

医用超声耦合剂微生物限度检查方法 建立及适用性研究

刘海萍¹, 张 勇²

(1 西安大兴医院, 陕西西安 710016; 2 陕西省核工业二一五医院)

摘要 **目的** 建立和验证医用超声耦合剂微生物限度检查方法。**方法** 采用活菌计数培养方法, 对医用超声耦合剂微生物限度检查方法进行适用性验证试验。**结果** 需氧菌总数计数法倾注法和滤膜过滤法细菌回收比值均值分别为 0.90 和 1.11; 酵母菌和霉菌总数计数法倾注法和滤膜过滤法细菌回收比值均值分别为 0.90 和 1.03。倾注法和滤膜过滤法在医用超声耦合剂需氧菌总数、酵母菌和霉菌总数计数检测结果差异具有统计学意义($P < 0.05$); 滤膜过滤法检出能力优于倾注法。**结论** 滤膜过滤法更适合于医用超声耦合剂污染细菌的检测。

关键词 医用超声耦合剂; 微生物限度检查; 倾注法; 滤膜法

中图分类号: R181.8 + 1

文献标识码: A

文章编号: 1001 - 7658(2019)07 - 0494 - 03

DOI: 10.11726/j.issn.1001 - 7658.2019.07.005

Establishment and applicability of microbial limit test method for medical ultrasonic coupling agent

LIU Hai - ping¹, ZHANG Yong²

(1 Xi'an Daxing Hospital, Xi'an Shaanxi 710016; 2 The 215 Hospital of Shaanxi Nuclear Industry, China)

Abstract **Objective** To establish and verify the microbial limit test method for medical ultrasound coupling agents. **Methods** The viable bacteria counting culture method was used to verify the applicability of microbial limit test for medical ultrasound coupling agent. **Results** The results showed that the average bacterial recovery ratios of aerobic bacteria counting method and filtration membrane method were 0.90 and 1.11, respectively, while those of yeast and mould counting method and filtration membrane method were 0.90 and 1.03, respectively. The results showed that there were significant differences in the total number of aerobic bacteria, yeasts and fungi in the medical ultrasound coupling agent between the pouring method and the filter membrane filtration method ($P < 0.05$), and the detection ability of the filter membrane filtration method was better than that of the pouring method. **Conclusion** Membrane filtration method is more suitable for the detection of contaminated bacteria by medical ultrasound coupling agents.

Key words medical ultrasound coupling agent; microbial limit test; pouring method; filtration method

医用超声耦合剂^[1] (以下简称耦合剂) 作为超声诊断的辅助医疗用品在疾病检查时与患者的完好皮肤、黏膜、无菌组织接触, 尤其目前临床微创开展广泛, 超声引导下的穿刺术应用甚广, 耦合剂动态卫生质量直接影响着医疗质量与安全。国内外因使用了被细菌污染的超声耦合剂导致医院感染暴发事件时常被报道^[2-6], 使用中耦合剂染菌情况越来越受到医院感染管理部门的重视^[7,8]。在新修订的医药行业标准 YY 0299 - 2016《医用超声耦合剂》^[1]中, 对普通耦合剂微生物限值作出了明确的规范, 相关监督监测机构和医疗机构例行对耦合剂产品卫生学

质量进行检测势在必行。为此, 本研究依据 2015 版《中国药典》第四部(通则 1105 - 1106) 的相关要求^[9], 建立医用超声耦合剂微生物限度检查方法, 并对该试验方法的适用性进行验证, 为临床微生物实验室提供一个关于检验耦合剂染菌量切实易行的方法, 为医院感染管理部门监管耦合剂卫生状况提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用主要仪器设备包括细菌鉴定仪、生物安全柜、立式压力蒸汽灭菌器、无菌过滤器、电子天平、水浴箱、电热恒温培养箱、真菌培养箱、比浊仪和涡旋振荡器等, 均为国内市售产品。

【作者简介】 刘海萍(1986 -), 女, 陕西西安人, 本科, 主管检验师, 从事临床微生物检验及细菌耐药机制研究工作。

试验菌种主要有大肠埃希菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 25213)、铜绿假单胞菌(ATCC 27853)、枯草芽孢杆菌(ATCC 63501)、白色念珠菌(ATCC 10231)和黑曲霉(ATCC 16404),均为国内市售品。

主要试剂有 pH 值为 7.0 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、吐温 80、胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、沙保罗琼脂培养基(SDA)、胰酪大豆胨琼脂液体培养基(TSB)、沙保罗琼脂液体培养基、哥伦比亚血琼脂培养基、念珠菌显色培养基和无菌生理盐水。试验用滤膜为孔径 0.45 μm,直径 50 mm,灭菌后备用。

检测样品随机抽取该医院 B 超室使用的不同规格不同批号普通耦合剂;按 YY 0299-2016《医用超声耦合剂》规定非无菌型医用超声耦合剂,细菌数每 1 g 不得超过 100 cfu;霉菌和酵母菌菌数每 1 g 不得超过 100 cfu;金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌,每 1 g 不得检出^[1]。

