

非接触消毒方法对生物材料表面细菌生物膜的清除效果评价

秦亚辉¹⁾, 陈颖²⁾, 黄云超²⁾, 赵宏³⁾

(1) 昆明医科大学第三附属医院护理部; 2) 胸外科一病区; 3) 消毒供应中心, 云南昆明 650118)

[摘要] **目的** 评价非接触消毒方法对生物材料表面细菌生物膜的清除效果. **方法** 将灭菌消毒后的 PVC 材料与表皮葡萄球菌 RP62A 混合培养 48 h 后, 取出 PVC 材料分别行不同时间的紫外线、环氧乙烷消毒, 扫描电镜观察生物膜的变化. 用无菌生理盐水超声冲洗 PVC 材料, 收集冲洗液接种于平板培养基, 恒温培养, 24 h 后菌落计数法测定细菌菌落数. **结果** 环氧乙烷组中消毒 40 min、50 min、60 min 与对照组菌落数 (CFU/mL) 分别为 1 026、162、0、5 020, 组间比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$). 紫外线组中消毒 30 min、40 min、50 min 与对照组菌落数 (CFU/mL) 分别为 266、48、0、5 020, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$). 在环氧乙烷与紫外线组经过灭菌处理后, PVC 材料表面细菌及生物膜细菌间胞外基质, 呈片状残留, 无生物膜形成, 2 组间差异不明显. **结论** 环氧乙烷与紫外线法消毒对生物材料表面细菌生物膜都具有清除效果, 且消毒时间越长效果越好.

[关键词] 生物材料; 细菌生物膜; 表皮葡萄球菌; 消毒

[中图分类号] R187 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2014) 07 - 0084 - 04

The Assessment of Non-touch Disinfection Methods in Removing Bacterial Biofilm on the Surface of Biomaterial

QIN Ya-hui¹⁾, CHEN Ying²⁾, HHUANG Yun-chao²⁾, ZHAO Hong³⁾

(1) The Nursing Department; 2) Dept. of Thoracic Surgery; 3) Sterile and Supply Center, The Third Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Tumor Hospital of Yunnan Province, Kunming Yunnan 650118, China)

[Abstract] **Objective** To assess the effects of different disinfection methods on removing bacterial biofilm on the surface of biomaterial. **Methods** The PVC material and epidermis staphylococcus RP62A were co-cultured for 48 hours, then the PVC material was disinfected with ethylene oxide and ultraviolet ray for different times. SEM was used to observe the changes in biofilm. The PVC material was flushed with sterile saline, the washing fluids were collected, and cultured in plate culture medium, then was incubated in constant temperature for 24 hours, the colony counts was performed. **Results** In the ethylene oxide group, after 40 min, 50 min and 60min disinfection, the CFU was 1026, 162, 0 and 5020 in control group respectively, the difference between groups had statistical significance. In the ultraviolet ray group after 30 min, 40 min and 50 min disinfection, the CFU was 266, 48, 0 and 5020 in control group respectively, the difference between groups had statistical significance. After disinfection by ethylene oxide and ultraviolet ray, the SEM showed Extracellular matrix between bacteria and bacteria biofilm, plate shaped residues on the surface of PVC biomaterial, and no biofilm was formed. The difference between groups had no statistical significance. **Conclusion** Epoxy ethane and ultraviolet disinfection method has good effect on removing bacterial biofilm of biological material surface, and the better result can be got with the longer disinfection time.

[Key words] Biomaterials; Bacterial biofilm; Staphylococcus epidermidis; Disinfection

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81260228; 30872555)

[作者简介] 秦亚辉 (1962~), 女, 湖南衡阳市人, 医学学士, 副主任护师, 主要从事肿瘤护理工作.

[通讯作者] 黄云超. E-mail: huangyuch2001@aliyun.com

近年来, 随着医疗器械、导管、植入物、透析设备及内镜等医用生物材料的广泛应用, 因细菌黏附于生物材料表面形成生物膜而导致以生物材料为中心的感染 (biomaterial centered infection, BCI) 日益严重^[1].

BCI 多由葡萄球菌属引起, 特别是定植皮肤、黏膜表面条件致病菌表皮葡萄球菌 (staphylococcus epidermidis, SE) 常伴随植入过程侵入体内, 等可粘附在高分子医疗材料的表面形成生物膜^[2]. 由于生物膜的存在使得抗生素和杀菌剂很难穿透生物膜的胞外多糖基质杀死被粘液层包裹的细菌.

生物膜的存在使得细菌可抵抗清洗与消毒的作用, 造成生物材料清洗和消毒的失败, 成为医院感染的潜在因素^[3]. 如何在医用生物材料消毒过程中彻底清除清除细菌生物膜, 是临床中必须面临的问题之一.

本研究使用临床常见的生物材料聚氯乙烯材料 (polyvinyl chloride, PVC) 为载体建立表皮葡萄球菌生物膜感染模型, 探讨临床中常用非接触消毒方式环氧乙烷消毒与紫外线消毒对 PVC 材料表面表皮葡萄球菌生物膜的清除效果.

