物会干扰消毒剂对病毒的杀灭作用。病毒灭活的剂量常受到有机物的种类和数量的影响。病毒在有机物保护下还可能形成凝集块,使灭活更加困难。

有人观察了有机物含量对流感 A2 病毒灭活的影响,5% 热灭活牛血清、鸡血清、过滤的 BSA 和 2.5% 粘蛋白,分别加入病毒悬液中,再将病毒干燥于平皿内表面,然后进行消毒处理。结果发现,加有 5% BSA 的病毒存活数最高,其次为 2.5% 粘蛋白。而牛血清和鸡血清几乎无明显保护作用。也有人发现,0.25% BSA 溶于 1 mmol/L Tris 盐,在干燥过程中,也有显著保护柯萨奇 B3 病毒作用。

在自然社会环境条件下,病毒受有机物的保护情况差别很大。如游泳池水中的肠道病毒,会被大量的水稀释而易于灭活,但粪便中的病毒,由于有太多的有机物,常导致消毒失败。

## 第二节 病毒悬液灭活试验法

是指在一定温度下,于无菌试管内,病毒悬液与有机物混合,模拟实际使用条件,然后加入待测消毒液,作用规定时间,最终测定灭活效果的实验方法。该方法对不能耐受干燥的病毒特别适用。

根据具体操作方法的差异、检测系统的不同、去除消毒剂毒性的方式等,又可分为下列几种方法。

### 一、细胞培养终点稀释法

是目前使用最多的一种病毒测试方法。要求将对照与消毒后的病毒悬液进行 10 倍系列稀释,其最高稀释度应无病毒检出为原则,然后取各稀释度接种细胞管,细胞瓶,或 96 孔细胞板。每稀释度应接种 4~6 个管(瓶或孔)。继续培养观察病毒生长情况(细胞病变、抗原检测等),最后按本章第四节介绍的方法,计算各组 TCID<sub>50</sub> 滴度。

早在 1963 年, Klein 等报告的病毒灭活试验,就曾使用该方法。试验的病毒有: HSV、腺病毒 2、痘病毒、脊髓灰质炎病毒 I、柯萨奇 B1、ECHO-6。HSV 在新鲜胰酶消化的兔肾细胞上培养。其他病毒在 HeLa 细胞上培养。维持液为 2% 鸡血清、20% 胰酶大豆肉汤、78% Eagle 液组成。收获的病毒悬液经 3 000 r/min 离心 30 min,取上清。病毒滴度为 10<sup>6</sup>~10<sup>8</sup>/ml。灭活试验时,用 0.9 ml 待测消毒液与 0.1 ml 病毒悬液混合。室温作用 1,3,5,10 min 后,经系列稀释测定残留病毒滴度。测定时发现,最初的稀释度对细胞有毒性作用,所以很难确定是否完全灭活。

Armstrong 等同样采用该方法,观察了麻疹、脊髓灰质炎病毒 II 型、单纯疱疹、森林脑炎、牛痘、犬肝炎病毒的灭活效果。使用了人的羊膜细胞(ATR 和 CATR 系)、犬肾细胞(719 系、原代)。消毒剂为苯扎氯铵。室温或 30℃ 水浴下进行。取一个病毒浓度,与规定浓度药物混合,作用至规定时间后,进行 10 倍系列稀释,每稀释度均测定残留的病毒数,与对照比较,计算灭活率。

我国消毒技术规范中,HIV 的灭活试验采用的也是该方法。

### 二、细胞培养空斑计数法

同样是一种常用的病毒灭活方法。主要适用于可引起细胞病变的病毒。主要原理是在组织培养中,加入适宜的琼脂培养基,使引起的病变不易扩散,形成空斑,经染色后肉眼可见,并可计数。

如脊髓灰质炎病毒灭活试验,可用 BGM 细胞、VERO 细胞培养病毒悬液,取病毒悬液与有机物混合后,加入适当浓度的消毒液,于特定温度下作用至规定时间,取适量混合液加入到含中和剂的稀释液中,使充分中和(可根据需要再适当比例稀释),然后取 1ml 接种到已经长满单层细胞的空斑瓶中,37℃ 吸附 1~2 h,弃去液体,加入含 0.8% 琼脂的细胞维持液 3 ml,冷却后放入 37℃ 培养 2~3 d,然后用甲醛固定、结晶紫染色后,计数空斑数。

$\text{pfu/ml} = \text{平均空斑数} \times \text{稀释倍数}$

此外,同样使用该方法,有人将消毒剂浸泡滤纸片后,粘贴于含有细胞与病毒的琼脂表面,



观察空斑抑制率情况（染色时去除滤纸片）

对部分病毒与培养细胞，还可采用四唑染色或中性红染色观察空斑，同样取得满意结果。

### 三、鸡胚培养法

该方法要求病毒能够在鸡胚中生长繁殖，使鸡胚死亡、萎缩，或在绒毛尿囊膜上引起痘斑，或在尿囊液中产生凝聚素（可使鸡红细胞凝集）。

病毒灭活试验的要求与过程与前两种方法一样。只是病毒滴度的测定使用 6~9 日龄的鸡胚，每稀释度接种 5~6 只鸡胚，每只 0.2 ml，继续孵育 7 d，观察结果。计算  $ID_{50}$  滴度。

### 四、小鼠模型病毒灭活法

该方法适用于可引起小鼠死亡的病毒。优点是无组织培养的毒性问题。

如 1965 年，**Fellows** 报告，用乳鼠模型，测试表面活性剂对口蹄疫病毒的灭活效果。用原代牛肾细胞培养的口蹄疫病毒，对数滴度为 7.3  $ID_{50}$ /ml。阴阳离子表面活性剂浓度为 0.5%、1.0%、2.0%、5.0%，用 1 mol/L 盐酸与 1 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值。病毒与药物混合液（20 ml）经 28℃ 磁力混合 2 h。测定存活病毒效价，乳鼠腹膜下注射，每稀释度注射 10 只乳鼠，观察 7 d。最后计算各组  $LD_{50}$ 。每种药物效价测 2 次，取平均值。同时设 pH 对照（pH5, 6.5, 9）。

### 五、噬菌体灭活法

消毒剂对噬菌体的灭活方法，早在 1959 年就有人报告。在其报告中，作者在含有链球菌的脱脂奶中，加入噬菌体进行培养，培养物经过滤除菌，即为试验用噬菌体（ $10^7$  pfu/ml）。消毒液用水稀释为双倍浓度后，加入等量的噬菌体混合，25℃ 保持 30~60 s（餐具消毒时间）后，取 1 ml 或再稀释后取 1 ml，移至内含 0.25 ml 宿主菌（经 5 h 培养）肉汤中，1 min 后，加入 3 ml 冷至 45℃ 的软琼脂（0.85%），混匀，平铺于含 20 ml 硬琼脂的平板上。30℃ 培养 12 h，可形成噬斑并可计数。初始噬菌体滴度经消毒后不再检出，即为有效灭活。

在我国饮水消毒中，也使用大肠杆菌 F2 噬菌体，作为肠道病毒的指示微生物。其主要操作过程首先是用肉汤增殖寄生菌 *E. coli* 285 与 F2 噬菌体（37℃, 24 h），经过滤可得噬菌体悬液，4℃ 可保存 1 年，消毒时取 1 L 水样，加入适当滴度的噬菌体，加入待测消毒剂，作用规定时间，取样 10 ml，经中和后，进行存活滴度测定。测定时，取 1 ml 待测水样，加到已凝固的底层营养琼脂上，再加入 0.1 ml 幼龄寄生菌（8 h 肉汤培养），然后倒入事先融化好的 45℃ 软琼脂（0.8%）5 ml，混匀，冷却后 37℃ 培养 24 h，计数噬斑数，计算灭活率。

### 六、荧光抗体技术

由于部分病毒在细胞培养时无细胞病变，只能采用间接方法测定细胞培养中出现的活病毒。如猪霍乱病毒、甲型肝炎病毒等。可以采用荧光抗体技术。用异硫氰酸荧光素标记病毒的特异免疫球蛋白。试验程序如下：取 1 ml 病毒悬液与 9 ml 消毒液，在 20℃ 水浴下混匀，并作用一定时间（1, 5, 10 min）后，各取出 0.5 ml，加入 4.5 ml 细胞培养液中稀释，再各取 1 ml 接种 4 支猪肾细胞管，37℃ 吸附 1 h，换液，继续培养 15~19 h。去除培养液，用 pH7.2 的 0.01 mol/L PBS 冲洗细胞，丙酮室温固定 5 min，干燥，荧光抗体染色 37℃、20 min，PBS 冲洗 3 min，蒸馏水

冲洗后,干燥,用等体积甘油和双倍 PBS,装片。荧光显微镜下(100~250倍)观察结果。

## 七、抗原捕捉 ELISA 技术

HIV-1 是 AIDS 的病原体。可在从正常人体中分离的淋巴母细胞内增殖,但不引起细胞病变,不能肉眼或显微镜观察结果,但培养上清中有病毒抗原和反录酶存在,可以使用抗原捕捉 ELISA 技术测定抗原,同时测定反录酶的活性。该方法最早由 McDougal 报道(1985年):①用抗 HIV IgG(25  $\mu$ g/ml)包被 96 孔酶联板,室温 4 h,用 PBS 洗涤 4 次;②加入  $-20^{\circ}\text{C}$  保存的细胞培养上清液 0.1 ml,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜;③PBS 洗板 4 次,加入 0.1 ml 酶标 HIV 抗体,  $4^{\circ}\text{C}$ , 4 h;④PBS 洗板 4 次,加入 0.2 ml ODP-过氧化氢,显色 30~45 min,再加入 0.05 ml 硫酸终止显色;⑤酶标仪下测定 OD 值。通过该技术,作者发现  $10^{5.24}$  ID<sub>50</sub> 的 HIV-1,经 0.1% 漂白粉作用 20 s,可以灭活 4 个对数滴度。

此外,还有各种病毒检测技术,如放射免疫测定技术、免疫电泳技术、同位素标记技术、核酸探针技术、PCR 技术等,均可用于病毒灭活试验中检测病毒存在与否。

## 第三节 病毒载体灭活试验法

该方法模拟消毒剂实际应用的条件,将病毒干燥于无生命物体表面,再用消毒液浸泡或喷洒,作用至规定时间,然后终止消毒剂的继续作用,测定残留的病毒滴度或存活情况,以确定消毒剂是否可用于实际病毒灭活。

### 一、应用稀释法

1964 年, Lorenz 等介绍了使用稀释法。主要是修改 AOAC 细菌消毒应用稀释法。不同之处是采用新城疫病毒鸡胚尿囊液,作为标准病毒悬液,消毒后转移至 1 ml 肉汤中,然后取 0.1 ml 肉汤接种 6 日龄鸡胚尿囊腔,如经 5 d 孵育,鸡胚无感染死亡发生,可判为合格。

特殊试剂和设备:带螺旋盖的试管(150 mm×20 mm)用于放病毒悬液,100 mm×15 mm 试管用于放肉汤,1 ml 注射器,6 号针头,蛋壳切割器,蛋架,火棉胶,生理盐水,碘酊,无菌鸡胚( $37^{\circ}\text{C}$  孵育,每日转动 1 次)及孵箱。

病毒悬液的制备:取贮存的新城疫病毒尿囊液 1:1 000 稀释后,接种 50 个鸡胚尿囊腔,每个 0.1 ml,孵育 1 d 后,烛光检查,去掉死胚,活胚放冰箱中数小时,然后收集尿囊液,混合于 1 个无菌瓶中,分装带盖试管,  $-20^{\circ}\text{C}$  存放备用。使用时取出融化,离心去掉沉淀物后使用。

试验步骤:将 20 个载体环放入 20 ml 病毒悬液中( $20^{\circ}\text{C}$ ),15 min 后,移至无菌平皿内,  $37^{\circ}\text{C}$  干燥 20~60 min,取 1 个环于 10 ml 消毒液中( $20^{\circ}\text{C}$ ),1 min 后,取另 1 个环加入另 1 支 10 ml 消毒液中,依次操作,共 10 个环。消毒时间为 10 min。然后将环取出,加入 1 ml 肉汤管中( $20^{\circ}\text{C}$ )混匀。取 0.1 ml 注入 6~12 日龄鸡胚中,每管 6 只鸡胚。不同的肉汤管使用不同的注射器。经过初步练习,可在 15 min 内完成 60 个鸡胚的注射。注射后次日,烛光检查,弃去死胚。如果每组 6 个鸡胚中出现 2 个以上死胚,试验无效。共检查 5 d,在第 2~5 天出现死胚,可认为该浓度消毒液不能杀死病毒。如鸡胚均存活,即认为消毒合格。

该方法只适用于引起鸡胚死亡的病毒。但是,引起绒毛尿囊膜空斑的病毒,或引起鸡胚萎缩的病毒,也可使用。

1974年, Gaustad 等同样参考 AOAC 使用稀释试验法, 观察了消毒剂对不锈钢载体表面病毒的灭活效果。试验用病毒株有: HSV、Polio-1、Adeno-3 和 Vaccinia。使用 Hep2 细胞培养。病毒经细胞培养增殖后, 4 次反复冻融, 离心去细胞碎片, 超滤浓缩,  $-90^{\circ}\text{C}$  冻存。病毒滴度测定, 采用 10 倍系列稀释法, 接种 Hep2 细胞, 观察细胞病变, 以  $\text{TCID}_{50}$  表示。试验用病毒滴度分别为: HSV  $10^{7.9}$ 、Polio-1  $10^{8.8}$ 、Adeno-3  $10^{5.9}$  和 Vaccinia  $10^{6.2}$ 。将不锈钢柱状载体放入病毒悬液中, 暴露 15 min 后, 移至含滤纸的无菌平皿内,  $37^{\circ}\text{C}$  干燥 20~50 min。消毒时, 将 1 个染毒载体放入 10 ml 使用浓度的消毒液中, 作用 10 min, 再转至含 1.8 ml 肉汤的试管内, 振摇 5 min, 再 10 倍系列稀释 (0.2+1.8 ml), 各稀释度接种 5 支 Hep2 细胞管, 每管 0.2 ml 吸附一定时间后, 换细胞维持培养液, 培养 3~5 d, 观察病变, 计算滴度。同时设病毒对照与消毒液毒性对照。本试验发现, 载体经  $37^{\circ}\text{C}$  干燥 20 min 以上, 各病毒的回收滴度约下降 1.5 个对数值。

Wright 按照上述方法进行病毒灭活试验时, 使用了 VSV 和素瓷载体, 但发现载体干燥 20 min 后, 载体上存活的病毒数在 3 次试验中仅分别为 0.6、1.5、1.74 个对数滴度。而未干燥的对照载体病毒滴度为 6.5 个对数值。故认为使用该载体不合适。

1979 年 Chen 和 Phebus 也发现, 使用细菌用的不锈钢载体, 不能保持足够的 HSV 滴度。同时发现, 载体上脊髓灰质炎病毒在浸泡过程中, 部分病毒会掉下来, 最高可达 99%。所以在下结论时, 应注意并非完全是消毒液的杀灭作用。

## 二、玻璃表面喷洒法

1971 年, Klein 模仿 AOAC 玻璃表面喷洒试验, 进行了病毒灭活效果观察。实验中使用了 A 型流感病毒和鸡胚培养技术。具体方法如下。在 10 日龄鸡胚尿囊腔中接种 A 型流感病毒,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 40 h 后收获, 滴度为  $10^8/0.1\text{ ml}$  鸡胚感染剂量。配制 0.5% 鸡红细胞悬液, 用于检测感染的尿囊液中的血凝素。取 0.1 ml 病毒悬液, 涂于直径 10 cm 平皿表面, 干燥后 (玻璃表面回收病毒滴度与试管内相似), 用消毒液喷洒喷头距离平皿表面 8 英寸) 3 s, 然后放置 10 min, 再用棉拭子沾肉汤, 反复擦拭染毒表面, 采样后放入 0.9 ml 肉汤中洗 3 次, 该肉汤即为病毒的  $1:10$  稀释液, 再经 10 倍稀释, 然后取 0.1 ml 接种尿囊腔, 每稀释度接种 6 只鸡胚。

1975 年, Chen 使用一种薄玻片 (24 mm × 60 mm) 作为载体, 先染以 0.3 ml 未稀释的 HSV,  $37^{\circ}\text{C}$  干燥 1.5 h, 喷洒试验后, 彻底压碎玻片 (玻璃压碎用试管 30 mm × 120 mm, 内含 0.7 ml PBS), 用吸头反复吹吸, 使病毒混匀, 再用 PBS 作 10 倍稀释后, 定量接种 Hep2 细胞, 每稀释度接种 5 瓶细胞, 培养后观察细胞病变, 计算滴度。HSV 原液滴度为  $10^{6.9}/\text{ml}$ ,  $37^{\circ}\text{C}$  干燥 1.5 h 后, 玻片回收滴度为  $10^{5.57}/\text{ml}$ 。

1977 年, Pancic 等介绍了一种便捷的玻璃载体病毒灭活方法。试验采用鼻病毒与 HeLa 细胞。取 0.1 ml 鼻病毒悬液涂于直径 10 cm 平皿内表面, 用机械过滤的无菌空气吹干 1 min, 室温放置 10 min 后, 加入 0.9 ml 适当浓度的消毒液, 涂匀平皿表面, 室温下作用 10 min (几乎呈干燥状态), 再加入 0.9 ml 细胞培养液, 反复吹吸 10 次, 洗下混合液, 10 倍稀释后, 超速离心  $159\,000 \times g, 2\text{ h}$ 。病毒沉淀用培养液重悬后, 系列稀释、接种细胞,  $33^{\circ}\text{C}$  培养 48~72 h, 镜检细胞病变效应。同时设病毒对照与消毒液毒性对照。在没有细胞毒性、不引起细胞病变时, 提示病毒被灭活。

## 三、病毒漂浮法

1980 年, Van der Groen 等在测试虫媒病毒的灭活效果时, 使用了病毒漂浮试验技术。试验

用病毒有: VSV、基孔肯雅病毒、西尼罗河病毒、Bangyi 病毒、布尼亚样病毒。均采用 VERO 细胞培养。试验程序如下:

1. 将 2% 的琼脂糖切成  $1\text{ cm}^2$  大小的块, 置于载玻片上。
2. 加上已知量的病毒悬液于琼脂糖块表面, 使扩散和蒸发, 直至干燥, 一般约需 10 min。
3. 加 2 滴二氯乙烷溶解的 0.5% (w/v) 的 Formvar (聚乙烯醇缩甲醛), 放置几秒钟, 多余的 Formvar 可垂直载玻片于纸片上去除。
4. 将上述制作的病毒块, 轻轻放入消毒液中, 立即计时。
5. 经规定作用时间后, 用吸管将病毒膜从消毒液中取出, 轻触试管边缘, 排除多余的消毒液。
6. 转至 1 ml 组织培养液中, 用毛细管捣碎, 使释放出残留的病毒。
7. 用上述悬液接种细胞管。培养后观察病变情况。计算存活滴度。对照使用培养液代替消毒剂。

结果发现, 漂浮的膜上病毒回收滴度分别为: VSV  $10^{5.7}$ 、基孔肯雅病毒  $10^{5.7}$ 、西尼罗河病毒  $10^{4.7}$ 、Bangyi 病毒  $10^{5.2}$ 、布尼亚样病毒  $10^{6.0}$ 。由于消毒剂的细胞毒性得到控制, 所以测试的病毒滴度不必太高。但该方法对部分影响 Formvar 膜性质的消毒剂不适用, 如乙醇即不可使用。

#### 第四节 病毒气溶胶灭活试验法

1964 年, Sing 等首先介绍了空气中噬菌体气溶胶灭活试验方法。其使用的一些特殊的设备和器材如下。

一个密闭的专用房间, 内贴水泥板, 容积 29.25 立方英尺, 有抽气系统、观察窗 (2.5 英尺  $\times$  5.0 英尺), 安装有橡胶袖套的密闭式操作口, 由全玻璃制成的微生物雾化器 (便于清洁灭菌, 可产生超细雾粒), 消毒液喷雾器 (一种简易气压型, 压缩气体水平方向流动, 通过一个垂直方向的下接消毒液的吸管时形成负压, 吸出消毒液并雾化喷出。通过更换吸管头可控制雾粒大小, 一般使用直径 0.75 mm 吸管头即可)。空气采样器使用 Andersen 采样器, 可直接定量采集噬菌体粒子。采样器由 6 节组成, 可内置 6 个平板。每个平板上部均有筛板, 筛板含有 400 个孔。由上向下, 筛板的孔径逐渐缩小。在流量相同时, 孔径越小, 流速越快, 气流中粒子的动能越大。据此原理, 可知该采样器的上部主要采集大粒子, 下部采集小粒子。本试验气体流速为每分钟 1 立方英尺。

采样器中放置的平板培养基, 由 5% 明胶和中和剂组成。中和剂根据消毒剂选择, 碘和氯制剂, 可用 0.144% 硫代硫酸钠。季胺盐, 可用 6.66 g asolectin, 46.8 ml 吐温 80, 80 ml PBS (4 ml/L), 5% 明胶, 定容为 1 L, 调 pH 为 7.2 即可。

宿主菌为乳酪链球菌 144F 株和二乙酸乳链球菌 16~18 株。液体培养基为 10% 无菌脱脂奶。噬菌体每日转种、扩增后, 过滤, 滴度测定采用半固体乳琼脂平铺法, 可达  $10^{10}$  pfu/ml。试验用滴度为  $5 \times 10^4$  pfu/ml, 用无菌牛乳清稀释。

试验时, 应根据噬菌体粒子沉降曲线, 确定采样的时机和间隔, 并在完整的灭活试验中保持一致。本试验中, 在噬菌体喷雾 4 min 后, 喷消毒液 45 s, 然后让其作用 5 min 后, 采样 (此时对照组仍有 92%~93% 的噬菌体漂浮在空气中), 时间为 5 min, 流速为每分钟 1 立方英尺。采集的平板可以融化, 再适当稀释后, 测定噬斑数, 培养条件为 37℃, 14 h。

## 第五节 官方批准的病毒灭活试验方法

### 一、英国农渔食品部批准的方法

1970年,英国农渔食品部推出一种病毒灭活试验方法,使用酵母作为有机物,测定消毒剂对新城疫病毒和鸡瘟病毒(fowl plaque virus)的效果。

试验由位于英格兰 Weybridge 的中央兽医实验室进行。试验程序与常规目的消毒剂测试相似,只是微生物改为新城疫病毒(Herts1933株),试验混合液放置于  $4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 30 min,消毒终点时,用 5%灭活马血清系列稀释,然后用鸡胚测定存活滴度。要求消毒剂在测试条件下能够灭活  $10^4$  以上的病毒。整个试验由毒性试验组和病毒灭活试验组构成。具体操作步骤如下。

#### (一)毒性试验组

目的是确定消毒剂在试验条件下,对鸡胚是否产生毒性作用。

- 1.用 WHO 标准硬水,配制消毒液,浓度为厂商推荐的最低稀释度。
- 2.取 2.5 ml 上述消毒液,加入等量的 5%酵母液中。
- 3.充分混匀后,放入  $4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 30 min,间隔摇动。
- 4.用 5%马血清(先  $56^{\circ}\text{C}$  灭活 30 min 后,用无菌蒸馏水配制),作 1:200 稀释。
- 5.取 0.2 ml 接种鸡胚尿囊腔,共接种 10 只鸡胚。对照用等量蒸馏水稀释的酵母悬液接种,共 10 只鸡胚。
- 6.每日检查鸡胚,共 7 d,如鸡胚仍然存活,即认为消毒剂对鸡胚无毒性作用。

#### (二)病毒灭活试验组

试验病毒为新城疫病毒 Herts1933 株,  $-55^{\circ}\text{C}$  保存,对数感染滴度为 0.1 ml 尿囊液  $6.6 \pm 0.4 \text{ EID}_{50}$ 。

- 1.将 1 ml 病毒尿囊液加至 24 ml 5%干重酵母悬液中,混匀。
- 2.用 WHO 标准硬水,配制消毒液,浓度为厂商推荐的最低稀释度。取 2.5 ml 上述病毒酵母混合液,加至 2.5 ml 消毒液中。
- 3.彻底混匀后,放入  $4 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ , 30 min,间隔摇动。
- 4.用 5%马血清作 1:200 稀释。5%马血清的配制同毒性试验组。
- 5.继续用 5%马血清作 10 倍系列稀释( $10^{-1} \sim 10^{-6}$ )。
- 6.每稀释度接种 7 只鸡胚尿囊腔,每只 0.2 ml。 $37.5^{\circ}\text{C}$  孵育。
- 7.每日检查鸡胚,共 7 d。
- 8.7 d 后,检查所有鸡胚,无论死活,测定病毒血凝素的有无,计算存活病毒滴度。

### 二、美国环境保护局(EPA)需要的病毒灭活资料

目前,美国还没有官方统一的病毒灭活方法或标准。但是, EPA 接受技术可靠;尽可能模拟实际条件;采用任何病毒技术发展而来的资料。

例如,某消毒剂说明书指出,可用于干燥环境表面病毒的灭活,如地面、桌面、医疗设备表面等,则其提供的下列资料是可以接受的,如应用稀释度试验(液体表面消毒)、载体表面喷洒试验等。

为了模拟实际使用条件,病毒应涂于硬的表面(如平皿、玻片、钢柱等),病毒的回收滴度应大于  $10^4$ ,待干燥后,按产品说明书指定的浓度进行消毒处理,室温下作用规定时间,然后使用适当的病毒检测技术,检查灭活效果。病毒灭活程序中,应含有下列基本内容。

- 1.病毒测定时,每个稀释度应同时接种 4 个(组织、细胞、鸡胚、动物)以上。
- 2.设立消毒剂毒性对照。
- 3.可采用任何提高病毒滴度,或减少消毒剂毒性的方法。
- 4.每次检测均应设立病毒对照,并计算出  $ID_{50}$  值。
- 5.试验结果的报告,应以病毒滴度的对数下降值来表示。
- 6.有效的试验结果,应证明各稀释度均无病毒检出。
- 7.如初始稀释度出现细胞毒性,应至少保证还有 3 个以上对数滴度无细胞毒性,而且其中的病毒能够完全灭活。
- 8.最好测试两批产品,两次独立的测试结果均达到要求,即判为合格。

### 三、欧洲共同体标准化委员会(CEN)推荐的病毒灭活方法

1997 年,CEN 提出了一套完整的病毒定量悬液灭活方法,供各成员国讨论,以便最终成为正式欧洲标准。其主要目的是评价化学消毒剂在实验室测试条件下是否具有灭活病毒作用。具体试验程序和要求如下。

- 1.病毒株的选择。医疗器械、物体表面和皮肤用化学消毒剂,使用脊髓灰质炎病毒疫苗株(Polio-1 LSc-2ab,作为无包膜 RNA 病毒代表)和腺病毒 5 型(Adeno-5, ATCC,作为无包膜 DNA 病毒代表)。二者均可使用 HeLa、FL 细胞系,或其他适宜的细胞系。使用加热使用的化学消毒剂(如低温蒸汽甲醛),应使用细小病毒(Parvovirus, ATCC)作为指示病毒。所有病毒均  $-70^{\circ}\text{C}$  或  $-196^{\circ}\text{C}$  保存。
  - 2.有机干扰物质的选择,清洁条件使用 0.3g/L 的 BSA,污染条件使用 3.0 g/L BSA + 3 ml/L 洗涤羊红细胞。
  - 3.取 1 ml 干扰物质,于 1 ml 病毒悬液中,混匀,置  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴。
  - 4.用无菌蒸馏水配制规定浓度的消毒液,取 8 ml 于加入上述含病毒的试管中,混匀后,  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$  水浴,适当摇动。
  - 5.作用至规定时间,一般皮肤消毒为 1、3、5 min,器械物体表面消毒为 5、15、30、60 min,立即取出 1 份,加入 9 份已经冰浴的稀释液中(有细胞毒性的消毒剂,可取出 1 份,加入 99 份稀释液,还可进一步采用去毒性操作),通过稀释和低温终止消毒剂的继续作用。
  - 6.在冰浴条件下,继续进行 10 倍系列稀释。
  - 7.对各稀释度,进行病毒感染性测定。定性测定,每稀释度接种 6 孔细胞;定量测定(如噬斑计数)每稀释度接种 3 瓶细胞。培养观察,计算存活病毒滴度。
  - 8.试验同时,设立病毒悬液对照、消毒剂细胞毒性对照。如有去毒性操作,应有该操作对病毒滴度影响的数据。
  - 9.根据消毒液产品说明,试验温度可以增加,以  $10^{\circ}\text{C}$  为幅度。如对加热使用的化学消毒剂,可设定温度为  $60^{\circ}\text{C}$ ,消毒作用时间为 10 min,然后按同样方法测定病毒灭活效果。
- 该推荐方法要求病毒的灭活滴度应达到 4 个对数值。

#### 四、我国消毒技术规范暂定的乙型肝炎病毒灭活方法

当前,在我国最新版的消毒技术规范中,对乙型肝炎病毒的灭活,暂时仍以 **HBsAg** 抗原性的破坏作为观察指标。由于孤立地使用纯化的 **HBsAg** 不属于病毒灭活的范畴,其结果不能解释病毒是否灭活,为使读者了解基本情况,这里仅作简要介绍如下。

**HBsAg** 悬液,纯化品,  $\geq 1.0 \text{ mg/ml}$ ,使用时,用含 5% 小牛血清 **PBS** 作适当稀释,用酶联免疫吸附法或固相放射免疫法测定(直接使用商业化双抗体夹心法试剂盒)。试验要求:阴性对照值,直接取中和产物检测。阳性对照,以中和产物代替消毒剂,同样进行试验。试验组应设 3 个浓度和 4 个时间,共 12 个剂量组。试验程序如下。

1. 悬液定性试验 在试管中加入适当浓度的消毒液 2 ml,至 20℃ 水浴 5 ~ 10 min,加入 40  $\mu\text{l}$  抗原(检测方法灵敏度的 10 万倍),混匀,作用至规定时间,取出 1 份与等量的中和剂溶液(含 20% 小牛血清)混匀,中和作用 10 min 后,取 0.1 ml 进行检测,平行检测 2 份,取平均 OD 值或 cpm 值,计算 S/N 值,  $S/N < 2.1$  为检测阴性。阳性对照值用含 10% 小牛血清的中和剂 1 ml,加 10  $\mu\text{l}$  抗原混匀后测定。阴性对照值,直接取含 10% 小牛血清的中和剂测定。试验重复 3 次。

2. 载体微量定性试验 于每片无菌不透性载体表面中央,加 20  $\mu\text{l}$  抗原(检测方法灵敏度的 5 万倍),用 L 型白金丝涂匀(如为布片、纸片等可透性载体,不必涂匀),称为样片,37℃ 干燥 30 min。取样片于无菌平皿中,置 20℃ 水浴 10 min,加测试消毒液 50  $\mu\text{l}$ ,立即涂匀,作用规定时间,将样片移入 1 ml 中和剂(含 10% 小牛血清)中,振荡中和作用 10 min 后,取 0.1 ml 进行检测,平行检测 2 份,取平均 OD 值或 cpm 值,计算 S/N 值,  $S/N < 2.1$  为检测阴性。阳性对照与阴性对照值的测定,同悬液试验法。试验重复 3 次。

合格要求:找出 3 次试验中均达到阴性的最低剂量。

## 第六节 病毒感染滴度的计算方法

这里主要介绍病毒感染滴度的定性资料计算方法。并重点介绍经典的 **Reed 与 Muench** 法、简便快捷的 **Spaerman - Kärber** 法。此外,还有 **FISHER** 统计法、**Bayes** 法等,需专门的统计软件进行分析。可直接购买商业软件,这里不作介绍。

定量资料的计算方法,请参见细菌滴度计算方法。

### 一、Reed 与 Muench 法

是最经典的计算方法。其计算过程如下。

假设某消毒剂的病毒灭活试验结果如表 22-1,病毒的检测可以是细胞病变效应、荧光抗体、噬斑计数、动物反应,或其他可接受的方法。

表 22-1 中病毒对照组  $\text{TCID}_{50}$  的计算,可先整理出  $\text{TCID}_{50}$  计算表(表 22-2)。累积阳性数,由高稀释度向低稀释度累积;累积阴性数,则反之,由低稀释度向高稀释度累积。病变比为各稀释度累积阳性数除以该稀释度累积阳性数与累积阴性数之和,结果可得病变率(%)。 $\text{TCID}_{50}$  的计算公式如下。

表 22-1 病毒灭活试验结果

病毒稀释度	病毒对照组	消毒剂毒性组	病毒灭活试验组
$10^{-1}$	++++	TTTT	TTTT
$10^{-2}$	++++	TTTT	TTTT
$10^{-3}$	++++	T000	T000
$10^{-4}$	++++	0000	0000
$10^{-5}$	++++	0000	0000
$10^{-6}$	+++0	0000	0000
$10^{-7}$	+000	0000	0000
$10^{-8}$	0000	0000	0000

注: T 表示有细胞毒性, + 表示病毒生长, 0 表示无病毒生长

表 22-2 TCID<sub>50</sub> 计算表

稀释度	接种数	细胞病变数		累积阳性数	累积阴性数	病变比	病变率(%)
		阳性	阴性				
$10^{-1}$	4	4	0	24	0	24/24	100
$10^{-2}$	4	4	0	20	0	20/20	100
$10^{-3}$	4	4	0	16	0	16/16	100
$10^{-4}$	4	4	0	12	0	12/12	100
$10^{-5}$	4	4	0	8	0	8/8	100
$10^{-6}$	4	3	1	4	1	4/5	80
$10^{-7}$	4	1	3	1	4	1/5	20
$10^{-8}$	4	0	4	0	8	0/8	0

TCID<sub>50</sub> = 病变率高于 50% 的最高稀释度的负对数 + 距离比例

距离比例 = (稍微高于 50% 的实际病变率 - 50) ÷ (稍微高于 50% 的实际病变率 - 稍微低于 50% 的实际病变率)

如本例中, 距离比例 = (80 - 50) ÷ (80 - 20) = 0.5, TCID<sub>50</sub> = 6 + 0.5 = 6.5。

按照同样的原理和方法, 根据表 22-1 中消毒剂毒性组资料, 还可计算出消毒剂毒性造成 50% 细胞死亡的滴度 (TCLD<sub>50</sub>)。结果为 2.7 (读者可以自己验算)。

最后, 根据表 22-2 资料, 可计算出病毒灭活试验组的灭活滴度。由于试验组未检出病毒生长, 故其灭活滴度 = 病毒对照组 TCID<sub>50</sub> - 消毒剂毒性组 TCLD<sub>50</sub> = 3.8。

结论, 通过病毒灭活试验, 证实某消毒剂可以灭活 10<sup>3.8</sup> 以上的病毒。

## 二、Spaerman - Kärber 法

是一种最简易的计算法。该方法与其他计算方法比较, 同样具有较好的可比性。该方法要求含有 100% 细胞病变、部分细胞病变和无细胞病变的稀释度。

TCID<sub>50</sub> = 最低稀释度的负对数 + (Σ 各稀释度阳性百分比 ÷ 100 - 0.5) × 稀释倍数的对数

下面举例说明具体计算过程。假设某病毒悬液各稀释度测定结果为表 22-3 资料。则其 TCID<sub>50</sub> = 4 + (300 ÷ 100 - 0.5) × 1 = 6.5。即该病毒悬液的滴度 (TCID<sub>50</sub>) 为 6.5 个对数值。



表 22-3 Spaerman - Kärber 法计算表

稀释度 ( - log10)	细胞感染性结果	阳性百分比
4	++++++	100
5	++++++	100
6	+++--+	66.7
7	+- - - + -	33.3
8	-----	0
Σ 各稀释度阳性百分比		300

注意：如果一个稀释度没有病毒生长，特别是最低稀释度仍无病毒生长时，又一定要测试其中残留的病毒感染数，应测试该稀释度所有容积。将该稀释度所有容积，拆分为尽可能多的小体积，分别接种细胞。此时，其  $TCID_{50}$  的估计值，可按下列 Lycke 公式计算。

$$TCID_{50} = -1.4 \ln(1 - p)/v$$

$p$  为细胞感染数和总接种数之比， $v$  为拆分的体积。

(张文福 李敬云)

#### 参考文献

- 1 Chen JHS, Methods of testing virucides. In: Block SS, ed. Disinfection sterilization and preservation. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1996
- 2 European Standard CEN/TC216/WG1N137. Virucidal quantitative suspension test for chemical disinfectants and antiseptics used in human medicine. 1997
- 3 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;11

