文章编号:1000-5404(2014)01-0059-04

论著

光波对口腔实心金属器械消毒灭菌效果的实验研究

舒绍兵[1,2],李 方[1],罗金英[3],张 洁[4],钟建鑫[1],张 倩[1],周继祥[1] (400038 重庆,第三军医大学西南医院口腔科[1];401147 重庆,武警重庆总队机关门诊部口腔科[2];408415 重庆,重庆市南川区人民医院口腔科[3];310004 杭州,杭州市儿童医院口腔科[4])

[摘要] **目的** 探讨光波对口腔实心金属器械消毒灭菌的温效、时效关系。**方法** 采用人工污染实验法,以无菌口镜、镊子和探针为载体,用不同指示菌和HBsAg纯抗原进行污染,经不同温度、对应不同时间的光波消毒灭菌后进行采样,最后采用增菌培养和酶联免疫吸附法、雅培检测法来分别检测光波对细菌的灭活情况和对HBsAg抗原的破坏情况。**结果** 光波在120 ℃时5 min,130 ℃时3 min,140 ℃时1 min都能彻底杀灭金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌;在120 ℃时7 min,130 ℃时5 min,140 ℃时3 min都能彻底杀灭白色念珠菌;在120 ℃时9 min,130 ℃时7 min,140 ℃时5 min都能彻底杀灭枯草芽孢杆菌黑色变种。光波在120 ℃时7 min,130 ℃时5 min,140 ℃时3 min,都能有效破坏HBsAg的抗原性。经抗力实验比较,口腔自然菌比枯草芽孢杆菌黑色变种更易灭活。**结论** 光波能够实现对口腔实心金属器械的快速消毒灭菌,并且在器械能耐高温的前提下,温度越高则时间越短、效果越好。

[关键词] 光波;消毒灭菌;实心金属器械;效果
[中图法分类号] R187.4; R197.39; R78 [文献标志码] A

Sterilizing effect of light-wave on dental solid metal equipment

Shu Shaobing[1,2], Li Fang[1], Luo Jinying[3], Zhang Jie[4], Zhong Jianxin[1], Zhang Qian[1], Zhou Jixiang[1] ([1]Department of Stomatology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Stomatology, Authority Clinic of Chongqing Armed Police Force, Chongqing, 401147; [3]Department of Stomatology, Nanchuan People's Hospital, Chongqing, 408415; [4]Department of Stomatology, Hangzhou Children's Hospital, Hangzhou, Zhejiang Province, 310004, China)

[**Abstract**] Objective To investigate the temperature efficiency and time efficiency of the light-wave on the sterilization of the dental solid metal equipment. Methods Sterile mouth mirrors, tweezers and probes were artificially contaminated with different indicator bacteria and HBsAg antigen. Then these equipments were disinfected by the light-wave at different temperatures and for different time periods. The inactivation of the bacteria and the destruction of HBsAg antigen were measured with enrichment culture, enzyme-linked immunosorbent assay and Abbott laboratories test. Results *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* were thoroughly killed after being disinfected by light-wave at 120 ℃ for 5 min, 130 ℃ for 3 min, or 140 ℃ for 1 min. *Candida albicans* was thoroughly killed after being disinfected by light-wave at 120 ℃ for 7 min, 130 ℃ for 5 min, or 140 ℃ for 3 min. The black variant of *Bacillus subtilis* was thoroughly killed after being disinfected by light-wave at 120 ℃ for 9 min, 130 ℃ for 7 min, or 140 ℃ for 5 min. The HBsAg antigen was destructed after being disinfected by light-wave at 120 ℃ for 7 min, 130 ℃ for 5 min, or 140 ℃ for 3 min. And the oral natural bacteria are more likely to be inactivated than the black variant of *Bacillus subtilis*. Conclusion Light-wave achieves rapid sterilization of the dental solid metal equipments. In addition, the higher temperature, the shorter time, and the more efficiency if the equipment can withstand the higher temperature.