1 材料与方法

1.1 试验用菌种及试剂、器材

表皮葡萄球菌标准株 RP62A (生物膜表型阳性) 购自中国科学院微生物研究所; 医用 PVC 材料 (四川大学生物材料系), 将 PVC 材料加工成面积 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小, 甲醛熏蒸 24 h 灭菌备用. RPMI 1 640 培养基、DMSO、PBS 缓冲液 (GIBCO 公司, 美国); FBS (COSTAR 公司, 美国); 电子显微镜 EYO LS10 (Carl Zeiss 公司德国); 超净工作台、恒温培养箱、高压蒸汽灭菌锅、环氧乙烷消毒柜 (3M 公司, 美国)、紫外线消毒柜 (启东市海联有限公司).

1.2 PVC 材料表面表皮葡萄球菌生物膜的建立

在超净工作台上将表皮葡萄球菌标准株 RP62A 浓度调整为 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 取细菌悬液 1 mL 与灭菌硅 PVC 共培养 48 h. 取出 PVC 材料, PBS 液进行冲洗 3 遍, 无菌蒸馏水冲洗 3 遍, 备用.

1.3 紫外线消毒

将 PVC 薄片放入无菌的玻璃平皿中, 放置于输出功率 40W 紫外线消毒柜中, 与紫外线灯正下方距离 1 m 处进行垂直辐射消毒, 每组 6 片, 各组辐射时间分别为: 30、40、50 min. 5 片行超声洗

脱后, 使用灭菌理盐水 2 mL 冲洗, 取 $10\ \mu\text{L}$ 种植于血琼脂平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h 后行菌落计数. 1 片行扫描电镜观察生物膜结构.

1.4 环氧乙烷消毒

将 PVC 薄片装入环氧乙烷消毒专用密封袋内, 消毒设置为温度 $56\text{ }^\circ\text{C}$ 、湿度 70%、环氧乙烷浓度 600 mg/L , 每组 6 片, 各组时间分别为: 40、50、60 min. 后使用灭菌理盐水 2 mL 冲洗. 5 片行超声洗脱后, 使用肉汤进行倍比稀释, 取 $10\ \mu\text{L}$ 种植于血琼脂平板上, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 恒温培养 24 h 后行菌落计数. 1 片行扫描电镜观察生物膜结构.

1.5 扫描电镜标本制作和观察

取出未处理的 PVC 材料及经消毒处理的 PVC 材料, 用羟乙基哌嗪乙硫磺酸 (HEPES) 缓冲液 ($\text{pH}=7$) 冲洗 3 次, 4% 戊二醛固定于 SEM 载物台上, PBS 冲洗 3 遍, 二氧化碳 (CO_2) 临界干燥, 离子溅射表面固定镀膜致 PVC 材料表面成金黄色, 扫描电镜观察细菌生物膜表面结构.

1.6 统计学处理

数据使用 SPSS 统计软件进行统计学分析, 两两比较采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义.

2 结果

2.1 环氧乙烷消毒组中表皮葡萄球菌生物膜的活菌菌落计数

环氧乙烷组中消毒 40 min、50 min、60 min 与对照组菌落数分别为 $1\ 026\ \text{CFU/mL}$ 、 $162\ \text{CFU/mL}$ 、 $0\ \text{CFU/mL}$ 、 $5\ 020\ \text{CFU/mL}$, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 1.

2.2 紫外线消毒组中表皮葡萄球菌生物膜的活菌菌落计数

紫外线组中消毒 30 min、40 min、50 min 与对照组菌落数分别为 $266\ \text{CFU/mL}$ 、 $48\ \text{CFU/mL}$ 、 $0\ \text{CFU/mL}$ 、 $5\ 020\ \text{CFU/mL}$, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2.

2.3 生物膜表面的扫描电镜观察

表皮葡萄球菌 RP62A 株, 在对照组中, 可观察到 PVC 材料与表皮葡萄球菌共培养 48 h 后, PVC 材料表面大量表皮葡萄球菌相互聚集重叠, 形成生物膜 (图 1). 在环氧乙烷与紫外线组经过灭菌处理后, PVC 材料表面细菌及生物膜细菌间胞外基质呈片状残留, 无生物膜形成, 2 组间差异不明显, 见图 2、3.

表 1 环氧乙烷杀灭表皮葡萄球菌生物膜的实验结果

Tab. 1 The result of impact of ethylene oxide on staphylococcus epidermidis biofilm

组 别	菌落数 (CFU/mL)					平均生长菌落数
	1	2	3	4	5	
对照组	5 500	4 900	3 800	4 200	6 700	5 020
40 min	1 500	970	1 260	780	620	1 026**
50 min	120	170	230	90	200	162**
60 min	0	0	0	0	0	0**

与对照组比较, ** $P < 0.01$.

表 2 紫外线杀灭表皮葡萄球菌生物膜的实验结果

Tab. 2 The result of impact of ultraviolet ray on staphylococcus epidermidis biofilm

组 别	菌落数 (CFU/mL)					平均生长菌落数
	1	2	3	4	5	
对照组	5 500	4 900	3 800	4 200	6 700	5 020
30 min	500	370	160	80	220	266**
40 min	70	0	50	100	20	48**
50 min	0	0	0	0	0	0**

与对照组比较, ** $P < 0.01$.