# 第二十三章 残余消毒剂的去除

## 第一节 概述

在消毒剂杀灭微生物的试验中,消毒剂与微生物相互作用至规定时间后,作用体系内游离的或吸附于微生物表面的残留消毒剂,若不及时去除,在接种检测时可对微生物产生抑制或持续杀灭作用。因此欲准确测定消毒剂对微生物的杀灭作用,需在消毒处理至预定时间时,及时中和或去除消毒剂与微生物(悬液或载体)作用体系内游离的或吸附于微生物表面的残留消毒剂,排除其对微生物的抑制或持续杀灭作用,从而使试验获得正确结果。

### 一、残余消毒剂的中和或去除基本原则

- 1.所用中和或去除方法可有效去除残留消毒剂,拟用中和剂具有良好水溶性,且性质稳定。
- 2.对受试微生物无害,不影响其生长繁殖,不减少试验体系中微生物的回收量;所用中和剂及其使用量(浓度和容量)对测试浓度的消毒剂具有良好的中和作用,使用浓度的中和剂及其与测试浓度消毒剂的反应产物对受试微生物生长繁殖及其恢复培养无有害或不良影响,不影响对消毒或灭菌效果的检测与判定。
- 3.不破坏培养基的营养成分,不影响其透明度及对微生物的观察或检验。
- 4.在用细胞感染法进行消毒剂对病毒灭活效果的评价时,应不破坏细胞培养基中的营养成分,对宿主细胞的生长繁殖无不良影响,不影响受试病毒的生长繁殖及其生长繁殖能力的观察或检测。
- 5.在用免疫学方法进行消毒剂对微生物抗原或抗体活性、或用分子生物学方法进行消毒剂对微生物 **DNA** 或 **RNA** 及蛋白活性成分破坏效果的评价时,中和或去除残余消毒剂的方法应不影响抗原或抗体、**DNA** 或 **RNA** 和蛋白活性成分检测的特异性与灵敏度。
- 6.必须按规定方法经鉴定合格方可在相应的消毒试验中使用。

### 二、中和或去除残余消毒剂鉴定试验的设计原则

- 1.通过所设各组试验结果的综合分析,应能确定所选中和或去除方法是否对测试消毒剂有良好的中和或去除作用,对受试微生物及其恢复培养是否有有害或不良影响。
- 2.试验中所用消毒剂的浓度应为杀灭微生物试验中使用的最高浓度。使用浓度低时不足以显示此中和剂能否将高浓度消毒剂完全中和或去除。
- 3.中和剂鉴定试验中,一般应依据杀灭微生物所用试验方法,选用相应的悬液或载体定量试验方法。若试验中有悬液定量试验也有载体定量试验时,可用悬液定量试验进行中和剂鉴定试验,该试验鉴定合格的中和剂可用于载体定量杀灭试验,而载体试验鉴定合格的中和剂不一定适用于悬液定量杀灭试验,因为载体定量试验中,中和处理时,所用消毒剂溶液的容量少,

产生的中和产物浓度低,对受试微生物产生的影响也相应变弱。

4.消毒处理后经中和或去除消毒剂组应有适量受试微生物生长,若无微生物生长,不能表明中和或去除消毒剂后细菌是否复苏或是否对微生物的恢复生长有害或不良影响。此时可改变中和或去除方法,调整消毒处理时间(消毒剂与微生物的作用时间最短不得少于 30 s,否则难以控制试验的准确性)重新进行试验。

5.同一消毒剂拟对多种微生物进行杀灭效果的评价时,应按微生物种类分别进行鉴定试验。

### 三、受试微生物的选择

1.在观察同一种消毒剂对多种细菌繁殖体的杀灭试验中,可选其中对受试消毒剂抗力较强的一种(或株)进行试验。

2.对真菌则应分别以其中对受试消毒剂抗力较强的一种(或株)真菌繁殖体或真菌孢子进行试验。

3.对细菌芽孢,由于杀灭试验时,通常只对一种(或株)细菌芽孢进行测定,中和或去除残余消毒剂的试验中,亦用该种(或株)细菌芽孢进行试验;若测定对多种细菌芽孢的杀灭效果时,则以枯草杆菌黑色变种(ATCC9372)芽孢为受试菌进行试验。

4.在对其他特定微生物的杀灭试验中,如病毒等应对受试微生物分别进行试验。

## 第二节 残余消毒剂的中和或去除方法

在评价消毒剂杀灭微生物效果的试验中,已有多种方法用于中和或去除消毒剂与微生物作用体系内游离的或吸附于微生物表面的残留消毒剂,这些方法主要包括物理法和化学中和法两类。其中物理法又包括稀释法、过滤法、离心沉淀法、凝胶过滤法和漂浮洗涤法等。其中凝胶过滤法和漂浮洗涤法多用于病毒灭活试验中消毒剂的中和与去除。凝胶过滤法是依据病毒与消毒剂混物流经多孔凝胶(如 Sephadex LH-20、Sephadex G75 和 PD10 等)固相时,混合物中病毒等大分子被阻作用小,先流出层析柱,收集柱层析液体,可检出残留病毒;而消毒剂、中和剂及其与消毒剂的反应产物、水和盐类易进入凝胶,被阻截于层析柱内,从而达到分离病毒与消毒剂、剩余中和剂及其与消毒剂的反应产物的目的。收集柱层析液体,可检出残留病毒。目前应用不多,本文不作详细介绍。

### 一、物理法

#### (一)稀释法

1.基本原理 稀释法是利用稀释液对消毒处理后的微生物样本适当稀释,通过降低残余消毒剂浓度而减少或消除残余消毒剂对受试微生物的抑制或杀灭作用。稀释法通常只用于抑制微生物浓度和非常接近杀灭微生物浓度的消毒剂,如醇类消毒剂等。目前在杀菌效果的鉴定试验中较少应用,但在消毒剂灭活病毒感染性试验中仍不失为一种良好方法,特别是结合低浓度中和剂(经鉴定对宿主细胞无毒者)使用时,效果较好。

2.试验操作要点 试验在  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴条件下按下列分组进行。

(1)第 1 组,按消毒要求的试验方法,对受试微生物进行消毒处理至预定时间后,即刻用无

菌生理盐水或其他对受试微生物无害的无菌稀释液（如低浓度中和剂溶液）进行稀释，病毒灭活试验中多用细胞维持液进行稀释（稀释倍数不宜太大，但稀释后消毒剂浓度应小于其抑制微生物生长的浓度）。振荡混匀，取稀释样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。病毒灭活试验中，即刻接种细胞培养管，测定感染性病毒的滴度。观察消毒剂被稀释后受试微生物有无生长。

(2)第 2 组，试验先将消毒剂溶液用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害的无菌稀释液（病毒用细胞维持液）作相同倍数稀释后，再加入受试微生物，振荡混匀，作用至预定时间后，取稀释样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。病毒灭活试验中，即刻接种细胞培养管，测定感染性病毒的滴度。观察消毒剂经稀释后对受试微生物的生长有无影响。

(3)第 3 组，以无菌蒸馏水代替消毒剂溶液，加入受试微生物，振荡混匀，作用至预定时间后，用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害的无菌稀释液（病毒用细胞维持液）作相同倍数稀释，取稀释样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。病毒灭活试验中，即刻接种细胞培养管，测定感染性病毒的滴度。作为受试微生物阳性对照。

(4)第 4 组，细菌杀灭试验用鉴定试验时，应设稀释液和营养琼脂培养基阴性对照组。病毒灭活试验用鉴定试验时，应设消毒液和稀释消毒液对细胞影响试验及稀释液与细胞培养基阴性对照组。

3. 结果判定 试验结果符合下列要求时，可用稀释法中和或去除残留的消毒剂。

(1)第 1 组经适宜倍数稀释后有受试菌或病毒生长；

(2)第 2 组和第 3 组，受试菌生长数量达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml 或片，或感染性病毒的滴度达  $10^4 \sim 10^5$  TCID<sub>50</sub>；

(3)第 4 组无菌生长或细胞无污染且生长良好。

## (二) 滤膜过滤法

1. 基本原理 利用微孔滤膜可滞留微生物而使消毒剂通过的原理，将经消毒处理后消毒剂与微生物的混合样本，即刻经微孔滤膜滤器过滤，再用适量冲洗液冲洗过滤，以去除悬液中或微生物表面吸附的消毒剂。该方法多用于难以找到适宜中和剂的消毒剂。

2. 鉴定试验操作程序 试验在  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴条件下按下列分组进行。

(1)第 1 组，在对细菌或真菌的试验报告中，按消毒要求的试验方法，对受试微生物进行消毒处理至预定时间后，即刻取样液均匀地滴加在滤器的滤膜（滤膜孔径大小依受试微生物形态大小而定，细菌类选用滤膜孔径应小于  $0.45 \mu\text{m}$ ，病毒类一般选用的滤膜孔径应小于  $0.22 \mu\text{m}$ ）上，一式两份，分别抽滤，先滤除消毒剂，不经冲洗直接取下滤膜，有样本的一面向上，贴附在琼脂平板表面，置规定温度下培养，计数存活菌数。观察消毒剂对受试微生物是否有抑制或杀灭作用。

(2)第 2 组，按消毒要求的试验方法，向消毒剂溶液中加入受试微生物，振荡混匀，消毒处理至预定时间后，取样液 0.5 ml，均匀地滴加在滤器的滤膜上，一式两份，分别抽滤，先滤除消毒剂，再用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害兼或有利于去除残留消毒剂的溶液冲洗抽滤，重复 2~3 次，以完全去除残余的消毒剂。取下滤膜，有样本的一面向上，贴附于营养琼脂平板表面，置规定温度下培养，计数存活菌数。观察受试微生物是否有复苏生长。

(3)第 3 组,以无菌蒸馏水代替消毒剂溶液,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物,振荡混匀,同样作用至预定时间后,取样液均匀地滴加在滤器的滤膜上,一式两份,分别抽滤,先滤除样液,再用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害兼或有利于去除残留消毒剂的溶液冲洗抽滤,重复 2~3 次。取下滤膜,有样本的一面向上,贴附于营养琼脂平板表面,置规定温度下培养,计数存活菌数。作为试验阳性对照。

(4)第 4 组,取无菌生理盐水或其他对受试微生物无害兼或有利于去除残留消毒剂的稀释液,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物,同样作用至预定时间后,振荡混匀,不经滤膜过滤处理,置规定温度下培养,计数存活菌数。观察原始加菌量。

试验同时设稀释液和营养琼脂培养基等阴性对照。

3. 结果判定 试验结果符合下列要求时,可用滤膜过滤法中和(或)去除残留的消毒剂。

(1)第 1 组,滤膜上未见或仅见少量受试菌生长。

(2)第 2 组,有较第 1 组为多,但较第 3 和第 4 组为少的受试菌生长。第 1 组无菌生长时,第 2 组细菌生长菌数不少于 5 cfu/张滤膜。

(3)第 3 组和第 4 组,受试菌生长数量在  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/张滤膜之间。且组间误差不超过回收菌数平均值的 15%。

### (三)离心沉淀法

1. 基本原理 利用离心产生的离心力,使经消毒处理后样本中的微生物沉淀,去除上清中的消毒液,再用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害的溶液,重悬沉淀物,再次离心,如此反复离心 3~4 次,以去除悬液中或微生物表面吸附的残余消毒剂。

2. 鉴定试验操作程序 试验在  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴条件下按下列分组进行。

(1)第 1 组,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物消毒处理至预定时间后,振荡混匀,不离心,直接取样液接种平皿,一式两份,每份 0.5 ml,倾注营养琼脂培养基后,置规定温度下培养,计数存活菌数,或即刻取样液接种细胞培养管,测定感染性病毒的滴度。观察消毒剂对受试微生物是否有抑制或杀灭作用。

(2)第 2 组,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物,消毒处理至预定时间后,即刻取样液移入无菌离心管中,在  $4^\circ\text{C}$  下离心,细菌和真菌在  $3\,000 \sim 5\,000$  r/min 离心 20~30 min,病毒则以  $40\,000$  r/min 离心 120~180 min。去上清,用无菌生理盐水或其他对受试微生物无害兼或有利于去除残留消毒剂的溶液重悬离心沉淀物,再次离心,如此重复离心 2~3 次,最后一次离心后,去上清,再次加入与原样液量相同的无菌生理盐水重悬离心沉淀物,振荡混匀,取样液,接种平皿,一式两份,每份 0.5 ml,倾注营养琼脂培养基后,置规定温度下培养,计数存活菌数,或接种于细胞培养管中,测定感染性病毒的滴度。观察离心处理后受试微生物是否有复苏生长。

(3)第 3 组,用生理盐水代替消毒剂溶液,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物,进行处理至预定时间后,即刻取样液移入无菌离心管中,按第 2 组要求在  $4^\circ\text{C}$  下离心,重悬沉淀物,接种平皿或细胞管。检测阳性对照细菌数或感染性病毒的滴度。

(4)第 4 组,用生理盐水代替消毒剂溶液,按消毒要求的试验方法,加入受试微生物,处理至预定作用时间后,不离心,直接振荡混匀,接种平皿,一式两份,每份 0.5 ml,倾注营养琼脂培养基后,培养计数存活菌数。或接种于细胞培养管中,测定感染性病毒的滴度。与第 3 组比较用于观察离心沉淀处理时,微生物的损失率。

(5)第 5 组,用病毒进行试验时,应设重悬溶液及细胞基础培养液阴性对照。用细菌或真

菌进行试验时，应设离心冲洗液与琼脂培养基阴性对照组。

### 3.结果评价

(1)第 1 组未见或仅见少量受试菌或病毒生长。

(2)第 2 组有远较第 1 组为多,但较第 3 和第 4 组为少的受试菌或病毒生长。第 1 组无细菌生长时,第 2 组细菌生长数不少于 5 cfu / 平板。

(3)第 3 组和第 4 组受试菌生长数量达  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$  cfu/ml 或片。感染性病毒的滴度达  $10^3 \sim 10^5$  TCID<sub>50</sub>。

(4)离心稀释液或培养基无污染。

### (四)漂浮冲洗法

1.基本原理 利用聚乙烯醇缩甲醛对病毒的非特异性吸附作用,先将病毒经琼脂糖吸附浓缩,再将聚乙烯醇缩甲醛溶液滴注于琼脂糖表面,干燥成膜后,揭下,制成聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜载体,将该载体经消毒处理后,反复漂洗,以去除膜上或病毒表面残留的消毒剂。

该方法多用于病毒灭活试验、中和剂或其与消毒剂的反应产物对细胞有毒性作用的消毒剂。

2.鉴定试验操作程序 试验前先将融化并冷至 45~50℃的 2%琼脂糖滴注在洁净载玻片表面,凝固后移至展平的多层(3~5层)滤纸表面,制成琼脂糖吸附载体。取适宜浓度的病毒悬液 0.1 ml( $10^5$  TCID<sub>50</sub>/0.1 ml)均匀滴染于琼脂糖块表面,待液体完全被吸附后,用溶于 1,2-二氯乙烷的 0.5%聚乙烯醇缩甲醛溶液覆盖,置室温或  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  恒温箱内(30~40 min),干燥后揭下制成聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜载体。

试验在  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  条件下按下列分组进行。

(1)第 1 组,将聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜漂浮于消毒液中,灭活处理至预定时间后,即刻取出聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜,不经漂洗,移至含有 1.0 ml 细胞基础培养液的培养皿中,将聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜打碎,取样接种细胞培养管,测定残余感染性病毒的滴度。观察消毒剂对病毒是否有抑制或杀灭作用。

(2)第 2 组,将聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜漂浮于消毒剂溶液中作病毒灭活处理,作用至预定时间,即刻取出聚乙烯醇缩甲醛-病毒膜,用无菌蒸馏水或其他对病毒与细胞无害的溶液漂洗 5~6 次,洗除膜上或病毒表面吸附的残余消毒剂,再移至含有 1.0 ml 细胞基础培养液的培养皿中,将膜打碎,取样液接种细胞培养管,测定残余感染性病毒的滴度。观察去除残余消毒剂后是否有病毒的复苏生长。

(3)第 3 组,该组为病毒阳性对照组,试验除以无菌蒸馏水代替消毒液外,其他操作程序均和第 2 组相同。

(4)第 4 组,为正常病毒对照组,取 0.1 ml 病毒悬液移入含有 1.0 ml 细胞基础培养液的培养皿中,混匀,取样液接种细胞培养管,测定试验病毒悬液感染性病毒的滴度。与第 3 组比较用于观察漂浮冲洗处理时受试病毒的损失率。

(5)第 5 组为正常细胞对照。

### 3.结果评价

(1)第 1 组未见或仅见少量病毒生长。

(2)第 2 组有远较第 1 组为多,但较第 3 和第 4 组为少的试验病毒生长。

(3)第 3 组和第 4 组感染性病毒滴度相近,且 TCID<sub>50</sub> >  $10^3$ 。

#### (4)细胞及其培养基无污染。

## 二、化学中和法

化学中和法又称中和剂法，是指在消毒剂溶液与微生物作用达规定时间的终点时，取样液加于适宜种类、浓度和容量的中和剂溶液（用以中和微生物与测试消毒剂混悬液中或微生物体表面吸附的残留消毒剂，并使其失去抑制或杀灭作用的试剂称为中和剂）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。本法最为常用。

### （一）基本原理

利用某些试剂可与消毒剂发生化学反应，使生成对受试微生物无害、不影响消毒或灭菌效果的检测与判断的新化合物，或与消毒剂发生吸附、乳化作用、而中止消毒剂对微生物的抑制和杀灭作用。中和剂鉴定试验则在于选出该种试剂（中和剂），并评价拟用中和剂及其使用量（浓度和容量）是否对测试浓度的消毒剂有良好的中和作用，使用浓度的中和剂及其与测试浓度消毒剂的反应产物（中和产物）是否对受试微生物生长繁殖有害或不良影响，是否影响对消毒或灭菌效果的检测与观察的一组各具特定意义的试验。

### （二）常用消毒剂的中和剂

1.含氯、含碘等卤素类消毒剂,过氧化氢、过氧乙酸、高锰酸钾和二氧化氯等过氧化物类消毒剂的中和剂为硫代硫酸钠，由上述消毒剂与表面活性剂等组成的复方消毒剂的中和剂为卵磷脂+吐温 80+硫代硫酸钠（LPH）等。

2.戊二醛与甲醛的中和剂为甘氨酸和双甲酮+吗啉复方溶液，其与表面活性剂等组成的复方消毒剂的中和剂为甘氨酸或双甲酮+吗啉复方溶液+卵磷脂+吐温 80等。

3.季铵盐类消毒剂的中和剂为吐温 80+卵磷脂或卵磷脂+吐温 80+组氨酸等。

4.醋酸氯己定的中和剂为吐温 80+卵磷脂或卵磷脂+吐温 80+组氨酸+硫代硫酸钠等。

5.酚类消毒剂的中和剂为吐温 80+卵磷脂或卵磷脂+吐温 80+组氨酸+硫代硫酸钠等。

6.醇类消毒剂的中和剂为吐温 80+卵磷脂或用稀释法去除等。

7.表面活性剂的中和剂为吐温 80+卵磷脂等。

8.银盐的中和剂为硫代硫酸钠+硫代乙醇酸钠等。

9.酸与碱类则互为中和剂等。

10.铜盐的中和剂为 EDTA 或 EDTA+硫代硫酸钠等。

### （三）中和剂的初选试验

在难以确定对测试消毒剂使用何种中和剂及其使用浓度时，可通过初选试验对多种中和剂进行测定，以初步确定何种中和剂可中和测试消毒剂，再经中和定量试验确定所用中和剂浓度及其容量是否能达鉴定合格。

中和剂的初选试验一般仅设中和剂、中和产物和阳性对照组。AOAC 方法以 8.0 ml 含中和剂的营养肉汤加 1.0 ml 无菌蒸馏水,再加 1.0 ml 经过滤的细菌营养肉汤培养物（含菌量  $10^3$  cfu/ml）,作为中和剂组；将无菌蒸馏水换成消毒剂，与 8.0 ml 含中和剂的营养肉汤混匀,再加 1.0 ml 经过滤的细菌营养肉汤培养物，作为中和产物组；阳性对照组则仅为 9.0 ml 无菌蒸馏水,加 1.0 ml 经过滤的细菌营养肉汤培养物。分别作用 0 min、30 min 和 60 min,取样接种，置规定温度下培养。若 3 组菌数相近时，可初步确定该中和剂可中和测试消毒剂。欧洲标准

委员会方法与 AOAC 方法大致相同，只是受试微生物用 0.1% 胰蛋白胨生理盐水稀释，加菌量为  $(1.5 \sim 5.0) \times 10^7$  cfu/ml。作用时间则分别为 5 min, 15 min, 30 min 和 60 min。

我国《消毒技术规范》亦推荐使用 3 组试验法进行中和剂的初选。试验操作程序如下：

1. 以硬水配制杀灭微生物试验所需最高浓度的消毒剂溶液。

2. 取中和剂溶液 9 份加 1 份消毒剂溶液，混匀，制成中和产物溶液。

3. 取 0.5 ml 受试菌悬液(含菌量达  $1.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3$  cfu/ml)加入含 4.5 ml 中和剂溶液的试管中，混匀，作用 30 min 后，取样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。

4. 取 0.5 ml 受试菌悬液(含菌量达  $1.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3$  cfu/ml)加入含 4.5 ml 中和产物溶液的试管中，混匀，作用 30 min 后，取样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。

5. 取 0.5 ml 受试菌悬液(含菌量达  $1.0 \times 10^3 \sim 5.0 \times 10^3$  cfu/ml)加入含 4.5 ml 胰蛋白胨(0.1% 生理盐水溶液)的试管中，混匀，作用 30 min 后，取样液接种平皿，一式两份，每份 0.5 ml，倾注琼脂培养基后，置规定温度下培养，计数存活菌数。

6. 试验同时设受试菌阳性对照和中和剂、胰蛋白胨生理盐水与培养基阴性对照。

7. 若 3 组生长菌数相近时，则判定该中和剂初选试验有效，可进一步进行中和剂鉴定试验。中和剂鉴定试验合格者，可用于微生物杀灭试验，否则应选择新的中和剂，重新进行中和剂初选试验。

值得注意的是中和剂初选试验也可依据杀灭微生物试验方法的要求设计，以便更确切反映杀灭微生物试验中中和剂的中和效果。

### (三) 细菌及其芽孢和真菌杀灭试验用中和剂鉴定试验

1. 鉴定试验分组 在细菌及其芽孢与真菌杀灭试验中，所用中和剂鉴定试验，一般可平行进行以下各组试验。

(1) 消毒剂 + 菌悬液或菌片 → 培养

观察消毒剂对受试菌有无杀灭或抑制能力。

(2) (消毒剂 + 菌悬液或菌片) + 中和剂 → 培养

观察残留消毒剂被中和后受试菌有无复苏生长。

(3) 中和剂 + 菌悬液或菌片 → 培养

观察中和剂是否有抑菌作用。

(4) (消毒剂 + 中和剂) + 菌悬液或菌片 → 培养

观察中和产物，或未被完全中和的残留消毒剂对受试菌有无抑制作用。

(5) 胰蛋白胨(0.1%)生理盐水 + 菌悬液 → 培养

作为菌悬液阳性对照。

(6) 胰蛋白胨(0.1%)生理盐水 + 中和剂，接种培养基 → 培养

作为试验溶液和培养基阴性对照。

### 2. 悬液定量杀菌试验用中和剂鉴定试验操作程序

(1) 第 1 组。吸取 0.5 ml 菌悬液，先加入 0.5 ml 3% 牛血清白蛋白，混匀，再加入置  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  水浴中保温 5 min 的消毒剂溶液 4.0 ml，混匀。作用至预定时间，取样液 0.5 ml 加于含 4.5 ml 胰蛋白胨(0.1%)生理盐水的试管中，混匀，作用 10 min。吸取该样液 0.5 ml，接种平皿，



一式两份,做活菌培养计数。

(2)第2组。吸取 0.5 ml 菌悬液,先加入 0.5 ml 3% 牛血清白蛋白,混匀,再加入置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 5 min 的消毒剂溶液 4.0 ml,混匀。作用至预定时间,取样液 0.5 ml 加于含 4.5 ml 中和剂溶液的试管中,混匀,作用 10 min。吸取该样液 0.5 ml,接种平皿,一式两份,做活菌培养计数。

如平板生长菌落数均超过 300 cfu / 平板,应以胰蛋白胨 (0.1%) 生理盐水对上述样液作适宜稀释后,再次接种平皿进行活菌培养计数。

(3)第3组。吸取 0.5 ml 菌悬液,先加入 0.5 ml 3% 牛血清白蛋白,混匀,再加入置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 5 min 的中和剂溶液 4.0 ml,混匀。作用至预定时间,取样液 0.5 ml 加于含有 4.5 ml 中和剂溶液的试管中,混匀,作用 10 min 用中和剂溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种平皿,一式两份,做活菌培养计数。

(4)第4组。吸取 0.5 ml 菌悬液,先加入 0.5 ml 3% 牛血清白蛋白,混匀,再加入置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 5 min 的中和产物(以 1 份消毒剂溶液加 9 份中和剂溶液配制而成)溶液 4.0 ml,混匀。作用至预定时间,取样液 0.5 ml 加于含有 4.5 ml 中和产物溶液的试管中,混匀,作用 10 min,用中和产物溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种平皿,一式两份,做活菌培养计数。

(5)第5组。吸取 0.5 ml 菌悬液,先加入 0.5 ml 3% 牛血清白蛋白,混匀,再加入置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中保温 5 min 的胰蛋白胨 (0.1%) 生理盐水 4.0 ml,混匀。作用 10 min,取样液 0.5 ml 用胰蛋白胨(0.1%)生理盐水做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种平皿,一式两份,做活菌培养计数。

(6)第6组。吸取同次试验用胰蛋白胨(0.1%)生理盐水和中和剂溶液各 0.5 ml,接种于平皿中,倾注营养琼脂,做活菌培养计数。检测有无微生物污染。

### 3.载体定量杀菌试验用中和剂鉴定试验

(1)第1组。吸取消毒剂溶液 5.0 ml 于无菌小平皿内,将其置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 片菌片,并使浸没于消毒剂溶液中。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 PBS 的试管中,作用 10 min。振荡洗涤,洗下菌片上的微生物,吸取该样液 0.5 ml,接种于平皿中,一式两份,做活菌培养计数。

(2)第2组。吸取消毒剂溶液 5.0 ml 于无菌小平皿内,将其置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 片菌片,并使浸没于消毒剂溶液中,待作用至试验预定时间,立即用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 ml 中和剂溶液的试管中,作用 10 min。振荡洗涤,洗下菌片上的微生物,吸取该样液 0.5 ml,接种于平皿中,一式两份,做活菌培养计数。

如平板生长菌落数均超过 300 cfu / 平板,应重新吸取该最终样液 0.5 ml,用 PBS 做适当稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种于平皿中,做活菌培养计数。

(3)第3组。吸取中和剂溶液 5.0 ml 于无菌小平皿中,将其置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,用无菌镊子夹入 1 片菌片,并使浸没于中和剂溶液中,作用 10 min。用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 ml 中和剂溶液试管中,振荡洗涤,洗下菌片上的微生物,吸取该样液 0.5 ml,用中和剂溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种于平皿中,一式两份,做活菌培养计数。

(4)第4组。吸取中和产物溶液(用可透性载体时,以浸有消毒剂溶液的载体样片 1 片置

5.0 ml 中和剂溶液内,作用 10 min;用不透性载体时,吸取消毒剂溶液 50 μl,置 5.0 ml 中和剂溶液内,作用 10 min。)5.0 ml 于无菌小平皿内,将其置 20±2℃水浴中 5 min后,用无菌镊子夹入 1 菌片,并使浸透于中和产物溶液中。作用 10 min。用无菌镊子取出菌片,移入含 5.0 ml 中和剂溶液的试管中,振荡洗涤,洗下菌片上的微生物,吸取该样液 0.5 ml,用中和产物溶液做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种于平皿中,一式两份,做活菌培养计数。

(5)第 5 组。吸取 PBS 5.0 ml 于无菌小平皿内,将其置 20±2℃水浴中 5 min后,用无菌镊子夹入 1 片菌片,并使浸没于 PBS 中。作用 10 min,用无菌镊子取出菌片移入含 5.0 ml PBS 的试管中,振荡洗涤,洗下菌片上的微生物,吸取该样液 0.5 ml,用 PBS 做 10 倍系列稀释,选适宜稀释度悬液,吸取该稀释度样液 0.5 ml,接种于平皿中,一式两份,做活菌培养计数。

(6)第 6 组。吸取同次试验用胰蛋白胨(0.1%)生理盐水和中和剂溶液各 0.5 ml,接种于平皿中,倾注营养琼脂,做活菌培养计数。检测有无微生物污染。

4.鉴定试验结果评价 试验结果符合以下全部条件时,所测中和剂可判为合格:

(1)第 1 组无受试菌或仅有极少量受试菌菌落生长。

(2)第 2 组有较第 1 组为多,但较第 3、4 和第 5 组为少的受试菌菌落生长,并符合表 23-1 要求者。

表23-1 中和剂鉴定试验中对第 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: X指在 1~10 之间的菌落数, Y为大于 10 的菌落数

对抑菌作用不明显的消毒剂所用中和剂鉴定试验中,当第 1 组与第 2 组菌落数相近,难以达到表 23-1 要求时,可根据具体情况另行作出判断或评价。

(3)第 3、4、5 组有相似量受试菌菌落生长,并在 5×10<sup>5</sup>~5×10<sup>6</sup> cfu/ml(片)之间,其组间菌落数误差率应不超过 15%。3、4、5 组间菌落数误差率计算公式:

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

(4)第 6 组无菌生长。

(5)在模拟现场试验和现场试验中若使用的消毒剂浓度高于杀灭微生物试验或中和剂鉴定试验用浓度,且没有相应浓度消毒剂的中和剂鉴定试验结果,应补做中和剂鉴定试验。此时,若遇第 1 组和第 2 组残留菌数为“0”或低于表 23-1 要求,但第 3、4 和第 5 组菌落生长菌落数符合要求,第 6 组无菌生长。在已有合格的中和剂鉴定试验的基础上,该试验亦可证明,所用中和剂可有效中和测试消毒剂,且中和剂和中和产物对受试菌生长无影响。

5. 注意事项

(1)试验所分各组均有其特定意义,不得任意删减。

(2)严格无菌操作,保持试液和器材的无菌,每吸一管样液,应更换一支吸管,以防止污染

而影响试验的准确性。

(3) 试验组次序应按本文所列排列。

(4) 在计算微生物浓度时，须考虑其稀释倍数。

#### (四) 病毒灭活试验(细胞感染法)用中和剂鉴定试验

1. 鉴定试验分组 在病毒灭活试验用中和剂鉴定试验中，一般先观察中和剂及其与消毒剂的反应产物对细胞的毒性作用。只有在其对细胞无毒性作用时才可进行中和剂鉴定试验。对细胞毒性观察试验按下列分组进行。

(1) 中和剂 + 细胞 → 培养

观察所用中和剂对细胞生长有无影响。

(2) (消毒剂 + 中和剂) + 细胞 → 培养

观察中和产物溶液对细胞生长有无影响。

(3) 消毒剂 + 细胞 → 培养

观察消毒剂对细胞生长有无影响。

(4) 正常细胞对照

观察细胞是否生长良好。

对中和剂中和效果的鉴定试验时则按下列分组进行。

(1) 消毒剂 + 病毒悬液或染有病毒的载体(下称染毒载体) → 接种细胞培养

观察所试消毒剂对病毒有无抑制或灭活作用。

(2) (消毒剂 + 病毒悬液或病毒载体) + 中和剂 → 接种细胞培养

观察残留消毒剂被去除后，病毒感染性是否可恢复。

(3) 中和剂 + 病毒悬液或病毒载体 → 接种细胞培养

观察中和剂对病毒有无抑制作用。

(4) (消毒剂 + 中和剂) + 病毒悬液或病毒载体 → 接种细胞培养

观察中和产物，或未被完全中和的残留消毒剂对病毒有无抑制作用。

(5) 病毒悬液或病毒载体 → 接种细胞培养

观察病毒是否可正常生长，并将其结果作为阳性对照值。

(6) 未接种病毒的细胞 → 培养

观察细胞生长是否良好。

#### 2. 悬液定量病毒灭活试验用中和剂鉴定试验

(1) 细胞毒性观察试验第 1 组，将中和剂溶液用细胞基础培养液稀释成不同浓度，分别吸取 1.0 ml 接种试验用细胞，作用 3~4 h 后，吸去中和剂溶液，另加细胞基础培养液，置 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。

(2) 细胞毒性观察试验第 2 组，将不同浓度的中和产物 1 份消毒剂溶液加 1 份中和剂溶液，混合后，作用 10 min 溶液，分别吸取 1.0 ml 接种试验用细胞，作用 3~4 h 后，吸去中和产物溶液，另加细胞基础培养液，置 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。

(3) 细胞毒性观察试验第 3 组，将不同稀释度的消毒剂溶液，分别吸取 1.0 ml 接种试验用细胞，作用 3~4 h 后，吸去消毒剂溶液，另加细胞基础培养液，置 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。

(4) 细胞毒性观察试验第 4 组，将试验用细胞，加细胞基础培养液后，置 37℃ 二氧化碳培养箱中培养。

在确定试验浓度的中和剂和中和产物溶液对细胞无毒性作用后可进行下列中和剂鉴定试验。

(1)中和剂鉴定试验第1组。吸取双倍浓度消毒剂溶液 0.5 ml 于试管内,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,加入 0.5 ml 病毒悬液,混匀。待作用至预定时间,再加入 1.0 ml 去离子水,吸取该样液 1.0 ml,进行随后的病毒滴度测定。

(2)中和剂鉴定试验第2组。吸取双倍浓度消毒剂溶液 0.5 ml 于试管内,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,加入 0.5 ml 病毒悬液,混匀。待作用至预定时间,再加入 1.0 ml 中和剂溶液,混匀,作用 10 min。吸取该样液 1.0 ml,进行随后的病毒滴度测定。

(3)中和剂鉴定试验第3组。吸取 0.5 ml 去离子水于试管中,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,加入 0.5 ml 病毒悬液,混匀。待作用 10 min,再加入 1.0 ml 中和剂溶液,混匀。吸取该样液 1.0 ml 进行随后的病毒滴度测定。

(4)中和剂鉴定试验第4组。吸取双倍浓度消毒剂溶液 0.5 ml 于试管内,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,加入 1.0 ml 中和剂,混匀,5~10 min 后,再加入 0.5 ml 病毒悬液,混匀,作用 10 min 吸取该样液 1.0 ml,进行随后的病毒滴度测定。

(5)中和剂鉴定试验第5组。吸取去离子水 1.5 ml 于试管内,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴中 5 min 后,加入 0.5 ml 病毒悬液,混匀。吸取该样液 1.0 ml,进行随后的病毒滴度测定。

(6)中和剂鉴定试验第6组。将试验用细胞,加细胞基础培养液后,置  $37^{\circ}\text{C}$  二氧化碳培养箱中培养。

本试验中对各种病毒的接种和检测操作技术,若无特殊要求,按病毒学中各种病毒的常规培养和检测方法进行即可。

3. 载体定量病毒灭活试验用中和剂鉴定试验 在确定试验浓度的中和剂和中和产物溶液对细胞无毒性作用时,可进行下列中和剂鉴定试验。

(1)中和剂鉴定试验第1组,取 0.02~0.1 ml 病毒悬液(使回收感染性病毒的滴度达  $10^5$  TCID<sub>50</sub>/样本)滴注在 24 孔细胞培养板孔中或其他特定试验载体中或表面,涂匀,置  $37^{\circ}\text{C}$  恒温箱中 30~60 min 使干燥制成染毒载体,加入测试浓度的消毒剂溶液 1.0 ml,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴条件下作用至预定时间,加入 1.0 ml 去离子水,洗下病毒;吸取该样液 1.0 ml,接种细胞培养瓶(或板),测定感染性病毒滴度。

(2)中和剂鉴定试验第2组,取染毒载体,加入测试浓度的消毒剂溶液 1.0 ml,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴条件下,作用至预定时间,加入 1.0 ml 中和剂溶液,作用 10 min,洗下病毒,吸取该样液 1.0 ml 接种细胞培养瓶(或板),测定感染性病毒滴度。

(3)中和剂鉴定试验第3组,取染毒载体,加入 1.0 ml 去离子水,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴条件下,作用至预定时间,加入 1.0 ml 中和剂溶液,作用 10 min,洗下病毒,取该样液用经去离子水对倍稀释的中和剂溶液适当稀释,吸取取适宜稀释度的样液 1.0 ml,接种细胞培养瓶(或板),测定感染性病毒滴度。

