

过氧化氢蒸汽对微生物实验室的消毒效果观察

蔡标, 戴陈伟, 李舜, 童琳, 刁慧敏, 辛及娣, 江杨帆

安徽省医学科学研究院, 安徽 合肥 230061

摘要: **目的** 为正确使用过氧化氢蒸汽进行实验室消毒提供试验依据, 观察过氧化氢蒸汽对微生物实验室工作台、墙面及空气的消毒效果。 **方法** 采用 HTY-SUPER SD2 型汽化过氧化氢发生器将浓度为 30% H_2O_2 液体分别按照 3.5、7.0、10.5 ml/m^3 的用量对微生物实验室进行汽化熏蒸处理, 作用时间为 30 min 和 60 min, 根据消毒前后实验室工作台、墙面及空气细菌数, 计算消毒后工作台、墙面的细菌杀灭对数值和空气细菌的消亡率。 **结果** 采用过氧化氢蒸汽对微生物实验室空气进行消毒时, H_2O_2 剂量为 7.0 ml/m^3 和 10.5 ml/m^3 时消毒 30 min 所有进行消毒的实验室细菌消亡率平均值均 > 90%, 符合空气消毒的要求; 对微生物实验室工作台面及墙面进行消毒时, H_2O_2 剂量 7.0、10.5 ml/m^3 时, 消毒 30 min 对所有试验台和墙面的杀灭对数值平均值均 > 1, 均符合物体表面消毒的要求。 **结论** 过氧化氢蒸汽对微生物实验室工作台、墙面等物体表面及空气消毒效果较好, 可以作为微生物实验室的综合消毒方法使用。

关键词: 过氧化氢; 微生物实验室; 消毒效果

中图分类号: R187 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)06-0752-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.034

微生物实验室是进行微生物相关科研、教学以及检验检测等的实验场所, 为了减少微生物的污染、获得准确的实验结果同时保护环境及实验人员的安全, 应定时对微生物实验室进行消毒。本试验通过汽化过氧化氢发生器将液体过氧化氢汽化后对实验室工作台面、墙面及空气进行熏蒸来实现微生物实验室的消毒, 对比分析消毒前后微生物实验室空气、工作台面及墙面自然菌的数量及对实验室工作台、墙面细菌的杀灭对数和空气中细菌的自然消亡率, 现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 试验对象 安徽省医学科学研究院微生物实验室, 包括实验室 1、实验室 2、实验室 3。

1.2 材料 营养琼脂培养基(杭州微生物试剂有限公司、批号 20161012-02)、HTY-SUPER SD2 型汽化过氧化氢发生器(浙江泰林生物技术股份有限公司)、SPX-150B-Z 生化培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂)、30% H_2O_2 (上海哈勃化学技术有限公司)。

1.3 中和剂鉴定试验 分别选择金黄色葡萄球菌和白色念珠菌作为细菌繁殖体和真菌的代表进行中和剂鉴定试验。试验分为 6 组: 第 1 组: 消毒剂+菌悬液; 第 2 组: (消毒剂+菌悬液)+中和剂; 第 3 组: 中和剂+

菌悬液; 第 4 组: (消毒剂+中和剂)+菌悬液; 第 5 组: 稀释液+菌悬液; 第 6 组: 稀释液+培养基+中和剂。具体试验步骤按《消毒技术规范》卫生部 2002 版^[1]中和剂鉴定试验进行。试验结果以第 1 组无菌落生长或者有少数菌落生长, 第 2 组菌落数比第 1 组多, 但比第 3、4、5 组少, 第 3、4、5 组组间菌落数误差率 $\leq 15\%$, 第 6 组无菌落生长, 为所选中中和剂及浓度, 重复实验 3 次。

1.4 消毒方法 将汽化过氧化氢发生器主设备放置在待消毒房间的中部位置, 将仪器的控制器放在房间外部并连接主机和控制器, 然后加注 30% H_2O_2 , 通过控制器设定 H_2O_2 剂量和消毒时间对实验室进行消毒, 消毒过程保持实验室的密闭。