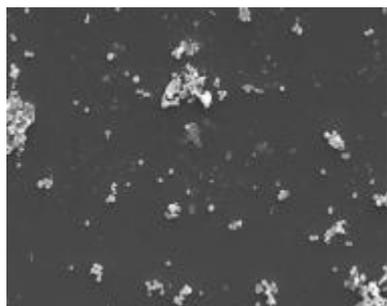


图 1 对照组中 PVC 材料表面生物膜 SEM 图片

Fig. 1 The SEM picture of biofilm on the surface of PVC material in control group



图 2 环氧乙烷组中 PVC 材料表面生物膜 SEM 图片

Fig. 2 The SEM picture of biofilm on the surface of PVC material in ethylene oxide group



图 3 紫外线组中 PVC 材料表面生物膜 SEM 图片

Fig. 3 The SEM picture of biofilm on the surface of PVC material in ultraviolet ray group

3 讨论

随着多种导管、透析膜、起搏器、人工瓣膜等高分子医疗材料的广泛应用, 细菌黏附于生物材料表面形成生物膜而导致的医院内感染日益严重, 生物膜中的细菌能有效地抵御消毒剂的作用, 是医院内细菌污染的重要来源。

临床使用的内镜或复用使用呼吸机、透析机等管腔型材料, 在使用过程中容易病原菌可黏附于器械表面形成生物膜, 生物膜中细菌对抗菌素、消毒剂和灭菌剂产生抵抗性, 较浮游细菌强 1 000 多倍^[4]。研究表明^[5]: 从临床使用中内镜更换下的管道发现, 所有管道内壁均有细菌生物膜存在, 生物膜一旦在管腔型器械中形成, 则难以去除,

并在反复使用、处理、使用的循环过程中逐渐累积,当生物膜积累到一定厚度,消毒及灭菌因子均难以杀灭包裹于其中的细菌,对于这些刷洗困难的管腔状生物材料,只能采用熏蒸或紫外线照射等方法进行灭菌处理。

本研究参照课题组之前建立的体外生物材料生物膜培养模型^⑥,选取生物膜相关感染的主要致病菌表皮葡萄球菌为培养菌。观察用非接触消毒法环氧乙烷和紫外线对PVC材料上表皮葡萄球菌生物膜的去除效果。结果提示环氧乙烷和紫外线对PVC材料表面生物膜中的表皮葡萄球菌均具有杀灭作用,且灭菌效果随着处理时间的延长而增加,环氧乙烷与紫外线均需约60 min消毒处理方能杀灭生物膜内细菌,消毒时间不足往往不能起到较好的杀菌作用。

对于医用生物材料细菌生物膜导致的细菌污染的预防不能局限于常规消毒措施,应特别注意消毒方法的选择、作用时间以及针对不同的生物材料应选择恰当的清洗措施等。此外,细菌生物膜的形成时间对灭菌效果也有影响,随着生物膜形成时间延长其成熟度增加,对消毒剂的抵抗增强更加明显,此与生物膜耐药性研究结果一致^⑦,因此应在生物膜形成早期采取有效的消毒和清除措施,可获得更好效果。

综上所述,生物膜在医院医疗器械、导管及内镜等生物材料表面的形成是造成清洗和消毒失败,是引起交叉感染的重要因素,必须引起足够的重视,对存在细菌生物膜的生物材料使用非接触

消毒过程中,应适当增加消毒时间,同时还要积极探索新的有效的消毒方法。

[参考文献]

- [1] STOODLEY P, SIDHU S, NISTICCO L, et al. Kinetics and morphology of polymicrobial biofilm formation on polypropylene mesh [J]. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 65(2): 283 - 290.
- [2] 叶联华, 黄云超, 许赓, 等. 医源性表皮葡萄球菌胞间黏附素基因操纵子在聚氯乙烯材料表面细菌生物膜形成中的作用研究 [J]. *中国修复重建外科杂志*, 2011, 25(4): 466 - 471.
- [3] OTTER J A, YEZLI S, FRENCH G L. The role played by contaminated surfaces in the transmission of nosocomial pathogens [J]. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2011, 32(7): 687 - 699.
- [4] 陆龙喜, 陆焯, 林军明, 等. 铜绿假单胞菌生物膜对不同消毒因子的抗力研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(9): 1 728 - 1 731.
- [5] 任伟, 黄茜, 周立平, 等. 不同清洗剂对内镜生物膜清除的效果评价 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(7): 1 382 - 1 384.
- [6] ZHAO G Q, YELH, HUANG Y C, et al. In vitro model of bacterial biofilm formation on polyvinyl chloride biomaterial [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2011, 61(2): 371 - 376.
- [7] 黄忠强, 韦雪菱. 生物膜阳性致病菌对常用消毒剂耐受性研究 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(16): 3 420 - 3 422.

(2014 - 05 - 01 收稿)