(4)中和剂鉴定试验第4组,取 1.0 ml 测试浓度的消毒剂溶液,加入 1.0 ml 中和剂溶液,作用 10 min,制成中和产物溶液,取该中和产物溶液 2.0 ml,加入染毒载体,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  水浴条件下,作用至预定时间,洗下病毒,用中和产物溶液适当稀释,吸取取适宜稀释度的样液 1.0 ml 接种细胞培养瓶(或板),测定感染性病毒滴度。

(5)中和剂鉴定试验第5组,取 2.0 ml 去离子,加入染毒载体中,置  $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$  条件下,作用

至预定时间,洗下病毒,用细胞基础培养液适当稀释,吸取适宜稀释度的样液 1.0 ml,接种细胞培养瓶(或板),测定感染性病毒滴度。

(6)中和剂鉴定试验第 6 组,将试验用细胞,加细胞基础培养液后,置 37℃二氧化碳培养箱中培养。

4.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:

(1)中和剂鉴定试验第 1 组无试验病毒,或仅有少量试验病毒生长。

(2)中和剂鉴定试验第 2 组有较第 1 组为多,但较第 3、4、5 组显著为少的试验病毒生长。

(3)中和剂鉴定试验第 3、4、5 组病毒生长与原接种量相近。

(4)中和剂鉴定试验第 6 组细胞生长正常。

(5)预备试验结果显示,消毒剂、中和剂和中和产物,在正式试验的最高浓度下对细胞生长无影响。

(6)连续 3 次试验均取得合格评价。

由于消毒剂种类繁多,尤其是复方消毒剂的广泛应用,在灭活病毒试验中,残余消毒剂或其余中和剂的反应产物,以及剩余中和剂的去除,对正确评价其灭活效果至关重要。目前,仍有不少问题尚需解决,实践中应依据消毒剂及其复方的种类,选用适宜的中和与去除方法,以便获得正确的评价结论。

(王太星)

#### 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部.消毒技术规范,第一分册实验技术规范.1999;11
- 2 史江,王元伦,郑纪山,等.用病毒漂浮技术研究消毒剂对甲型肝炎病毒的灭活作用.中国公共卫生学报,1992;11(增刊):36
- 3 European Standard Committee. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in food, industrial, domestic, and institutional areas – test method and requirements. EN 1276, 1997:1 – 18
- 4 European Standard Committee. Chemical disinfectants and antiseptics – quantitative suspension test for the evaluation of bactericidal activity of products for hygienic and surgical handrub and handwash used in human medicine – test method and requirements. EN 12054. 1998:17 – 25
- 5 European Standard Committee. Chemical disinfectants and antiseptics – basic fungicidal activity – test method and requirements. EN 1275, 1997:1 – 16
- 6 Groen G, Mekki A, Pattyn SR. New method for virucide testing. J Virol Methods, 1980;1:27

# 第二十四章 灭菌器械微生物鉴定试验

## 第一节 无菌检查试验方法

无菌试验是检测医疗用品和药品经灭菌处理后是否有存活细菌的一种实验方法，其目的是检测医疗用品经过压力蒸汽、环氧乙烷气体或电离辐射等方法灭菌处理后是否达到或保持无菌标准。

### 一、基本要求

1. 无菌试验的过程应严格遵守无菌操作技术规程，防止微生物污染。

(1) 所用物品器材必须灭菌。

(2) 无菌试验应在空气洁净度至少达到 100 级的实验室,或在 100 级层流超净工作台内进行。

(3) 实验室地面、桌子及试验台面要进行擦拭消毒,实验室内空气每日需经消毒后(层流洁净实验室除外)进行实验。

(4) 工作人员应经淋浴后,着无菌隔离衣、帽、口罩、鞋后进入实验室并进行手消毒。

2. 无菌实验室内各种技术操作必须由经过严格专业技术培训的人员进行。

3. 检验物品抽样要求：供检物品抽样应随机取样，按规定比例抽样；对所抽样的物品需要采集足够的面积或接种量，以保证检验结果具有代表性。

英、美、日等国药典对无菌物品抽样都有明确规定。我国药典委员会编辑出版的《国内外药典(制剂)对照手册》中记载的英国药典对无菌检查抽样规定列于表 24-1。

表 24-1 无菌检查中不同批量采取样品数

制品数量	建议检查制品最低数
≤100 个	4~10 个
100~500 个	10 个
>500 个	10~20 个

我国规定供试品和培养基的接种量和装量见表 24-2。

表 24-2 无菌检查样品接种量与培养基装量

供试品装量(ml)	每管接种量(ml)	培养基分装量(ml)
≤2	0.5	15
2~20	1.0	15
>20	5.0	40

我国国家卫生部颁布的《消毒技术规范》“实验技术规范”中,对不同灭菌物品的抽样和操作也进行了统一的规定(见本节无菌检查试验方法)。

## 二、实验前准备

### (一)供试品检测用培养基与洗脱液(配制方法见本书附录一)

- 1.需氧菌 - 厌氧菌培养基(硫乙醇酸盐液体培养基)。
- 2.真菌培养基。
- 3.营养肉汤培养基。
- 4.营养琼脂培养基。
- 5.真菌琼脂培养基。
- 6.无菌检查用洗脱液。

### (二)实验室准备

1.实验室洁净度检查 检验洁净室或超净台空气含菌量:用平皿沉降法采样检查,用 9 cm 直径的平板采样 30 min 后进行培养。以存活菌颗粒平均数  $\leq 1.0$  cfu/ 平板为合格。

2.培养基和洗脱液的无菌检查 试验液的无菌检查:试验前,对各类培养基、洗脱液需作无菌检查,合格后方能用于试验。

#### (1)培养基培养性能检查方法

菌种:藤黄微球菌(*Micrococcus lutea*) CMCC (B) 28001

生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) CMCC (B) 64941

白色念珠菌(*Candida albicans*) CMCC (F) 98001

【菌液制备】取藤黄微球菌的营养琼脂斜面 and 白色念珠菌的真菌琼脂斜面的新鲜培养物,分别用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成均匀的菌悬液;将生孢梭菌的需氧 - 厌氧菌培养基的新鲜培养物,用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成均匀的菌悬液。分别取上述菌悬液用 0.9% 灭菌氯化钠溶液稀释至与细菌浊度标准管相同的浓度,然后,作 10 倍系列稀释并计数。

【需氧 - 厌氧菌培养基性能检查】接种 1 ml 含 10 个以下的藤黄微球菌菌悬液,置 30 ~ 35℃ 培养 24 h 后,生长良好。另接种 1 ml 含 50 个以下的生孢梭菌菌悬液,置 30 ~ 35℃ 培养 24 h 后,亦生长良好,此培养基培养性能合格。

【真菌培养基性能检查】接种 1 ml 含 50 个以下的白色念珠菌菌悬液,置 20 ~ 25℃ 培养 24 h 后生长良好为合格。

#### (2)培养基和洗脱液无菌检查

【培养基无菌检查】于无菌检查试验前 3 d,将未种菌的需氧 - 厌氧培养基与真菌培养基,分别置 30 ~ 35℃ 和 20 ~ 25℃ 条件下,培养 72 h,无菌生长为合格。

【洗脱液无菌检查】于无菌检查试验前 3 d,向需氧 - 厌氧菌培养基与真菌培养基内各接种 1 ml 洗脱液,分别置 30 ~ 35℃ 与 20 ~ 25℃ 条件下,培养 72 h,无菌生长为合格。

3. 阳性对照菌悬液的制备 实验时,要以金黄色葡萄球菌、白色念珠菌作阳性对照,以实验条件的环境监测作阴性对照。结果合格,实验有效。

【方法】于无菌检查试验前 1 d,取 1 接种环金黄色葡萄球菌[CMCC (B) 26003]普通琼脂斜面新鲜培养物,接种于需氧 - 厌氧菌培养基内,在 30 ~ 35℃ 培养 16 ~ 18 h 后,用 0.9% 无菌

氯化钠溶液稀释成  $1:10^6$  悬液备用。实验时,用其中一支加有样本的需氧-厌氧菌培养管,接种 1 ml 金黄色葡萄球菌稀释悬液,放入  $30\sim 35^{\circ}\text{C}$  培养 5 d,逐日观察结果。混浊而有菌生长为合格。

同样于无菌检查试验前 1 d,取 1 接种环白色念珠菌 (CMCC (F) 98001) 真菌琼脂斜面的新鲜培养物,用 0.9% 灭菌氯化钠溶液稀释成  $1:10^5$  悬液备用。实验时,用其中一支加有样本的真菌培养管,接种 1 ml 白色念珠菌稀释悬液,放入  $20\sim 25^{\circ}\text{C}$  培养 7 d,逐日观察真菌生长情况,混浊而有菌生长为合格。

阴性对照:为实验环境监测指标。实验开始,取需氧-厌氧培养管与真菌培养管各 1 支,打开盖(或塞)置试验台上,直到实验完毕。盖上盖(或塞),与供试品一起培养,方法同上,无菌生长为合格。

### 三、无菌检查试验方法

按无菌操作要求打开供试品外包装,按以下方法制备并随机抽取样本接种需氧-厌氧菌培养管与真菌培养管。

【敷料、手术衣等非管道类样本】取 2 个包装内的样本,于不同部位剪取约  $1\text{ cm}\times 3\text{ cm}$  大小的样片 24 片,接种需氧-厌氧菌培养管 5 管与真菌培养管 3 管。每培养管含培养基 40 ml,各接种 3 片样片。用其中需氧-厌氧培养管和真菌培养管各 1 个作阳性对照管。

【手术器械类】手术钳、刀、剪、镊等大件手术器械每类取 2 件,用沾有无菌洗脱液的棉拭子反复涂抹采样,将棉拭子投入 5 ml 无菌洗脱液中,振荡混合,取样液接种到含培养基量 15 ml 的需氧-厌氧菌培养管内,连续接种 5 管,每管接种 1 ml,再接种 1 支阳性对照管;同时接种真菌培养基管 4 支。

【各种针具及棉签类】每种取 7 件样本,直接放于 5 管需氧-厌氧菌培养管内和 2 管真菌培养管,每管内含培养基 15 ml,用其中 1 管加样本的需氧-厌氧菌培养管,接种 1 ml 金黄色葡萄球菌稀释液作为阳性对照。

【注射器样品】取 5~10 支注射器样本,各吸取经灭菌的洗脱液 2~10 ml,将芯杆抽至全程刻度,振摇 5 次,洗下管壁附着的细菌和真菌。将各管洗液混合,接种需氧-厌氧菌培养管 5 管与真菌培养管 3 管。洗液接种量:1 ml 注射器为 0.5 ml,2 ml 注射器为 1 ml,5~10 ml 注射器为 2 ml,20~50 ml 注射器为 5 ml。培养管中的培养基量,洗液接种量在 2 ml 以下者,每管为 15 ml;接种量在 5 ml 者,每管为 40 ml。按要求留取阳性对照。

【输液(血)器等导管类样本】取 5~10 件样本,各以无菌注射器吸取 5~10 ml 无菌洗脱液注入管内往返摇荡 5 次,洗下管壁上的细菌和真菌。将各样本洗液混合后,接种需氧-厌氧菌培养管 5 管与真菌培养管 3 管。培养管含培养基 15 ml,每管接种混合样本溶液 1 ml。按要求留取阳性对照。

【其他样本】不能用上述方法处理的,可用无菌棉签涂抹法采样。每个样本涂采面积不得少于  $25\text{ cm}^2$ 。采样后将棉签去掉手污染的根部,投入培养管中。每次检测采 4 个样本,以其混合洗液分别接种需氧-厌氧菌培养管 5 管和真菌培养管 3 管,每支培养管含培养基 15 ml,接种洗液 2 ml。并按要求留取阳性对照。

供试品如有抑菌作用或含有抑菌物质时,可选用适宜的培养基,或种入较大的培养基中,使该供试品稀释至不具有抑制作用的浓度。也可采用“薄膜过滤法”处理并接种于培养基



中。

【薄膜过滤法】取规定量的供试品，加入 0.9% 的灭菌氯化钠溶液至少 100 ml 或其他适宜溶剂中（要将供试品浸没），摇匀，以无菌操作加入装有直径约 50 mm，孔径不大于  $0.45 \pm 0.02 \mu\text{m}$  微孔滤膜的薄膜过滤器内，减压抽干后，用 0.9% 灭菌氯化钠溶液或其他适宜溶剂冲洗滤膜 3 次，每次至少 100 ml。取出滤膜，分成 4 片，取 3 片，分别放在 3 管各 40 ml 需氧 - 厌氧培养管中，其中 1 管接种金黄色葡萄球菌菌液 1 ml 作阳性对照，另 1 片放在真菌培养管中。

将接种观察细菌污染的样本培养管同阳性、阴性对照管一起放在 30 ~ 35℃ 培养 5 d，逐日观察结果。

将接种观察真菌污染的样本培养管同真菌阳性、阴性对照管一起放在 20 ~ 25℃ 培养 7 d，逐日观察结果。

#### 四、结果判定

##### （一）与对照组比较

阳性对照管有菌生长（一般 24 h 内），阴性对照管在培养期内无菌生长，接种有样本的需氧 - 厌氧菌培养管及真菌培养管均呈澄清或虽混浊但经证明无菌生长，则判供试品合格。

##### （二）重复矫正

如接种样本的需氧 - 厌氧菌培养及真菌培养管中，有任何一管呈浑浊，并确证有菌生长时，应用同批样本，重复上述试验 2 次。复测中，除阳性对照管外，其他各管均无菌生长，仍可判为合格。否则应判供试品不合格。

##### （三）对照异常处理

阳性对照管或阴性对照管结果不合格，试验重做。

#### 五、注意事项

1. 试验的基本要求各项均不可省略，否则难以得出结论。
2. 培养基配好后应置低温清洁处，不宜久藏，一般不超过 1 个月。
3. 配制培养基的容器不宜用铜、铁器具，以免影响细菌生长。

## 第二节 内毒素及热原检查法

### 一、内毒素及致热原的发现

早在一百多年前就有人发现，供注射用的蒸馏水能使人发热。1875 年，有学者将腐肉的无菌抽出物给动物注射后，能致动物发热。从此，医学界将注射剂中能使生物体发热的物质称之为“致热原”或“热原质”（pyrogen）。

19 世纪初，Seident 等研究证实，热原质为细菌污染繁殖引起，并且它能从滤器滤过，对热稳定。经过半个多世纪的研究，人们认识到，许多细菌、病毒和真菌（如酵母菌）都能产生热原。致热最强的是革兰阴性杆菌，其次是革兰阳性杆菌，革兰阳性球菌较弱。

热原是微量即可引起恒温动物体温异常升高的物质的总称。广义概念的热原质包括细菌性热原、内源性高分子热原、内源性低分子热原等，主要物质为细菌内毒素、胞壁酰二肽及其他

抗原抗体复合物、半抗原物质和某些药物（类固醇）等。非细菌性热原质在制备和压力蒸汽灭菌过程中可以被破坏，只有细菌内毒素生物活性极强，致热活性也远高于其他致热物质，且不易被破坏和去除，因此“起源于革兰阴性微生物的内毒素是热原污染药品、器材，产生毒性反应的最常见因素”。

## 二、细菌内毒素特性

### （一）内毒素概念

细菌内毒素（endotoxin）一般指革兰阴性细菌细胞壁的结构成分，主要是脂多糖（lipopolysaccharide, LPS）。它是一种大分子物质，分子量约为  $2 \times 10^5$  kD，位于胞壁外膜，并在菌体表面形成一个疏水的障碍层，限制胆盐、消化酶及某些抗生素的进入，使细菌能逃避宿主防卫因子（包括补体、溶菌酶、阳离子蛋白质等）的作用。脂多糖由三部分组成：最外层为特异性多糖，即菌体抗原（O 抗原），是由几个单糖组成的许多同样的重复单位连接而成，与细菌的侵袭力和血清型特异性有关；中间是核心寡糖；内层是类脂 A，它是一种特殊的糖磷脂，是主要起毒性作用的部分。

### （二）细菌内毒素生物学活性

可将其分为两类：（1）致病作用。如发热反应（热原性）、糖代谢紊乱、弥漫性血管内凝血（DIC）、施瓦兹曼现象（Shwartzman phenomenon），大剂量内毒素可导致死亡等。（2）保护性反应。小剂量的内毒素可刺激机体的免疫反应，增强非特异性抵抗力，增强免疫应答以及有保护机体减轻放射性损伤的作用。多糖体部分具有的抗原性，生物体反复接触（低量）它会很快产生耐受。所以家兔热原检查法规定了使用次数及间隔时间。另外，鲎变形细胞溶解物具有中和细菌内毒素的作用，正是这一生物学活性，奠定了鲎试验检测细菌内毒素的方法。

### （三）细菌内毒素的其他理化特性

1. 耐热性：60℃ 对其无影响，100℃ 时不发生明显分解，120℃ 加热 4 h，可破坏 98%。180℃ 加热 2 h 或 250℃ 加热 30 min，才可彻底破坏。

2. 滤过性：其体积小，约在 1~5 nm 之间，故能通过滤器进入滤液中，但不能通过石棉滤板（可被吸附），也不能通过半透膜。

3. 具有水溶性及不挥发性。

4. 能被强酸、强碱和氧化剂  $\text{KMnO}_4$ 、 $\text{H}_2\text{O}_2$  等破坏。

### （四）临床输液反映热原质来源

1. 生产过程的污染 ① 水的污染：在蒸馏水制取过程中由于操作不当、水质不好、室温下存放过久造成细菌繁殖，使灭菌后存在细菌裂解物。② 盛水容器污染。③ 生产装置和输送管道污染。④ 制药原料含菌量过高，如葡萄糖、水解蛋白等有机物本身含菌并且容易生长繁殖。⑤ 灭菌工艺不合格，造成灭菌不彻底。

2. 输液过程污染 ① 输液器具不合格：医院自制输液器具，一次性输液器具均有可能本身污染有热原。② 重复使用输液器具处理不规范，去除热原不彻底。③ 输液操作不规范造成污染：在临床输液过程中，由于打开药瓶不消毒、加药、接管带入等造成污染。

### （五）消除细菌内毒素的方法

1. 高温破坏法：可用 180℃ 干烤 3~4 h 或 250℃ 干烤 30 min。

2. 吸附法：在吸附剂中，活性炭吸附力量强。一般用量为总容量的 0.1%~0.5%，pH 值为

3~5,将溶液加热到 70℃,振荡保温 15 min,少量多次较一次用同等量效果好。也可用阴离子交换树脂吸附或以石棉板为滤材的吸附过滤。

3.蒸馏法:此法仅限于制备蒸馏水。应反复蒸馏 3 次。

4.化学酸碱和氧化法:可用重铬酸钾硫酸清洁液或稀氢氧化钠溶液处理(0.8% NaOH 液煮沸 20 min)。也可用强氧化剂( $H_2O_2$ 等)处理。

5.离子交换法。

6.反渗透法。

7.凝胶过滤法。

8.超滤法。

### 三、鲎试剂检测细菌内毒素试验(凝胶法)

本法利用鲎试剂(鲎变形细胞裂解物)与细菌内毒素产生凝集反应的原理,以判断供试品中细菌内毒素限量的一种方法。具有灵敏度高,反应快,准确可靠等特点。内毒素使用单位用内毒素单位(EU)表示。

#### (一)机理

鲎为海洋生物,由于其血中存在能携氧的含铜血蓝蛋白(hemocyanin)而呈蓝色。鲎血仅有一种血细胞,称变形细胞。细胞浆中含有大量致密的颗粒。颗粒中含有与细菌内毒素起凝集作用的酶系统,即凝固蛋白原(coagulogen)、凝固酶原(proclotting enzyme)、B 因子、C 因子。细菌内毒素可使 C 因子激活,激活的 C 因子又将 B 因子激活,其又使凝固酶原活化成凝固酶,它通过酶解作用使凝固蛋白原转变为凝固蛋白。凝固蛋白又通过交联酶作用,相互聚合形成纤维状的凝胶。

鲎血变形细胞中还有一种酶,称 G 因子。它在凝固酶原作用下,可与真菌细胞壁一些成分产生凝集作用而形成假阳性。为保证鲎试剂的灵敏性和准确性,现生产的鲎试剂已去掉了变形细胞中的 G 因子,从而为定性或定量检测细菌内毒素试验提供了可靠的基础。

#### (二)检查步骤

##### 1.试验前准备

(1)试验设备:电热干烤箱、恒温水浴箱。

(2)试剂:细菌内毒素国家标准品系自大肠杆菌提取精制而成,用于标定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度和标定细菌内毒素工作标准品的效价。

细菌内毒素工作标准品系以细菌内毒素国家标准品为基础标定其效价,用于试验中鲎试剂灵敏度复核、干扰试验及设置的各种阳性对照。细菌内毒素工作标准品中每 1 ng 细菌内毒素的效价应不小于 2 EU,不大于 50 EU。

细菌内毒素检查用水系指与灵敏度为 0.03 EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  条件下 24 h 不产生凝集反应的灭菌注射用水。

(3)试验器材:试验用的吸管、烧瓶、注射器、试管等一律除去可能存在的外源性内毒素。玻璃器具可先用重铬酸钾洗液浸泡,再用无热原蒸馏水冲洗干净,置于干烤箱  $180^\circ\text{C}$  干烤 2 h 或  $250^\circ\text{C}$  干烤 30~60 min。塑料制品置 30% 双氧水或 3% 盐酸溶液中浸泡 4 h,再用无热原水冲洗后于  $60^\circ\text{C}$  烘干备用。

(4)鲎试剂灵敏度复核:实验前应对使用批号的鲎试剂做灵敏度测定,并符合规定。鲎试

剂灵敏度定义为在本检查法规定的条件下能检测出内毒素标准溶液或供试品中的最低内毒素浓度,用 EU/ml 表示。

根据鲎试剂灵敏度的标示值( $\lambda_b$ ),将细菌内毒素国家标准品或工作标准品,用细菌内毒素检查用水(或无热原水)溶解,在旋涡混合器上混合 15 min,然后制备成 2 倍稀释度,即  $2\lambda_b$ 、 $\lambda_b$ 、 $0.5\lambda_b$ 、 $0.25\lambda_b$  四个浓度的内毒素标准液备用。每稀释一步,均应在旋涡混合器上混合 30 s,按“检查法”项下试验,每一稀释液平行做 4 管。如最大浓度 4 管均为阳性,最低浓度 4 管均为阴性,按下式计算鲎试剂灵敏度测定值( $\lambda_c$ )。

$$\lambda_c = \text{Log} - 1(\sum X/4)$$

$X$  为反应终点内毒素浓度的对数值

当  $\lambda_c$  在  $0.5 \sim 2.0\lambda_b$  (包括  $0.5\lambda_b$  和  $2.0\lambda_b$ ) 时,方可用于细菌内毒素检查并以  $\lambda_b$  为该批鲎试剂的灵敏度。每批新的鲎试剂在用于试验前都要进行灵敏度的复核。

(5)供试品干扰试验:准备同一批号至少 3 个供试品。在无菌条件下,每套输液器内腔注入 10 ml 无热原水,输血器腔内注入 15 ml 无热原水,反复荡洗 5 次后,两端密封,置  $37^\circ\text{C}$  恒温箱中保温 2 h,取出后将供试液汇集至无菌无热原的有塞玻璃容器内,贮存不超过 2 h,液体药品可直接在无菌操作技术下抽取。

本试验用于对细菌内毒素试验所用物品(包括无热原水、试剂、器具等)的检测,要求其所含内毒素不可被检出。同时也用于证明被检验的制品(药液、生物制品等)及其成分不干扰细菌内毒素试验,以保证试验结果的准确。

供试品干扰试验按鲎试剂灵敏度复核试验各项之下,使用内毒素检查用水和未检出内毒素的供试品溶液或其不超过最大有效稀释倍数的稀释液。分别将同一支细菌内毒素国家标准品或工作标准品制成含细菌内毒素工作标准品  $2\lambda_b$ 、 $\lambda_b$ 、 $0.5\lambda_b$ 、 $0.25\lambda_b$  四种浓度的内毒素稀释液。用细菌内毒素检查用水和用供试品溶液或其他稀释液制成的每一浓度平行做 4 支,另取细菌内毒素检查用水和供试品溶液或其稀释液各做 2 支阴性对照管。如最大浓度  $2\lambda_b$  管均为阳性,最低浓度  $0.25\lambda_b$  管均为阴性,且阴性对照管均为阴性时,按下式计算用细菌内毒素检查用水制成的内毒素标准液的反应终点浓度的几何平均值( $E$ )和用供试品溶液或其稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的几何平均值( $E_t$ )。

$$E_s = \lg - 1(\sum X_s/4)$$

$$E_t = \lg - 1(\sum X_t/4)$$

式中  $X_s$ 、 $X_t$  分别代表内毒素检查用水和供试品溶液或其稀释液制成的内毒素溶液的反应终点浓度的对数值( $\lg$ )。当  $E_s$  在  $0.5 \sim 2\lambda_b$  含两端值范围时,且  $E_t$  在  $0.5\lambda_b$  和  $2\lambda_b$  时,则该供试品在该浓度下不干扰试验,否则需使用更灵敏的鲎试剂。如鲎试剂、供试品来源、供试品配方或生产工艺发生变化时,必须重新进行干扰试验。对供试品进行更大倍数稀释,使用更高的鲎试剂灵敏度,是排除干扰因素的简单有效的方法。

供试品的最大有效稀释倍数(MVD)按下式计算:

$$MVD = CL/\lambda_b$$

$L$  为供试品的细菌内毒素限值, $C$  为供试品溶液浓度, $L$  单位为 EU/ml 时, $C$  为 1.0 ml/ml。

2. 鲎试验检查法 取装有 0.1 ml 鲎试剂溶液的 10 mm × 75 mm 试管(或 0.1 ml/支的鲎试剂原安瓿)5 支,其中 2 支加入 0.1 ml 按最大有效稀释倍数稀释的供试品溶液作为供试品管,1 支加入  $2\lambda_b$  内毒素工作标准品溶液 0.1 ml 作为阳性对照管,1 支加入细菌内毒素检查用水

0.1 ml作为阴性对照管,最后 1支加入 0.1 ml 供试品阳性对照溶液作为供试品阳性对照管(是用被测供试品溶液将同一支细菌内毒素工作标准品制成 2  $\lambda$ b 浓度的内毒素溶液)。将试管中溶液轻轻混匀后,封闭管口,垂直放入  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  水浴中,恒温水浴保持  $60 \pm 2$  min,轻轻取出,观察结果。

### 3. 结果判断

(1)取出观察:将试管从恒温器中轻轻取出,缓慢倒转  $180^\circ$ ,管内容物呈坚实凝胶不变形,不从管壁滑脱者为阳性,记录为(+)。不呈凝胶或虽呈凝胶,但不能保持完整者为阴性,记录为(-)。

(2)结果:2支供试品管均为(-)者应认为符合规定,供试品 2管均为(+),应认为不符合规定;如 2管中有 1管为(+),另一管为(-)时,应按上述方法另取 4管供试品管复试;如 4管均为(-),判定产品或药品符合规定。若阳性对照管为(-)或供试品阳性对照管为(-)或阴性对照管为(+),则试验无效。

(3)供试品细菌内毒素含量不超过 0.5 EU/ml。

### 4. 注意事项

(1)从恒温器中拿取试管过程中应避免受到振动造成假阴性结果。

(2)试验所用物品(器具、溶液、稀释液、洗脱液及其提取物)应无菌、无热原、经干扰试验证明本身不对细菌内毒素具有抑制或增强作用。

(3)蛋白变性剂、洗涤剂、部分巯基化合物、螯合剂、高浓度盐溶液等对本试验均有干扰,因此,预先要做干扰试验。

(4)鲎试验最佳 pH 值为 6.25~7.25。pH 值低于 4 或高于 8,凝胶反应会被阻止。因此,制备供试品溶液,其 pH 值可调至 6.0~8.0。可用不含细菌内毒素的 0.1 mol/L 的盐酸液或氢氧化钠液调节。

(5)温度应控制在  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ 。温度过低,凝胶化会推迟。过高,凝胶化会被阻止。

(6)每次试验,应将有关检查试验项目、数据及结果进行认真登记。

## 四、热原检查家兔试验法

热原检查家兔试验法为最经典方法,本法系将一定剂量的供试品静脉注入家兔体内,在规定时间内,观察家兔体温升高的情况,以判定供试品中所含热原的限度是否符合规定。

人体对内毒素的病理作用最为敏感,2  $\mu\text{g/kg}$  体重的剂量就可引起发热反应。按每公斤体重的最小致热剂量比较,家兔和人基本相当,热反应阈值也基本一致。但热反应延滞期(自静脉注射内毒素之后到热原反应发生之前的时间),家兔比人稍快即人类为 45~90 min,家兔为 15~30 min;有效剂量的内毒素能在家兔身上诱发典型的双峰热,第一峰在 1~2 h,第二峰于 3~4 h,有利于试验观察。因此,家兔热原试验结合鲎试验法可算是检测天然内毒素和热原质的最佳方法。

### (一)供试用家兔

1.试验动物基本条件:供试用的家兔应健康动物且无外伤,体重 1.7~3.0 kg,雌兔应无孕。预测体温前 7 d 即应用同一饲料饲养。在此期间内,体重应不减轻,精神、食欲、排泄等不得有异常现象。

2.动物选择范围:选择动物均应在检查供试品前 3~7 d 内预测体温,进行挑选。选择范

围:(1)未经使用于热原检查的家兔;(2)符合供试品规定,但组内升温达  $0.6^{\circ}\text{C}$  的家兔;(3)判为不合格,但组内家兔平均升温未达  $0.8^{\circ}\text{C}$ ,并且已休息 2 周以上的家兔;(4)3 周内未曾使用的家兔。挑选条件与供试家兔相同,仅不注射药液,每隔 30 min 测量体温 1 次,共测 8 次,8 次体温均在  $38.0\sim 39.6^{\circ}\text{C}$  的范围内,且最高最低体温的差数不超过  $0.4^{\circ}\text{C}$  的家兔,方可供热原检查用。

3.用于热原检查后的家兔,作为供试品判为合格,至少也应休息 2 d 方可供第 2 次检查用。如作为供试品判为不合格,且其组内家兔平均升温达  $0.8^{\circ}\text{C}$  或更高时,则组内全部家兔不再使用。

4.每一家兔的使用次数,不应超过 10 次。

#### (二)试验前准备

1.在作热原检查前 1~2 d,供试家兔应尽可能处于同一温度的环境中,实验室和饲养室的温度相差不得大于  $5^{\circ}\text{C}$ ,实验室的温度应在  $17\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。在试验全过程中应注意室温变化不得大于  $3^{\circ}\text{C}$ ,并注意避免噪音干扰。

2.家兔在试验前至少 1 h 开始停食并置于适宜的装置中,直至试验完毕。

3.家兔体温应用精密度为  $\pm 0.1^{\circ}\text{C}$  的肛温计、或其他同样精确的测温装置测定。肛温计插入肛门的深度和时间,各兔应相同。深度一般约 6 cm,时间不少于 1.5 min。每隔 30~60 min 测量 1 次,一般重复测量 2 次,两次体温之差不得超过  $0.2^{\circ}\text{C}$ 。并以此两次体温的平均值作为该兔的正常体温。当日使用的家兔,正常体温应在  $38.0\sim 39.6^{\circ}\text{C}$  范围内,且各兔间正常体温之差不得超过  $1^{\circ}\text{C}$ 。

4.试验用的注射器、针头及一切和供试品溶液接触的器皿,应彻底除去热原。

#### (三)检查法

取适用的家兔 3 只,测定其正常体温后 15 min 以内,自耳静脉缓缓注入规定剂量并温热至约  $38^{\circ}\text{C}$  的供试品溶液,然后每隔 30 min 按前法测量其体温 1 次,共测 3 次,以 3 次体温中最高的 1 次减去正常体温,即为该兔体温的升高度数。如 3 只家兔中有 1 只体温升高  $0.6^{\circ}\text{C}$  或  $0.6^{\circ}\text{C}$  以上,或 3 只家兔体温升高均低于  $0.6^{\circ}\text{C}$ ,但升高的总数达  $1.4^{\circ}\text{C}$  或  $1.4^{\circ}\text{C}$  以上,应另取 5 只家兔复试,检查方法同上。

#### (四)结果判断

1.在初试的 3 只家兔中,体温升高均低于  $0.6^{\circ}\text{C}$ ,并且 3 只家兔体温升高总数低于  $1.4^{\circ}\text{C}$ ;或在复试的 5 只家兔中,体温升高  $0.6^{\circ}\text{C}$  或体温升高至  $0.6^{\circ}\text{C}$  以上的家兔仅有 1 只,并且初试、复试合并 8 只家兔的体温升高总数  $\leq 3.5^{\circ}\text{C}$ ,均认为供试品的热原检查符合规定。

2.在初试的 3 只家兔中,体温升高  $0.6^{\circ}\text{C}$  或  $0.6^{\circ}\text{C}$  以上的兔数超过 1 只;或在复试的 5 只家兔中,体温升高  $0.6^{\circ}\text{C}$  或  $0.6^{\circ}\text{C}$  以上的兔数超过 1 只;或在初试、复试合并 8 只家兔的体温升高总数超过  $3.5^{\circ}\text{C}$ ,均认为供试品的热原检查不符合规定。

(杨华明)

## 参考文献

- 1 卫生部药典委员会. 国内外药典(制剂)对照手册. 北京: 化学工业出版社, 1999:1-78
- 2 药典委员会. 中华人民共和国药典第一部. 附录 **XI D** 热原检查法. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 附录 85 页
- 3 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, 1999:120
- 4 周士珉, 王成群, 主编. 简明药剂学. 北京: 人民卫生出版社, 1994:1-100
- 5 马剑文, 韩永平, 沈克温, 主编. 现代药品检验学. 北京: 人民军医出版社, 1994:20-80
- 6 李仲兴, 郑家齐, 李家宏, 主编. 诊断细菌学. 香港: 黄河文化出版社, 1992:30-85
- 7 胡晋红, 主编. 医院制剂质量检验. 北京: 人民军医出版社, 1999:58-110

## 第二十五章 消毒剂对金属腐蚀性试验

消毒剂用于医疗器械或餐饮具的消毒时,由于其有效成分多含氧化剂或其 pH 呈酸性或碱性,可对各种金属物品造成不同程度的腐蚀。本章所介绍的方法,是以四种标准的金属样片代表金属物品,模拟消毒剂的浸泡过程,并通过浸泡后金属样片的失重值,计算出金属的腐蚀速率,从而判断出金属受腐蚀的程度。

### 第一节 测定条件与方法

#### 一、试验材料与要求

1. 金属片:圆形片状,直径  $24 \pm 0.1$  mm,厚 1.0 mm,穿一直径为 2.0 mm 小孔,表面积(包括上、下、周边表面与小孔侧面)总值约为  $9.80 \text{ cm}^2$ 。光洁度为 4~6。原材料如下:

(1)碳钢(密度  $7800 \text{ kg/m}^3$  见 GB 700-65);碳钢暴露于空气中易氧化生锈,应保存于机油中。

(2)铜(密度  $8400 \text{ kg/m}^3$  见 GB 2060-80)。

(3)铝(密度  $2700 \text{ kg/m}^3$  见 GB 1173-74)。

(4)不锈钢(密度  $7750 \text{ kg/m}^3$  见 GB 1220-75)。

2. 浸泡容器(带盖玻璃罐,容积为 800~1000 ml)。

3. 砂纸(120号粒度水砂纸,GB 2477)。

4. 分析天平(感量 0.1 mg)。

5.  $50^\circ\text{C}$ 温箱。

#### 二、测定方法

1. 以 120 号粒度水砂纸磨去金属片两面和周边表面的氧化层,用自来水冲净。在有表面活性作用的清洁剂中浸泡 10 min,用毛刷刷洗金属片表面,充分去油,再用蒸馏水冲洗干净。亦可用氧化镁糊剂涂抹除油后洗净。在无水丙酮或无水乙醇中浸泡 10 min,再次脱脂。然后将金属样片放入垫有滤纸的平皿内,置  $50^\circ\text{C}$ 温箱中干燥 1 h。对保存于油中的碳钢片或其他金属片,应先用洗涤剂初步去除油垢,并以自来水冲净后再按上述步骤做进一步处理。

2. 用分析天平称取每片金属片的重量,每金属片称重 3 次,精确至 0.1 mg,取其平均值作为试验前重量。称重后,用塑料线给每个样片系以标签,注明编号和日期,并记录每个样片的重量。

3. 按消毒剂最高使用浓度配制试验用消毒液,以每个样片 200 ml 的量将消毒液放置于玻璃罐中。对于固体消毒剂应使其充分溶解。

4. 将金属样片悬挂于含消毒液的玻璃罐中,使样片完全浸泡于消毒液中。在  $20 \sim 25^\circ\text{C}$  条件下一致性浸泡 72 h。对易挥发性或有效成分不稳定的消毒剂,应根据情况,酌情定时更换消