1.5 采样方法 (1) 工作台、墙面采样: 选取 3 个实验室的工作台及墙面, 每个实验室工作台及墙面分别放置 2 个 5 cm×5 cm 标准无菌规格板, 将高压灭菌过的无菌棉拭子在装有稀释液的试管内浸湿后, 在试管壁口挤去多余水分, 在规格板内螺旋式均匀涂抹 3 次。采样结束后用无菌剪刀剪去棉拭子与手接触的部分, 将剩余棉拭子留在装有中和剂的试管内, 充分混匀后待检。(2) 空气采样^[2]: 采用自然沉降法采集样本, 将直径 90 mm 的普通营养琼脂培养基平皿(消毒试验后的采样平板中加 1 ml 中和剂后)放置于实验室的中央及四角(距离墙体大于 1 m), 采样高度距地面 1 m, 平皿暴露时间 15 min。

1.6 采样时间 分别于消毒前 30 min 和消毒后 30 min, 采用相同的采样方法对同一采样位置进行采样。

基金项目: 安徽省“十三五”医疗卫生重点专科“病原微生物实验室”(皖卫科教[2017]30 号); 安徽省卫计委 2018 年科研计划项目(2018YK005)

作者简介: 蔡标(1981-), 男, 安徽亳州人, 副研究员, 研究方向: 病原微生物、流行病学。

1.7 培养方法 按照《消毒技术规范》(2002 年版)^[1]要求,将营养琼脂培养基 121 ℃ 高压灭菌 15 min 后冷却至 50 ℃,取 20 ml 加入含有 1 ml 待检样品的直径 90 mm 无菌一次性培养皿,轻轻转动培养基,将待检样品与培养基混匀,待培养基冷却后盖好培养基,置 35 ℃ 培养 48 h,观察结果,菌落计数。

1.8 评价指标 细菌消亡率=(消毒前菌落平均数-消毒后菌落平均数)/消毒前菌落平均数×100%,杀灭对数值=对照组平均活菌浓度的对数值-试验组活菌浓度对数值。

1.9 评价标准 空气消毒后细菌消亡率平均值≥90%判定消毒合格,物体表面消毒后杀灭对数平均值≥1 判定消毒合格。

1.10 统计学分析 应用 SPSS 13.0 进行统计分析,计量资料采用均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示。

2 结果

2.1 中和剂鉴定试验结果 试验结果表明,含 2% (W/V) 硫代硫酸钠、1% (W/V) 吐温 80 的 PBS 溶液可以有效中和该消毒剂对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的杀菌作用,并且该中和剂和中和产物对培养基和试验菌的生长无影响,3 次试验,金黄色葡萄球菌第 3、4、5 组间菌落误差率分别为 5.6%、1.9%、5.3%,白色念

珠菌第 3、4、5 组间菌落误差率分别 3.3%、4.4%、3.4%符合要求,见表 1。

表 1 中和剂鉴定试验结果(CFU/ml)

组别	3 次试验各组菌落生长数(金黄色葡萄球菌)				3 次试验各组菌落生长数(白色念珠菌)			
	1	2	3	平均值	1	2	3	平均值
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	2.7×10 ³	2.5×10 ³	2.9×10 ³	2.7×10 ³	2.0×10 ³	2.2×10 ³	2.1×10 ³	2.1×10 ³
3	1.7×10 ⁷	1.8×10 ⁷	2.0×10 ⁷	1.8×10 ⁷	3.1×10 ⁷	3.2×10 ⁷	3.0×10 ⁷	3.1×10 ⁷
4	1.9×10 ⁷	1.8×10 ⁷	2.0×10 ⁷	1.9×10 ⁷	3.1×10 ⁷	2.9×10 ⁷	3.0×10 ⁷	3.0×10 ⁷
5	1.9×10 ⁷	1.9×10 ⁷	1.8×10 ⁷	1.9×10 ⁷	2.9×10 ⁷	2.9×10 ⁷	2.8×10 ⁷	2.9×10 ⁷
6	0	0	0	0	0	0	0	0