1.2 试验方法

1.2.1 供试液制备 称取耦合剂 10 g 于无菌的锥形瓶内,加 45℃左右的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100 ml,作为 1:10 的供试液。

1.2.2 试验菌液制备 取各试验菌株经 24 h 培养的典型菌落,用无菌生理盐水制成菌悬液,最终浓度约为 10³ cfu/ml。取黑曲霉经 28℃培养 7 d 的典型菌落,用含 500 mg/L 吐温 80 的无菌生理盐水洗下孢子,并稀释成约为 10³ cfu/ml 的孢子悬液。使每 1 ml 供试液或每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大 100 cfu。

1.2.3 微生物限值验证试验方法 ①倾注培养法:在供试液中加入菌悬液占供试液体积的 1%(9.9+0.1);确保菌数在 100 cfu/ml 或/滤膜。试验组取供试液 9.9 ml,加入菌悬液 0.1 ml(每种试验菌分别进行),然后取混合液 1 ml 加入到无菌平皿中,一式 2 份;倒入已融化冷却的琼脂培养基约 20 ml 摇匀。待冷却凝固后翻转平板置于恒温箱培养 48 h(真菌培养 5 d),计数平板菌落数。②对照组:取不加菌的供试液接种平皿,倒入培养基作为供试液对照组;取 9.9 ml 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,加入试验菌液 0.1 ml 混匀,取样液接种无菌平皿,倒入培养基进行培养,作为试验菌对照组。③滤膜过滤法:试验组取供试液 9.9 ml,加入试验菌液 0.1 ml 混合均匀;取样液 10 ml 置于孔径 0.45 μm 的滤膜上,再用 100 ml 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗 3 次,待滤干后转移滤膜,滤膜截留细菌面朝上贴于营养琼脂培养基平板表面。置于恒温箱培养 48 h(真菌培养

5 d),计数平板菌落数。再按滤膜过滤法分别进行供试液阴性对照和试验菌阳性对照组试验。

1.2.4 控制菌检查法适用性试验 ①倾注法培养与鉴定:取 3 份 10 ml 供试液接种至 100 ml TSB 中,再分别加入 1 ml 浓度约为 10³ cfu/ml 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌试验菌液^[10]混匀,培养 24 h 后将金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌增菌液吸取 100 ul 接种到哥伦比亚血琼脂培养基,将白色念珠菌增菌液吸取 100 ul 接种到念珠菌显色培养基;培养 24 h,分别取培养基上生长的菌落进行菌落观察和细菌鉴定。②滤膜过滤法:取 3 份 10 ml 供试液分别与 1 ml 浓度约为 10³ cfu/ml 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和白色念珠菌试验菌液混匀,过滤,冲洗 3 次,待滤干后将滤膜置于 TSB 中,35℃培养 24 h 后将金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌增菌液吸取 100 ul 接种到哥伦比亚血琼脂培养基,将白色念珠菌增菌液吸取 100 ul 接种到念珠菌显色培养基;培养 24 h,分别取培养基上生长的菌落进行菌落观察和细菌鉴定。

1.2.5 细菌回收比值计算 分别计算出倾注法测定的样品含菌数和滤膜过滤法测定的样品含菌数,按以下公式计算细菌回收比值:细菌回收比值=试验组平均菌数-供试液对照组菌数/试验菌对照组菌数。

2 结果

2.1 验证试验结果

检测结果表明,需氧菌用倾注法培养,细菌回收比值范围在 0.89~0.92;滤膜过滤法培养,细菌回收比值范围在 1.09~1.11(表 1)。

表 1 需氧菌 2 种计数培养法测定结果比较						
试验菌	倾注培养法菌数 (cfu/10 ml)			滤膜过滤法菌数 (cfu/10 ml)		
	试验组	对照组	比值	试验组	对照组	比值
大肠埃希菌	120	130	0.92	122	112	1.09
金黄色葡萄球菌	100	110	0.91	117	108	1.08
铜绿假单胞菌	110	120	0.92	115	108	1.11
枯草芽孢杆菌	80	90	0.89	105	96	1.09
白色念珠菌	90	100	0.90	116	102	1.14
黑曲霉	80	90	0.89	97	89	1.09

注:2 组供试液组空白对照均无菌生长。

酵母菌和霉菌用倾注法培养,细菌回收比值范围在 0.89~0.91;滤膜过滤法培养,细菌回收比值范围在 1.02~1.04(表 2)。

通过 SPSS 20.0 统计软件采用独立样本 t 检验对检验结果进行分析,二次处理结果显示,需氧菌总数计数法倾注法和滤膜过滤法细菌回收比值均值分

别为 0.90 和 1.11;酵母菌和霉菌总数计数法倾注法和滤膜过滤法细菌回收比值均值分别为 0.90 和 1.03。

表 2 酵母菌和霉菌 2 种计数培养法测定结果比较						
试验菌	倾注培养法菌数 (cfu/10 ml)			滤膜过滤法菌数 (cfu/10 ml)		
	试验组	对照组	比值	试验组	对照组	比值
白色念珠菌	100	110	0.91	112	110	1.02
黑曲霉	80	90	0.89	102	98	1.04