毒液,直至浸泡 72 h。

5. 每种金属每次试验放置 3 样片。浸泡时,若每一样片相隔 1 cm 以上,同种金属可在同一容器内(含 600 ml 消毒液)进行。

6. 待浸泡至规定时间,取出金属样片,先用自来水冲洗,再用毛刷或其他软性器具去除腐蚀产物。如仍有清除不掉的腐蚀产物,可作如下处理:

(1) 铜片:在室温下浸泡于盐酸溶液(36%~38%盐酸 500 ml 加蒸馏水至 1 000 ml,盐酸比重为 1.19)中 1~3 min。

(2) 碳钢片:置锌粉氢氧化钠溶液(20%氢氧化钠溶液 1 000 ml 加入锌粉 200 g)煮沸 5~30 min。

(3) 铝片:浸泡于三氧化铬磷酸溶液(三氧化铬 20 g,磷酸 500 ml,加蒸馏水至 1 000 ml。磷酸比重为 1.69)中,升温至 80℃,持续 5~10 min。如还未清除干净,可在室温浸于硝酸(比重 1.42)溶液中 1 min。

(4) 不锈钢:浸泡于 60℃硝酸溶液(66%~68%硝酸 100 ml 加蒸馏水至 1 000 ml)20 min。或浸于 70℃柠檬酸铵溶液(柠檬酸铵 150 g 加蒸馏水至 1 000 ml)中 10~60 min。

7. 金属样片除去腐蚀产物后,用自来水冲洗,并用毛刷刷洗样片表面,再用蒸馏水冲净,用粗滤纸吸干水分,置于垫有滤纸的平皿中,放入 50℃温箱,干燥 1 h。

8. 用镊子夹取样片,分别在分析天平上称重 3 次,取其平均值作为试验后重量。记录每个样片的重量。

9. 样片在用化学法去除腐蚀物时,需设相应空白对照以校正误差。空白对照样片与试验组样片同样进行表面处理、洗净和称重,但不经消毒剂浸泡。然后随同试验组样片用相同方法进行化学处理、水冲洗、干燥、称重,并计算其平均失重值。

10. 试验的全过程应同时设不锈钢片浸泡蒸馏水的对照,浸泡前后的重量差应  $< 0.3 \text{ mg}$ 。否则,在找出原因后,重新进行试验。

### 三、注意事项

1. 每张砂纸只能磨一种金属材料。
2. 称重关系到结果的准确性,必须认真进行。接触样片的器具不得带有油垢。
3. 所用金属片大小、厚薄应严格一致,表面需磨光。
4. 试验期间,需换消毒剂溶液时,操作应迅速,勿使样片暴露空气中过久。
5. 当某试样腐蚀速率与该组平均值相差  $> 10\%$  时,应另取新样重新试验。
6. 金属样片仅可使用一次,否则影响试验的准确性。
7. 称重时,应戴洁净手套,勿以手直接接触样片。

## 第二节 测试结果的计算与判定

### 一、金属腐蚀速率的计算

金属腐蚀性试验结果,以金属腐蚀速率( $R$ )表达。按照第一节试验,测得的各金属片的重量,按照下列计算公式,计算腐蚀速率  $R$ 。在计算时应减去空白对照组样片的失重值。

$$R = \frac{8.76 \times 10^7 \times (M - M_l - M_k)}{S \times t \times d}$$

式中  $R$  为腐蚀速率( mm/年 );  $M$  为试验前金属片重量( g );  $M_l$  为试验后金属片重量( g );  $M_k$  为化学处理去除腐蚀产物样片失重值 ( g ) , 试验中未进行化学清除处理者, 计算时在公式中删去  $M_k$  值 ;  $S$  为金属片的表面积总值(  $\text{cm}^2$  );  $t$  为试验时间( h );  $d$  为金属材料密度(  $\text{kg/m}^3$  )。

## 二、腐蚀性分级标准

腐蚀速率( $R$ )	级别
< 0.005	无腐蚀
0.005 ~ < 0.010	基本无腐蚀
0.010 ~ < 0.100	轻度腐蚀
0.100 ~ < 1.000	中度腐蚀
$\geq 1.000$	重度腐蚀

(李新武)

## 参考文献

- 1 GB10124-88. 金属材料实验室均匀腐蚀全浸的实验方法1988
2. 中华人民共和国卫生部 . 消毒技术规范 . 第一分册实验技术规范 . 1999:80

## 第二十六章 消毒剂稳定性试验

消毒剂的使用在控制疾病爆发流行，防止医院感染及家庭卫生消毒等方面发挥着重要作用。然而不同温度、湿度条件下，保存不同时间对消毒剂杀灭微生物有效成分含量和杀灭微生物能力均有影响，消毒剂稳定性鉴定试验是在实验室条件下测定消毒剂存放中杀灭微生物有效成分含量和杀灭微生物能力的变化情况，以便为消毒剂的生产、包装、存放和运输条件及制定有效期提供参考。

### 第一节 试验条件与方法

#### 一、试验基本原则

1.稳定性鉴定试验按存放条件分为加速试验和长期试验 加速试验适用于在  $54^{\circ}\text{C}$  或  $37^{\circ}\text{C}$  保存条件下较稳定的消毒剂。长期试验适用于产品使用说明书中表明需要在阴凉处保存的消毒剂和厂家明确说明不能在  $54^{\circ}\text{C}$  或  $37^{\circ}\text{C}$  条件下保存的消毒剂以及厂家要求产品的有效期超过 2 年的消毒剂，并以其测定结果作为确定该消毒剂最终有效期的依据。

2.按测定方法分为化学法和微生物法 测定消毒剂稳定性时，首选化学法测定杀灭微生物有效成分含量的变化。对尚无适宜化学测定方法者，可用微生物法测定杀灭微生物能力的变化。

#### 3.结果的评价

(1)在应用化学法时，存放后杀灭微生物有效成分含量下降超过产品企业标准规定含量的下限值(该值应根据产品原料、工艺流程允许的误差范围科学、合理地确定，而不可为了通过稳定性鉴定试验而任意扩大下限值)为有效成分含量有明显变化。

(2)在应用微生物法时，对只使用原液的消毒剂，存放后杀灭微生物效果低于安全使用水平者，及对需稀释后使用的消毒剂，存放后杀灭微生物达到消毒合格所需的最短时间长于存放前所需最短时间者，为杀灭微生物能力有明显变化。

#### 二、材料和试剂

##### 1.对供试品的要求

(1)供试品应为包装完整的同一产品的 3 个批次。

(2)消毒剂的供试品应是具有一定规模批量生产的产品，其配方与生产工艺应与大规模生产一致。

(3)供试品的质量标准应与各项基础研究和检测所使用的供试品质量标准一致。

(4)加速试验和长期试验所用供试品的容器和包装材料及包装规格应与上市产品一致。若产品为大桶包装，应改用模拟小包装，其包装材料和封装条件应与大桶包装的内包装一致。

2.恒温恒湿箱:温度波动范围应控制在  $\pm 2^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度波动范围应控制在  $\pm 5\%$ 。

3. 化学法测定所用仪器、设备、器材和试剂。

4. 微生物检测所用仪器、设备、器材和试剂。

### 三、试验方法

#### 1. 加速试验

(1) 存放方法: 将 3 个批次的供试品置  $54^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿箱内 14 d 或  $37^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿箱内 90 d (在上述两温度下对于粉剂或片剂等固体消毒剂要求相对湿度  $75\% \pm 5\%$ , 对溶液或混悬液等液体消毒剂可不要求相对湿度)。

(2) 检测方法: 分别测定存放前、后消毒剂的有效成分含量或杀灭微生物能力。

(3) 评价方法

①  $54 \pm 2^{\circ}\text{C}$  存放 14 d, 杀灭微生物有效成分含量或杀灭微生物能力无明显变化, 则存放有效期可定为一年。

②  $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$  存放 90 d, 杀灭微生物有效成分含量或杀灭微生物能力无明显变化, 则存放有效期可定为两年。在加速试验条件下, 消毒剂的杀灭微生物有效成分含量或杀灭微生物能力有明显变化, 该消毒剂的有效期暂不作确定, 应按长期试验的方法进行试验, 以确定有效期。

#### 2. 长期试验

(1) 存放方法: 将 3 个批次的供试品置  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  恒温恒湿箱内, 存放 12 个月 (对于颗粒、粉剂或片剂等固体消毒剂要求相对湿度  $60\% \pm 5\%$ , 对溶液或混悬液等液体消毒剂可不要求相对湿度)。12 个月后仍需继续观察者, 可存放至观察结束。

(2) 检测方法: 分别于存放前和存放后第 3、6、9 和第 12 个月, 分别测定消毒剂杀灭微生物有效成分含量或杀灭微生物的能力。如于 12 个月后仍需继续观察时, 分别于存放至第 18 和 24 个月及以后每隔 12 个月取样进行检测, 直至有明显变化为止。

(3) 评价方法: 以杀灭微生物有效成分含量或杀灭微生物能力无明显变化的最长存放时间作为消毒剂的有效期。对能够测定杀灭微生物有效成分含量的消毒剂, 若未取得足够的数据 (如只有 12 个月的数据), 则应进行统计分析, 以确定消毒剂的有效期 (见本章第二节)。

3. 化学法按《消毒技术规范》(第三版 第一分册 实验技术规范 1999.11) 4.1 项的方法测定各种消毒剂杀灭微生物有效成分含量, 每批次供试品各测 1 份样品, 每份样品重复测定 3 次, 取其平均值, 每份样品 3 次测定值误差率不得  $> 0.5\%$ 。3 个批次供试品批间误差率  $\leq 5\%$ , 则取其平均值作为判定依据。若其批间误差率  $> 5\%$ , 则以下降率最大者作为判定依据。

4. 微生物法 本法仅适用于尚不能以化学法测定杀灭微生物有效成分含量的消毒剂, 如某些植物提取物或其他尚无适宜化学测定方法的消毒剂等。

(1) 将按规定方法存放的 3 个批次供试品等量混合后取样, 按《消毒技术规范》(第三版 第一分册 实验技术规范 1999.11) 2.2、2.4、2.6 和 2.9 项的方法检测各种消毒剂杀灭微生物能力。

(2) 在杀灭微生物试验中, 所用指标微生物应为使用说明书中拟杀灭微生物中抗力最强者。

(3) 对只使用原液进行消毒的消毒剂, 存放后, 仍用消毒剂原液进行杀灭微生物试验。对可稀释后进行消毒的消毒剂, 存放后, 其杀灭微生物试验所用浓度按下列公式计算。

杀灭微生物试验用浓度 =  $C_1 + (C_2 - C_3)/T$

式中,  $C_1$  为存放前杀灭微生物的最低有效浓度;  $C_2$  为消毒剂的标识浓度或标识浓度范围的平均值;  $C_3$  为消毒剂产品企业标准规定含量的下限值或标识浓度的下限值;  $T$  为将消毒剂配制存放前杀灭微生物的最低有效浓度所需稀释倍数。

(4) 杀灭微生物试验的作用时间及其他试验条件均应与存放前杀灭微生物试验相同。

## 第二节 长期稳定性鉴定试验中确定有效期的统计分析方法

### 一、目的

通过长期试验实测结果推测消毒剂的有效成分含量下降小于产品企业标准规定含量下限值的最长保存期限。

### 二、统计分析步骤

1. 根据消毒剂杀灭微生物的有效成分含量变化, 即按照长期试验测定数据, 以实测消毒剂有效成分含量 ( $Y$ ) 对存放时间 ( $X$ ) 进行直线回归, 得出回归方程,  $\hat{Y} = a + bX$ ,  $b =$

$$\frac{\sum(X - \bar{X})(Y - \bar{Y})}{\sum(X - \bar{X})^2} = L_{xy}/L_{xx}, a = \bar{Y} - b\bar{X}$$

2. 出不同存放时间有效成分含量的计算值( $\hat{Y}$ )。

3. 后计算  $\hat{Y}$  值 95% 单侧可信限的置信区间下界( $\hat{Y} - Z$ )。

式中:

$$Z = t_{0.05(n-2)} S \sqrt{1/n(X_0 - \bar{X})^2 / \sum(X_i - \bar{X})^2},$$

0.05 -  $(n-2)$  是概率为 0.05, 自由度为  $n-2$  的  $t$  单侧分布值, 可从统计学书中查到。

$n$  为长期试验的测定时间点数。

$$S = \sqrt{\frac{Q}{n-2}}$$

$Q = L_{yy} - bL_{xy}$ ;  $b$  为直线斜率

$$L_{yy} = \sum Y^2 - (\sum Y)^2/n$$

$$L_{xy} = \sum XY - (\sum X)(\sum Y)/n$$

$X_0$  为给定自变量(不同存放时间)

$\bar{X}$ : 为自变量  $X$  的平均值

4. 将计算出的  $\hat{Y} - Z$  各点连接可得出置信区间下界曲线。

5. 取产品质量标准规定的产品含量下限值与置信区间下界线相交点对应的时间, 即为消毒剂的有效期。

6. 将该消毒剂的下限值、 $\hat{Y} = a + bX$  与  $\hat{Y} - Z$  拟合得一方程, 即该消毒剂的下限值 =  $a + bX - Z$ , 通过解此方程, 求出  $X$  值即有效期。

例: 某消毒剂的标识浓度为  $5000 \pm 500$  mg/L, 长期试验于 0、3、6、9、12 和 18 个月测定的浓度见表 26-1 浓度( $Y$ )项, 按下列步骤计算有效期。

表 26-1 某消毒剂实测浓度与时间的回归方程的计算

试验序号	保存时间(X)	浓度(Y)	X·Y	X <sup>2</sup>	Y <sup>2</sup>
1	0	5 000	0	0	25 000 000
2	3	4 950	14 850	9	24 502 500
3	6	4 910	29 460	36	24 108 100
4	9	4 840	43 560	81	23 425 600
5	12	4 790	57 480	144	22 944 100
6	18	4 710	84 780	324	22 184 100
总和	48	29 200	230 130	594	142 164 400
平均值	8	4 866.667			
Lxx	210				
Lyy	57 733.333				
Lxy	- 3 470				
B	- 16.52381		S = 9.9462843		
A	4 998.8571				

查统计表得  $t_{N-2} = 2.132$

(1)回归方程为

$$Y = a + bX$$

$$= 4998.8571 - 16.5238X$$

$$Z = 2.132 \times 9.9463 [1/6 + (X_0 - 8)^2/210]^{1/2}$$

(2)各时间点指示量的计算值( $\hat{Y}$ )见表 A<sup>2</sup>。

(3)然后计算  $\hat{Y}$  值 95%单侧可信限的置信区间下界( $\hat{Y} - Z$ ),见表 26-2。

(4)将计算出的  $\hat{Y} - Z$  各点连接可得出置信区间下界曲线。

(5)取产品质量标准规定的产品含量下限值与置信区间下界线相交点对应的时间,即为消毒剂的有效期。有效期为 28 个月。

(6)拟合方程求解

将该消毒剂的下限值 4 500 mg/L,将回归方程与  $\hat{Y} - Z$  拟合得一方程,即  $4\,500 = \hat{Y} - Z = 4\,998.857 - 16.524X - 2.132 \times 9.9463 \times [1/6 + (X - 8)^2/210]^{1/2}$

求解二次方程  $X^2 - 60.7305X + 917.8484 = 0$  得  $X = 28.32$ ,所以该消毒剂的有效期为 28 个月。

### 三、注意事项

1.用统计分析方法确定的有效期,在消毒剂标签和说明书中均应标明在低于 25℃条件下保存,不得使用“室温”之类的名词。

表 26-2 计算 95% 单侧可信限的置信区间

时间( $X_0$ )月	$\hat{Y}$	$Z$	$\hat{Y} - Z$
1	4 982.333	13.41 154312	4 968.922
2	4 965.81	12.33 014778	4 953.479
3	4 949.286	11.33482273	4 937.951
4	4 932.762	10.45019021	4 922.312
5	4 916.238	9.706562281	4 906.532
6	4 899.714	9.138426239	4 890.576
7	4 883.19	8.779915934	4 874.411
8	4 866.667	8.657113859	4 858.01
9	4 850.143	8.779915934	4 841.363
10	4 833.619	9.138426239	4 824.481
11	4 817.095	9.706562281	4 807.389
12	4 800.571	10.45019021	4 790.121
13	4 784.048	11.33482273	4 772.713
14	4 767.524	12.33014778	4 755.194
15	4 751	13.41154312	4 737.588
16	4 734.476	14.55984342	4 719.916
17	4 717.952	15.76043143	4 702.192
18	4 701.429	17.0022341	4 684.426
19	4 684.905	18.27685248	4 666.628
20	4 668.381	19.57787822	4 648.803
21	4 651.857	20.90038042	4 630.957
22	4 635.333	22.2405282	4 613.093
23	4 618.81	23.59531509	4 595.214
24	4 602.286	24.96235768	4 577.323
25	4 585.762	26.3397478	4 559.422
26	4 569.238	27.72594335	4 541.512
27	4 552.714	29.11968684	4 523.595
28	4 536.19	30.51994423	4 505.671
29	4 519.667	31.92585844	4 487.741

2. 对很稳定的消毒剂（例如，利用统计方法推测其有效成分含量下降小于产品企业标准规定含量下限值的最长保存期限超过 3 年者）不宜用此统计分析推测其有效期，而应根据实际存放时间确定有效期。如用此统计分析推测的有效期超过 3 年者，其实际有效期只能定为 3 年。

（李新武）

#### 参考文献

- 1 中华人民共和国卫生部消毒技术规范, 第一分册实验技术规范, 消毒剂稳定性测定, 1999:79
- 2 国家药典委员会, 中华人民共和国药典 2000 年版二部, 附录 X IX C: 附录 197 药物稳定性试验指导原则

## 第二十七章 消毒机理研究方法

消毒机理研究是消毒研究的一项重要内容，它对消毒方法的改进和新的消毒药械的开发具有重要的指导意义。由于我国消毒研究起步较晚，消毒机理的研究尚较薄弱，只在近 10 年来才有了较大的发展，目前较常用的消毒机理研究方法主要有两个方面：一是应用普通光学显微镜和电子显微镜观察经消毒因子作用后微生物结构的变化；另一方面是应用免疫学和分子生物学技术检测消毒因子作用后微生物代谢和功能的变化。

### 第一节 电子显微镜技术

用普通光学显微镜和电子显微镜观察病原微生物经消毒因子作用后形态的变化，是消毒机理研究最常用的方法。普通光学显微镜只能初步分辨病原微生物的基本形态，而应用电子显微镜、包括透射电镜和扫描电镜技术，可以观察到病原微生物胞壁、胞膜、细胞核、细胞器等微细结构，成为研究消毒因子作用机理的重要手段。

#### 一、透射电镜

透射电镜是由电子通过样品时产生的吸收、干涉、衍射和散射作用形成像的反差，经放大后形成明暗不同的像。透射电镜的生物样品的制备方法主要有以下几个方面。

##### （一）载网与支持膜

因为电子的能量很弱，电子束不能透过玻璃，故用于透射电镜的标本，无论是细菌或病毒的悬滴标本还是细菌及病毒细胞培养物的超薄切片标本，均要置于一层极薄的支持膜上。支持膜厚度一般为 10~15 nm。支持膜附在一用铜或镍制成的直径为 3 mm 载网上。

载网在使用前必须经严格的洗涤，去除上面的污物方可使用。

支持膜的作用为支撑标本。支持膜很薄，电子容易透过，且有足够的机械强度，耐电子束轰击，本身无任何结构且对生物样品有化学稳定性。支持膜中最常用的有机材料薄膜为聚乙烯醇缩甲醛（Formvar）和火胶棉，将其溶于易挥发的有机溶剂中即可。

##### （二）微生物样品制备方法

1. 悬滴标本法 细菌、立克次体、螺旋体、支原体、病毒等微小颗粒标本可取其培养物经稀释或分离提纯后直接滴于附有支持膜的载网上用电镜观察。悬液应尽量除去杂质如培养基残渣、细胞碎片以及各种结晶等，以免干扰染色和电镜观察。另外，悬滴标本还应注意样品的浓度。浓度太浓，会因样品的堆积而影响观察，太稀则在电镜下较难找到样品。因此在制样时可同时选择几种不同的浓度进行滴样，挑选合适浓度的铜网进行观察。

2. 负染色技术 负染色是一种反衬染色，即高密度物质如重金属磷酸钙、醋酸铀等在投射电镜下形成黑色的背景反衬低密度的样品，从而清晰地显示出被衬物的细节结构。负染色技术更常用于观察病毒的形态结构。主要染色方法有三种：

（1）悬滴法：将带膜铜网粘附于滤纸上，吸一滴样品悬液滴于其上，静置片刻后用滤纸从铜



网边上吸去多余的样品悬液,未待样品干燥即滴上负染色液(常用为 1%~2% 的磷酸钙水溶液, pH 为 1 左右,用前用 1 mol/L KOH 或 NaOH 调至 pH 6.4~7.0),染色 1~2 min,用滤纸吸去多余的染色液,再用蒸馏水滴在铜网上洗 1~2 次,滤纸吸去水分,干后即可。

(2)喷雾法:将负染色液和样品悬液等量混合,用特制的玻璃喷雾器将混合液喷至有膜的铜网上,干后即可用电镜观察。

(3)漂浮法:用吸管吸取样品悬液滴于带蜡滤纸上,然后将铜网膜面覆盖于样品悬液上,1~2 min 后用镊子夹起铜网,滤纸吸去多余样品悬液后,膜面向下漂浮于另一带蜡滤纸上的负染色滴上。染色 1~2 min,用镊子夹起铜网,滤纸吸去多余染色液,干后即可用电镜观察。

有时由于病毒量少,用普通悬滴法在电镜下难以发现稀少散在的病毒粒子,则可用免疫吸附电镜法。利用相应的病毒抗血清来吸附病毒,其病毒的检出率高于一般悬滴法。

在研究消毒因子对病毒如乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、甲型肝炎病毒时均有使用该法的报道。

3. 超薄切片技术 尽管细菌、立克次体、螺旋体、支原体和病毒均为极微小的生物,但除病毒外,微弱的电子束仍无法透过其他微生物的整体标本,而需制作成 100 nm 以下厚度的超薄切片,才能看清其内部的微细结构。超薄切片技术包括取材、固定、漂洗、脱水、浸透、包埋聚合、切片、染色等一系列过程,操作较为复杂。

(1)取材:对于细菌、立克次体、螺旋体或病毒的分离培养物,必须注意其数量、浓度,如量太少,则无法进行。

(2)固定:固定是为保持微生物的结构并尽量保持在生活状态,并使标本在以后的漂洗、脱水包埋时,保护微生物成分不致流失和溶解。主要有物理和化学两种固定方法:物理方法系采用冰冻、微波照射、临界点干燥等手段来保存细胞,化学方法是通过固定剂与蛋白质发生化学结合形成交联来保持微生物生活时的形态和结构。目前常用的固定剂有:锇酸、戊二醛、多聚甲醛等。

(3)脱水:因包埋剂大多不溶于水,组织中若有游离水,包埋剂不能渗入内部,故在包埋前必须用脱水剂将有利水去除,常用脱水剂有乙醇或丙酮。

(4)浸透和包埋:浸透和包埋是使包埋剂逐步均匀地渗透到微生物体内,以便与微生物体外的包埋剂同时聚合,保证能切出理想的超薄切片。目前应用较为普遍的包埋剂为环氧树脂。

(5)制作超薄切片:包埋块在切片前须先进行修整,从而将包埋块内的标本暴露出来,同时提供一形状和大小合适的切面。然后再用切片机或切片刀进行切片,用载网收集切片,干燥后用重金属离子(如铀、铅等)染色,提高标本的反差。

## 二、扫描电镜

扫描电镜是有照明电子束在样品表面做光栅扫描运动,激发出样品浅表的电子(即二次电子)。二次电子经检测器检出,再经视频放大后在显像管中显示出来。应用扫描电镜可观察到物体的外表形貌结构,可用于研究消毒因子作用后微生物形态的变化。扫描电镜标本因不需制作超薄切片,制备方法较为简单。

### (一)标本的预处理

在高度真空的扫描电镜中观察的标本必须是干燥标本,因此样品必须经预处理,在尽量减少样品变形的条件下除去样品中的水分,提高样品耐受电子束轰击的能力,使样品表面有良好

的导电性能和二次电子发射率。预处理主要包括取材、表面清洁、固定、漂洗、脱水等过程。

## （二）样品的干燥

生物样品多数要经过干燥后才能镀金进行扫描电镜观察。因干燥会引起的微生物样品发生收缩和龟裂，该过程成为生物样品制样的关键步骤。目前常用的干燥方法有以下几种：

1. 空气干燥法 即将脱水的样品直接暴露于空气中使其自然干燥，因用此法干燥收缩变形较严重，不适合微生物样品的检测。

2. 临界点干燥法 其原理是当某一液体在一密闭的容器里，在特定的温度和压力下，由于液体膨胀，气体被压缩使二者密度相同，相互混合成一种均一的液体，这时存在于气相和液相之间的截面消失，表面张力等于零。在此状态下，使脱水置换剂（如液态  $\text{CO}_2$ ）缓慢放气而干燥。它是一种消除了物相 / 液相 / 气相界面，即消除了表面张力来源的干燥方法，不易引起样品的收缩和损伤，是最佳的干燥方法。

3. 冰冻干燥法 将冰冻的样品置于高真空中，通过升华除去样品中的水分和脱水剂。它不经过液态，使水分直接由固态转化为气态，不存在气相和液相之间的表面张力对样品的影响，避免了对样品的损伤。

## （三）样品粘胶装台

干燥的样品必须用导电胶固定在样品台上。常用的导电胶有两种：银粉导电胶和石墨粉导电胶。粘胶时应注意样品底部和样品台接触部位必须涂满导电胶，不能留空隙。如样品为细菌悬液，可将其滴于粘有双面胶纸的样品台上或小盖玻片上，再将小盖玻片粘于样品台上。如细菌培养物浓度太稀，也可通过滤膜将细菌置于滤膜上，再将滤膜粘于样品台上。

## （四）样品表面导电处理

生物样品表面电阻率很高，用扫描电镜观察时，常易产生荷电现象，且生物样品均由碳、氢、氧、氮等元素组成，二次电子的发射率高，讯号弱，难以获得足够的二次电子，形成必要的图像反差。所以生物样品在进行扫描电镜观察前，必须进行表面导电处理。常用方法有金属镀膜法和组织导电法。

金属镀膜法是采用特殊的装置（真空镀膜仪和离子溅射镀膜仪）将电阻率小的金属，如金、铂、钨等蒸发后覆盖于样品表面的方法。它为入射电子提供通路，消除荷电现象；提高了二次电子发射率，提高了图像反差，能获得细节丰富和分辨率高的图像；提高了样品表面的机械强度，增加了耐受电子束攻击的能力；能将二次电子的信息来源限定于样品表面，防止了组织内部的信息参与成像。

组织导电法是利用某些金属盐溶液对生物体中的蛋白质、脂肪类及淀粉等成分的结合作用，使样品表面离子化或产生导电性能好的金属化合物，从而提高样品耐受电子束轰击的能力和导电率。

# 三、电镜技术在消毒机理研究中的应用

电镜技术为人类探索微观世界的奥秘提供了极其有力的工具，应用扫描电镜和透射电镜比较作用前后微生物表面形态和内部超微结构的变化，是研究消毒因子杀灭微生物的作用机理极为常用的方法，在消毒学的研究方面得到了广泛的应用。

## （一）对病毒灭活机理的研究

因电子束对病毒较易穿透，应用电镜观察病毒的结构，采用负染色技术即可，无需制成超

薄切片。很早就有人应用透射电镜观察了消毒剂作用后 **HBV** 粒子的形态改变和崩解,他们认为,若在电镜下 **HBV** 颗粒形态完整无损,或膜蛋白外壳部分缺损、核心颗粒完整、负染色特征明显、双层外壳明显,空心 **HBV** 颗粒中心有暗染区或实心 **HBV** 颗粒中心呈白色、且大小均一,此时 **HBV** 仍具感染性;若 **HBV** 核心颗粒不同程度裂解,表面形成孔穴,负染色特征消失,甚至裂解成不定型样物质,则感染性消失。对水中脊髓灰质炎病毒、血浆中辛德比斯病毒和水泡性口炎病毒经消毒因子作用后形态结构的变化,均可用电镜进行观察。

张凌等在研究短波紫外线与交联淀粉碘联用灭活血浆中的鸭乙型肝炎病毒时,还采用固相免疫电镜法比较消毒前后病毒形态的变化。观察消毒因子对 **HBsAg** 灭活效果,也可采用此法。

## (二)对细菌杀灭机理的研究

应用电镜技术观察消毒因子作用后细菌特别是细菌芽孢结构的变化在消毒机理研究中尤为常用。芽孢因体积较大,一般采用超薄切片技术。刘怀田等在研究紫外线与乙醇协同对枯草杆菌黑色变种芽孢杀灭机理研究中应用了透射电镜观察芽孢经作用后超微结构的变化。他们发现,未经消毒因子作用时,正常芽孢的结构包括:壳层、壳下层、皮质和核心四部分。壳层又分电子密度较高的外壳层和叠层结构的内壳层,内壳层下为电子密度较低的壳下层,形状为圆形或椭圆形。经消毒因子作用后,芽孢的壳层肿胀,内壳层层次消失,难与外壳层区分,核心电子密度下降。

张朝武等研究碘伏对蜡状杆菌芽孢的杀灭机理发现,经 **0.01%** 有效碘作用 **5 min**,电镜下可见壳质层肿胀,随作用时间延长,改变愈明显。至作用 **60 min**,芽孢壳质层崩解,核心溶解漏出,电镜下可见大范围的透电子区。

黄英及段燕文等用国产 **WD** 复合碘所做的试验,以金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草杆菌黑色变种芽孢和白色念珠菌为试验对象。除用电镜观察外,还采用了扫描电子显微探针能谱分析,对芽孢中 **P、S、Ca** 的变化进行了分析,用超微结构细胞化学技术对碱性磷酸酶、酸性磷酸酶及细胞色素氧化酶的变化进行了分析。对金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和白色念珠菌在消毒剂作用后,用扫描电镜观察,可见菌体膨胀,折光性降低,表面凹陷,菌体皱缩,局部断裂破损;用透射电镜观察,可见细胞壁溶解,细胞器结构模糊不清,呈破碎状态,细胞内容物明显减少,形成大片透电子区。枯草杆菌黑色变种芽孢经消毒剂作用后扫描电镜观察由长变粗,表面纹理增粗,相互熔融粘连;透射电镜观察芽孢壳质层肿胀,内壳层层次不清或消失,局部电子密度稀疏,出现透电子区,且可见薄薄的空壳结构。

边藏丽等应用透射电镜观察了由臭氧导致大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌和蜡状杆菌 **L** 型变化,发生细胞壁缺损的情况。许欣等在扫描电镜下观察大肠杆菌为表面光滑,两端钝圆的短杆状,消毒剂新洁灵作用后菌体变形,表面有粘附物。透射电镜观察,正常大肠杆菌胞壁胞膜完整、光滑,胞壁紧贴胞膜,胞浆内容物均匀,消毒剂作用后,菌体变形,胞壁胞膜间空隙加宽,胞壁表面出现皱褶并部分模糊不清,胞浆内容物不均匀,随消毒剂作用时间的延长,胞浆内容物出现固缩。

## 第二节 分子生物学技术

应用免疫学和分子生物学的技术观察消毒因子作用后微生物功能的改变和代谢的影响,主要有研究菌体膜结构的改变(如渗透性),胞浆内各细胞器(如酶活性、线粒体、脂肪粒等)的改变及胞核(如 **DNA** 和 **RNA**)的影响等。因免疫学和分子生物学的技术极为多样,现只简要介绍其中几种。

### 一、多聚酶链反应(PCR)

**PCR** 是一种模拟天然 **DNA** 的复制过程,在体外扩增特异性 **DNA** 或 **RNA** 片段的技术,又称为无细胞分子克隆技术。它以待扩增的两条 **DNA** 链作为模板,由一对人工合成的寡核苷酸引物介导,以 **dNTP** 为底物,通过 **DNA** 多聚酶促反应,于体外快速扩增特异性 **DNA** 序列。

**PCR** 过程大致可分下列步骤:

1.模板 **DNA** 变性 在 **90~95℃** 高温加热下,靶 **DNA** 变性,双链解离成为两条单链,成为杂交模板。

2.模板 **DNA** 分子与互补引物结合 在确定了模板 **DNA** 的特异序列之后,按碱基互补配对原则,设计并合成两段与各自 **DNA** 双链 3'端互补的寡核苷酸作为引物。

3.引物的延伸 结合于模板上的引物,在 **DNA** 聚合酶的催化下,利用反应体系中的 4 种 **dNTPs** 为原料,按碱基互补配对的方式延伸,分别合成两条新的 **DNA** 链。

上述反应由温度控制,在反应体系中,如温度升高,模板 **DNA** 解链,为变性;温度降低时,两种引物分别与变性后的正、负股 **DNA** 链互补结合,即复性。这种变性 - 复性 - 延伸的过程即为一个 **PCR** 循环。

在研究消毒因子对微生物核酸的破坏作用时,**PCR** 技术是最常应用的方法。目前常用的 **PCR** 有巢式 **PCR**、反转录 **PCR**、免疫 **PCR** 等。

### 二、核酸杂交技术

核酸杂交技术是基于两条同源单链核酸在一定条件下发生碱基配对形成双链的原理,通过将标记已知核酸片段作为探针,与待测标本核酸进行杂交反应,即可观察到样本核酸中相应的基因,基本步骤为:

1.核酸的制备 即通过核酸纯化技术获得相当完整和纯度的核酸。

2.电泳 一般为琼脂糖凝胶电泳。

3.转印 基于核酸带有负电荷的原理,采用电转印方法。

4.探针标记

5.杂交

6.检测 有两种方法:放射自显影(用于同位素标记核酸探针的检测)和化学显影(用于化学标记探针的检测)。

核酸杂交的种类按照杂交相可分为液相杂交和固相杂交,按照杂交标记的不同可分为放射杂交和荧光杂交,按照杂交检测分子及手段的不同可分为 **Southern** 杂交、**Northern** 杂交、**DNA** 点(狭缝杂交)、**RNA** 点(狭缝杂交)、原位杂交、减法杂交、动物园杂交、基因芯片、同 **PCR** 相结

合杂交(分子灯塔、原位 PCR、抑制性差减杂交 PCR、DNA 代表性差异分析等)等。

### 三、分子生物学技术在消毒机理研究中的应用

应用分子生物学技术在消毒因子作用机理的研究方面,主要表现在对核酸损伤的研究。研究结果显示,大多数消毒因子均可与微生物的核酸作用,引起核酸结构和功能的改变,从而阻止病原微生物复制和转录的进行,达到灭活的目的。紫外线对微生物的杀灭是由于它作用于 DNA 的胸腺嘧啶和 RNA 的尿嘧啶,使其形成胸腺嘧啶键二聚体和尿嘧啶键二聚体,使微生物失去复制和转录能力而死亡。超声波可将 DNA 降解,引起 DNA 双螺旋的中断。 $H_2O_2$  引起 DNA 损坏的主要根源是  $H_2O_2$  的产物  $HO\cdot$ ,它既具有高度亲电性,又具有高度热反应性,可使腺嘌呤的  $C_7$  和  $C_8$  之间的双键打开,与  $C_8$  结合形成 8-羟基腺嘌呤自由基并进一步使咪唑开环。 $H_2O_2$  还可使 DNA 或 RNA 单链发生断裂,且随浓度的增加,单链断裂数增加。 $H_2O_2$  还可引起 DNA-蛋白质和 DNA-DNA 交联。甲醛可与 DNA 嘧啶环或嘌呤环上的氨基结合。补骨脂素光化学用于血液消毒时,补骨脂素进入细胞的膜结构和病毒的包膜,可逆地插入核酸的碱基中间,在长波紫外线的照射下,呋喃端先与双股螺旋上的嘧啶碱基形成共价键,在吸收一个光子之后,吡喃酮端与另一股螺旋上的嘧啶形成共价键,从而形成共价交联桥,阻止细胞或病毒的复制和转录。

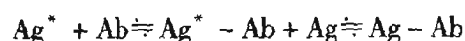
## 第三节 免疫学技术

放射免疫技术、酶联免疫技术、免疫扩散技术、免疫电泳技术、免疫荧光技术、免疫凝集技术等,在消毒机理研究中都有较为广泛的应用,现仅简要介绍放射免疫技术和酶联免疫技术的基本原理和过程。