2.2 不同 H₂O₂ 剂量和消毒时间对微生物实验室空气中细菌的杀灭效果 见表 2。采用过氧化氢蒸汽对微生物实验室空气进行消毒时,H₂O₂ 剂量为 3.5 ml/m³时消毒 30 min 有一个实验室细菌消亡率平均值小于 90%,消毒 60 min 实验室细菌消亡率平均值均大于 90%;H₂O₂ 剂量为 7.0 ml/m³ 时消毒 30 min 和 60 min 所有实验室细菌消亡率都为 100%;H₂O₂ 剂量为 10.5 ml/m³时消毒 30 min 和 60 min 所有实验室细菌消亡率都为 100%。为了减少消毒时间,提高消毒效率,并能够尽量节约消毒成本,可以选择 H₂O₂ 剂量 7.0 ml/m³消毒时间 30 min 对实验室空气进行消毒。

表 2 不同消毒时间和 H₂O₂ 剂量对微生物实验室空气消毒效果

作用时间 (min)	地点	采样数量 (皿)	消毒前菌落数 (CFU/皿, $\bar{x}\pm s$)	不同 H ₂ O ₂ (ml/m ³) 剂量消毒后					
				3.5		7.0		10.5	
				菌落数(CFU/皿, $\bar{x}\pm s$)	细菌消亡率(% , $\bar{x}\pm s$)	菌落数(CFU/皿)	细菌消亡率(%)	菌落数(CFU/皿)	细菌消亡率(%)
30	实验室 1	10	19.90±7.05	1.30±0.95	93.61±5.01	0	100.00	0	100.00
	实验室 2	10	18.20±3.55	2.10±1.20	88.11±8.22	0	100.00	0	100.00
	实验室 3	10	19.20±5.67	1.80±0.79	100.00	0	100.00	0	100.00
	合计	30	19.10±5.46	1.73±1.01	90.40±6.96	0	100.00	0	100.00
60	实验室 1	10	19.90±7.05	0	100.00	0	100.00	0	100.00
	实验室 2	10	18.20±3.55	0	100.00	0	100.00	0	100.00
	实验室 3	10	19.20±5.67	0	100.00	0	100.00	0	100.00
	合计	30	19.31±5.34	0	100.00	0	100.00	0	100.00

2.3 不同 H₂O₂ 剂量和消毒时间对微生物实验室工作台及墙面消毒效果 采用过氧化氢蒸汽对微生物实验室工作台面及墙面进行消毒时,H₂O₂ 剂量为 3.5、7.0、10.5 ml/m³ 时,消毒 30 min 和 60 min,对所有试验台和墙面的杀灭对数值平均值均>1,均符合物体表面消毒的要求,因此单独对实验室工作台及墙面等物体表面进行消毒时可以选择 H₂O₂ 剂量为 3.5 ml/m³、消毒时间 30 min。H₂O₂ 剂量为 3.5 ml/m³ 时消毒 60 min、

7.0 ml/m³ 和 10.5 ml/m³ 时消毒 30 min 后采样的平皿培养后细菌全部为 0,可以彻底杀灭试验台、墙面等物体表面的所有细菌,见表 3。

综合分析过氧化氢蒸汽对实验室空气和试验台、墙面消毒的结果可知,H₂O₂ 剂量为 7.0 ml/m³、消毒时间 30 min 的消毒程序对微生物实验室的物体表面及空气进行综合消毒能够达到良好的消毒效果。

表 3 不同消毒时间和 H₂O₂ 剂量对微生物实验室工作台及墙面消毒效果($\bar{x}\pm s$)