[**Key words**] light-wave; sterilization; solid metal equipment; effect

Supported by the Tackling Project for Sci & tech Research of Chongqing (CSTC 2010AA5032). Corresponding author: Zhou Jixiang, Tel: 86-23-68754387, E-mail: Zhoujx6518@sina.com

[基金项目] 重庆市科技攻关计划(CSTC 2010AA5032)
[通信作者] 周继祥,电话:(023)68754387,E-mail:Zhoujx6518@sina.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131014.1034.011.html(2013-10-14)

口腔是多种微生物赖以生存的环境,存在大量的口腔正常菌群以及包括乙肝病毒在内的多种病源微生物。在进行口腔检查治疗时,器械难免会触及患者的唾液、龈沟液甚至血液,如果消毒不严,必然会造成患者之间,甚至是医患之间的交叉感染[1]。所以,口腔器械的严格消毒灭菌,一直以来都是历届政府和医患双方共同关注的一个敏感问题[2-3]。高温高压消毒灭菌作为一种传统、有效的消毒方法,已经得到国内外相关专家、学者的公认,安全有效且无污染,但是消毒时间较长,器械周转较慢,不适合一些使用频率较高的口腔器械的消毒灭菌。为了弥补传统消毒方法的不足,需要寻找一种既能彻底灭菌,又能快速消毒,满足临床实际需要的消毒灭菌方法。本研究观察用光波对口腔实心金属器械的消毒灭菌效果,进而探讨了光波对口腔实心金属器械消毒灭菌的温效时效关系。现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 主要材料

光波消毒器(海尔公司生产,功率900 W,经适当改装,使温度可调),口镜、镊子和探针,金黄色葡萄球菌(ATCC6538)、绿脓杆菌(ATCC15692)、白色念珠菌(ATCC10231)、枯草芽孢杆菌黑色变种(ATCC9372),口腔自然菌,LB培养液、沙氏培养液,LB固态培养基和沙氏固态培养基,HBsAg纯抗原(1 mg/mL,北京金豪公司),ELISA试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 箱内升温速度测试 分别在120、130、140 ℃的预设温度下,将温度测量仪(苏州全胜仪表公司)的传感头置于消毒器内,记录达到预设温度时的时间,重复5次,取平均值。

1.2.2 紫外线辐照强度测定 在不同的预设温度下,将紫外线辐射照度计(上海产ZDC-1型)的探头置于消毒箱内进行测量,以箱内不同的位置重复5次,取平均值。

1.2.3 HBsAg破坏实验 参照卫生部《消毒技术规范》。用含5%小牛血清的PBS液将1 mg/mL的HBsAg纯抗原稀释,用浓度为50 μg/mL(10^5 IU/mL)的HBsAg悬液滴染载体(口镜头部),每个滴染20 μL,37 ℃干燥后备用。实验时,按消毒温度分别为120、130 ℃和140 ℃,消毒时间分别为1、3、5 min和7 min,分为12个实验组,每个实验组需将5个HBsAg载体分别置于光波消毒器内的四角和中央进行消毒。消毒后,再分别用无菌棉拭子蘸取PBS液后在口镜头的滴染物处反复擦拭5遍,去掉手接触的部分,投入1 mL含10%小牛血清的PBS液中,在振荡器上充分振荡20 s后取其上清液。并以未消毒的HBsAg载体洗脱液作阳性对照,以含10%小牛血清的PBS液作阴性对照。然后采用酶联免疫吸附法和雅培[4] HBsAg定量检测法,分别检测上清液的光密度值和浓度,再分别计算出S/N值(S是被检样品或阳性对照的光密度值,N是阴性对照的光密度值)和HBsAg的量[HBsAg的数量(U)=采样液浓度(U/mL)×采样液的体积(mL)]。

1.2.4 定性载体杀菌实验 对每个实验菌种,按消毒温度分别为120、130 ℃和140 ℃,消毒时间分别为1、3、5、7 min和9 min进行分组,每组20件载体,其中16件作光照消毒实验,2件作阳性对照,2件作阴性对照。

参照卫生部《消毒技术规范》[5]。配置浓度为1.5×10^8 cfu/mL的实验菌菌悬液[5-6]200 mL置于250 mL无菌小烧杯内。在每组已准备好的无菌口腔器械中任选18件(另2件作阴性对照),将其前端7 cm范围浸入菌悬液约1 min进行染菌,然后沥干。从每组的18件染菌载体中随机取出16件(另2件作阳性对照),放入光波消毒器内,分别按照各组预定的温度和时间进行消毒,取出静置,自然冷却约5 min,用醮有LB培养液(白念选沙氏培养液)的无菌棉拭子在器械前端7 cm左右来回擦拭(并随之转动棉拭子)5遍,然后去掉手接触的部分,将棉拭子放入含有5 mL LB培养液(白念选沙氏培养液)的试管内,用振荡器充分振荡20 s;用同样的方法将阳性对照和阴性对照进行采样。然后将洗脱液以5 000 r/min的离心速度离心10 min,离心后分别移取离心管底部的洗脱液100 μL于相应的LB固态培养基上作涂板接种(白念选沙氏固态培养基),再置37 ℃孵箱内培养48 h后,观察培养基上有无试验菌生长[7]。