### 一、放射免疫技术

放射免疫技术是研究消毒因子作用机理中较常用的免疫学技术。它是根据同位素分析的敏感性和抗原-抗体反应的特异性两大特点综合起来建立的一种检测技术,其基本原理是标记抗原( $Ag^*$ )和非标记抗原( $Ag$ )对特异性抗体的竞争性反应。

竞争反应用下式表示:



非标记抗原和标记抗原与特异性抗体的结合能力是相同的。标记抗原与特异性抗体结合形成标记抗原-抗体复合物,非标记抗原与特异性抗体结合形成非标记抗原-抗体复合物。如果标记抗原与特异性抗体的量保持一定,并且标记抗原与非标记抗原相互竞争与有限量的特异性抗体结合,随着非标记抗原量的增加,标记抗原被稀释的程度随着增加,继之形成的抗原抗体复合物的数量减少,放射性强度就降低。

在放射免疫分析方法中,最常用的核素为  $^{125}I$ ,可采用氯胺 T 碘化标记法、联接标记法、乳过氧化物酶法、葡萄糖氧化酶碘化标记法进行标记。

### 二、酶联免疫技术

酶联免疫分析是利用了免疫反应的高度特异性和酶促反应的高度敏感性,进行对抗原或

抗体的检测，是一种定量和定性的综合性技术。酶联免疫技术按是否将抗原或抗体结合到固相载体上分为固相酶免疫测定法、均相酶免疫测定法、双抗体酶免疫测定法。

固相酶免疫测定是将待测抗原或抗体结合到固相载体上，再通过免疫酶的结合和底物显色过程进行检测，又分为酶联免疫吸附实验、限定抗原底物珠法和免疫酶测定实验等。其中酶联免疫吸附实验是目前最常用的固相酶免疫测定法，在消毒研究中有极广泛的应用。现以双抗体夹心法简要介绍其基本过程：

- 1.用纯化的特异性抗体或含有特异性抗体的抗血清包被酶标反应板，孵育后洗涤。
- 2.用封闭液封闭酶标反应板，孵育后洗涤。
- 3.加入待测样品，孵育后洗涤。
- 4.加入酶标记的特异性抗体，孵育后洗涤。
- 5.加入酶底物，测定酶促反应强度。

均相酶免疫测定法用于检测小分子半抗原，半抗原与酶标记物结合后，可使酶的活性受到抑制或激活，但当再与相应抗体结合后，其酶活性被激活或抑制。

双抗体酶免疫测定法是一类介于二者之间的测定方法，主要利用抗原与抗体之间的可逆结合，以及抗原与抗体比例适当时可交联形成大分子复合物的原理进行的。

除此之外，免疫扩散技术、免疫电泳技术、免疫荧光技术、免疫凝集技术等消毒机理研究中都有较为广泛的应用，在此不再一一列举。

### 三、免疫学技术在消毒机理研究中的应用

应用免疫学的技术主要检测消毒因子作用后微生物功能的改变和代谢的影响，包括菌体膜结构的改变(如渗透性)、胞浆内各细胞器(如酶活性、线粒体、脂肪粒等)的改变等。

金属离子可与病毒衣壳发生循环往复的氧化还原反应而产生多处复合伤，从而改变病毒表面结构使其灭活。含氯消毒剂在水中形成次氯酸，次氯酸分解形成的新生态氧均可直接作用于蛋白质，使其氧化或破坏磷酸脱氢酶，致微生物死亡。碘制剂与脊髓灰质炎病毒的蛋白质衣壳反应，破坏其对 **HeLa** 细胞的吸附，使它的等电点由 **7.0** 降为 **5.8**。戊二醛可与细胞膜上氨基酸形成交联产物，引起膜结构的变化。研究臭氧对肠道病毒的灭活机理发现，臭氧可对其敏感的氨基酸残基(半胱氨酸残基、色氨酸残基、蛋氨酸残基)发生反应而可破坏病毒蛋白衣壳。臭氧还可与细菌细胞壁脂类双键反应，穿入菌体内部，作用于脂蛋白和脂多糖，改变细胞的通透性，从而导致细胞溶解、死亡。

### 四、酶活性的测定

检测消毒因子作用前后微生物体内酶活性的变化，也是消毒机理研究的一个常用方法。测定酶的活性，可从单位时间内一定条件酶促反应中底物的消耗量或产物的生成量来测定。因底物在反应体系中总是过量的，测定底物的变化不易达到精确，故常用测定产物的增加来反映酶的活性。常用的方法有：

1 抽样终止法 让被测酶与底物在适当的缓冲系统中温育一定时间后，终止酶反应，取出一定体积的反应液，测定底物生成或底物减少量。至少测 3 次，以反应时间为 0 做对照。

2 连续测定法 用一起连续检测整个酶促反应过程中底物的消耗或产物的生成，也称为动态测定法，是测量酶活性较为理想的方法。可采用分光光度法、荧光分析法和自动分析仪

法。

3. 快速反应追踪法 可用于追踪极短时间 ( $10^{-7}$  s 以下) 内反应过程的方法。将酶液和底物分别盛入注射器, 同时压入混合器进行反应, 用电子记录装置记录反应瞬间的吸光值或荧光光度的变化。其代表有停流法和温度跃变法。

刘体全等在研究氮酮抑菌机理时发现, 氮酮作用后革兰阳性菌体内多种酶 (门冬氨酸氨基转移酶、乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶、肌酸磷酸激酶同工酶、 $\alpha$ -羟丁酸脱氢酶、丙氨酸氨基转移酶、谷酰转氨酶、淀粉酶等) 大量外漏, 说明氮酮导致菌体细胞壁结构破坏, 而革兰阴性菌则无此现象。 $H_2O_2$  可与生物酶中所含的金属离子反应产生  $HO\cdot$ , 使酶灭活。如  $0.25\text{ mmol/L } H_2O_2$  能使大肠杆菌中 90% 含铁超氧化物歧化酶灭活; 用 6%  $H_2O_2$  对白色念珠菌作用 30 min, 其琥珀酸脱氢酶和酸性磷酸酶活性明显降低。咪康唑和酮康唑对白色念珠菌中细胞色素氧化酶及 ATP 酶的活性, 从而抑制了细菌线粒体中的呼吸系统, 阻断呼吸链的电子传递。

(饶林)

#### 参考文献

- 1 孙志贤, 主编. 现代生物化学理论与研究技术. 北京: 军事医学科学出版社, 1995
- 2 严杰, 主编. 现代微生物学实验技术及其应用. 北京: 人民卫生出版社, 1995
- 3 朱立平, 主编. 免疫学常用实验方法. 北京: 军事医学科学出版社, 1999
- 4 薛广波, 主编. 实用消毒学. 北京: 人民军医出版社, 1990

## 第二十八章 消毒剂毒理试验

### 第一节 消毒剂毒理试验的意义

#### 一、毒理试验为消毒剂安全性评价提供科学依据

一种合格的消毒剂,不仅要具有消毒灭菌的功效,保质期较长(对金属、织物等)无腐蚀性,生产成本(或销售价格)低,而且必须对人体安全、无毒副作用。在消毒剂使用的条件下,对于接触消毒剂人群的健康能否造成损害,这是衡量消毒剂优劣的重要指标。因此,必须对消毒剂进行安全性评价。

消毒剂安全性评价(safety evaluation)是指在通常使用消毒剂条件下对接触个体和人群健康损害的评估,其目的是通过消毒剂进入市场前后的安全性评审和监督控制消毒剂的质量,保障人体健康。消毒剂安全性评价,主要是依据毒理试验。经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)为规范世界各国对化学物(包括消毒剂)安全性评价的毒理试验,制定了一系列的毒理试验准则和具体的毒理试验方法。我国卫生部《消毒技术规范》(第三版,1999)是目前我国对消毒剂市场准入评审的技术法规。该法规详尽地规定了对各种消毒剂安全性评价的毒理试验项目,毒理试验方法及市场准入的标准。因此,毒理试验结果是消毒剂安全性评价的科学基础和准许消毒剂进入市场的科学依据。

虽然自20世纪50年代后期,由于考虑化学物的致癌作用,关于化学物对人体健康损害的评价,采用危险度评价(risk assessment)的术语,比安全性评价术语从理论上更科学些,但两种评价的基本理论与方法一致。鉴于危险度评价包括危害鉴定(hazard identification)、剂量-反应关系评定(dose-response relationship assessment)、接触评定(exposure assessment)、危险度表征(risk characterization)四个步骤,程序繁杂,工作量太大,可操作性差,故我国迄今对健康相关产品(包括消毒产品)仍采用安全性评价的术语和方法。

#### 二、毒理试验是制定消毒卫生标准的基础

消毒剂卫生标准可分为消毒剂的环境卫生标准和消毒剂产品的安全性标准,前者是对在生产车间或外界大气中消毒剂含量的规定;后者是在使用消毒剂的情况下对消毒剂含量或必做某些毒理试验的规定。由于消毒剂有单方和复方之分,而且其中大部分为复方,即使一些消毒剂复方组分相同,但其含量亦异,因此消毒剂产品的安全性标准大多是依据消毒剂的特点和应用方式对于毒理试验及其制定标准的规定。

消毒剂卫生标准,实际上是对消毒剂剂量的限量值,其目的是使接触消毒剂个体或人群的健康不受损害。制定消毒剂卫生标准的主要方法是毒理学方法和流行病学方法。毒理学研究在制定消毒卫生标准时具有以下优点:①可根据研究的目的和要求,人为地控制消毒剂的暴露水平和强度(包括剂量和时间),进行单一因素研究,客观地获得剂量-反应关系,这一方面正



是流行病学现场调查难以做到的。②可通过活体组织检查和组织病理学,评价和确定消毒剂对各器官系统和组织细胞的毒理作用。因此,毒理试验是制定消毒剂卫生标准的基础。

一般制定消毒剂环境卫生标准时需要进行一系列的毒理试验,主要包括以下几个方面内容:①毒物代谢动力学试验。通过研究消毒剂在体内的吸收分布、代谢和排泄等过程,为阐明消毒剂在体内的转归、生物学效应和毒性作用机理提供可靠资料,并为确定安全系数提供依据。②毒性试验。毒性是指消毒剂接触或进入机体内部的易感部位后能引起有害生物学作用的相对能力,是研制安全性卫生标准的重要的毒理学参数。毒理试验通常包括全身毒性试验(急性毒性试验、蓄积毒性试验、亚慢性毒性试验和慢性毒性试验)特殊毒性试验(致突变试验、致畸试验和致癌试验)局部作用试验(皮肤刺激试验、眼刺激试验、阴道黏膜刺激试验)和致敏作用试验(皮肤变态反应试验)。③剂量-反应关系研究,这是确定生物阈值和卫生基准的重要毒理学资料。④毒理学资料的外推,这是指用从动物试验中所获得的高剂量-效应资料来预测消毒剂对人的低剂量效应,以解决人接触环境中和产品中消毒剂的安全剂量(浓度)问题。制定消毒剂产品的安全性标准时,必须包括全身毒性试验和特殊毒性试验。此外,根据消毒剂接触人体的方式,还增做一些相应的毒理试验。例如,对于皮肤消毒剂,需增做皮肤刺激试验;对于妇科消毒洗液,需增做眼刺激试验和阴道黏膜刺激试验;对于空气消毒剂,需增做吸入毒性试验等。综上不难看出,无论是制定消毒剂的环境卫生标准,还是制定消毒剂的安全性标准,均必须做一系列配套的毒理试验,因此,毒理试验是制定消毒卫生标准的基础。

至今国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)已制定和颁布了很多的消毒剂安全性标准,其中详细地规定了毒理试验方法和判断标准,例如,ISO 10993-3:1992 医疗器械生物学评价第三部分:遗传毒性、致癌性和生殖毒性试验 ISO 10993-10:1995 医疗器械生物学评价第十部分:刺激与致敏试验;ISO 10993-11:1993 医疗器械生物学评价第十一部分:全身毒性试验等。上述国际标准,均被等同采用为我国国家标准 GB/T 16886.3-1997、国家标准 GB/T 16886.2000 及国家标准 GB/T 16886.11-1997。

## 第二节 消毒剂毒理试验的原则和程序

### 一、消毒剂毒理学试验的原则

#### (一)保障按常规使用消毒剂对人体安全的原则

消毒剂的主要成分是化学物质。一定量的化学物质进入体内或接触人体局部,均有可能引起人体健康的危害。因此,在研究开发消毒剂及卫生行政部门审批消毒剂产品时,都必须对消毒剂进行毒理学试验,保障使用消毒剂对人体健康没有任何危害。至于对人体健康的保护水平定位到什么程度?通常是与卫生标准制订原则是一致的,即在按常规使用消毒剂的情况下,对人体不产生任何功能或形态方面的损害,对后代也不产生任何不良的影响。

#### (二)采用分阶段系统法逐级进行毒理学试验的原则

化学物质的毒性,大致可分为一般毒性和特殊毒性。一般毒性包括急性毒性、蓄积毒性、亚慢性毒性和慢性毒性;特殊毒性包括致突变性、致畸性和致癌性。一般来说,化学物质的急性毒性较高,则其蓄积毒性、亚慢性毒性和慢性毒性亦相应较高;化学物质的致突变性较强,则其致癌性亦相应较强;反之亦然。因此,对于毒性评价采用分阶段系统法进行毒理学试验已被

世界各国所公认。当然,除了一般毒性和特殊毒性外,化学物质毒性还包括局部作用毒性(如对皮肤、黏膜的刺激作用)及对特殊人群的致毒性作用等。

### (三)依消毒剂特点区别选择毒理学试验的原则

1. 依据消毒剂使用的状态,选择一些必要的毒理学试验项目。如果消毒剂为气体、蒸汽或气溶液状态,必须增做急性吸入实验;根据消毒剂的成分,估计可能对眼睛具有刺激作用者,还需做眼刺激实验。

2. 依据消毒剂接触人体的方式,选择一些必要的毒理学试验项目。如果消毒剂为手和皮肤消毒剂,必须增做皮肤刺激实验;根据消毒剂的成分,估计可能有致敏作用者,还需做皮肤变态反应实验。如果消毒剂为黏膜消毒剂,必须增做眼刺激实验和阴道黏膜刺激实验。

3. 依据消毒剂产品的来源和特点,消毒剂分为以下三类,并做相应的毒理学试验项目。

(1) 第一类消毒剂:指我国首创或根据国内外文献报道首次进行生产的新消毒剂,原则上需要进行四个阶段的毒理学试验。首先必须做急性经口毒性实验(包括大鼠和小鼠)、蓄积毒性实验、亚慢性毒性实验、致畸实验和三项致突变实验(包括反映基因水平、体细胞染色体水平和性细胞染色体水平的三种类型实验)。根据实验结果,判定是否需做其他实验项目。

(2) 第二类消毒剂:指从国外进口在我国销售的消毒剂,或国外已批准生产、现由我国生产的消毒剂。必须做急性经口毒性实验、蓄积毒性实验和两项致突变实验(包括反映基因水平和染色体水平的两种类型实验)。根据实验结果,判定是否需做其他实验项目。

(3) 第三类消毒剂:指与国内已获准生产的消毒剂属于同类的产品。必须做急性经口毒性实验、蓄积毒性实验和一项致突变实验。根据实验结果,判定是否需继续做其他实验项目。

## 二、消毒剂毒理学试验的程序

消毒剂安全性评价的毒理学试验,是按系统分以下四个阶段:

### (一)第一阶段毒理学试验(急性毒性实验、皮肤刺激实验和黏膜刺激实验)

- 1 急性经口毒性实验。
- 2 急性吸入毒性实验。
- 3 皮肤刺激实验。
- 4 眼刺激实验。
- 5 阴道黏膜刺激实验。
6. 皮肤变态反应实验。

### (二)第二阶段毒理学试验(蓄积毒性实验和致突变实验)

#### 1. 蓄积毒性实验

(1) 20 d 蓄积毒性实验;

(2) 剂量递增蓄积系数法实验。

#### 2. 致突变实验

(1) 体外哺乳动物细胞基因突变实验(体细胞基因水平,体外实验):①L5178Y 细胞基因突变实验;②V79 细胞基因突变实验。

(2) 体外哺乳动物细胞染色体畸变实验(体细胞染色体水平,体外实验)。

(3) 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验(体细胞染色体水平,体内实验)。

(4) 哺乳动物骨髓细胞染色体畸变实验(体细胞染色体水平,体内实验)。

(5)程序外 DNA 修复合成实验(DNA 水平,体外实验)。

(6)小鼠精子畸形实验(性细胞染色体水平,体内实验)。

(7)睾丸生殖细胞染色体畸变实验(性细胞染色体水平,体内实验):①小鼠精原细胞染色体畸变实验;②小鼠精母细胞染色体畸变实验。

(三)第三阶段毒理学试验(亚慢性毒性实验和致畸实验)

1.亚慢性毒性实验。

2.致畸实验。

(四)第四阶段毒理学试验(慢性毒性实验和致癌实验)

1.慢性毒性实验。

2.致癌实验。

### 第三节 消毒剂毒理学试验方法

OECD 是世界各国公认的制定颁布化学物毒理试验方法的权威机构。实际上,它起到了引导和规范一些有关国际组织和世界各国毒理试验方法的作用。OECD 于 2000 年颁布的化学物毒理试验准则 **Guideline for Testing of Chemicals** 中包括 42 种毒理试验方法及判定标准。当然,近 30 年来欧美国家对于化学物安全性评价(或危险度评价)逐渐有减少动物试验、增加人体试验的趋势。例如,美国在 2000 年颁布的《联邦危险物条例规则》(**Federal Hazardous Substances Act Regulations**)中对(产品)安全性评价只列了少数的毒理(动物)试验,而且其中一些试验大大简化。由于各国间社会背景、经济发展和道德伦理不同,因此我国对于健康相关产品(包括消毒产品)和农药等产品的安全性评价主要是按照 OECD 的方法,仍以毒理试验为主。下面介绍我国现行的消毒剂安全性评价的毒理试验方法。

#### 一、急性经口毒性实验

通常选用的实验动物为小鼠或大鼠,雌雄各半,小鼠体重为 18~22 g,大鼠体重为 180~200 g。实验前,禁食 6~12 h,不限制饮水。配制受试物溶液时,以常用水或食用植物油为溶剂,给予受试动物溶液量最大的体积,小鼠不超过 0.4 ml/20 g 体重;大鼠不超过 1.0 ml/200 g 体重。一般随机分为 5~6 个剂量组,大鼠每组动物数为 6~10 只,小鼠每组动物数为 10~20 只。各剂量组间距大小,随受试物的毒性作用带宽窄而异。一般要求最高剂量组出现全部实验动物死亡,最低剂量组出现全部动物存活。可先以较大的组距和较少的动物进行预实验,找出其粗略致死剂量范围,然后再设计正式实验的剂量分组。给药一般用特别的灌胃针头将受试物一次给予动物。

急性经口毒性实验中着重观察给药后 14 d 期间动物的中毒表现、死亡数量和死亡时间,并计算  $LD_{50}$ (半数致死量)。计算  $LD_{50}$  可应用概率单位对数图解法或其他方法。但是一定要计算出  $LD_{50}$  的 95%可信限。

#### 二、急性吸入毒性实验

选用小鼠或大鼠,在染毒柜内作一次性吸入暴露。暴露时间为 2~4 h。吸入染毒时,染毒柜的浓度以平均浓度计算。观察 14 d,应用上述方法计算  $LC_{50}$ (半数致死浓度)。关于剂量、动

物分组、观察指标和  $LC_{50}$  计算等,同急性经口毒性实验。

### 三、皮肤刺激实验

于实验前 24 h,将家兔或豚鼠背部脊柱两侧的毛剪掉,不得损伤表皮。去毛范围,左右两侧各约 3 cm×3 cm,供实验用。将受试物 0.2 ml 滴于 2.5 cm×2.5 cm 大小的两层纱布上并敷贴在一侧皮肤表面;或将受试物直接涂于皮肤,然后用一层油纸覆盖,再加胶布和绷带加以固定。另一侧作为对照。敷贴时间一般为 4 h。实验只须用 4 只动物。实验结束后,用湿水或无刺激性溶剂除去残留受试物。分别于去除受试物后 1、24 和 48 h 观察皮肤局部反应。根据不同时间动物局部皮肤的红斑和(或)水肿反应程度,计算皮肤刺激指数,评定该受试物对皮肤刺激的级别(无刺激性、轻刺激性、中等刺激性、强刺激性)。

### 四、眼刺激实验

实验用家兔 4 只,将受试物溶液 1~2 滴,滴入家兔的一侧眼结膜囊内,另一侧眼作为对照。滴受试物后,立即使眼被动闭合 4 s,用生理盐水冲洗 5 min。于滴眼后 1、24、48 h 和 4、7 d,用肉眼检查家兔眼角膜、巩膜和结膜的损伤程度,计算急性眼刺激积分指数,评定该受试物对黏膜的刺激强度(无刺激性、轻度刺激性、刺激性、中度刺激性、轻重度刺激性、重度刺激性)。

### 五、阴道黏膜刺激实验

选用成年雌性家兔或大鼠,分为染毒组、赋形剂对照组和空白对照组,家兔每组 4 只,大鼠每组 6 只。用适当大小的无菌棉条浸以受试物置动物阴道内(赋形剂对照组以同样大小的棉条浸以灭菌生理盐水),与阴道黏膜接触 4 h,于 24 h 时处理动物,取出局部阴道组织,观察有无充血、水肿等现象。根据阴道黏膜的变化,判断消毒剂对黏膜的刺激强度级别(无刺激性、轻刺激性、中等刺激性、强刺激性)。

### 六、皮肤变态反应实验

选用白色豚鼠 32 只,雄雌各半,均分为实验组和阴性对照组。对于实验组动物给予受试物致敏和激发处理;阴性对照组仅给以激发接触。致敏接触浓度允许引起皮肤轻度刺激反应,激发浓度应低于致敏浓度,不得引起原发刺激性反应。

于实验前 24 h 将豚鼠背部左侧 3 cm×3 cm 范围内剪毛。取引起皮肤刺激反应最低浓度的消毒剂溶液 0.2 ml,滴在 2 cm×2 cm 两层纱布上,并将其敷贴在左侧去毛区。用一层无刺激塑料膜或油纸覆盖,再以无刺激胶布固定,持续 6 h。第 7 天和第 14 天以同样方法重复一次。在末次致敏诱导后 14~28 d,将低于致敏浓度的消毒剂溶液 0.2 ml 滴在 2 cm×2 cm 的两层纱布上,敷贴于豚鼠背部右侧 3 cm×3 cm 去毛区。然后,用一层无刺激塑料膜或油纸和无刺激胶布固定,6 h 后将敷贴的受试物取掉。24 h 和 48 h 后观察皮肤反应。根据皮肤出现反应(红斑或水肿)的动物数,除以该组实验动物数,求得致敏率。根据致敏率可判断该消毒剂的致敏强度(极轻、轻度、中度、强度、极强)等级。

## 七、蓄积毒性实验

### (一) 20 d 蓄积毒性实验

选用成年大鼠(体重 180~200 g)共 50 只,雄雌各半,按 1/20、1/10、1/5 及 1/2 LD<sub>50</sub> 随机分 4 个剂量组,另设对照组,每组雄雌各 5 只。对实验动物,每天灌胃一次,连续给以 20 d,每天记录动物体重及死亡数,注意随体重变化调整给予受试物。结果评价:停止染毒 7 d 内,如 1/2 LD<sub>50</sub> 组动物出现死亡,各剂量组并呈剂量-反应关系,则受试物具有中等蓄积毒性;若仅 1/2 LD<sub>50</sub> 组有动物死亡,则受试物为弱蓄积性;如各剂量组均未死亡,则该受试物未见蓄积毒性。

### (二) 剂量递增蓄积系数法实验

选用小鼠或大鼠,体重 18~20 g 或 180~200 g,雄雌各 10 只。按表 28-1 每 4 d 递增剂量经口给受试物,连续给 28 d,至半数动物死亡为止。如果给受试物 28 d,死亡动物仍未达半数可停止实验。

表 28-1 定期递增染毒剂量用表

染毒日期(d)	每日染毒剂量(LD <sub>50</sub> )	4 d 内染毒剂量(LD <sub>50</sub> )	累积染毒剂量(LD <sub>50</sub> )
1~4	0.10	0.40	0.40
5~8	0.15	0.60	1.00
9~12	0.22	0.88	1.90
13~16	0.34	1.36	3.30
17~20	0.50	2.00	5.30
21~24	0.75	3.00	8.30
25~28	1.12	4.48	12.00

结果评价,首先计算蓄积系数 K,公式为:

$$K = \Sigma LD_{50} / LD_{50}$$

式中  $\Sigma LD_{50}$  为蓄积实验中出现 50% 动物死亡时的受试物累积总剂量; LD<sub>50</sub> 为急性毒性实验一次染毒的半数致死量。

结果判断:  $K \leq 1$  为极强蓄积性;  $K > 1$  为强蓄积性;  $K > 3$  为中等蓄积性;  $K > 5$  为弱强蓄积性。

## 八、致突变实验

### (一) 体外哺乳动物细胞基因突变实验

#### 1. L5178Y 细胞基因突变实验

(1) 试剂: F<sub>10p</sub> 培养液: 为完全培养液。

F<sub>0p</sub> 培养液: 为无血清培养液。

马血清

集落用培养基

无钙镁磷酸盐缓冲液(pH 7.2-7.4)

阳性对照物: 甲基磺酸乙酯(EMS), 丝裂霉素 C(MMC) 等

### 三氟胸苷 (TFT)

#### 肝微粒体酶混合液(S9混合液)

(2)细胞:小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞。

(3)实验分组:一般设 4 个剂量组及阴性对照组和阳性对照组。以上各组还应包括有加 S9 混合液和不加 S9 混合液两大部分。

#### (4)操作程序

①细胞准备:将新清除了自发突变体的细胞群体,用  $F_{10P}$  培养液制成悬液。实验前一天用  $F_{10P}$  培养液和  $F_{0P}$  培养液各 50% 的对半混合液(马血清终末浓度为 5%)稀释。

②受试物处理:用上述 50%  $F_{10P}$  和 50%  $F_{0P}$  的对半混合液将细胞培养物稀释至  $1 \times 10^6$  个/ml 并分种于 50 ml 试管中,每管 6 ml,再加 S9 混合液 4 ml。不加 S9 混合液管,代之以  $F_{0P}$  培养液。在上述试管内加入一定浓度的受试物,并以含 5% 二氧化碳的空气充气后加盖密闭,于 37℃ 振荡培养 4 h。处理结束后,以 200 g 离心 10 min,除去上清液,收集细胞。细胞用 Hanks 液洗涤,再加入 20 ml  $F_{10P}$  培养液充分混悬(细胞浓度为  $0.3 \times 10^6$  个/ml),以含 5% 二氧化碳的空气充气后,加盖密闭,于 37℃ 振荡培养,开始表达。

③表达:细胞的表现型表达时间为 2 d。表达开始后 24 和 48 h 经计数后,将细胞稀释至  $3 \times 10^5$  个/ml。

④选择和集落化:表达结束后,取 10 ml 培养物经离心后除去大部分上清液。并将细胞在留下的约 1 ml  $F_{10P}$  培养基中混悬。将细胞悬液移入含 100 ml 集落培养基的烧瓶中。此时细胞密度为  $3 \times 10^4$  个/ml。在 37℃ 振荡培养 30 min。取出 0.5 ml 后,向余下的细胞悬液中加入 1.0 ml TFT 贮存液,继续振荡培养 15 min。将样本取出,倒于 3 个 10 cm 平皿中,每平皿 33 ml,含  $1 \times 10^6$  个细胞称为 TFT 平板,作突变体的选择。将先前取出的 0.5 ml 细胞悬液用集落培养基先作 1:100 稀释(此时细胞浓度为  $3 \times 10^2$  个/ml)。振荡培养 15 min 后,取出 2.0 ml 再用集落培养基作 1:50 稀释(此时细胞悬液浓度为 6 个/ml)后振荡培养。经 15 min 培养后,倒入 3 个直径为 10 cm 的平皿中,每平皿 33 ml,含细胞 200 个(称为 VC 平板)。待琼脂凝固后,置二氧化碳培养箱(37℃)中静置培养 10 d。计数各个平皿中出现的集落数,计算集落形成效率(CFE)。

⑤阳性与阴性对照组的操作程序同实验组,仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性溶剂对照组用受试物溶剂代替受试物。

⑥按下列公式计算有关指标:

绝对 CFE = 形成集落数 / 接种细胞数

相对 CFE = (实验组绝对 CFE / 溶剂对照组绝对 CFE)  $\times 100\%$

突变频率(MF) = (TFT 平皿集落数 / VC 平皿集落数)  $\times$  稀释系数

(注:本实验条件下,稀释系数为  $2 \times 10^{-4}$ )

#### (5)评价规定

①对 L5178Y 细胞,推荐可接受的自发突变频率范围为(20 ~ 100)/ $10^6$  个存活细胞。

②当各剂量组 MF 与阴性溶剂对照组相比,具有显著性增加,并呈剂量 - 反应关系时,或仅一个剂量组有显著性增加并经重复实验证实,均可判为阳性结果(即受试物对 L5178Y 细胞 TK 系统有致突变性)。

## 2. V79 细胞基因突变实验

### (1) 试剂: 完全培养液

小牛血清

无钙镁磷酸盐缓冲液

胰蛋白酶——EDTA 溶液

阳性对照物

6-硫代鸟嘌呤(6-TG)

S9 混合液

姬姆萨染液

### (2) 细胞: 中国仓鼠肺(V79)细胞。

(3) 实验分组: 一般设 4 个剂量实验组及阴性对照组和阳性对照组。各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

### (4) 操作程序

① 细胞准备: 将  $5 \times 10^5$  个细胞接种于含完全培养液的直径为 10 cm 的平皿中, 于二氧化碳培养箱中(37℃ 培养 24 h。

② 接触受试物: 将细胞培养物吸去培养液, 用无钙镁 PBS 洗 2 次。将细胞悬液分为两大组, 一组加 S9 混合物, 二组不加 S9 混合物。加 S9 混合物者, 一般在 6 ml 细胞悬液中加入 4 ml S9 混合液; 对不加 S9 混合物者, 则代之以 4 ml 无血清完全培养液。阳性和阴性溶剂对照组亦分加与不加 S9 混合物两大组, 操作方法同上。细胞悬液中加入 S9 混合物的同时, 还加入无血清完全培养液及一定浓度的受试物。将样本置二氧化碳培养箱中 5 h 处理结束后, 吸去含受试物的完全培养液, 用无钙镁 PBS 洗涤细胞 2 次, 再加入完全培养液, 在二氧化碳培养箱中培养 19~22 h。

③ 表达: 将培养物用胰蛋白酶-EDTA 消化。待细胞脱落后, 加入完全培养液, 终止消化。混匀、计算并进行表达和细胞毒性测定。表达时, 以  $5 \times 10^5$  个细胞接种于直径为 10 cm 的平皿中。培养 3 d 后, 分传一次, 仍接种  $5 \times 10^5$  个细胞, 培养 3 d 后再进行突变体的选择及集落形成效率(CFE)的测定。

④ 细胞毒性测定: 将上述消化计数后的细胞, 每平皿接种 200 个, 每组 5 个平皿, 于二氧化碳培养箱内(37℃)培养 7 d。取出样本, 固定并进行姬姆萨染色后, 计数各平皿的细胞集落数, 以相对 CFE 值表示细胞的毒性。

⑤ 突变体的选择及集落形成率的测定: 表达结束后, 消化细胞, 分别接种, 每组 5 个平皿, 每平皿种  $2 \times 10^5$  个细胞。待细胞贴壁后加入 6-TG, 终末浓度为 5 mg/ml。放入二氧化碳培养箱培养 7~10 d。固定后进行姬姆萨染色, 计数平皿内集落数, 并计算其突变频率(MF)。

⑥ 阳性与阴性对照组的操作程序同实验组, 仅阳性对照组用阳性对照物代替受试物, 阴性溶剂对照组用受试物溶剂代替受试物。

计算有关指标和评价规定, 同于 L5178Y 细胞基因突变实验。如实验出现阳性结果, 表明受试物对 V79 细胞 HGPRT 系统有致突变性。

### (二) 体外哺乳动物细胞染色体畸变实验

#### 1. 试剂 完全培养液

小牛血清

无钙镁 PBS

胰蛋白酶 - EDTA

阳性对照物

S9 混合液

秋水仙素溶液( 0.04%)

氯化钾溶液 0.075 mol/L)

甲醇 / 冰醋酸3:1, v/v)固定液

姬姆萨染液

2. 细胞 可选用中国仓鼠肺 CHL细胞、中国仓鼠肺 V79 细胞、中国仓鼠卵巢 CHO 细胞等。通常选用 CHL 细胞。

3. 实验分组 一般设计 4 个剂量组及阴性对照组和阳性对照组、各组均应包括加 S9 混合液和不加该液的样本。

#### 4. 操作程序

(1)实验时, 吸出细胞培养皿中的培养液, 加入实验所规定浓度的受试物和 S9 混合物(10%)以及不含小牛血清的完全培养液,放二氧化碳培养箱内作用 2 h。结束后,吸去完全培养液,用 Hanks 液洗细胞 3 次。加完全培养液,再置二氧化碳培养箱中培养,于 24 h 收获细胞。收获细胞前 2~4 h,加秋水仙素溶液(终末浓度为 1 $\mu$ g/ml), 阻断细胞于有丝分裂中期相。

(2)收获细胞时,用胰蛋白酶 - EDTA 溶液消化细胞,待细胞脱落,加入完全培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心(1 000 ~ 12 000/min, 5 ~ 7 min),弃去上清液后,加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液低渗处理 10 ~ 20 min。离心后,再以甲醇 / 冰醋酸液固定 2 次。按常规滴片干燥,用姬姆萨应用液染色 15 min。

(3)阳性与阴性对照组的操作程序同实验组,只是阳性对照组用已知染色体丝裂剂替代受试物。阴性溶剂对照组用受试物的溶剂。

(4)观察:每组各选 100 个分散良好的中期分裂相细胞,进行染色体畸变分析,观察和记录染色体结构的异常及数量的异常。

(5)评价规定:当各剂量组与阴性溶剂对照组相比,畸变细胞率有显著性意义的增加,并有剂量 - 反应关系时,或仅一个剂量组有显著性意义的增加,并经重复实验证实,可判为该受试物具有致突变性。

#### (三)小鼠骨髓细胞多染红细胞微核实验

1. 试剂 阳性对照物:常用环磷酰胺或丝裂霉素 C。

小牛血清

姬姆萨染液

2. 实验动物和分组 选用体重 25 ~ 30 g 的小鼠 50 只,雌雄各半。一般设 3 个剂量组(1/2 LD<sub>50</sub>、1/5 LD<sub>50</sub>、1/20 LD<sub>50</sub>)及阴性对照组和阳性对照组,每组雌雄动物各 5 只。

#### 3. 操作程序

(1)动物经口灌胃染毒,分两次,第一次染毒后 24 h 进行第二次染毒,第二次染毒后 6h 取材。按常规取股骨或胸骨,切断两端暴露骨髓腔。

(2)吸取 0.1 ml 小牛血清,冲洗骨髓腔。用冲洗液常规涂片,晾干。将已干的涂片,在甲醇中固定 5 ~ 10 min。姬姆萨应用液染色 10 ~ 15 min,立即用 pH 6.8 PBS 液冲洗,晾干。



(3)阳性与阴性对照组的操作程序同实验组。只是阳性对照组选用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素 C(1~1.5 mg/kg 体重)作为受试物的替代物。阴性溶剂对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

(4)在显微镜油镜下计数含微核的嗜多染红细胞(PCE)数。每只动物计数1 000个PCE。微核细胞率是指含有微核的PCE数,以千分率表示。还应观察PCE/NCE比例。当PCE/NCE<0.1时,提示对骨髓有抑制作用,应降低受试物剂量重新进行实验。

(5)评价规定:当各剂量组与溶剂对照组相比,微核细胞率有显著性意义的增加,并有剂量-反应关系,或仅一个剂量组有显著性意义的增加并经重复实验证实,均可判为受试物具有体内遗传毒性。

#### (四)哺乳动物骨髓细胞染色体畸变实验

##### 1.试剂 阳性对照物:

常用环磷酰胺或丝裂霉素 C

秋水仙素 0.04%

氯化钾溶液(0.075 mol/L)

甲醇/冰醋酸 3:1, v/v) 固定液

姬姆萨染液

PBS(1/15 mol/L, pH 6.8)

2. 实验动物和分组 成年小鼠(体重25~30 g),或大鼠(体重180~220 g)共50只,雌雄各半。随机分为3个剂量组( $1/2 LD_{50}$ 、 $1/5 LD_{50}$ 、 $1/20 LD_{50}$ )和阳性对照组及阴性溶剂对照组。阳性对照组用环磷酰胺(40 mg/kg 体重)或丝裂霉素 C(1.5~2 mg/kg 体重)。

