

감염성미생물-세균배양 검사법

2017

(Infectious Microorganism - Culture Test)

1.0 개요**1.1 목적**

이 시험기준은 폐기물 중에 감염성미생물을 세균배양검사법으로 검사하는 방법으로, 감염성폐기물을 증기·열관멸균분쇄시설의 정상운전으로 멸균처리한 다음 그 멸균잔류물의 추출물을 혐기성 및 호기성균이 동시에 생장할 수 있는 티오글리콜레이트 배지(fluid thioglycollate medium)에 배양하여 미생물의 생장여부로부터 멸균 상태를 확인하는 방법이다.

1.2 적용범위

이 시험기준은 폐기물 중에 감염성미생물을 아포균 검사법으로 검사하는 방법으로 감염성폐기물의 멸균잔류물에 대한 멸균여부의 판정은 세균배양 검사법으로 실험한 결과 세균이 검출되지 않으면 멸균된 것으로 본다.

1.3 간섭물질

일반적으로 미생물 실험은 시료 중에 함유된 미생물의 상태가 시시각각으로 변할 수 있으며, 당초 시료 중에 함유되어 있던 미생물 이 외의 다른 미생물이 조작 중에 오염될 수 있다. 이러한 실험상의 오염을 방지하기 위하여 배지, 시약, 기구, 장비 등과 모든 실험조작은 원칙적으로 무균조작을 하여야 한다.

2.0 용어정의

2.1 감염성폐기물 지표생물

감염성 폐기물을 증기·열관멸균분쇄시설의 정상운전으로 멸균처리한 다음 그 멸균 잔류물의 추출물을 혐기성 및 호기성균이 동시에 성장할 수 있는 티오글리콜레이트 배지(fluid thioglycollate medium)에 배양하여 미생물의 성장여부로부터 멸균상태를 검사하는데 여기에서 혐기성 및 호기성균이 지표생물이 된다.

3.0 분석기기 및 기구

3.1 배양기

온도가 30 ~ 37℃가 유지되는 항온배양기를 사용한다.

3.2 증기멸균이 가능한 45 mL 유리시험관

안지름 18 mm, 길이 180 mm의 유리 시험관을 사용한다.

3.3 현미경

미생물의 관찰이 가능한 현미경을 사용한다.

3.4 멸균된 핀셋, 가위 또는 메스 및 피펫

4.0 시약 및 표준용액

4.1 표준지표생물

4.1.1 바실러스 스테어로써머필러스(*Bacillus stearothermophilus* : ATCC 7953, 12980, 10149 등)를 증기멸균·분쇄시설의 표준 지표생물로 하고, 바실러스 섭틸리

스(*Bacillus subtilis* : ATCC 9372, 19659, ATOCC 6633 등)는 열관멸균분쇄시설의 표준 지표생물로 한다.

4.1.2 표준 지표생물의 아포밀도는 세균현탁액 1 mL에 1×10^4 개 이상의 아포를 함유하여야 한다. 이러한 표준 지표생물은 스트립(strips), 바이알(vials) 또는 디스크(disks) 등의 팩 형태로 시판되고 있는 것을 사용할 수 있으며, 이 경우 반드시 유효기간과 아포밀도를 확인하여야 한다.

4.1.3 지표생물의 스트립, 바이알 또는 디스크는 시험아포 주입용기에 넣어 처리 대상 감염성폐기물에 혼입시킨다.

5.0 시료채취 및 관리

5.1 정상운전조건에서 멸균처리가 끝난 다음 멸균잔류물을 잘 혼합하거나 혼합이 불가능할 경우에는 전체의 성상을 대표할 수 있도록 서로 다른 곳에서 시료를 채취한다.

5.2 시료의 채취는 가능한 한 무균적으로 하고 멸균된 용기에 넣어 1시간 이내에 실험실로 운반·실험하여야 하며, 그 이상의 시간이 소요될 경우에는 10 ℃ 이하로 냉장하여 6시간 이내에 실험실로 운반하고 실험실에 도착한 후 2시간 이내에 배양조작을 완료하여야 한다. 다만 8시간 이내에 실험이 불가능 할 경우에는 현지 실험용 기구세트를 준비하여 현장에서 배양조작을 하여야 한다.

6.0 정도보증/정도관리(QA/QC)

시험아포균(표준 지표생물)의 아포밀도와 동등하거나 그 이상의 시판 키트(kit) 제품을 사용하는 경우에는 그 제품의 배양 조건에 따른다.

7.0 분석절차

7.1 시료를 무균실에서 멸균된 분쇄기를 이용하여 분쇄하거나 또는 멸균 된 가위나 메스를 이용하여 잘게 자른다.

7.2 잘게 분쇄된 시료 10 g을 멸균희석수(인산염완충용액 또는 생리식염수) 90 mL와 혼합하여 얻은 추출물을 시료용액으로 한다.

7.3 멸균·조제한 티오글리콜레이트 배지 15 mL가 들어 있는 시험관 8개에 멸균된 1 mL피펫을 이용하여 시료용액 1 mL 씩을 각각 무균적으로 천자접종 한다.

7.4 시료용액을 접종한 시험관 4개는 $(31 \pm 1)^\circ\text{C}$, 나머지 4개는 $(36 \pm 1)^\circ\text{C}$ 에서 각각 7일간 배양한다. 접종 후 2, 3, 6 및 7일째에 균의 생장유무 확인을 위하여 배지의 혼탁도를 관찰한다. 육안으로 판단이 곤란한 경우에는 시험관 배양액을 직접 또는 도말염색한 후 현미경 검경을 통하여 세균의 유무를 확인한다.

[주 1] 배지가 혼탁되었거나 균의 생육이 의심되는 경우에는 최종 배양일에 새로운 티오글리콜레이트 배지에 계대하여 3일 이상 배양하고 균의 생장유무를 확인하여 시료의 멸균여부를 판정한다.

8.0 결과보고

감염성폐기물의 멸균잔류물에 대한 멸균여부의 판정은 세균배양 검사법으로 실험한 결과 세균이 검출되지 않으면 멸균된 것으로 본다.

9.0 참고자료

“내용 없음”