灭菌合格标准:以阴性对照组培养基上无菌生长,阳性对照组培养基上有菌生长,光波消毒组的16个培养基上都无菌生长为灭菌合格。

1.2.5 枯草芽孢杆菌黑色变种与口腔自然菌对光波灭菌处理的抗力比较 以实验菌中最难杀灭的枯草芽孢杆菌黑色变种与口腔自然菌进行抗力比较。参照卫生部《消毒技术规范》,采用染菌实验法,将无菌玻片放于无菌平皿内,用微量移液器吸取枯草芽孢杆菌黑色变种(ATCC9372)菌悬液和慢性牙周炎患者的唾液各20 μL分别滴染于无菌玻片上(0.5 cm×1.0 cm),待干燥后,平放于光波消毒器内相同的位置,分别以120、130、140 ℃的光波辐射消毒3 min。将消毒后的玻片连同未消毒处理的对照玻片,分别用无菌棉拭子蘸取采样液后在玻片的滴染物处反复擦拭5遍,去掉手接触的部分,将棉拭子放入含有5 mL采样液(LB培养液)的试管内,再用振荡器充分振荡20 s,然后将洗脱液以5 000 r/min的离心速度离心10 min,离心后分别移取离心管底部的洗脱液100 μL于相应的LB固态培养基上作涂板接种,再置37 ℃孵箱内培养48 h后,进行活菌计数,计算不同消毒温度下的细菌杀灭率,重复3次,求平均值。

2 结果

2.1 箱内升温速度测试结果

从开机到达到120、130、140 ℃的时间分别为2 min 55 s、3 min 3 s、3 min 8 s。

2.2 紫外线辐照强度测定结果

紫外线的辐照强度与预设温度无明显关系,在不同预设温度下,开机2 min后的紫外线辐照强度都在2 000 μW/cm^2以上(表1)。

表 1 不同预设温度下的紫外线强度测定结果($\mu W/cm^2$)

时间(min)	120 ℃	130 ℃	140 ℃
1	1 840	1 838	1 841
2	2 066	2 067	2 066
3	2 121	2 123	2 122

2.3 HBsAg 破坏实验结果

2.3.1 酶联免疫吸附法(ELISA)检测结果 光波在 120 ℃时消毒 7 min,130 ℃时消毒 5 min,140 ℃时消毒 3 min,都能有效破坏 HBsAg 的抗原性(表 2)。

表 2 ELISA 检测对光波消毒后 HBsAg 破坏情况的检测结果(S/N)

消毒温度	消毒时间 (min)				阳性对照
	1	3	5	7	
120 ℃	5.6	2.9	2.1	1.2	9.2
130 ℃	3.0	2.2	1.3	1.0	9.0
140 ℃	2.5	1.8	1.1	1.0	9.1

S/N 值 <2.1 为合格

2.3.2 雅培 HBsAg 定量检测结果 经 120 ℃时 7 min,130 ℃ 时 5 min 及 140 ℃时 3 min 的光波消毒后,采样液内已检测不到 HBsAg 的存在(表 3)。

表 3 雅培检测法对光波消毒后 HBsAg 破坏情况的检测结果(IU)

消毒温度	消毒时间 (min)				阳性对照
	1	3	5	7	
120 ℃	826.21	185.75	1.65	0.00	1 770.28
130 ℃	209.49	30.28	0.00	0.00	1 706.84
140 ℃	86.11	0.00	0.00	0.00	1 735.17

2.4 定性载体杀菌实验结果

光波在 120 ℃时 5 min,130 ℃时 3 min,140 ℃时 1 min 都能彻底杀灭金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌;在 120 ℃时 7 min,130 ℃时 5 min,140 ℃时 3 min 都能彻底杀灭白色念珠菌;在 120 ℃时 9 min,130 ℃时 7 min,140 ℃时 5 min 都能彻底杀灭枯草芽孢杆菌黑色变种(表 4)。