##### 3.操作程序

(1)经口灌胃方式,共染毒2次,间隔24 h,第二次染毒后6 h处死动物。处死动物前2~4 h腹腔注射0.04%秋水仙素溶液,剂量为40 mg/kg 体重。

(2)处死动物,取出股骨,剪去股骨两端,吸取5 ml生理盐水,从股骨一端注入,从股骨另一端接取流出的骨髓细胞悬液。

(3)将骨髓细胞悬液离心(1 000 r/min, 5~7 min),弃上清液。加0.075 mol/L氯化钾溶液7 ml,混匀,置37℃水浴中低渗处理7 min。

(4)加入2 ml 甲醇/冰醋酸固定液,混匀。离心(1 000 r/min, 5~7 min),弃上清液,再加入7 ml固定液,混匀,固定7 min。离心(1 000 r/min, 5~7 min),弃上清液。用同法再固定1~2次,弃上清液,加入数滴新鲜固定液,混匀。用悬液滴片,晾干,以姬姆萨应用液染色。

(5)每个动物选100个中期分裂相细胞,进行染色体畸变分析,观察和记录染色体结构的异常和数量的异常。

(6)计算畸变细胞率。畸变细胞率为100个中期分裂相细胞中有染色体畸变的细胞数。

(7)阳性与阴性对照组的操作程序同实验组。只是阳性对照组选用环磷酰胺或丝裂霉素 C作为受试物的替代物;阴性溶剂对照组用受试物溶剂作为受试物的替代物。

4. 评价规定 当各剂量组与阴性溶剂对照组相比,畸变细胞率有显著意义的增加,并有剂量-反应关系时,或仅一个剂量组有显著性意义的增加,并经重复实验证实时,可判为具有致突变性。

## (五)程序外 DNA 修复合成实验

### 1. 试剂 完全培养液

同步培养液

无钙镁 PBS

胰蛋白酶 - EDTA 溶液

甲醇 / 冰醋酸 3:1, v/v) 固定液

羟基脲 HU 贮备液

1%枸橼酸钠溶液

$^3\text{H}$  - 胸腺嘧啶核苷

NTB - 2 核乳胶,或国产核 - 4 乳胶

S9 混合液

显影液及定影液

### 2. 细胞 人胚肺成纤维细胞 (2BS)。

3. 实验分组 受试物分 4 个剂量组,另设阴性(未处理溶剂)对照组和阳性对照组。

### 4. 操作程序 采用人胚肺成纤维细胞 (2BS) 放射自显影法操作程序。

(1)将细胞增殖至所需数量后,用完全培养液制成单细胞悬液,浓度为  $(0.5 \sim 1.0) \times 10^5$  个/ml 将细胞悬液接种置有小盖玻片的细胞培养板中,在  $37^\circ\text{C}$  二氧化碳培养箱内培养 1~3 d,至细胞 50% 融合。每一剂量组和各对照组分别做 2~3 个平行样本。

(2)换用同步培养液,培养 3 d。

(3)在实验前一天,加入 HU 贮备液使 HU 的终末浓度为 10 mmol/L。继续在  $37^\circ\text{C}$  下培养 16 h。然后将上述长有细胞的盖片置于含不同浓度受试物、HU (10 mmol/L) 及  $^3\text{H}$  - 胸腺嘧啶核苷 (5~10  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ , 30 Ci/mmol) 同步培养液中,在  $37^\circ\text{C}$  培养 5 h。

(4)阳性和阴性对照组的操作程序同实验组,只是阳性对照组用阳性对照物代替受试物,阴性溶剂对照组用受试物溶剂代替受试物。

(5)处理结束后, Hanks 液洗涤 3 次,再用 1%枸橼酸钠溶液处理 10 min。将小盖玻片用甲醇 - 冰醋酸固定液固定 30 min,重复 2 次。干燥过夜,将有细胞的盖玻片用少量中性树胶粘固于载玻片上。

(6)暗室中将适量的 NTB - 2 乳胶移入浸渍用的玻璃皿中,置  $40^\circ\text{C}$  水浴中溶化,再加入等量  $40^\circ\text{C}$  蒸馏水,继续在水浴中加温,搅拌 10~20 min。同时将准备做自显影处理的载玻片置水浴箱平台上预热。其后,将附有样本的载玻片垂直浸渍于乳胶液中约 5 s。提出玻片,拭去其背面乳胶,待其干固。

(7)将干固的附有样本的载玻片置于曝光盒中,于  $40^\circ\text{C}$  冰箱中曝光 10 d。曝光后,将玻片在 D - 19 显影液中显影 4 min。在停止液中漂洗 30 s,在 F - 5 定影液中定影 10 min,再用水漂洗数小时。

(8)将细胞在显影后用姬姆萨染液染色,脱水透明,用盖片封固。在油镜下计数各样本细胞核的显影银粒数。每个样本计数 100 个细胞,同时计数相当面积的本底银粒数,两者之差为细胞核银粒数。计算各组“银粒数 / 核”的均值及其标准差。

5. 评价规定 当各实验剂量组“银粒数 / 核”均值与阴性溶剂对照组比较,有显著性意义的增加,并呈剂量 - 反应关系时,或仅一个剂量组有显著性意义的增加,并经重复实验证实,可判

为该受试物诱导了 DNA 修复合成, 具有遗传毒性。

#### (六) 小鼠精子畸形实验

##### 1. 试剂 阳性对照物: 环磷酰胺或丝裂霉素 C

甲醇

##### 2.5% 伊红溶液

2. 实验动物和分组 选用成年雄性小鼠 25 只, 体重 25 ~ 35 g。分 3 个剂量组及阳性对照组和阴性溶剂对照组, 每组 5 只动物。

##### 3. 操作程序

(1) 小鼠灌胃染毒, 连续 5 d, 每天一次。

(2) 首次染毒后 35 d 处死动物, 解剖取出附睾。将附睾放入盛有 2 ml 生理盐水的平皿中, 剪碎。以 3 层擦镜纸过滤, 取滤液离心(1 000 r/min, 5 min)。除上清液, 加少量生理盐水, 以混悬液涂片, 自然干燥, 甲醇固定 5 min, 用伊红溶液染色 1 h。

(3) 在高倍显微镜下, 每只动物计数 2 000 个精子中的畸形精子数。

(4) 阳性对照组, 腹腔注射环磷酰胺(每天 40 ~ 60 mg/kg 体重), 或丝裂霉素 C(每天 1.0 ~ 1.5 mg/kg 体重); 阴性对照组为受试物溶剂对照。其他操作程序同实验组。

4. 评价规定 当各剂量组与阴性溶剂对照组比较, 精子畸形率有显著意义的增加, 并有剂量 - 反应关系时, 或仅一个剂量组有显著意义的增加, 并经重复实验证实, 可判为该受试物对雄性生殖细胞具有遗传毒性。

#### (七) 睾丸生殖细胞染色体畸变实验

##### 1. 小鼠精原细胞染色体畸变实验

##### (1) 试剂: 阳性对照物: 环磷酰胺, 或丝裂霉素 C

秋水仙素 (0.04%)

甲醇 / 冰醋酸(3:1, v/v) 固定液

##### 2.2% 枸橼酸三钠

姬姆萨染液

(2) 实验动物与分组: 选用雄性小鼠 30 只, 体重 25 ~ 30 g。设 3 个实验剂量组及阳性对照组和阴性溶剂对照组。阳性对照组用环磷酰胺 (40 mg/kg 体重) 或丝裂霉素 C(1.5 ~ 2 mg/kg 体重) 腹腔注射。

##### (3) 操作程序

① 灌胃染毒两次, 间隔 24 h。于第 2 次染毒后 6 h 处死动物。处死前 3.5 ~ 5.0 h 腹腔注射 0.04% 秋水仙素溶液 (4 mg/kg 体重)。

② 处死动物, 取睾丸。置含 2.2% 枸橼酸三钠溶液平皿中去除睾丸被膜, 用针头使曲精小管松散。

③ 用吸管去除 2.2% 枸橼酸三钠溶液, 将曲精小管置于含 3 ~ 4 ml 低渗液(1% 枸橼酸钠) 的试管中。10 min 后更换低渗液, 以去除碎片和精子, 室温下低渗时间总计不超过 25 min。低渗结束后更换低渗液, 加入预冷的甲醇 - 冰醋酸固定液固定 10 min 后, 更换固定液, 再固定 10 min。第 3 次固定至少 30 min, 也可在冰箱中过夜。用镊子将已固定的曲精小管移到含 50% 醋酸 5 ml 的离心管中, 吸管吹打至不透光, 离心(1 000 r/min, 5 min)。

④ 将固定液 1.0 ~ 1.5 ml 加至离心所得的细胞沉淀物中。滴管吹打后, 滴 2 滴至用 70%

乙醇浸湿的玻璃片上,分散后,热风干燥。姬姆萨应用液染色 10 min,自来水淋洗两次。

⑤以显微镜油镜检查染色体结构的异常情况。每只动物做两个睾丸,每个睾丸分析 50 个中期分裂精原细胞,记录观察染色体型和染色单体型染色体的结构异常。

评价规定:当各剂量组与阴性对照组相比,畸变细胞率有显著意义的增加,并有剂量-反应关系时,或仅一个剂量组有显著意义的增加,经重复实验证实,可判为该受试物对哺乳动物睾丸细胞具有致突变性。

2. 小鼠精母细胞染色体畸变实验 本实验采用灌胃染毒,每天 1 次,连续 5 d。于第一次染毒后的第 12~14 d 将受试动物处死。处死前 3.5~5.0 h 腹腔注射 0.04%秋水仙素溶液(4 mg/kg体重)。记录观察精母细胞染色体结构异常并作精母细胞畸变率评价。

其他操作程序及试剂,实验动物与分组和评价规定,与小鼠精原细胞染色体畸变实验相同。

## 九、亚慢性毒性实验

一般用啮齿类动物,首选大鼠,理想的是 4~6 周龄大鼠,使用雌雄两性。设 3 个剂量组与 1 个对照组,每个剂量组 20 只动物,雌雄各 10 只。选择剂量时,最高剂量组应出现毒性反应,理想的中间剂量组应出现最小可观察到的毒性反应。每天给受试物一次,通常采用灌胃方式。必须每周称体重,并按体重调整给予的受试物剂量。其实验期为 3 个月。

观察指标随受试物不同而异。通常包括一般中毒表现、死亡情况、体重、血液学检查、肝功能以及其他的生理、生化指标等。实验结束时,病理组织学检查。在对实验结果进行评价时,将各实验组动物观察指标与阴性对照组比较,经统计学处理,求出受试物最小作用量和最大无作用量。

## 十、致畸实验

实验可用大鼠或小鼠。通常用健康、性成熟、体重为 200~250 g 的大鼠或体重为 20~25 g 的小鼠。至少设 5 组,其中 3 个为实验组,一个阴性对照组,一个阳性对照组,每组至少 12 只孕鼠。实验高剂量组所用的剂量,建议可用雌性动物  $LD_{50}$  的 1/10;实验低剂量组的剂量,可用雌性动物  $LD_{50}$  的 1/100,实验将雌鼠和同龄的雄鼠 1:1 或 2:1 同笼。每日晨观察阴道栓(或阴道涂片)。查出阴道栓(或精子)的当天定为孕期零天。在大鼠或小鼠孕期 6~15 d 期间,每天灌胃给受试物,对第 20 天孕大鼠或第 18 天孕小鼠用颈椎折断或静脉气栓法处死。剖腹检查卵巢内黄体数,取出子宫称重,检查活胎、早期吸收和迟死胎数目。检查并记录活胎鼠的体重、性别、身高、尾长,外观检查头颅、面部、躯干、四肢等有无畸型。然后将每窝 2/3 活胎鼠,应用茜素红染色法,制备胎鼠骨骼标本;将每窝 1/3 活胎鼠,制备胎鼠内脏标本。主要观察指标是动物畸胎出现率,将实验组与对照组经统计处理比较,并结合其他观察指标(如着床系数、活胎数、死胎数、吸收胚胎数以及活胎体重、身长、尾长等)综合评价受试物是否具有致畸作用。求出最小致畸剂量和最大不致畸剂量。判定致畸强度,常用致畸指数来表示。

致畸指数 = 雌鼠  $LD_{50}$  / 最小致畸剂量

致畸指数小于或等于 10 为不致畸;致畸指数大于 10~100 为致畸;大于 100 为强致畸。

## 十一、慢性毒性实验

实验一般选用刚断乳的雌性和雄性大鼠。设 3 个剂量组和 1 个对照组,每个剂量组每种

性别鼠至少 10 只。根据亚慢性实验结果, 选择剂量。最高剂量应引起毒性反应或明显损害作用, 最低剂量应不引起毒性作用或有害影响, 每天给受试物一次, 采用灌胃方式。每周称量体重, 并调整受试物剂量。实验期限为 6 个月以上, 或直至 2 年。观察指标, 主要取决于在亚慢性实验中受试物对动物的毒理作用和靶器官。一般情况下, 观察指标基本上与亚慢性实验相同。获得实验结果后, 比较各实验组与对照组观察指标的变化, 经统计学分析, 求出受试物最小作用剂量和最大无作用剂量。

## 十二、致癌实验

多用刚断乳的大鼠、小鼠或金黄地鼠等啮齿类动物。如果和慢性毒性实验结合在一起进行, 通常选用雌性和雄性大鼠。分组同慢性实验, 一般设 3 个剂量组与 1 个阴性对照组。最高剂量组应足以引起低毒性反应, 但不能因肿瘤以外因素明显改变其正常生命期限; 最低剂量组应不影响动物正常的生长、发育和寿命, 即不引起任何毒性反应; 中间剂量应处于最高和最低剂量之间。每个剂量组和对照组, 一般使用动物每种性别 50 只。实验期间每天给受试物一次, 一般采用灌胃方式。每周称重并调整给予的受试物剂量。实验期应包括动物正常寿命期的大部分时间, 大鼠为 24 个月以上, 小鼠和地鼠为 18 个月以上。在整个致癌实验中, 着重观察动物肿瘤出现的时间、部位大小、外形和发展情况都应有记录。凡在实验过程中死亡或处于垂死状态而被处死, 及实验结束全部处死的动物, 均应进行完整的尸检及主要器官和组织镜检。若致癌实验和慢性实验结合在一起进行, 还应观察慢性实验中其他指标。

结果判断: 按下列 WHO 提出的 4 项致癌实验阳性标准进行评价: (1) 肿瘤只发生在实验组动物中, 对照组无肿瘤; (2) 实验组与对照组均发生肿瘤, 但实验组中发生率高; (3) 实验组动物中多发性肿瘤明显, 对照组中无多发性肿瘤或少数动物有多发性肿瘤; (4) 实验组与对照组动物肿瘤的发生率无明显差异, 但实验组中肿瘤发生的时间较早。上述 4 项中, 实验组与对照组之间的数据经统计学处理后, 任何一项有显著的差异时, 即可认为样品致癌实验属阳性。

(王有森)

## 参考文献

- 1 王有森. 卫生标准制定的原则、依据和方法. 见: 史安俐, 李春生, 王有森, 主编卫生标准概论. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 168 - 223
- 2 消毒剂毒理学试验技术. 见: 卫生部. 消毒技术规范. 第三版. 第一分册实验技术规范, 1999: 46 - 70
- 3 ISO 10993 - 10: 1995 Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and sensitization
- 4 ISO 10993 - 3: 1992 Biological evaluation of medical devices - Part 3: Tests for genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity
- 5 ISO 10993 - 11: 1993 Biological evaluation of medical devices - Part 11: Tests for systemic toxicity
- 6 OECD: OECD Guideline for testing of chemicals, 2000
- 7 United States Code of Federal Regulations 16 Part 1000: Federal hazardous substances act regulations 2000
- 8 周宗灿, 主编. 毒理学基础. 第 2 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000: 180 - 192
- 9 Hayes AW. Principles and methods of toxicology. 3rd ed. New York: Raven Press, 1994



## 第四篇 附 录

附录一	消毒试验常用试剂及培养基的配制	..... (397)
附录二	消毒与灭菌相关标准及试验菌株	..... (403)
附录三	消毒学相关文献网络地址	..... (407)
附录四	我国消毒药械部分供应商及产品名录	... (409)
附录五	我国消毒产品上市要求	..... (415)
附录六	英汉消毒学词汇	..... (425)





## 附录一 消毒试验常用试剂及培养基的配制

### 一、常用的试剂和培养基配制

#### 1. 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)

磷酸氢二钠( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 无水)	2.83 g
磷酸二氢钾( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.36 g
蒸馏水	1 000 ml

配制: 分别将磷酸氢二钠 2.83 g 和磷酸二氢钾 1.36 g 溶解于蒸馏水中, 待溶解后补足蒸馏水至 1 000 ml 即成。

#### 2. 无菌检查用洗脱液

吐温-80	1 g
蛋白胨	10 g
氯化钠	8.5 g
蒸馏水	1 000 ml

配制: 将上述成分加入到蒸馏水中, 加热溶解, 调整至 pH 7.0 ~ 7.2, 按需要分装, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

#### 3. 标准硬水(硬度 342 mg/L)

氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )	0.034 g
氯化镁( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	0.139 g
蒸馏水	1 000 ml

配制: 将氯化钙 0.034 g 和氯化镁 0.139 g 加入蒸馏水中, 溶解混匀即成。

#### 4. 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

配制: 取上述成分混合于蒸馏水中后, 加热溶解, 调整至 pH 7.2 ~ 7.4, 按需要分装于玻璃瓶或试管内, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

#### 5. 营养肉汤培养基

蛋白胨	10 g
牛肉膏	5 g
氯化钠	5 g
蒸馏水	1 000 ml

配制: 取上述成分混合于蒸馏水中后, 加热溶解, 调整至 pH 7.2 ~ 7.4, 按需要分装于玻璃瓶或试管内, 121 °C 灭菌 15 min, 备用。

## 6. 品红亚硫酸钠培养基

蛋白胨	10 g
酵母浸膏	5 g
牛肉膏	5 g
乳糖	10 g
无水亚硫酸钠	5 g
磷酸氢二钾	3.5 g
琼脂	15 ~ 20 g
5% 碱性品红乙醇溶液	20 ml
蒸馏水	1 000 ml

配制: ①先将琼脂加至 900 ml 蒸馏水中, 加热溶化, 然后加入磷酸氢二钾及蛋白胨, 混匀, 溶解, 再以蒸馏水补至 1 000 ml, 调整至 pH 7.2 ~ 7.4; ②趁热再加入乳糖, 混匀后定量分装于烧瓶内, 115℃灭菌 20 min, 贮存于暗处, 备用; ③临用时将上法制备的培养基加热溶化, 再加下列试剂; ④将约 5 g 无水亚硫酸钠溶于少许灭菌蒸馏水中, 煮沸 10 min 灭菌。用灭菌吸管吸取已灭菌的亚硫酸钠溶液, 滴加于 20 ml 碱性品红乙醇溶液内呈深红色, 待褪至淡红色为止。将此亚硫酸钠与碱性品红乙醇混合液按 2 ml 加于每 100 ml 已融化的上述琼脂培养基内, 充分混和。待冷却凝固后, 置冰箱内, 备用。

## 7. 溴甲酚紫蛋白胨培养液

蛋白胨	10 g
葡萄糖	5 g
可溶性淀粉	1 g
1% 溴甲酚紫乙醇溶液	1 ml
蒸馏水	1 000 ml

配制: ①1% 溴甲酚紫乙醇溶液的配制: 称取 1 g 溴甲酚紫放研钵中, 用适量 95% 乙醇溶液边加边研磨, 直至完全溶解, 用 95% 乙醇溶液稀释至 100 ml。②除溴甲酚紫乙醇溶液外, 将各成分加于蒸馏水中, 加热溶化, 再以蒸馏水补至 1 000 ml, 调整至 pH 7.2 ~ 7.4, 然后取 1% 溴甲酚紫乙醇溶液 1 ml 于培养基内。115℃灭菌 20 min, 备用。

## 8. 嗜热脂肪杆菌恢复琼脂培养基

蛋白胨	10 g
葡萄糖	1 g
可溶性淀粉	1 g
牛肉膏	3 g
琼脂	20 g
蒸馏水	1 000 ml

配制: 取上述成分混合于蒸馏水中后, 加热溶解, 调整至 pH 7.2 ~ 7.4, 按需要分装于玻璃瓶或试管内, 115℃灭菌 20 min, 备用。

## 9. 需氧 - 厌氧菌琼脂培养基 (硫乙醇酸盐液体培养基)

酪朊(胰酶水解)	15 g
新配制 0.1% 刃天青溶液	1 ml

硫乙醇酸钠	0.5 g
酵母浸出粉	5 g
葡萄糖	5 g
氯化钠	2.5 g
L-胱氨酸	0.5 g
琼脂	0.5~0.7 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热溶解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

#### 10. 厌氧菌增菌培养基

蛋白胨	10 g
牛肉浸膏	10 g
酵母浸膏	3 g
葡萄糖	5 g
可溶性淀粉	1 g
氯化钠	5 g
醋酸钠	3 g
盐酸半胱氨酸	0.5 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热溶解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

#### 11. 沙堡氏琼脂培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
琼脂	16 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热溶解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

#### 12. 沙堡氏液体培养基

葡萄糖	40 g
蛋白胨	10 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热溶解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

#### 13. 改良沙堡氏培养基

麦芽糖	20 g
蛋白胨	10 g
琼脂	16 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热融解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

另:此培养基加入维生素 B<sub>1</sub> 0.1 mg/ml 可促进紫色癣菌和断发癣菌的生长繁殖;加入酵母浸膏 5 mg/ml 可促进皮肤癣菌的生长繁殖。

#### 14. 保存真菌菌种培养基

蛋白胨	10 g
琼脂	18~20 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热融解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。

注:由于不加糖或少加糖,能保持培养基中 pH 稳定,真菌不会因酸度增加而发生变异。

#### 15. 无菌试验用真菌培养基

磷酸二氢钾(KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1 g
硫酸镁(MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	0.5 g
葡萄糖	10 g
蛋白胨	5 g
蒸馏水	1 000 ml

配制:混合上述各成分,加热溶解,调整至 pH 7.2~7.4,按需要分装于玻璃瓶内或试管内,115℃灭菌 20 min,备用。上述处方中加入 15~20 g 琼脂,即为无菌试验用真菌琼脂培养基。

#### 16. 细胞维持培养基

1640 干粉培养基	10×10.4 g
L-谷氨酰胺	2.93 g
丙酮酸钠	1.004 g
青霉素	80 万单位
链霉素	100 万单位
碳酸氢钠	20.0 g
HEPES	23.9 g
去离子水加至	10 000 ml

配制:无菌操作,将 1640 干粉培养基用去离子水溶解,除青霉素和链霉素外,将其余各成分逐个加入,混合后用 7%~10% 的碳酸氢钠(NaHCO<sub>3</sub>)调整至 pH 7.0~7.2,最后用去离子水补足至 10 000 ml,过滤除菌后,再加入青霉素和链霉素等成分。

#### 17 细胞完全培养基

1640 干粉培养基	10×10.4 g
L-谷氨酰胺	2.93 g
丙酮酸钠	1.004 g
青霉素	80 万单位
链霉素	100 万单位
碳酸氢钠	20.0 g
Hepes	23.9 g

小牛血清	10%
去离子水加至	10 000 ml

配制:无菌操作,将 1640 干粉培养基用去离子水溶解,除青霉素和链霉素外,将其余各成分逐个加入,混合后用 7% ~ 10% 的碳酸氢钠( $\text{NaHCO}_3$ )调整至 pH7.0 ~ 7.2,最后用去离子水补足至 10 000 ml 过滤除菌后,再加入小牛血清、青霉素和链霉素等成分。

## 二、常用的细菌染色剂的配制

实验室所用的染色剂分为酸性和碱性两大类。酸性染色剂对于细胞原浆的亲合力较大;碱性染色剂对于细胞核的亲合力较大。一般认为,细菌的核弥散于菌体内,所以细菌易被碱性染色剂着色。实验室常用的碱性染色剂有:美蓝、龙胆紫或结晶紫、碱性复红和沙黄等。

### 1. 革兰染色液

#### 第 1 液:结晶紫溶液

结晶紫乙醇饱和溶液	100 ml
结晶紫	4 ~ 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:脱水剂

丙酮乙醇溶液	
95% 乙醇	70 ml
丙酮	30 ml

#### 第 4 液:稀释石炭酸复红液

碱性复红饱和溶液	10 ml
碱性复红	5 ~ 10 g
95% 乙醇	100 ml
5% 石炭酸溶液	90 ml
蒸馏水	900 ml

制法:①将结晶紫溶于乙醇中制成饱和液,再取此饱和液 20 ml 与草酸铵溶液混合即成;②先将碘化钾溶于 10 ml 蒸馏水中,再加碘至全部溶解后,加蒸馏水至 200 ml 即成;③将丙酮加于乙醇中即成丙酮乙醇溶液;④将碱性复红溶于乙醇中,即成碱性复红饱和溶液,取此饱和液 10 ml 加入石炭酸溶液中混合后,再加蒸馏水摇匀,滤纸过滤即成。

注意:结晶紫草酸铵的混合液不易保存,如有沉淀出现,应重新配制。

### 2. 孔雀绿与沙黄染色液

第 1 液:孔雀绿	5 g
蒸馏水	100 ml
第 2 液:沙黄	0.5 g

蒸馏水

100 ml

制法：用乳钵分别研磨溶解后即成。

染色方法：白金耳烧灼灭菌→采取样本适量于载玻片上，涂抹成均匀薄层→自然干燥→通过火焰三次固定→滴加 **5.0%**孔雀绿水溶液，反复加温 **2~3** 次，至气腾为止，放置冷却，如上染色 **2 min**，或置 **56℃**温箱内 **30 min**，中途适量添加染色液→水洗；→**0.5%**沙黄水溶液复染 **1 min**→水洗→吸水纸吸水干燥→滴油镜检。

用途：用于各种细菌的芽孢染色。细菌的芽孢呈绿色；细菌的繁殖体呈红色。

（蒋 莉 袁庆霞）

## 附录二 消毒与灭菌相关标准及试验菌株

### 一、国际标准化组织(ISO)灭菌技术标准

1. ISO11134:1994 医疗保健产品灭菌 – 有效要求和程序控制 – 蒸汽灭菌
2. ISO11135:1994 医疗器械 – 对于环氧乙烷灭菌的有效要求和程序控制
3. ISO11137:1995 医疗保健产品灭菌 – 有效要求和程序控制 – 辐射灭菌
4. ISO11138 – 1,1994 医疗保健产品灭菌 – 生物指示剂 – 第一部分:总则
5. ISO11138 – 2,1994 医疗保健产品灭菌 – 生物指示剂 – 第二部分: 环氧乙烷灭菌用生物指示剂
6. ISO11138 – 3,1994 医疗保健产品灭菌 – 生物指示剂 – 第三部分: 蒸汽灭菌用生物指示剂
7. ISO11140 – 1,1995 医疗保健产品灭菌 – 化学指示剂 – 第一部分:通用要求
8. ISO11140 – 2,1998 医疗产品灭菌 – 化学指示剂 – 第二部分:试验设备和方法
9. ISO11140 – 3,2000 医疗产品灭菌 – 化学指示剂 – 第三部分: 蒸汽穿透试纸的二级指示剂
10. ISO11140 – 4,2001 医疗产品灭菌 – 化学指示剂 – 第四部分: 蒸汽穿透试纸的二级指示剂
11. ISO11140 – 5,2000 医疗产品灭菌 – 化学指示剂 – 第五部分: 空气排除试纸及测试包的二级指示剂
12. ISO11737 – 1,1995 医疗保健产品灭菌 – 微生物学方法 – 第一部分:检测产品微生物总数
13. ISO11737 – 2,1998 医疗保健产品灭菌 – 微生物学方法 – 第二部分:对灭菌过程进行程序控制的灭菌试验
14. ISO13409:1996 医疗保健产品的无菌加工 – 辐射灭菌 – 小批量 25 kGy 辐射灭菌
15. ISO13683:1997 医疗保健产品灭菌 – 对医疗保健设备进行蒸汽灭菌的有效要求和程序控制
16. ISO13408 – 1,1998 医疗保健产品的无菌加工 – 第一部分:总则
17. ISO14160:1998 医疗保健产品灭菌 – 使用液体化学灭菌剂对混有动物源性物质的一次性使用医疗器械灭菌的有效要求和程序控制
18. ISO10993 – 7,1995 对医疗器械的生物学评价 – 第七部分: 环氧乙烷灭菌残留
19. ISO14161:2000 医疗产品灭菌 – 生物指示剂 – 选择使用和检验结果的解释指南

### 二、美国官方分析化学家协会(AOAC)消毒剂官方分析测试方法(1995)

#### 1. 酚系数法

- 955.11 – Testing disinfectants against *Salmonella typhi* – Phenol coefficient method
- 955.12 – Testing disinfectants against *Staphylococcus aureus* – Phenol coefficient method

955.12 - Testing disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* - Phenol coefficient method

## 2. 应用稀释法

955.14 - Testing disinfectants against *Salmonella choleraesuis* - Use - dilution method

955.15 - Testing disinfectants against *Staphylococcus aureus* - Use - dilution method

964.02 - Testing disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* - Use - dilution method

## 3. 消毒剂中有效氯杀菌等效浓度法

955.16 - Chlorine (available) in disinfectants - Germicidal equivalent concentration

## 4. 硬表面载体试验

991.47 - Testing disinfectants against *Salmonella choleraesuis* - Hard surface carrier test method

991.48 - Testing disinfectants against *Staphylococcus aureus* - Hard surface carrier test method

991.49 - Testing disinfectants against *Pseudomonas aeruginosa* - Hard surface carrier test method

## 5. 消毒剂杀真菌试验

955.17 - Fungicidal activity of disinfectants - using *Trichophyton mentagrophytes*

## 6. 消毒剂的杀菌与洗涤清洁试验

960.09 - Germicidal and detergent sanitizing action of disinfectants.

## 7. 消毒剂喷雾产品杀菌试验

961.02 - Germicidal spray products as disinfectants

## 8. 消毒剂杀细菌芽孢试验

966.04 - Sporicidal activity of disinfectants

## 9. 消毒剂杀结核分枝杆菌试验

965.12 - Tuberculocidal activity of disinfectants

## 10. 洗涤剂中添加消毒剂后的抑菌试验

972.04 - Bacteriostatic activity of laundry additive disinfectants

## 11. 游泳池水消毒剂试验

965.13 - Disinfectants (water) for swimming pools

# 三、美国测试与材料协会( ASTM )抗菌剂测试标准

1. ASTM E1174 - 00 评价保健专业人员或普通消费者洗手用品配方的标准试验方法

2. ASTM E1874 - 97 用刮杯技术评价抗菌洗涤用品的标准试验方法

3. ASTM E1882 - 00 用琼脂斑点技术评价抗菌产品配方的标准试验方法

4. ASTM E1883 - 97 用多盆洗手法评价抗菌洗手用品的标准试验方法

四、欧洲标准化委员会( CEN )消毒剂与防腐剂测试标准(注: EN 为正式欧洲标准, prEN 为推荐欧洲标准, CEN/TC216/WG1 代表欧洲标准化委员会第 216 消毒技术委员会第一工作组, N 为标准标号)

1. EN1040 - 1997:基本杀菌试验

2. EN1275 - 1997:基本杀真菌活性试验

3. prEN 216003 - 1998:基本杀细菌芽孢试验



4. EN1276 – 1997 :定量悬液细菌消毒试验(食品、工业、民用与机构领域消毒剂)
5. EN1650 – 1998 定量悬液真菌消毒试验(食品、工业、民用与机构领域消毒剂)
6. prEN12054 – 1998: 定量悬液杀菌试验(人类医疗卫生及外科擦手消毒剂)
7. EN1499 – 1997 :卫生洗手( handwash )试验方法与要求
8. EN1500 – 1997 :卫生擦手( handrub )试验方法与要求
9. prEN1656 – 1993 定量悬液杀菌试验(用于兽医学领域消毒剂)
10. prEN1257 – 1994 定量悬液杀真菌试验(用于兽医学领域消毒剂)
11. CEN/TC216/WG1N46 – 1998 :化学消毒剂表面消毒测试方法
12. CEN/TC216/WG1N88 – 1998:杀菌试验(医疗领域表面消毒剂)
13. CEN/TC216/WG1N135 – 1997 定量悬液杀灭分枝杆菌试验
14. CEN/TC216/WG1N137 – 1997 病毒灭活定量悬液试验(人类医学领域使用的消毒剂)
15. CEN/TC216/WG1N145 – 1998: 定量悬液杀灭分枝杆菌试验(医学领域仪器设备用消毒剂)
16. CEN/TC216/WG1N148 – 1998:卫生与外科擦手和洗手杀真菌试验
17. CEN/TC216/WG1N162 – 1998:定量载体杀灭细菌试验(医学领域仪器设备用消毒剂)
18. CEN/TC216/WG1N163 – 1998 :定量载体杀灭真菌试验(医学领域仪器设备用消毒剂)
19. prEN12353 – 1996 :杀菌、杀真菌和杀芽孢试验中所用微生物菌株的保藏

## 五、我国现行消毒与灭菌国家标准

- GB14930.2 – 1994 食品工具、设备用洗涤消毒剂卫生标准
- GB14934 – 1994 食(饮)具消毒卫生标准
- GB15979 – 1995 一次性使用卫生用品卫生标准
- GB15980 – 1995 一次性使用医疗用品卫生标准
- GB15981 – 1995 消毒与灭菌效果的评价方法与标准
- GB15982 – 1995 医院消毒卫生标准
- GB16383 – 1995 医疗卫生用品辐射灭菌消毒质量控制标准
- GB18278 – 2000 医疗保健灭菌 – 确认和常规控制要求 – 工业湿热灭菌
- GB18279 – 2000 医疗器械 – 环氧乙烷灭菌确认和常规控制要求 – 辐射灭菌
- GB18280 – 2000 医疗保健产品灭菌 – 确认和常规控制要求 – 辐射灭菌
- GB18281.1 – 2000 医疗保健产品灭菌 – 生物指示物第一部分:通则
- GB18281.2 – 2000 医疗保健产品灭菌 – 生物指示物第二部分:环氧乙烷灭菌用生物指示物
- GB18281.3 – 2000 医疗保健产品灭菌 – 生物指示物第三部分:湿热灭菌用生物指示物
- GB18282 – 2000 医疗产品灭菌 – 化学指示物第一部分:通则

## 六、消毒与灭菌试验常用国际标准菌株

- 金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* ATCC6538
- 大肠杆菌 *Escherichia coli* 8099、ATCC10536、ATCC11229、ATCC25922、(K12)NCTC 10538
- 绿脓杆菌 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC15442

海氏肠球菌 *Enterococcus hirae* ATCC10541  
伤寒沙门氏菌 *Salmonella typhi* ATCC6539  
猪霍乱沙门菌 *Salmonella choleraesuis* ATCC10708  
鼠伤寒沙门菌 *Salmonella typhimurium* ATCC13311  
肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* ATCC4352  
奇异变形杆菌 *Proteus mirabilis* ATCC14153  
产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* ATCC13048  
粘质沙雷菌(灵杆菌) *Serratia marcescens* ATCC14756  
粪链球菌 *Streptococcus faecalis* ATCC6057  
牛分枝杆菌(疫苗株) *Mycobacterium bovis* (BCG) ATCC35743  
结核分枝杆菌 *Mycobacterium tuberculosis* ATCC25618  
白色念珠菌 *Candida albicans* ATCC10231  
酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* ATCC9763  
须发毛癣菌 *Trichophyton mentagrophytes* ATCC9533  
黑曲霉菌 *Aspergillus niger* ATCC 16404  
枯草杆菌 *Bacillus subtilis* ATCC 19659, ATCC6633  
枯草杆菌黑色变种 *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC9372  
生孢梭菌 *Clostridium sporogenes* ATCC3584  
腊样杆菌 *Bacillus cereus* ATCC12826  
嗜热脂肪杆菌 *Bacillus stearothermophilus* ATCC7953;SSIK31  
短小杆菌 *Bacillus pumilus* E601 ATCC27142

(张文福)

### 附录三 消毒学相关文献网络资源

<http://www.iso.org/> 国际标准组织, 可检索工业灭菌、化学灭菌等相关的国际技术标准  
<http://search1.who.int/data-who-hq-live/search.shtml> 世界卫生组织文献馆藏资源检索  
<http://www.skysea.org/yxzx/biomed.htm> 医学资源网站导航  
<http://www.im.ac.cn/msdn.html> 国际微生物菌种数据网络( MSDN)  
<http://www.im.ac.cn/RKC.html> 国际计算机用微生物性状编码系统