作用时间 (min)	地点	采样数量 (cm ²)	消毒前菌落数 (CFU/cm ²)	不同 H ₂ O ₂ (ml/m ³) 剂量消毒后					
				3.5		7.0		10.5	
				菌落数(CFU/cm ²)	杀灭对数	菌落数(CFU/cm ²)	杀灭对数	菌落数(CFU/cm ²)	杀灭对数
30	实验室 1 工作台	250	15.50±3.34	0.80±0.63	1.15±0.16	0	1.18±0.11	0	1.18±0.11
	实验室 1 墙面	250	16.80±3.55	1.10±0.99	1.10±0.22	0	1.21±0.10	0	1.21±0.10
	实验室 2 工作台	250	15.90±2.77	1.20±0.79	1.08±0.10	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08
	实验室 2 墙面	250	15.90±3.63	1.20±0.79	1.12±0.24	0	1.19±0.12	0	1.19±0.12
	实验室 3 工作台	250	16.50±2.88	1.00±0.67	1.15±0.16	0	1.21±0.09	0	1.21±0.09
	实验室 3 墙面	250	16.50±3.00	1.20±1.03	1.07±0.16	0	1.21±0.09	0	1.21±0.09
	合计	1 500	16.18±3.11	1.08±0.81	1.11±0.17	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08
60	实验室 1 工作台	250	15.50±3.34	0	1.18±0.11	0	1.18±0.11	0	1.18±0.11
	实验室 1 墙面	250	16.80±3.55	0	1.21±0.10	0	1.21±0.10	0	1.21±0.10
	实验室 2 工作台	250	15.90±2.77	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08
	实验室 2 墙面	250	15.90±3.63	0	1.19±0.12	0	1.19±0.12	0	1.19±0.12
	实验室 3 工作台	250	16.50±2.88	0	1.21±0.09	0	1.21±0.09	0	1.21±0.09
	实验室 3 墙面	250	15.50±3.34	0	1.20±0.09	0	1.21±0.09	0	1.21±0.09
	合计	1 500	16.17±3.06	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08	0	1.20±0.08

3 讨 论

微生物实验室的消毒效果直接关系到实验人员的人身安全、实验室内外环境、仪器以及试验结果的准确性等,实验室的消毒过程既要完成对实验室潜在的微生物进行杀灭,同时还要做到对实验室工作人员、仪器及环境的保护,因此微生物实验室的消毒受到实验室负责人、实验室设立单位以及上级主管部门的重视。微生物实验室的消毒主要包括实验室工作台、仪器表面、墙面、空气等不同位置的消毒,由于消毒方法的局限性,通常对于实验室不同位置的消毒采取不同的消毒方式^[3-5]。微生物实验室内物体表面最常用的消毒方法是使用 84 消毒液、新洁尔灭、乙醇等化学消毒剂进行喷洒擦拭消毒^[6-7],这些常规的消毒方法消毒效果较好,受到大家的认可,但是在消毒的过程中不仅容易留下刺鼻的气味,长时间使用会产生残留,对实验室仪器造成损坏,并且使实验室常规细菌对所选的消毒剂产生耐性,降低消毒的效果。微生物实验室空气消毒的主要方法是紫外线照射消毒,消毒效果较好,但是紫外线的穿透能力较弱,一般普通的玻璃、纸张甚至是尘埃都能够阻挡紫外线,同时紫外线消毒效果受到空气中微生物种类、颗粒物大小,实验室环境的温湿度、实验室的面积、紫外线的照射强度、空气流动速度等因素的影响^[8-9],同时紫外线消毒时间过长实验室会有很浓的气味,可以损害实验人员的皮肤和角膜,对工作人员的健康会产生一定的影响,因此使用紫外线对实验室空气进行消毒时应特别注意防护并严格控制紫外线照射的时间。