2.5 抗力比较实验结果

3 次重复实验结果表明,光波对枯草芽孢杆菌黑色变种的杀灭率较自然菌者为低(表 5)。因此,口腔自然菌比枯草芽孢杆菌黑色变种更易灭活。

3 讨论

目前,口腔器械最有效、最常用的消毒灭菌方式是高温高压蒸气灭菌。灭菌效果好,特别适合手机一类的中空器械的消毒灭菌,但是灭菌时间长,器械流转慢,通常不能满足临床工作的实际需要。其他消毒灭菌方式也各有弊端,譬如干热灭菌,温度高,不适宜于不耐高温的器械;紫外线因其强度不够,杀菌作用较弱,而且其照射强度和灭菌效果随着使用时间的增长还会有所衰减[8];甲醛与戊二醛作用较慢,且对皮肤及黏膜有刺激性和致敏性[9];含氯消毒剂和过氧乙酸对器械有腐蚀性;苯扎溴铵(新洁尔灭)和氯己定(洗必泰)的消毒灭菌能力较弱;微波不适合对金属器械的消毒,且微波辐射对人体神经、心血管、血液、内分泌、消化、免疫、生殖等各系统都有一定危害。

光波消毒器的光波管是一个没有氧气的接近真空的石英玻璃管,中间有一根钨丝,在钨丝周围充斥着溴气,当通电时,钨丝会产生很强的光和热,再通过与箱内光波聚焦板的结合,使其在消毒灭菌时,能瞬间产生强大的杀菌光和高温,2 min 内紫外线辐照强度可达 2 000 $\mu W/cm^2$以上、3 min 内温度高达到 120 ℃以上。光波管所产生光波的波长在 250 ~ 780 nm 之间,这个波段除了包括杀菌能力较强的 UV 光波(253.7 nm)、可见光外,还包括部分近红外线波(短波红外线)。短波红外线(0.76 ~ 1.4 μm)以及红色光的近红外线部分对组织的穿透性较强,凭借光波对器械表面进行照射,微生物在瞬间被穿透加热,导致细胞壁破裂,失去活性而死亡,达到消毒灭菌的目的。同时又利用 UVC 光波的光化反应,使细菌在吸收紫外线后,菌体蛋白发生光解、变性,进而阻碍细菌的复制、转录、合成蛋白质,从而导致细菌迅速死亡[10-13]。由此可见,光波消毒的机理是利用了光化效应、热效应的双重协同作用,

表 4 光波对染菌载体的灭菌结果

菌种	120 ℃					130 ℃				140 ℃		
	1 min	3 min	5 min	7 min	9 min	1 min	3 min	5 min	7 min	1 min	3 min	5 min
金黄色葡萄球菌	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
绿脓杆菌	+	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−
白色念珠菌	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−	−
枯草芽孢杆菌	+	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	−

16 个培养基上都无菌落生长为(−),任有一个培养基上有菌落生长为(+)

表 5 枯草芽孢杆菌黑色变种与口腔自然菌对光波耐受力的比较

实验菌	120 ℃ 3 min			130 ℃ 3 min			140 ℃ 3 min		
	对照组(cfu)	光照组(cfu)	杀灭率(%)	对照组(cfu)	光照组(cfu)	杀灭率(%)	对照组(cfu)	光照组(cfu)	杀灭率(%)
枯草芽孢	32 600	21 900	32.82	32 600	14 100	56.75	32 600	26	99.92
口腔自然菌	9 100	2 100	76.92	9 100	8	99.91	9 100	0	100.00

同时又借助光波聚焦板对光波的强反射性和短波红外线的强穿透性,从而有效地提高了光波消毒灭菌的效率[14]。

口腔器械多数都是实心的金属器械,比如口镜、镊子、探针、各种金属充填器、车针、牙挺、金属托盘等。这些器械在口腔门诊的使用频率极高,常规的高温高压蒸气灭菌因消毒周期较长,已经满足不了临床实际工作需要。这些器械跟牙科手机有所不同,都是些表面比较光亮的、实心的金属器械,只需表面消毒[15],达到表面无菌,就能达到彻底灭菌的目的。而光波消毒正好能够满足这个要求,对实心金属器械的消毒快且彻底,在口腔器械消毒的过程中,能够作为高温高压蒸气灭菌法的一个有力补充,提高口腔实心金属器械的使用频率,满足临床工作的实际需要。

通过本实验,我们可以看出:光波灭菌即使作用较长时间,但光波辐射温度不够也不能得到满意的灭菌效果,这表明光波的灭菌温度和灭菌时间都对其灭菌效果有很大影响。从实验结果,我们还可以看出,不同的实验微生物在相同温度下,被完全杀灭的时间是不同的。但是,如果采用杀灭枯草芽孢杆菌黑色变种的条件,则其他试验菌种也都可被完全杀灭、HBsAg 的抗原性也能被有效破坏。因此,枯草芽孢杆菌黑色变种可作为口腔常用器械消毒灭菌的指示菌。光波灭菌温度在 120 ℃时 9 min、130 ℃时 7 min 或在 140 ℃时 5 min 都可完全杀灭枯草芽孢杆菌黑色变种,说明光波对口腔实心金属器械的灭菌是可行的,并且在器械能耐高温的前提下,温度越高则时间越短。