<http://www.cdc.gov/> 美国疾病控制中心  
<http://www.cdc.gov/ncidod/ncid.htm> 美国国家传染病中心  
<http://www.nlm.nih.gov/> 美国国立医学图书馆, 可检索 Medline 数据库资源  
<http://www.fda.gov/> 美国食品与药品管理局, 审批与人体接触的消毒产品  
<http://www.epa.gov/> 美国环境保护局, 审批环境消毒产品、杀虫产品、灭鼠产品

<http://www.aoac.org/> 美国官方分析化学家联合会, 可检索最新美国消毒试验方法  
<http://www.atcc.org/> 美国标准微生物收藏中心  
<http://mcb.harvard.edu/BioLinks.html> 虚拟图书馆生物学资源  
<http://www.ebi.ac.uk/> 欧洲生物信息学研究中心。提供检索数据库、文献、软件下载  
<http://www.im.ac.cn/francebactname.html> 法国细菌名称数据库

<http://www.moh.gov.cn/> 中华人民共和国卫生部, 可检索卫生部历年审批的消毒产品  
<http://www.nlc.gov.cn/main.htm> 中国国家图书馆(北京图书馆)  
<http://www.mlpla.org.cn> 中国人民解放军医学图书馆, 可在线检索光盘数据库  
<http://www.bio-engine.com/> 生物引擎。生物医学最新研究、产业信息、文献检索、软件等  
<http://www.chinapharm.com.cn/> 中国医药市场信息网。可检索各产品供求信息、价格等

<http://www.im.ac.cn/chinese/chinese.html> 中国微生物信息网络系统  
<http://www.im.ac.cn/ecofungi/fungimenu.shtml> 中国经济真菌数据库  
<http://www.im.ac.cn/database/aboutcccmcc.html> 中国菌种保藏管理委员会  
<http://cmccb.yeah.net/> 中国医学细菌保藏管理中心  
<http://www.nicpbp.org.cn/default.asp> 中国药品生物制品鉴定所

<http://www.china-cicc.org/> 中国工业微生物菌种保藏中心  
<http://www.im.ac.cn/im/im.shtml> 中国科学院微生物研究所  
<http://www.cef.com.cn/> 中国食用菌信息网, 包含种植技术、菌种、产品供求信息  
<http://www.chinaenzyme.org/> 中国发酵工业协会酶制剂分会  
<http://www.cbi.pku.edu.cn/> 北京大学生物信息中心

<http://biochem.im.ac.cn/> 生物化学分子生物学软件下载  
<http://bioinf.bmi.ac.cn/> 生物信息学专业网  
<http://www.chinah.com/> 中卫网，全国卫生产业企业管理协会主办  
<http://www.chem.com.cn/> 中国万维化工城，中国化工信息中心主办  
<http://www.emfhealth.com/> 电离辐射与健康网，中国预防医学科学院环境卫生监测所主办

究

<http://www.cirp.org.cn/> 中国辐射防护研究院，核工业辐射防护有关的综合性的多学科研

<http://www.bioequip.com.cn/> 中国生物器材网  
<http://irradiation-gz.51.net/> 广州辐照中心  
<http://www.china-radiation.com/> 苏州大学辐照技术研究所辐照中心  
<http://www.xiaodu.net/> 北京消毒在线

<http://www.xhmed.com> 山东新华医疗器械股份有限公司  
<http://www.szshierjie.com> 深圳市施尔洁生物工程有限公司  
<http://www.china-ozone.com> 江阴市三氧消毒设备有限公司  
<http://www.hso3.com> 北京华胜科技有限公司  
<http://www.adf.com.cn> 深圳市安多福实业发展有限公司

<http://http://www.hi-tech-bio.com/> 上海高科生物工程有限公司  
<http://www.mfk.com.cn> 江苏万福金安消毒液有限公司  
<http://www.yuexing-ok.com> 兴化市医疗卫生用品有限公司  
<http://www.lionser.com> 杭州朗索医用消毒剂有限公司  
<http://www.xq.gov.cn/contents/jquantong/bailing.htm> 天津市百灵卫生消毒厂

<http://www.zhongao.com.cn> 中奥环保高科技有限责任公司  
<http://www.84.com.cn> 爱特福集团  
<http://www.bj-welcom.com> 北京维尔康泰净化工程有限责任公司  
<http://www.china-huakang.com> 江西省华康实业有限公司

(张文福)

## 附录四 我国消毒药械部分供应商及产品名录

### 1. 上海爱特福实业有限公司

主要产品: (1)爱特福 84 消毒液, 可用于家庭、医院以及公共场所的广谱消毒剂, 并可适用于餐具、瓜果消毒。是控制甲、乙、丙各型肝炎、伤寒、流感、流脑、结核、梅毒、淋病以及医院内交叉感染的高效消毒剂。(2)爱特福碘伏, 对细菌繁殖体等有较强的抑制作用, 并对创伤具有消毒、止血、消肿、加快黏膜再生之功能, 无刺激、易脱色, 是一种广谱、无毒、稳定性好的新型消毒剂。可用于手术前刷子、手术及注射部位的清洗、消毒等。(3)老好空气净, 具预防感冒、提神醒脑、消除异味的功能, 有公用、家用、车用三种型号。网址: <http://www.84.com.cn>。

管理中心: 上海市中山南路 1877 号, 邮编: 200011; 电话: 021 - 63145184, 传真: 021 - 63148484。销售总部: 南京市金山大厦 B 楼 20 层, 邮编: 210009; 电话: 025 - 3245184, 传真: 025 - 3248484。研发中心: 北京市朝阳区建国路 88 号现代城, 邮编: 100022; 电话: 13910998484; Email: [info@84.com.cn](mailto:info@84.com.cn)。

### 2. 上海怡洋实业有限公司

与国际最先进的杀菌技术相承接, 致力于杀菌技术在国内医用及民用市场的升级及推广。主要产品有: 家而康婴幼儿皮肤护理液(150 ml/瓶)、家而康婴幼儿物品消毒液(150 ml/瓶)、家而康婴幼儿尿湿护理粉(120 g/罐)、中卫牌碘伏洁阴液(250 ml/瓶)。

地址: 上海市凯旋路 3500 号 B 幢 8F 室, 邮编: 200030; 联系人: 朱琪蝉; 电话: 021 - 64077498; 传真: 021 - 64074622。

### 3. 上海高科生物工程有限公司

主要消毒产品: 利用自主开发的 FE 酶(溶葡萄球菌酶)为主要成分, 生产系列含酶消毒剂, 如百克瑞复合溶菌酶消毒剂、新净界口腔喷雾剂等, 能快速杀灭皮肤和口腔黏膜表面的细菌, 对抗生素耐药菌株具有同样效果, 不产生耐药性。

地址: 上海市浦东新区福山路 45 号新天国际大厦 21 层, 邮编: 200122; 联系人: 黄芳; 电话: 021 - 68768833; 传真: 021 - 68767976。Email: [hf@hi-tech-bio.com](mailto:hf@hi-tech-bio.com)。

### 4. 北京四环卫生药械厂

主要产品: 四环牌碘伏消毒剂、强化戊二醛消毒剂、四环牌压力蒸汽灭菌化学指示卡、G-1 型消毒剂浓度试纸等灭菌效果监测器材。

地址: 北京市丰台区东大街 20 号, 邮编: 100071; 电话: 010 - 63811012, 联系人: 焦岩松; 传真: 010 - 68213026。

### 5. 北京维尔康泰净化工程有限责任公司

是集科、工、贸于一体的高新技术实体, 专业从事工业、油田、饮水等过程自动化系统设计, 设备成套调试, 技术服务以及水处理剂的生产企业。主要消毒产品有: 稳定性二氧化氯消毒剂、饮水缓释消毒剂、各种循环水处理剂等。具有稳定性高、货架期长、高效无残留等特点。

地址: 北京密云县溪翁庄镇七孔桥西, 邮编: 101512; 联系人: 刘琦; 电话: 010 - 69011516; 传真: 010 - 69011108 Email: [info@bj-welcom.com](mailto:info@bj-welcom.com)。

## 6. 北京华胜科技有限公司

是经北京中关村科技园核准的集科、工、贸为一体的高科技企业致力于改善中国水环境,提高中国人的生活品质。以从事臭氧技术研究,臭氧系统设计、制造和工程应用,安装、服务为主导。公司开发的臭氧水处理系统 1998 年顺利通过 ISO9001 国际质量体系认证,2001 年底公司顺利通过 2000 版质量管理体系认证。2000 年 3 月,首家获得北京市卫生局颁发的用于生活饮用水与游泳池水消毒卫生许可证。6 月被中国城镇供水协会列为推荐产品。2000 年 8 月获得中华人民共和国卫生部颁发的卫生许可,亦是国内首家获此国家级证书的臭氧设备制造公司。2000 年 10 月被建设部列为国家重点产品推广项目。2001 年被列入国家重点新产品。通过几年的努力公司主持设计、施工的供水、污水净化消毒工程有十多项。网址: <http://www.hso3.com>。

地址:北京海淀中关村路甲 12 号,邮编:100080。联系人:孙先生,卞先生,张先生。电话:010-62551580,62557289;传真:010-62541289。Email: [hssq@263.net](mailto:hssq@263.net) 或 [qintian333@sina.com](mailto:qintian333@sina.com)。

## 7. 北京中奥环保高科技有限责任公司

主要产品: (1)多功能空气净化机(带负离子); (2)杀菌消毒机; (3)果蔬杀菌农药降解机; (4)消毒康卫设备; (5)臭氧空气杀菌消毒设备; (6)臭氧多功能杀菌消毒机(空调型带遥控); (7)多系列臭氧发生器。网址: <http://www.zhongao.com.cn>。

地址:北京市海淀区中关村首体南路 20 号国兴家园 6 号楼 22 层 2208 室,邮编:100044。联系人:张立,吴磊。电话:010-88355308,88355311,传真:010-88355307,服务热线:800-8106680。Email: [Za8@263.net.cn](mailto:Za8@263.net.cn)。

## 8. 北京市万福金安消毒液厂

主要生产万福金安系列消毒剂产品: (1)器械消毒液; (2)器械消毒粉; (3)旅游喷雾消毒液; (4)内窥镜专用消毒液; (5)透析机专用消毒液; (6)环境消毒液; (7)防疫消毒泡腾片剂; (8)畜牧、水产消毒剂。

地址:北京首都医科大学 12 号楼,邮编:100054。联系人:曹玉梅,电话:010-63052767、63578302, 传真 010-63292720, Email: [bjjx707@sohu.com](mailto:bjjx707@sohu.com)。

## 9. 北京新新旭清技贸有限公司

主要产品有: BTT 系列二氧化氯协同消毒剂发生器(型号: BTT-Ⅲ·C20g~BTT-Ⅲ·2000g) 网址: <http://www.xuqing-ep.com>。

联系地址:北京 142 信箱(旭清),邮政编码:100854。电话:010-68211342,68167978,传真:010-68218977。联系人:张喜成。Email: [xq\\_sales@xuqing-ep.com](mailto:xq_sales@xuqing-ep.com)。

## 10. 北京市北卫恒生科技发展有限公司

主要产品:“洁世”消毒液,由次氯酸钠、稳定剂、缓释剂、防锈剂等组成,批准文号为卫消字(2000)第 0053 号。此外还生产除油剂产品。

联系地址:北京丰台区丰西人民村 63 号,邮编:100070。联系人:慕扬、华万。电话:010-83601557,83601657。

## 11. 天津市百灵卫生消毒剂厂

主要生产卫洁灵-100、卫洁纯,化学名称为 2,4,4'-三氯-2'-羟基二苯醚,经天津市防病中心多项检测与动物试验,结果均达到国外同类产品水平,是良好的外用抗菌消毒剂,具有安全高效、长效抗菌的作用。并荣获天津市科技进步三等奖和国家科技成果证书。本厂是

ISO9002 国际认证单位。

厂址：天津市西青道京福公路口铁道北，邮编：300380。联系人：韩福忠。电话：022 - 27912079 传真：022 - 27390936, Email: quantong@mail.xq.gov.cn。

#### 12. 山东新华医疗器械股份有限公司

是我国医疗器械行业骨干企业之一,拥有进出口自营权,通过 ISO9001 和 EN46001 国际认证。主要生产 26 个系列压力蒸汽与环氧乙烷灭菌器,如 X 系列小型手控(电热)灭菌器(0.24~0.36 m<sup>3</sup>)、Y 系列普通中型压力蒸汽灭菌器(0.6~2.3 m<sup>3</sup>)、PS 系列手控脉动真空灭菌器(0.24~1.5 m<sup>3</sup>)、U 系列手动门自动控制脉动真空灭菌器(0.24~2.0 m<sup>3</sup>)、DE 系列经济型机动门真空灭菌器(0.24~2.5 m<sup>3</sup>)、DM 系列机动门自动控制脉动真空灭菌器(0.24~3.0 m<sup>3</sup>)、DW 系列机动门自动控制卫生级真空灭菌器(0.24~3.0 m<sup>3</sup>)、PQM 系列平移门自动控制纯蒸汽灭菌器(1.0~8.5 m<sup>3</sup>)、XG2.SH 系列手动门混合气体环氧乙烷灭菌器(0.24~1.5 m<sup>3</sup>)、XG2.DH 系列机动门混合气体环氧乙烷灭菌器(0.24~20 m<sup>3</sup>)、XG2.SC 系列手动门纯环氧乙烷灭菌器(0.36~0.8 m<sup>3</sup>)、XG2.DC 系列机动门纯环氧乙烷灭菌器(0.36~0.8 m<sup>3</sup>)、ZFQ 系列全自动电加热蒸汽发生器、KLM 系列普通中型大输液蒸汽快冷灭菌器(1.2~2.3 m<sup>3</sup>)、UK(R)系列普通中型大输液蒸汽快冷灭菌器(1.2~1.5 m<sup>3</sup>)、K(R)系列大型大输液快冷蒸汽灭菌器(2.5~5.7 m<sup>3</sup>)、PSM 系列双轨式大输液水浴灭菌器(6.9~26 m<sup>3</sup>)、PSMD 系列软包装大输液水浴灭菌器(1.2~41.9 m<sup>3</sup>)、SS 系列手动门多功能安瓿检漏灭菌器(0.6~5.0 m<sup>3</sup>)、SD 系列手动门多功能安瓿(口服液)检漏灭菌器(0.6~5.0 m<sup>3</sup>)、OD 系列机动门多功能安瓿(口服液)检漏灭菌器(0.6~5.0 m<sup>3</sup>)、ASMP 系列平移门安瓿水浴灭菌器(1.0~5.2 m<sup>3</sup>)、ASMD 系列机动门安瓿水浴灭菌器(1.0~5.2 m<sup>3</sup>)、RFM 系列平移门软包装通风干燥式灭菌器(4.3~21.3 m<sup>3</sup>)、XPSM 系列平移门旋转式水浴灭菌器(3.9~23.2 m<sup>3</sup>)。网址: <http://www.xhmed.com>。

地址:山东省淄博市张店区洪沟路 2 号,邮编:255027。电话:0533 - 2284313,传真:0533 - 2282553。

#### 13. 山东广威消毒剂有限公司

主要产品:广威牌高效消毒杀菌剂;如二氯异氰尿酸钠(优氯净)粉剂、颗粒剂;灭毒威粉剂、片剂等。

地址:山东临;邮编:2262618;联系人:马光奎;电话:0536 - 3412789,3412289; 传真:0536 - 3412089; Email: lqsdgw@263.net。

#### 14. 南京万福金安生物技术有限公司(江苏万福金安消毒液有限公司)

中外合资高新技术企业,产品主要有消毒剂、保健品、生物制品及精细化工产品。万福金安系列络合氯消毒剂,采用二氯异氰尿酸钠作为主原料,配以独特的增效络合剂 HZ704,杀菌高效、速效、广谱,可灭活致热源,无毒、无刺激、无腐蚀,稳定性好,有效期长达 2 年,目前已广泛应用于医疗、卫生、畜牧、水产、石油、工业等领域消毒杀菌。有片剂、粉剂、喷雾剂等多种剂型。公司还提供 PVP 碘伏、50% 非吸附性固体、洗必泰醇皮肤黏膜消毒液,等多种其他消毒剂。网址: <http://www.mfk.com.cn>。

地址:南京浦口高新技术开发区经三北路,邮编:210061。联系人:喻红。电话:025 - 8849898,传真:025 - 8740212,电子信箱 [mfk@mfk.com.cn](mailto:mfk@mfk.com.cn)。

#### 15. 江阴市三氧消毒设备有限公司

主要生产:臭氧发生管、臭氧发生器、臭氧空气消毒杀菌机、臭氧水消毒杀菌机。网址: ht-

tp://www.china-ozone.com; Email: sales@china-ozone.com。

地址:江苏省江阴市利港镇;邮编:214444;联系人:陆顺根;电话(传真):0510-6631020, 6632044, 13901524260。

#### 16. 江苏宜兴市洁乐实业有限公司

主要生产“洁消精”消毒剂,外观为白色粉末状,具有消毒、去污、去热原作用,适用于医院、药厂对大输液瓶的洁消。以及化验室、实验室对玻璃、陶瓷器皿的清洗消毒和对公共场所环境的消毒。

地址:江苏省宜兴市芳桥镇南,邮编:214264。联系人:崔向群、强小英,电话:0510-7581652、7583352,传真:0510-7581652, Email: jiele@sina.com。

#### 17. 江苏兴化市医疗卫生用品有限公司

是集科工贸一体化的股份制经济实体,专业性生产各种消毒液的企业,主要产品有:(1)越星牌器械消毒液(戊二醛),卫消字(2001)第0015号;(2)越星牌皮肤消毒液(洗必泰醇),卫消字(2001)第0018号;(3)越星牌碘伏,苏卫消字(2002)第1009号;(4)OK空气消毒液,苏卫消准字(99)第X-084号;(5)越星牌84消毒液,苏卫消字(2000)第1032号。网址: <http://www.yuexing-ok.com>。

地址:江苏省兴化市孙家路16号,邮编:225700。联系人:施龙云。电话:0523-3261753, 传真:3268800, Email: webmaster@yuexing-ok.com。

#### 18. 浙江杭州朗索医用消毒剂有限公司

主要供应“康威达”系列消毒产品。如康威达消毒液(器械与表面消毒)、复合碘(皮肤黏膜消毒)、2%戊二醛、百能洗手液、百能外科洗手消毒液、内窥镜加酶清洗剂、测氯试纸、热原灭活消毒剂(三效热原灭活剂)、医用防感染床上用品等。

厂址:浙江省建德市新安江府前路19号,邮编:311600;网址: <http://www.lionser.com>。电话(传真):0571-64714585。总经销:上海培名实业有限公司-上海朗索贸易有限公司,地址:康定路2号(康定花园),邮编:200041;电话:021-62539325, 62564327, 62557836, 传真:021-62539325。

#### 19. 浙江德清县新市五洲精细化工厂

主要产品:(1)高效消毒剂,五洲牌漂粉精(粉剂、片剂),有效氯含量60%,主要成分次氯酸钙,批准文号:卫消字(2000)第0024号。(2)高效消毒剂,五洲牌消毒灵(粉剂、片剂)速溶泡腾,有效氯含量50%,主要成分三氯异氧尿酸,批准文号:浙卫消(2000)第05-1487号。能提供片剂重量在0.5~200g之间的各种规格,使用量准确方便。

地址:浙江省德清县新市枫洋路6号,邮编:313201;联系人:姚水法;电话:0572-8208138, Email: YYM.cn@163.net。

#### 20. 福建福清市康民消毒制品厂

主要产品有:金星消毒剂、康民消毒液、速效消毒剂、夫妇金安洗液。

地址:福建省福清市龙江路27号,邮编:350300。联系人(法人):翁坤明。电话:0591-5219946, 13950339856, 传真:0591-5284326。

#### 21. 武汉同济医大卫生新科技开发公司

主要消毒产品有:(1)LJ-复方强化戊二醛消毒灭菌剂,卫生部卫消字(2000)第0030号,水剂,含1.3%戊二醛和0.1%~0.2%增效剂,适用于医疗器械的消毒与灭菌;(2)利洁牌强化戊



二醛消毒剂, 卫生部卫消字(2001)第0041号, 水剂, 含2%戊二醛和增效剂, 适用于医疗器械的消毒灭菌。

地址: 武汉市航空路13号(华中科技大学同济医学院内), 邮编: 430030。联系人: 赵金辉, 左俊英, 姜朴, 夏正刚, 梅桥生, 联系电话: 027-83692704, 027-83620241, 13907181493(夏), 传真: 027-8362354, Email: TJhealth@mails.tjmu.edu.cn。

## 22. 山西大同市精细化工有限责任公司

主要产品有: (1)杰力牌三效热原灭活剂(免刷型、粉剂、500 g/袋), 是医院消毒供应室玻璃注射器专用洗涤剂。具有消毒、去污、热原灭活功能。(2)杰力牌三效热原灭活剂有效氯指示卡(纸型)。专用于三效热原灭活剂使用中的有效氯浓度测定。(3)杰力牌杰力酶-SQ免刷型、粉剂、20 g/袋, 由复合酶组成的复方制剂, 是手术及检查器械专用浸泡免刷型洗涤剂。(4)小天鹅全自动手术器械清洗机SQ型, 专门使用杰力酶洗涤剂的全自动手术器械清洗机。

地址: 山西省大同市庆周路8号, 邮编: 037008; 联系人: 潘悦; 电话: 0352-5025412; 传真: 0352-5029889。

## 23. 江西省华康实业有限公司

主要产品: 臭氧消毒水龙头(臭氧消毒水发生器), 采用专利技术(专利号: ZL99208102.5、ZL99304949.4)生产, 打开水龙头即可产生含有臭氧的水, 洗涤瓜果、蔬菜、餐具等任何物品, 均具有快速杀菌与消毒作用, 降解化肥、农药等有害物质, 安全环保。网址: <http://www.china-huakang.com>。

地址: 江西省九江市人民路188号, 邮编: 332000。联系人: 叶于康。电话: 0792-8218885 传真: 8227216。Email: huakang@public1.jj.jx.cn。

## 24. 广东中山市惠康医疗用品有限公司

主要生产“安高特牌”泡沫型皮肤消毒剂, 采用氯己定和乙醇为主药, 配以抛射剂, 以泡沫新剂型出现, 泡沫将消毒杀菌因子包围, 限制了酒精的挥发损失, 从而使产品能快速、简便、彻底地发挥作用。包装规格: 250 ml/瓶(48瓶/箱)。

地址: 广东省中山市小榄镇竹源宝源路第一工业区, 邮编: 528415; 联系人: 汤国天; 电话 / 传真: 0760-2253259。

## 25. 广东省茂名市消毒用品厂

主要产品: (1)茂康消佳净泡腾片(50%有效氯), 2001 粤卫消准字 0584 号; (2)茂康消佳净水剂(5%有效氯), 1995 粤卫消准字 0123 号; (3)茂康消佳净粉剂 10% 以上有效氯, 1995 粤卫消准字 0122 号; (4)茂康 PVP-碘(0.3%、0.5%), 1998 粤卫消准字 0314 号; (5)茂康 2% 强化戊二醛(2%), 1996 粤卫消准字 0229 号。

地址: 广东茂名市高山第三期开发区, 邮编: 525000。联系人: 刘嘉彬。电话: 0668-2523602, 2527900, 13709628848, 13509927790, 传真: 0668-2523602。

## 26. 广东省佛山市科的气体化工有限公司

主要生产经营的产品有: 标准混合气体、高纯气体、消毒剂(气体、片剂)、清洗剂、硬脂酸盐及非离子表面活性剂六大类。消毒剂获国家专利(专利号: 98102055.0)和卫生许可证(1998 粤卫消准字 0365 号)。清洗剂荣获 2000 年香港国际发明展银奖。公司 2000 年通过英国高保公司质量认证中心 ISO9002 质量体系认证。网址: <http://www.spgas.com.cn/>。

地址: 广东省南海市大沥 321 国道仙溪, 邮编: 528231, 销售部电话: 0757-5502055 转 22 或

18 或 11。传真:0757 - 5509066,5502055 - 18。公司电子邮箱: kdg@163.net。

**27. 深圳市安多福实业发展有限公司**

主要产品: ①“安多福”牌 PVP-I 消毒剂系列(有效碘含量 0.1%、0.5%, 剂型规格多样); ②“安洁乐”牌消毒冻胶系列(有效碘含量 0.2%, 规格多样)。本公司产品具有不粘滑、不起泡、不黄染、不刺激、加快伤口愈合等特点, 主要用于人体皮肤黏膜消毒杀菌抗感染, 如刀伤、烧烫伤抗感染, 医生手消毒、术野消毒、阴道黏膜消毒、注射部位消毒等。公司网页: <http://www.adf.com.cn>。

地址: 深圳市深南中路 3027 号嘉汇新城汇商中心 2126 信箱, 邮编: 518033。联系人: 聂小姐, 陈小姐。电话: 0755 - 3289571, 3297817, 传真: 0755 - 3603017, Email: shenzhen@adf.com.cn。

**28. 深圳市施尔洁生物工程有限公司**

主要产品有: ①各种用途、不同规格的系列湿巾(卫生湿巾、消毒湿巾、便携湿巾、婴儿洁体湿巾), 适用于人员手、餐具的消毒、清洁、去污, 以及皮肤护理、卸妆等; ②手术消毒液, 适用于手术前手臂消毒、皮肤消毒; ③器械消毒液, 适用于医疗手术器械的杀菌消毒、环境卫生消毒; ④家庭消毒药水, 适用于餐具、洁具、衣物、玩具、各种表面的消毒; ⑤洁阴液, 适用于外阴及阴道的冲洗、消毒; ⑥消毒生物护理液。网址: <http://www.szshierjie.com>。

地址: 深圳市福华路福庆街鸿图大厦三楼 302 室, 邮政编码: 518033。电话: 0755 - 3604150, 3339300, 3334135, 传真: 0755 - 3602932。联系人: 李才圣, 黄爱容。Email: licaisheng@szshierjie.com。

## 附录五 我国消毒产品上市要求

消毒产品是依据《中华人民共和国传染病防治法》及其《实施办法》、《消毒管理办法》审批的消毒药剂、消毒器械、一次性使用医疗用品、一次性使用卫生用品。

目前《消毒管理办法》规定,对于消毒药剂、消毒器械如果在本省范围内进行生产、经营、销售,只需获得省级卫生行政部门批准即可,如果在全国范围内生产、经营、销售的,则必须获得卫生部的批准。

### 第一节 消毒的基本概念

消毒:指杀灭或者消除传播媒介上病原微生物,使其达到无害化的处理。

灭菌:指杀灭或者消除传播媒介上所有的微生物。

消毒产品:包括消毒剂、消毒器械、生物指示物和化学指示物、一次性使用医疗用品和一次性使用卫生用品。

消毒剂:指用于杀灭或者清除微生物以达消毒或灭菌要求的制剂。

消毒器械:指用于杀灭或者清除微生物以达消毒或灭菌要求的各种器械或装置。

生物指示物和化学指示物:指用于消毒与灭菌效果监测的产品。

一次性使用医疗用品:指用于医疗、诊断、护理工作中的必须达到消毒或灭菌要求的一次性使用器材。

一次性使用卫生用品:指应符合国家规定的微生物卫生指标,并用于人体日常清洁、卫生的一次性使用用品。

疫源地:指传染病所在地和病原体自传染病人向周围扩散所能涉及的范围。

消毒服务机构:指为社会提供对可能被病原体污染的物品及其场所、一次性使用医疗、卫生用品等进行消毒与灭菌服务的单位。

医疗卫生机构:指医疗保健、疾病控制、计划生育、采供血机构与上述机构业务活动相同的单位。

### 第二节 审批要求

目前在我国,消毒产品必须经过省级以上卫生行政部门审核批准,并颁发卫生许可批件后方可进行生产、经营、销售。消毒产品的审批有一套完整的、科学的、规范的审批程序。

#### 一、申报需提供的资料

申报消毒产品时应按下列要求向审评机构提交申报资料及产品样品。每个产品的资料应按下列顺序排列,并使用明显的标志区分,同时装订成册。

##### (一) 新产品

##### 1. 国产消毒药剂(原件 1 份,复印件 13 份)

- (1)国产消毒药剂卫生许可申请表。
  - (2)省级卫生行政部门的初审意见。
  - (3)产品研制报告。
  - (4)产品配方。
  - (5)主要有效成分、含量及有效成分的检验方法。
  - (6)生产工艺及简图。
  - (7)产品质量标准(企业标准)。
  - (8)检验机构出具的检验报告。
  - (9)生产条件验收报告。
  - (10 产品设计包装(含产品标签)。
  - (11)产品说明书样稿。
  - (12 可能有助于产品评审的其他资料。
- 另附完整产品样品小包装 3 件。

## 2. 进口消毒药剂(原件 1 份,复印件 13 份)

- (1)进口消毒药剂卫生许可申请表。
  - (2)产品研制报告。
  - (3)产品配方。
  - (4)主要有效成分、含量及有效成分的检验方法。
  - (5)生产工艺及简图。
  - (6)产品质量标准(企业标准)。
  - (7)产品相关的国外检测报告。
  - (8)检验机构出具的检验报告。
  - (9)产品包装(含产品标签)。
  - (10 产品说明书。
  - (11)受委托申报单位应提交委托申报的委托书。
  - (12 产品生产国(地区)允许生产销售的证明文件。
  - (13 可能有助于产品评审的其他资料。
- 另附完整产品样品小包装 3 件。

## 3. 国产消毒器械(原件 1 份,复印件 13 份)

- (1)国产消毒器械卫生许可申请表。
- (2)省级卫生行政部门的初审意见。
- (3)产品研制报告。
- (4)产品结构图和杀菌原理。
- (5)生产工艺及简图。
- (6)产品质量标准(企业标准)。
- (7)检验机构出具的检验报告。
- (8)生产条件验收报告。
- (9)产品设计包装(含产品标签)。
- (10 产品说明书样稿。

(11)可能有助于产品评审的其他资料。

另附完整产品样品 1 件。

#### 4. 进口消毒器械(原件 1 份,复印件 13 份)

(1)进口消毒器械卫生许可申请表。

(2) 产品研制报告。

(3)产品结构图和杀菌原理。

(4)生产工艺及简图。

(5)产品质量标准(企业标准)。

(6)产品相关的国外检测报告。

(7)检验机构出具的检验报告。

(8)产品包装(含产品标签)。

(9)产品说明书。

(10) 受委托申报单位应提交委托申报的委托书。

(11)产品生产国(地区)允许生产销售的证明文件。

(12) 可能有助于产品评审的其他资料。

另附完整产品样品 1 件。

其中申报资料中检验报告应按下列顺序排列:

##### 1. 消毒药剂

(1)有效成分测定报告。

(2)稳定性试验报告。

(3)杀灭微生物效果评价报告。

(4) 有机物影响试验报告。

(5) 能量试验报告。

(6)毒理学安全性评价报告。

(7)现场试验报告。

(8)模拟现场试验报告。

(9)金属腐蚀性试验报告。

##### 2. 消毒器械

(1)杀菌强度(或浓度)测定报告。

(2)使用寿命试验报告。

(3)杀灭微生物效果评价报告。

(4) 有机物影响试验报告。

(5) 能量试验报告。

(6)安全性(包括毒理学)评价报告。

(7)现场试验报告。

(8)模拟现场试验报告。

(9)金属腐蚀性试验报告。

(二) 到期申请换发卫生许可批件的产品申报单位应按下列要求向审评机构提供产品中报资料及产品样品

**1. 消毒药剂(原件 1 份,复印件 13 份)**

- (1)消毒药剂卫生许可再次审核申请表。
  - (2)省级卫生行政部门的初审意见(国产产品)。
  - (3)产品现配方。
  - (4)主要有效成分及含量。
  - (5)产品质量标准(现行企业标准)。
  - (6)检验机构出具的检验报告:有效成分测定报告;稳定性试验报告;杀灭微生物效果评价报告(以最高抗力微生物为准)。
  - (7)产品包装(含产品标签)。
  - (8)产品说明书。
  - (9)委托申报单位应提交委托申报的委托书(进口产品)。
  - (10)原卫生许可批件原件。
- 另附完整产品样品小包装 3 件。

**2 消毒器械(原件 1 份,复印件 13 份)**

- (1)消毒器械卫生许可再次审核申请表。
  - (2)省级卫生行政部门的初审意见(国产产品)。
  - (3)产品结构图和杀菌原理。
  - (4)产品质量标准(现行企业标准)。
  - (5)检验机构出具的检验报告:杀菌强度(或浓度)测定报告;杀灭微生物效果评价报告(以最高抗力微生物为准)。
  - (6)产品包装(含产品标签)。
  - (7)产品说明书。
  - (8)受委托申报单位应提交委托申报的委托书(进口产品)。
  - (9)原卫生许可批件原件。
- 另附完整产品样品 1 件

## 二、审批程序

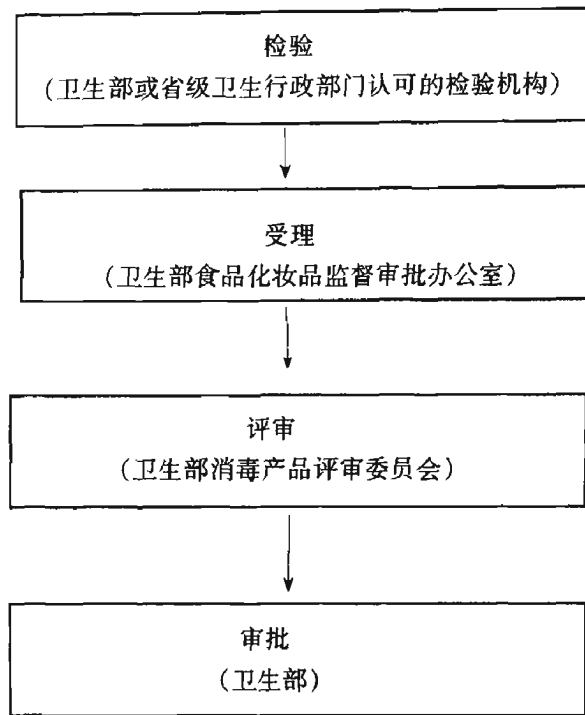
健康相关产品审批工作包括:检验、受理、评审和审批四个方面的内容(见附图)。

**检验:**申报单位应到卫生部或省级认可的检验机构做检验,申报单位应首先向检验机构提出检验申请,并填写卫生部健康相关产品检验申请表,检验机构将根据卫生部下发的检验项目及检验方法的要求对检验样品进行相关检验。

**受理:**按《卫生部消毒产品申报与受理的规定》的要求,将申报资料提交卫生部食品化妆品监督管理办公室。

**评审:**卫生部将每季度受理的消毒产品提交消毒专家评审委员会评审。

**审批:**将技术评审通过的消毒产品上报卫生部审批。



附图 消毒产品审批程序

### 第三节 审批中的注意事项

一、同一申报单位同时申报多个产品时,应按产品逐一申报。每份申请表只能申报一个具体型号(或剂型)的产品,不受理系列产品的申报。

二、产品名称应符合《健康相关产品命名规定》的要求,名称应包括商标名、通用名、属性名三部分,器械类产品还应包括产品型号。名称顺序为商标名、型号、通用名、属性名。

三、申报资料中除申请表及检验机构出具的检验报告外,所有资料应逐页加盖申报单位印章(可以是骑缝章)。

四、申报资料均应使用 A4 规格纸张打印(建议中文使用宋体小 4 号字,英文使用 12 号字)。申报的各项内容应完整、清楚,不得涂改。

五、申报资料的复印件应由原件复制,复印件应当清晰并与原件完全一致。

六、申报资料中同一项目的填写应当一致,不得前后矛盾。

七、申报资料中出现的产品名称应包括产品品牌和型号(或剂型)。

八、申报资料中所有外文(包括产品、生产企业和申报单位的名称)均应译为规范的中文,并将译文附在相应的外文资料之后,但本规定要求配方中使用英文或拉丁文的成分名称以及外国地址等除外。

九、申报单位提交检验报告时,应同时提交“卫生部健康相关产品检验申请表”和“卫生部健康相关产品检验受理通知书”。

十、检验机构出具的检验报告应符合下列要求:

(一)载明样品送检单位、产品生产单位、产品名称、样品数量、收样日期、报告日期、最终审核日期、检验依据和检验项目;

(二)报告格式规范,不得涂改;

(三)检验数据及结论明确;

(四)有检验单位法人代表(或其授权人)签名及检验单位公章;

(五)检验报告除在检验结论处加盖检验单位公章外,一页以上的检验报告必须加盖骑缝章。

十一、进口产品受委托申报单位提交的委托书应符合下列要求:

(一)每个产品一份委托书原件;

(二)委托书应载明委托书出具单位名称、受委托单位名称、委托申报产品名称、委托事项和委托书出具日期;

(三)委托书应有出具单位印章或法人代表人(或其授权人)签名;

(四)委托书载明的出具单位应与申报产品生产企业完全一致;

(五)委托书载明的受委托单位应与申报单位完全一致;

(六)委托书载明的产品名称应与申报产品名称完全一致;

(七)委托书凡载明有效期的,申报产品的时间应在有效期内;

(八)受委托单位再次委托其他单位申报产品时,应出具产品生产企业的认可文件;

(九)委托书中文译文应有中国公证机关的公证。

十二、进口产品在生产国(地区)允许生产销售的证明文件应符合下列要求:

(一)每个产品一份证明文件原件。无法提供证明文件原件的,须由文件出具单位确认,或由我国驻产品生产国使(领)馆确认;

(二)证明文件应载明文件出具单位名称、生产企业名称、产品名称和出具文件的日期;

(三)证明文件应是产品生产国政府主管部门、行业协会或政府主管部门认可的检验单位出具的;

(四)证明文件应有出具单位印章或法人代表人(或其授权人)签名;

(五)证明文件所载明的产品生产企业名称和产品名称,应与所申报的内容完全一致;

(六)证明文件凡载明有效期的,申报产品的时间应在有效期内;

(七)证明文件中文译文应有中国公证机关的公证。

十三、产品配方中成分的填报应符合下列要求:

(一)所有生产时加入的成分均需申报;

(二)给出配方中全部组分的名称及百分含量;

(三)配方中的成分应使用化学名称,并注明商品名;

(四)配方中的成分应当给出准确的百分含量,不得只给出使用含量范围;

(五)配方成分中来源于植物的原料应当给出学名(拉丁文);

(六)二元或多元包装的产品应将各包装配方分别列出。

十四、大型消毒器械无法提供产品样品的,应提供产品照片一张。

十五、到期申请换发卫生许可批件的产品,受理申报时应同首次申报产品一样履行相应的程序。

十六、申请换发卫生许可批件的进口消毒产品,应于批件到期前 **4~6**个月向卫生部提出



换发批件的申请。

到期申请换发卫生许可批件的国产消毒产品应于批件到期前 4~6 个月向所在省、自治区、直辖市卫生行政部门提出换发批件的申请。省级卫生行政部门应于受理换发批件申请一个月内完成初审。

凡超过上述期限提出申请的，不予受理。

十七、到期申请换发卫生许可批件的产品，凡产品配方、结构、型号(或剂型)等可能涉及卫生安全或功能性的项目有变更的，应按新产品申报。其他项目的变更应按有关规定履行相应的审批程序。

十八、凡经过省级卫生行政部门初审的产品，申报时应提供省级卫生行政部门的初审意见，加盖省级卫生行政部门公章(其他印章无效)，并附评审委员签名的省级评审委员会初审报告。

十九、审评机构受理申报之后，申报单位提交的修改补充资料，均应写明出具资料的日期(年月日)，并加盖与原申报单位一致的公章。

二十、已受理产品，要求更改申报内容的规定为：

(一)检验报告、产品配方、结构、型号(或剂型)、生产工艺及其他可能涉及产品卫生安全或功能的内容不得变更；

(二)进口产品全称和生产企业全称的外文原文不得变更；

(三)要求更改其他申报内容的，申报单位应出具书面申请并写明理由。申请应写明提交的日期，并加盖与原申报单位一致的公章。申请应对涉及更改的内容重新提供完整的资料，如更改产品中文名称时，应写明更改后的产品名全称。更改产品中文说明书时，应提交更改后的说明书全文；

(四)审评机构向卫生部提交的报批资料，应以申报单位最终出具的补充确认资料为准；

(五)更改申报内容涉及初审环节的，应经原初审的省级卫生行政部门审核；

(六)报批资料提交卫生部后，审评机构不再受理申报单位要求更改申报内容的申请。

二十一、申报单位申请更改消毒产品卫生许可批件的，应向卫生部提交书面申请，并附原卫生许可批件原件，具体规定为：

(一)生产企业名称变更(包括自身变更、被收购或合并等)：凭当地工商行政管理部门出具的证明文件，给予办理更改生产企业名称；

(二)生产企业地址变更：凭当地工商行政管理部门出具的证明文件，给予办理更改生产企业地址；

(三)产品名称变更：生产企业在注册商标时，已有同名产品注册，但其已获我部批准的产品名称中包括了其商标名称的，凭商标注册机构出具的证明文件，给予办理更改产品名称；由于生产企业被收购或合并，产品名称与生产企业名称相关，凭当地工商行政管理部门出具的生产企业名称变更证明文件，给予办理更改产品名称；

(四)一次性全权转让的产品，接受转让单位提供下列资料后给予办理相关项目的变更：

1. 转让和接受转让双方签订的有效转让合同；
2. 公证机关出具的转让合同的公证文件；
3. 接受转让单位的消毒产品生产企业卫生许可证；
4. 原卫生许可批件原件。

(五)申报及审批过程中存在填写或打印文字错误,要求更正的,给予办理。

除上述情况外,卫生部不受理其他批件更改的申请。其中,要求更改国产消毒产品卫生许可批件的,应有原初审的省级卫生行政部门签署的书面意见,并加盖省级卫生行政部门公章。

二十二、已受理产品,在卫生部做出审批结论之前,申报资料及样品一律不退申报单位。

二十三、未获卫生部批准的产品,申报单位可书面申请退回提交的受委托申报的委托书和产品在生产国(地区)允许生产销售的证明文件,其他申报资料及样品一律不退申报单位,由审评机构存档备查。

二十四、评审工作需要时,根据评审委员会建议,经卫生部同意,可以要求申报单位在评审会上解答技术性问题或作补充说明。申报单位可以回答评委提问和作必要的说明,但不参加评议。

## 第四节 消毒产品生产企业卫生规范

### 第一章 总则

第一条 为了加强消毒产品生产企业的卫生管理,保证消毒产品卫生质量和消费者的使用安全,特制定本卫生规范。

第二条 本规范依据《中华人民共和国传染病防治法》及其《实施办法》、《消毒管理办法》的有关规定制定。

第三条 本规范涉及的消毒产品包括消毒剂、消毒器械、一次性使用医疗、卫生用品和评价消毒与灭菌效果的指示器材。

第四条 从事消毒产品生产的企业必须遵守本规范。

第五条 地方各级人民政府卫生行政部门监督本规范的实施。

### 第二章 生产环境与布局

第六条 生产企业应当建于无积水、无杂草、无垃圾、无蚊蝇害虫孳生地的清洁区内。

一次性使用医疗用品生产企业应当距影响产品卫生质量的污染源 500 m 以外,厂区周围环境应当绿化。

第七条 生产企业布局合理,应当符合相应卫生要求,生产区、非生产区设置应当能保证生产连续性且不得有逆向交叉。

第八条 生产布局必须符合生产工艺流程,应当设置原料间、生产车间、成品间、质检部门等,生产工序衔接合理。

第九条 生产过程中使用或产生有毒、有害、易燃、易爆物的,必须具备相应卫生安全设施,并符合国家卫生安全有关规定。

第十条 动力、供暖、空调机房、给排水系统和废水、废气、废渣的处理系统等辅助建筑物和设施应当不影响生产卫生。

### 第三章 生产区卫生要求

第十一条 生产区必须设更衣室,室内应当有衣柜、鞋架等更衣设施,并配备流动水洗手、消毒设施。

第十二条 生产区厕所必须为水冲式,并保持清洁卫生。

第十三条 生产车间地面、墙面、顶面及工作台面应当便于清洗消毒。净化车间的内装修

应当选用不起尘的材料。

第十四条 生产企业必须具备适合产品生产特点、满足生产需要、保证产品卫生质量的设备。

第十五条 生产企业根据产品生产的卫生要求,应当对车间环境采取消毒措施。

第十六条 生产设备、工具、容器、场所和工作衣、帽、鞋,应当根据产品特点,在使用前进行清洗、消毒。

第十七条 生产用水水质应当达到生产工艺要求。

隐形眼镜护理液以及有特殊卫生要求产品的生产用水应当用无菌水。

消毒剂生产用水应当符合生活饮用水卫生标准。

一次性使用医疗用品的生产冲洗用水应当符合去离子水、注射用水标准。

第十八条 进入人体无菌组织、器官的一次性使用医疗用品、隐形眼镜护理液以及有特殊卫生要求的消毒产品的生产、分装,必须在 10 万等级洁净度以上净化车间进行。

第十九条 消毒产品生产车间的卫生学要求按 GB15979、GB15980 及国家有关卫生标准的规定执行。

#### 第四章 原材料、产品包装及仓储卫生要求

第二十条 用于生产一次性使用医疗、卫生用品的原材料必须无毒、无害、无污染,有相应的检验报告或证明材料。

第二十一条 原材料和成品必须分开存放,并设有明显标志。仓库应当有通风、防尘、防鼠、防虫等设施,储物存放保持干燥、清洁、整齐,应当符合产品相应的保存要求。

一次性使用医疗、卫生用品应当离地、离墙存放不小于 10 cm,离顶不小于 50 cm。

第二十二条 待检产品、合格产品、不合格产品应分开存放,并有易于识别的明显标记。产品出入库应当有登记、验收制度,并记录备查。

#### 第五章 卫生质量控制

第二十三条 企业应当建立、完善产品生产的卫生质量保证体系,产品企业标准或者质量标准中的卫生指标及检验方法应当符合国家有关卫生标准、技术规范的要求。

第二十四条 企业应当建立自检制度,具备相应的检验仪器、设备。用于生产与检验的计量器具应按要求定期检定,记录备查。

第二十五条 从事卫生质量检验工作的人员必须经省级卫生行政部门考核合格,并取得上岗证。

第二十六条 每批产品投放市场前必须进行卫生质量检验,合格后方可出厂。

第二十七条 企业应当根据产品特点开展对车间环境卫生自检和产品卫生质量自检,不同产品生产企业的自检项目:

(一)消毒器械生产企业应当对每个产品消毒作用因子强度或与消毒灭菌效果相关的理化指标进行检测;

(二)消毒剂生产企业应当对每批原材料和每个班组生产的产品理化指标进行检测。无特定有效含量检测方法的,如植物、生物类提取物等产品应当建立能保证该产品质量的相应技术参数、检测指标及方法;

(三)评价消毒与灭菌效果的指示器材应当建立能保证该产品质量的相应技术参数、检测指标及方法;

(四) 一次性使用医疗用品生产企业应当对每班次生产的产品进行微生物指标检测;

(五) 卫生用品生产企业应当对每个投料批次生产的产品进行微生物指标检测;

第二十八条 产品质量检测记录及报告应当完整,不得随意涂改,使用法定计量单位。

第二十九条 生产过程的各项原始记录应当妥善保存,保存期限为该产品的失效日期后三个月。

## 第六章 人员要求

第三十条 企业必须配备经专业培训的专职或兼职卫生管理人员,管理人员名单应当报省级卫生行政部门备案。

第三十一条 直接从事消毒产品生产的操作人员,上岗前及每年必须进行一次健康体检,取得预防性健康体检合格证明后方可上岗。

患有活动性肺结核、病毒性肝炎、肠道传染病患者及病原携带者,化脓性或慢性渗出性皮肤病等传染病患者,不得从事一次性使用医疗、卫生用品的生产。

第三十二条 生产人员上岗前必须进行消毒卫生知识及有关卫生标准的培训,并取得卫生培训合格证,方可上岗。

第三十三条 工作人员的工作服应当穿戴整洁,操作前根据产品卫生要求,应当清洁、消毒双手。

从事一次性使用的医疗、卫生用品的从业人员在生产过程中不得戴手饰、手表以及染指甲、留长指甲。

第三十四条 工作人员在生产过程中不得进行吸烟、进食等影响产品卫生质量的活动。

## 第七章 附则

第三十五条 本规范下列用语含义:

产品批次:产品最终经消毒灭菌处理的,以消毒灭菌批次为产品批次;其他产品以同一批原料、在相同生产条件下生产的产品为一批次。

**10万等级洁净度净化车间:**按控制区、洁净区严格分区设计,室内环境、用具采用不吸尘、易清洗、消毒的材料,通过物理过滤除尘、定向通风使室内微小气候达到以下要求:温度 **18~24℃**,相对湿度 **50%~65%**,进风口风速不小于 **0.25 m/s**,室内外压差不小于 **4.9 Pa**,空气中  $\geq 0.5 \mu\text{m}$  粒子数不大于 **3 500 个/L**,空气细菌菌落数不大于 **500 cfu/m<sup>3</sup>**,物体表面细菌菌落数不大于 **10 cfu/cm<sup>2</sup>**。

第三十六条 本规范由卫生部负责解释。

第三十七条 本规范自 **2001年1月1日** 起实施。

(翟廷宝 郭世兰)

## 附录六 英汉消毒学词汇

### A

AAMI, Association for the Advancement of Medical Instrumentation( 美国)医疗器械促进协会  
Achromobacter liquefaciens 溶胶无色杆菌  
Acid – fast bacillus 抗酸杆菌  
activation 激活作用  
active bromine compound 活性溴化合物  
active chlorine – containing disinfectant 含氯消毒剂  
active group 活性基团  
active solution 活性溶液  
adenosine triphosphatase 三磷酸腺苷酶  
adenovirus 腺病毒  
adipic acid 己二酸  
adsorbant 吸附剂  
aerobic bacteria 需氧菌  
aerosol 气溶胶  
aerosol atomizer 气溶胶喷雾器  
aerosol can 气雾罐  
aerosol dispenser 气雾发生器  
airborne 空气传播的  
air washing 空气洗涤  
Alcaligenes fecalis 粪产碱杆菌  
alcohols 醇类  
aldehydes 醛类  
aldolase 醛缩酶  
aliphatic acid 脂肪族酸  
alkaloid 生物碱  
alkylation 烷基化  
alpha ray  $\alpha$  射线  
amphoteric surfactant 两性离子表面活性剂  
anaerobic bacteria 厌氧菌  
anion surfactant 阴离子表面活性剂  
annular nozzle 同心式喷头

ANSI, American National Standards Institute 美国国家标准协会

antisepsis 抗菌  
antiseptic 抗菌剂  
AOAC, Association of Official Analytical Chemist  
( 美国)官方分析化学家协会  
asbestos pad filter 石棉板滤器,赛兹滤器  
ascospore 子囊孢子  
asepsis 无菌  
aseptic 无菌的  
aseptic technique 无菌操作  
Aspergillus flavus 黄曲霉  
Aspergillus nidulans 构巢曲霉  
Aspergillus niger 黑曲霉  
atomizer 雾化器  
autoclave 压力蒸汽灭菌器,压力锅  
autoclaving 压力蒸汽灭菌法  
available chlorine 有效氯

### B

Bacillus anthracis 炭疽杆菌  
Bacillus cereus 蜡状杆菌  
Bacillus coagulans 凝结芽孢杆菌  
Bacillus dysenteriae 痢疾杆菌  
Bacillus lacticus 乳酸杆菌  
Bacillus megatherium 巨大芽孢杆菌  
Bacillus mesentericus 肠膜芽孢杆菌  
Bacillus pneumoniae 肺炎杆菌  
Bacillus pumilis 短小芽孢杆菌  
Bacillus stearothermophilus 嗜热脂肪芽孢杆菌  
Bacillus subtilis 枯草杆菌  
Bacillus subtilis var. niger 枯草杆菌黑色变种  
Bacillus tuberculosis 结核杆菌  
bacteriocide 杀菌剂

bacteriophage 噬菌体  
 bacteriostat 抑菌剂,制菌剂  
 benzalkonium chloride 苯扎氯铵,洁尔灭  
 benzalkonium bromide 苯扎溴铵,新洁尔灭  
 benzoic acid 苯甲酸  
 benzyl alcohol 苯甲醇  
 Berkefeld filter 贝氏滤器,硅藻土滤器  
 Betadine 碘伏(商品名)  
 beta - propiolactone 乙型丙内酯  
 beta ray  $\beta$  射线  
 bioassay 生物测定  
 bioburden 生物负载  
 biochemical oxygen demand 生化需氧量  
 biocide 杀生物剂  
 biodegradation 生物降解  
 biological membrane 生物膜  
 biologicals 生物制品  
 biostat 抑制生物剂  
 black fluid 黑色消毒液  
 blastospore 芽生孢子  
 bleaching powder 漂白粉  
 boiling 煮沸  
 borax 硼砂  
 botanical disinfectant 植物消毒剂  
 break point 折点  
 bromine 溴  
 bromo - geramin 新洁尔灭, 苯扎溴铵  
 BSA 牛血清白蛋白  
 butyl rubber 丁基橡胶  
 Byssochlamys fulva 黄丝衣霉

## C

calcium hypochlorite 次氯酸钙  
 Candida albicans 白色念珠菌  
 capacity test 能量试验  
 Capillaria hepatica 肝毛细线虫  
 capsule 荚膜  
 carboxylesterase 羧酸酯酶

carrier (for bacteria) 载体, 菌片  
 casein 酪蛋白  
 caspid (viral) 衣壳(病毒)  
 catalase 过氧化氢酶  
 cation surfactant 阳离子表面活性剂  
 cavitation 空穴作用  
 CEN 欧洲标准化委员会  
 chamber (of sterilizer) 柜室(灭菌器)  
 Chamberland filter 素磁滤器  
 change of air 换气次数  
 chemical disinfectant 化学消毒剂  
 chemical indicator 化学指示剂  
 Chlamydozoan 衣原体  
 chloramine 氯胺  
 Chlorella 小球藻  
 chlorhexidine 洗必泰,氯己定  
 chlorinated trisodium phosphate 氯化磷酸三钠  
 chlorine 氯  
 chlorine demand 加氯量(需氯量)  
 chlorine dioxide 二氧化氯  
 chlorine - releasing disinfectant 含氯消毒剂  
 chloro - bromoisocyanuric acid 氯溴异氰脲酸  
 chlorobutanol 三氯叔丁醇  
 Cidex 碱性戊二醛(商品名)  
 Clostridium botulinum 肉毒杆菌  
 Clostridium perfringens 产气荚膜梭菌  
 Clostridium putrificum 腐败梭菌  
 Clostridium sporogenes 生芽孢梭菌  
 Clostridium tetani 破伤风梭菌  
 coal tar disinfectant 煤焦油类消毒剂  
 cobalt 钴  
 Coccidioides 球孢子菌属  
 Coccidioides immitis 粗球孢子菌  
 coli - index 大肠菌群数,大肠菌指数  
 coliphage 大肠杆菌噬菌体  
 colititre 大肠菌值  
 combined residual chlorine 结合性余氯  
 concentration exponent 浓度指数  
 concurrent disinfection 随时消毒

**conditional lethal factor** 条件致死因子  
**cone nozzle** 圆锥式喷头  
**conidia** 分生孢子  
**contamination** 污染  
**cortex** 皮质  
**Corynebacterium diphtheriae** 白喉杆菌  
**cotton swab** 棉拭  
**Coxsackie virus** 柯萨奇病毒  
**Creutzfeldt - Jakob disease** 克雅病  
**critical items** 关键性物品  
**Cryptococcus neoformans** 新型隐球菌  
**Cryptosporidium** 隐孢子虫  
**cryptosporidiosis** 隐孢子虫病  
**crystal violet** 结晶紫,龙胆紫  
**cyclohexylamine** 环己胺  
**cyst** (生物) 包囊

## D

**dark reactivation** 暗复活  
**dative bond** 配价键  
**DCMX soap solution** 二氯二甲酚皂溶液  
**death probability** 死亡机率  
**dechlorination** 脱氯  
**degradation** 降解  
**dehydration** 脱水  
**dengue haemorrhagic fever** 登革出血热  
**deoxyribonucleic acid** 脱氧核糖核酸  
**desiccation** 干燥  
**Detergadyne** 碘伏(商品名)  
**detergent** 洗涤剂,去垢剂  
**Dettol** 滴露(商品名),对氯间二甲苯酚  
**diatomaceous earth filter** 硅藻土滤器,贝氏滤器  
**dichloramine T** 双氯胺 T  
**dichlor - m - xylene** 二氯二甲酚  
**dichloro isocyanuric acid** 二氯异氰脲酸  
**dichlorophene (G4)** 二氯酚  
**dilution coefficient** 浓度系数  
**dimer** 二聚体

**dipicolinic acid** 吡啶二羧酸  
**Diplococcus intracellularis** 脑膜炎双球菌  
**Diplococcus pneumonia** 肺炎双球菌  
**dipole** 偶极子  
**disinfectant** 消毒剂  
**disinfection** 消毒  
**domiphen** 度米芬  
**dismutation** 歧化  
**dosage - response relationship** 剂量 - 反应关系  
**dose rate** 剂量率  
**downward displacement sterilizer** 下排气式灭菌器  
**drug resistance** 抗药性  
**drug resistant strain** 耐药菌株  
**dry heat** 干热  
**DTS - HC** 三合二消毒剂  
**dust collector** 集尘器  
**duster** 喷粉器  
**dust - handling capacity** 容尘量

## E

**eastern equine encephalitis** 东部马脑炎  
**effervescent tablet** 泡腾片剂  
**electro - ionizator** 电离器  
**electrolysed silver** 电解银  
**electromagnetic radiation** 电磁辐射  
**electron accelerator** 电子加速器  
**electron density** 电子密度  
**electron radiation** 电子辐射  
**electrostatic precipitator** 静电除尘器  
**electrostatics** 静电学  
**emulsion** 乳液  
**endogenous infection** 内源性感染  
**Enterococcus faecalis** 粪肠球菌  
**envelope viral** 包膜(病毒),囊膜  
**enzyme** 酶  
**epoxide** 环氧化物  
**epoxyethane** 环氧乙烷,氧化乙烯

*Escherichia coli* 大肠杆菌

ethanol 乙醇

ethyl alcohol 乙醇

ethylene oxide 氧化乙烯, 环氧乙烷

*Eucalyptus robusta* 大叶桉

exogenous infection 外源性感染

exponential phase (log phase) 对数生长期

exponential survivor curve 指数存活曲线

## F

filter 滤器

filter material 滤材

filtration 过滤

first order reaction 一级反应

flaming 烧灼

flash sterilizer 瞬间灭菌器

flat fan nozzle 扇形喷头

foot - and - mouth disease 口蹄疫病毒

forest - spring encephalitis 森林脑炎

formaldehyde 甲醛

formalin 福尔马林

formulation 配方

fractional sterilization 间歇灭菌

free iodine 游离碘

free radical 自由基

free residual chlorine 游离性余氯

freeze - drying 冷冻干燥

freezing 冰冻

freon 氟里昂, 氟氯烷

fumigant 熏蒸剂

fumigation 熏蒸

fungicide 杀真菌剂

fungistat 抑制真菌剂

fungus 真菌

fungus spore 真菌孢子

fumaric acid 富马酸

## G

gamma ray  $\gamma$  射线

gaseous disinfectant 气体消毒剂

gentian violet 龙胆紫, 结晶紫

Germa San Iodine (GSI) 碘伏 (商品名)

germicide lamp 杀菌灯

*Giardia* 贾第虫属

glacial acetic acid 冰醋酸

glass wool 玻璃棉

*Gleditsia sinensis* 皂荚

gluconate 葡萄糖酸盐

glutaraldehyde 戊二醛

glycine 甘氨酸

granulars 颗粒剂

granules 颗粒剂

Gray 戈瑞(辐射吸收剂量单位, 简 Gy)

## H

Halane 二氯二甲基乙内酰胺

halazone 清水龙, 哈拉宗

halogene 卤素

heat disinfection 热力消毒

heat penetration time 热力穿透时间

heat sterilization 热力灭菌

heat sterilizer (for air) 热力灭菌器 (空气)

heavy metals 重金属

hepatitis virus 肝炎病毒

herpes simplex virus 单纯疱疹病毒

hexachlorophene (G - 11) 六氯酚

hibitane 洗必泰

high efficiency filter 高效过滤器

high - vacuum steam sterilizer 预真空蒸汽灭菌器

HIV 人免疫缺陷病毒, 艾滋病病毒

holding time 作用时间

hospital acquired infection 医院感染



hot air sterilization 干烤灭菌  
hydration 水化作用  
hydrogen peroxide 过氧化氢,双氧水  
hydrolase 水解酶  
hydrophilic 亲水的  
hydrophobic 疏水的  
hypertonic 高渗的  
hypochloric acid 次氯酸

## I

immersion method 浸液法  
immunofluorescent assay (FA) 免疫荧光检测  
immunomagnetic separation (IMS) 免疫磁性分离  
impaction 惯性碰撞 (空气过滤机理)  
impinger 撞击式采样器  
inactivation 灭活  
inactivation factor 灭活指数  
incinerator 焚烧炉  
incineration 焚烧  
indicating bacteria 指示菌  
infectivity 传染性  
influenza virus 流感病毒  
infrared ray 红外线  
inhibition 抑制  
intensity 强度  
ICU, intensive care unit 重点监护病房  
interception 随流阻挡  
Ioclode 碘伏(商品名)  
iodine 碘  
iodometry 碘量法  
iodophor 碘伏  
ionic bond 离子键  
ionizing radiation 离子辐射  
isopropanol 异丙醇

## J

jacket (of autoclave) 夹层

jet 射流

## K

killing rate 杀灭率  
kinetics of disinfection 消毒动力学  
Kleenodyne 碘伏 (商品名)

## L

lactic acid 乳酸  
Lactobacillus 乳杆菌属  
laminar flow ventilation 层流通风  
Legionella pneumophila 嗜肺军团菌  
Leptospira 钩端螺旋体属  
leukemia virus 白血病病毒  
L - form of bacteria 细菌 L 型  
linear accelerator 直线加速器  
lipase 脂酶  
lipophilic virus 亲脂性病毒  
lipoprotein 脂蛋白  
liquid chlorine 液氯  
lithium hypochlorite 次氯酸锂  
lysol 米苏儿,煤酚皂溶液,甲酚溶液  
lysostaphin 溶葡萄球菌酶

## M

MBC, minimum bactericidal concentration 最小杀菌浓度  
mechanical scrub 机械擦拭  
mechanical sieving 机械筛除  
medium efficiency filter 中效滤器  
melting point 熔点  
membrane filter 薄膜滤器  
mercuric chloride 升汞  
mercurochrome 红汞  
merthiolate 硫柳汞  
mesophils 嗜温菌

metabolism( 新陈)代谢  
methanol 甲醇  
methvl alcohol 甲醇  
methvl bromide 溴甲烷  
methvl violet 甲紫,龙胆紫,结晶紫  
MIC, minimum inhibition concentration 最小抑菌浓度,最小抑制(微生物)浓度  
microcapsules 微囊,微胶囊  
micro encapsulated preparation 微囊剂  
Micrococcus radiodurans 耐辐射微球菌  
microwave 微波  
millipore membrane 微孔滤膜  
moist heat 湿热  
mold 霉菌  
morpholine 吗啉  
mortality 死亡率  
mutagenesis 致突变  
mycelium 菌丝  
Mycobacterium 分枝杆菌属  
Mycobacterium chelonae 龟分枝杆菌  
Mycobacterium smegmatis 耻垢分枝杆菌  
Mycobacterium tuberculosis var. bovis 牛结核杆菌  
Mycobacterium tuberculosis var. hominis 人结核杆菌  
Mycoplasma 支原体属  
myxomatosis 粘液瘤病  
myxoma virus 粘液瘤病毒

## N

nascent oxygen 新生态氧  
natural decay 自然衰亡  
natural resistance 自然抗药性  
n - bromo - n - chloro - dimethyl hydantoin 氯溴二甲基乙内酰脲  
Neisseria meningitis 脑膜炎双球菌  
neutralizer 中和剂

Newcastle disease virus 新城疫(鸡瘟)病毒  
nisin 乳链球菌肽  
nosocomial infection 医院感染  
nucleic acid 核酸  
nucleotide 核苷酸

## O

o - cresol 邻甲苯酚  
octadecylamine 十八碳烷胺  
oocysts (动)卵囊  
oral toxicity 经口毒性  
ortho phenyl phenol 邻苯基苯酚  
o - syl 邻苯基苯酚皂液  
oxidase 氧化酶  
oxirane 环氧乙烷  
ozone 臭氧  
ozone generator 臭氧发生器

## P

painting 涂沫  
paraformaldehyde 多聚甲醛  
particle radiation 粒子辐射  
pasteurella pestis 鼠疫杆菌  
pasteurization 巴氏消毒法,低热消毒法  
pathogenic microorganism 病原微生物  
p - chloro - m - xylenol (PCMX) 对氯间二甲酚  
p - chloro - o - cresol 对氯邻甲苯酚  
p - chlorophenol 对氯苯酚  
penicylinder 小管,小柱  
pentanedial 戊二醛  
peracetic acid 过氧乙酸,过醋酸  
permeability 通透性  
peroxide 过氧化物  
personal protection 个人防护  
phenol 苯酚,石炭酸  
photon 光子  
photo - reactivation 光复活

physical agents 物理因子  
 plasma 等离子体, 血浆  
 polyomavirus 多瘤病毒  
 poliomyelitis virus 脊髓灰质炎病毒  
 polio virus 脊髓灰质炎病毒  
 pollution 污染  
 polymerase 聚合酶  
 porcelain filter 素瓷滤器, 尚氏滤器  
 potassium dichloroisocyanurate 二氯异氰尿酸钾  
 potassium ferrate 高铁酸钾  
 potassium iodide 碘化钾  
 potassium permanganate 高锰酸钾  
 Povidone – iodine 碘伏 (商品名)  
 preservative 防腐剂, 保存剂  
 prevacuum autoclave 预真空压力蒸汽灭菌器  
 primary treatment (sewage) 一级处理 (污水)  
 prion 朊病毒  
 propanediol 丙二醇  
 propylene glycol 丙二醇  
 propylene oxide 环氧丙烷  
 Proteus vulgaris 普通变形杆菌  
 protozoan 原生动物  
 Pseudomonas aeruginosa 绿脓杆菌  
 Pseudomonas fluorescens 荧光假单胞菌  
 Pseudomonas mallei 马鼻疽杆菌  
 psoralen 补骨脂素  
 PVP – I 碘伏 (商品名)  
 pyrimidine dimer 嘧啶二聚体  
 pyrogen 热原

## Q

quaternary ammonium compounds 季铵盐类

## R

rad 拉德 (辐射吸收剂量单位)  
 radicidation 电离辐射杀菌法  
 radio – pasteurization 电离辐射巴氏消毒法

radurization 电离辐射杀菌法  
 relative humidity 相对湿度  
 reovirus 呼肠病毒  
 reproduction 繁殖  
 residual chlorine 余氯  
 residual ozone 剩余臭氧  
 residual toxicity 残留毒性  
 residue activity 残留作用  
 resistometer 抗力检测器  
 roentgen rays X 射线  
 rotary atomizer 旋转式喷雾器  
 rubella virus 风疹病毒

## S

Saccharomyces cerevisiae 酿酒酵母  
 safety valve 安全阀  
 SAL, sterility assurance level 灭菌保证水平  
 Salmonella 沙门菌属  
 Salmonella typhi 伤寒杆菌  
 Salmonella typhimurium 鼠伤寒杆菌  
 salting 盐腌  
 saprophytic bacteria 腐生菌  
 saturated steam 饱和蒸汽  
 secondary treatment (sewage) 二级处理 (污水)  
 sedimentation 沉降, 重力沉淀  
 Seitz filter 赛兹滤器, 石棉板滤器  
 semilogarithmic survivor curve 半对数存活曲线  
 sensitivity 敏感性  
 serial filter 串连过滤  
 Serratia salinaria 嗜盐沙雷菌  
 sewerage 下水道  
 silver nitrate 硝酸银  
 silver protein 蛋白银  
 single strand virus 单链病毒  
 singlet oxygen 单线态氧  
 single – use medical device 一次使用性医疗器械  
 sintered glass filter 垂熔玻璃滤器

slow release preparation 缓释剂  
 sludge 污泥  
 slurry of bleaching powder 漂白粉乳液  
 small pox virus 天花病毒  
 smoking 烟熏  
 sodium dodecyl sulfonate 十二烷基磺酸钠  
 sodium carbonate 碳酸钠  
 sodium chlorite 亚氯酸钠  
 sodium dichloroisocyanurate 二氯异氰尿酸钠  
 sodium dodecylbenzene sulfonate 十二烷基苯磺酸钠  
 sodium hypochlorite 次氯酸钠  
 sodium phosphate 磷酸钠  
 sodium thiosulfate 硫代硫酸钠  
 Sonacide 强化酸性戊二醛 (商品名)  
 sorbic acid 山梨酸  
 spirachete 螺旋体  
 spore (bacterial) 芽孢 (细菌)  
 spore formers 芽孢菌  
 spore (fungal) 孢子 (真菌)  
 sporicide 杀芽孢剂  
 spray - drying 喷雾干燥  
 sprayer 喷雾器  
 spraying 喷雾, 喷洒  
 SPRIA, solid phase radioimmunoassay 固相放射免疫测定 (法)  
 stability 稳定性  
 stabilizer 稳定剂  
 Staphylococcus albus 白色葡萄球菌  
 Staphylococcus aureus 金黄色葡萄球菌  
 Staphylococcus saprophyticus 腐生葡萄球菌  
 stationary phase 稳定期  
 sterilant 灭菌剂, 绝育剂  
 sterile examination 无菌检查  
 sterilization 灭菌  
 sterilization cycle 灭菌周期  
 sterilization time 灭菌时间  
 sterilizer 灭菌剂, 灭菌器  
 sterilizing test 灭菌试验

Streptococcus pyogenes 化脓性链球菌  
 Streptococcus salivarius 唾液链球菌  
 Streptococcus griseus 灰色链球菌  
 sudol 二甲酚皂溶液  
 sulfite 亚硫酸盐  
 super heated steam 超热蒸汽  
 surface active agent 表面活性剂  
 surfactant 表面活性剂  
 Surgidine 碘伏 (商品名)  
 surveillance 监视, 监督  
 susceptibility 易感性  
 suspension 悬液  
 swirl nozzle 漩涡式喷头  
 synergism 协同作用  
 synergist 增效剂

## T

tartaric acid 酒石酸  
 teichoic acid 磷壁酸  
 temperature coefficient 温度系数  
 teratogenesis 致畸  
 terminal disinfection 终末消毒  
 thermal death time 热死亡时间  
 thermocouple 热电偶  
 thermo - disinfection 热力消毒  
 thermophils 嗜热菌  
 thermo - sterilization 热力灭菌  
 Thermus aquadicus 水生栖热菌  
 thiomersal 硫柳汞  
 tincture iodine 碘酊  
 Torulopsis candida 白色球拟酵母  
 total count (of bacteria) 细菌总数  
 total residual chlorine 总余氯  
 toxicity 毒性  
 toxicological test 毒力试验  
 toxin 毒素  
 Toxoplasma 弓形体属  
 trichlorobutanol 三氯叔丁醇

trichloroisocyanuric acid 三氯异氰尿酸  
 Trichophyton ferrugineum 铁锈色发癣菌  
 Trichophyton mentagrophytes 须发癣菌  
 Trichophyton gypsum 石膏样发癣菌  
 trypsin 胰蛋白酶  
 tryptone 胰蛋白胨  
 tularemia 野兔热  
 turbulent flow ventilation 湍流式通风  
 tyndallization 廷德尔灭菌法，间歇灭菌

## U

ultra filter membrane 超微滤膜  
 ultrahigh efficiency filter 超高效滤器  
 ultralow dose sprayer 超低剂量喷雾机  
 ultralow volume spray 超低容量喷洒  
 ultrasonic 超声  
 ultraviolet barrier 紫外线屏蔽  
 ultraviolet lamp 紫外灯  
 ultraviolet radiation 紫外辐射  
 ultraviolet rays 紫外线  
 unimolecular reaction 单分子反应

## V

vaccinia virus 牛痘病毒  
 vector 媒介  
 vegetative cell of bacteria 细菌繁殖体  
 vesicular stomatitis virus 水泡性口炎病毒  
 viability 存活能力

Vibrio cholera 霍乱弧菌  
 vinegar 食醋  
 virucide 杀病毒剂  
 virus 病毒

## W

water activity 水活性  
 water bath 水浴  
 water extract 水浸剂  
 wave length 波长  
 Weladol 碘伏（商品名）  
 Wescodyne 碘伏（商品名）  
 white fluid 白色消毒液  
 white mouse 小白鼠  
 white rat 大白鼠

## X

X – rays X射线  
 xlenol 二甲酚

## Y

yeast 酵母菌  
 yellow fever 黄热病

## Z

zephiran 洁尔灭

（张文福）