注:2 组供试液组空白对照均无菌生长。

2.2 方法适用性试验结果

控制菌检查法适用性试验结果表明,所试验的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌在 2 种培养方法条件下均生长良好,菌落大小与预期相符,菌落形态典型,可判定所采用倾注培养法和滤膜过滤法的性能符合要求,经验证合格。

3 讨论

在超声诊疗中,耦合剂不可或缺,其对保障超声诊疗的质量起着重要作用,《消毒管理办法》^[11]和《医院感染管理办法》^[12]明确规定,凡接触皮肤和黏膜的医疗器械、器具和物品必须达到消毒要求。为保证超声医疗活动的安全,医院感染管理部门应对临床使用耦合剂进行监管,以保障耦合剂的安全性和有效性。

本试验建立的耦合剂微生物限度检查方法,倾注法操作简便、价格低廉,但也有其局限性,液体培养基和无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液要求温度控制在 45℃左右,如果温度过高会对细菌造成“热冲击”,平皿容易出现“白板”现象。其培养的程序预先滴加检样,再倾注融化的培养基,细菌往往是生长在培养基之下,这样不便于后续的细菌鉴定。此外,倾注法培养标本接种量为 1 ml,培养的结果仅代表 1/10 检样信息。滤膜过滤法可一次性将全部样品中的细菌过滤在一张滤膜上,再将薄膜转移至选定的培养基表面。本研究显示,滤膜过滤法检出的细菌数量明显高于倾注法,且便于后续的细菌鉴定与转种培养,但是需要昂贵的设备与耗材。可是为了得出更加准确的检验结果推荐有条件的医疗机构应优先选择滤膜过滤法。

本次研究所检验的耦合剂为普通耦合剂,如果检查消毒型耦合剂的微生物限度,应首先选择和鉴

定出有效的消毒剂残留物去除(中和)方法^[13],方可得出准确可靠的结果。试验中所使用的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、胰酪大豆胨琼脂液体培养基和沙保罗琼脂液体培养基均经过压力蒸汽灭菌,所有培养基均通过了无菌试验和生长试验验证合格。

检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染。供试液从制备至加入检验用培养基时间不长于 1 h。菌液制备后若在室温下放置,应在 2 h 内使用,若保存在 2~8℃,可在 24 h 内使用。采用滤膜过滤法时过滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌,滤膜应与培养基完全贴紧,两者间不得留有气泡,否则将导致检测值降低。使用时应保证滤膜在过滤前后的完整性,供试液过滤前先将少量的冲洗液过滤以润湿滤膜。为发挥滤膜的最大过滤效率,应注意保持供试品溶液及冲洗液覆盖整个滤膜表面。

参考文献

[1] 国家食品药品监督管理总局. YY 0299-2016 医用超声耦合剂[S]. 2016.

[2] 刘希茹,沈瑾,李涛,等. 北京市体外超声探头及耦合剂微生物污染现况调查[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(4):341-344.

[3] 韩佳音,林锦炎,陈惠珍,等. 一起剖宫产术后切口愈合不良事件流行病学调查[J]. 中华医院感染学杂志,2014,24(6):1518-1520.

[4] Jacobson M, Wray R, Kovach D, et al. Sustained endemicity of Burkholderia cepacia complex in a pediatric institution, associated with contaminated ultrasound gel[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 2006, 27(4):362-366.

[5] 刘希茹,张流波. 医用超声诊疗过程中的卫生现况及消毒进展[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(5):468-472.

[6] Abdelfattah R, Al-Jumaah S, Al-Qahtani A, et al. Outbreak of Burkholderia cepacia bacteraemia in a tertiary care centre due to contaminated ultrasound probe gel[J]. J Hosp Infect, 2018, 98(3):289-294.

[7] 沈芃,费春楠,刘军,等. 医院超声探头及耦合剂带菌状况调查[J]. 中国消毒学杂志,2012,29(4):290-291.

[8] 司徒敏雄,郭巧芝,周轶,等. 大瓶装医用超声耦合剂卫生状况调查[J]. 中国感染控制杂志,2017,16(9):849-851.

[9] 中华人民共和国药典委员会. 中国药典(四部)[M]. 第 10 版. 北京:中国医药科技出版社,2015:241-248.

[10] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 《中国药典》2015 年版非无菌产品微生物限度检查:控制菌检查法解读与对策[J]. 中国药师, 2016,19(4):748-752.

[11] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 消毒管理办法[S]. 2016.

[12] 中华人民共和国卫生部. 医院感染管理办法[S]. 2006.

[13] 谈智,孙巍,陈越英,等. 医用超声耦合剂卫生质量状况调查[J]. 中国消毒学杂志,2014,31(6):574-576,579.