采用光波对口腔实心金属器械进行灭菌还具有如下优点:①杀菌彻底。这种方法可以完全杀灭包括细菌芽孢、真菌在内的各种微生物,消除了因口腔器械灭菌不彻底而带来的交叉感染的隐患,符合了医院感染的管理要求。②灭菌速度快。光波灭菌的原理主要是通过热效应和非热效应的双重协同作用,热效应的热能主要是通过短波红外线的辐射传导,升温快,再配合 UV 光波的杀菌作用,5 min 内即可达到消毒灭菌的目的。③灭菌应用范围广泛。包括所有实心的金属和玻璃制品,都可以用光波进行快速彻底的灭菌。④器械冷却快,可及消及用。器械对光波的吸收能力与该器械表面黑度成正比。口腔实心金属器械的表面较光亮,有较强的反辐射能力,对辐射的能量吸收较弱。从而使得在消毒之后,器械能够快速降温(5 min 左右),达到及消及用的目的。⑤安全。光波灭菌后的器械无毒,又无残留物质。因器械本身温度不太高,所以对器械本身也无损伤。

国内外关于紫外线消毒、微波消毒的文献报道比较多,但是利用光波对医疗器械进行消毒灭菌的相关报道不多。本实验通过观察研究光波对人工污染的口腔实心金属器械的消毒灭菌效果,进而探索光波对口腔实心金属器械消毒灭菌的温效时效规律,为口腔实心金属器械光波消毒器的研发提供相应的实验依据。

参考文献:

[1] 安涓, 尚君兰. 口腔医师医院感染的因素及个体防护[J]. 第三军医大学学报, 2006, 28(20): 2061, 2064.

[2] Barlean L, Danila I, Balcos C, *et al*. Preventive attitudes towards infection transmission in dental offices in North-East Romania[J]. Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi, 2012, 116(4): 1209 - 1212.

[3] Rutala W A, Weber D J. Disinfection and sterilization: an overview[J]. Am J Infect Control, 2013, 41(5 Suppl): S2 - S5.

[4] 郝世勇, 聂华. 乙型肝炎病毒表面抗原定量及其临床意义[J]. 临床血液学杂志: 输血与检验版, 2013, 26(2): 141 - 144.

[5] 中华人民共和国卫生部. 医院消毒技术规范: 2009 版[S]. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2009.

[6] 郭映辉, 汤泓, 刘学聪, 等. 微波杀灭口腔石膏模型上白色念珠菌的效果观察[J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(4): 578 - 579.

[7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 755 - 801.

[8] 孙建英. 口腔科手机三种消毒方法的比较[J]. 哈尔滨医药, 2011, 31(1): 41 - 42.

[9] 黄秋华, 涂慧慧, 吴莉. 三种消毒液对硅胶气管套管消毒效果比较[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(3): 192 - 193.

[10] 李钟响, 吴红映, 金美琴. 常见细菌对紫外线敏感性试验观察[J]. 中华医院感染学杂志, 2012, 22(1): 121 - 122.

[11] Menzies D, Popa J, Hanley J A, *et al*. Effect of ultraviolet germicidal lights installed in office ventilation systems on workers' health and wellbeing: double-blind multiple crossover trial[J]. Lancet, 2003, 362(9398): 1785 - 1791.

[12] Kujundzic E, Matalkah F, Howard C J, *et al*. UV air cleaners and upper-room air ultraviolet germicidal irradiation for controlling airborne bacteria and fungal spores[J]. J Occup Environ Hyg, 2006, 3(10): 536 - 546.

[13] Ritter M A, Olberding E M, Malinzak R A. Ultraviolet lighting during orthopaedic surgery and the rate of infection[J]. J Bone Joint Surg Am, 2007, 89(9): 1935 - 1940.

[14] 李方, 舒绍兵, 周继祥. ZJX-1 型口腔常用器械光波消毒器消毒效果的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(9): 892 - 894.

[15] Schneider P M. New technologies and trends in sterilization and disinfection[J]. Am J Infect Control, 2013, 41(5 Suppl): S81 - S86.

(**收稿**:2013-07-08;**修回**:2013-09-02)

(编辑 张 维)