由于常规的微生物实验室消毒方式方法的种种弊端,科研人员在不断的寻找新的实验室消毒方法,其目的就是希望找到一种既可以实现实验室的彻底消毒,又不会对实验室环境、仪器、甚至工作人员产生负面影响的消毒方法,在这个过程中过氧化氢就慢慢进入大家的视野。过氧化氢超强的氧化能力可以破坏微生物体内的原生质,杀灭微生物,杀菌谱很广,不仅可以杀灭细菌繁殖体和真菌,对细菌芽孢也有很好的杀灭作用,同时过氧化氢是一种清洁的化工产品,几乎没有任何污染,因此过氧化氢作为一种新的消毒方法开始逐渐被大家认可。目前可以通过汽化过氧化氢发生器按照设定的消毒程序将食品级液体过氧化氢汽化来完成实验室消毒,消毒过程可以自动化运行,对工作人员无毒无害,对实验室工作台及实验仪器等也不会造成损伤,同时对实验室工作台消毒彻底、不留死角^[10]。

采用过氧化氢蒸汽对微生物实验室空气进行消毒时,H₂O₂ 剂量为 7.0 ml/m³ 和 10.5 ml/m³ 时消毒 30 min 所有进行消毒的实验室细菌消亡率平均值均>90%,符合空气消毒的要求;对微生物实验室工作台面及墙面进行消毒时,H₂O₂ 剂量 7.0、10.5 ml/m³ 时,消毒 30 min 对所有试验台和墙面的杀灭对数值平均值均>1,均符合物体表面消毒的要求。为了减少消毒时间,提高消毒效率,节约消毒成本,使用该方法对微生物实验室的物体表面及空气进行综合消毒时,建议选择 H₂O₂ 剂量为 7.0 ml/m³、消毒时间 30 min 的消毒程序进行消毒。

使用过氧化氢蒸汽不仅可以同时完成微生物实验

宫颈癌组织中角质细胞生长因子受体的表达以及对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、迁移能力的影响

娄欢, 武明莉, 李怡梅, 杨小凤

郑州大学附属郑州中心医院妇产科, 河南 郑州 450000

摘要: **目的** 探讨宫颈癌组织中角质细胞生长因子受体(KGFR)的表达以及对宫颈癌 HeLa 细胞增殖、侵袭能力的影响。

方法 选取 2017 年 1 月-2018 年 4 月郑州中心医院保存的宫颈癌组织标本 52 例(宫颈癌组),同时选取正常宫颈组 40 例作为对照组,采用免疫组化染色法检测 KGFR 表达;选取宫颈癌 HeLa 细胞株,随机分为对照组、空白 shRNA 组和 KGFR-shRNA 组,其中空白 shRNA 组转染空白慢病毒载体,KGFR-shRNA 组转染沉默 KGFR 表达的慢病毒载体,采用 RT-PCR 和 Western blot 检测 HeLa 细胞 KGFR mRNA 和蛋白表达,CCK-8 检测 HeLa 细胞增殖情况,Transwell 细胞迁移实验检测 HeLa 细胞迁移能力。 **结果** 宫颈癌组 KGFR 阳性表达率为 76.92%,明显高于对照组($\chi^2 = 54.438, P < 0.05$);宫颈癌 TNM 分期Ⅲ期患者 KGFR 阳性表达率为 100.00%,明显高于Ⅰ~Ⅱ期患者($\chi^2_{校正} = 5.183, P < 0.05$);宫颈癌中低分化患者 KGFR 阳性表达率为 91.89%,明显高于高分化患者($\chi^2_{校正} = 13.399, P < 0.05$);KGFR-shRNA 组的 KGFR mRNA 和蛋白相对表达量分别为(0.354±0.065)和(0.603±0.122),明显低于对照组和空白 shRNA 组($P < 0.05$);KGFR-shRNA 组培养 24、48、72 h 细胞 OD 值明显低于对照组和空白 shRNA 组($P < 0.05$);KGFR-shRNA 组穿膜细胞数分别为(53.11±7.49)个,明显低于空白 shRNA 组和对照组($P < 0.05$)。 **结论** 宫颈癌组织中 KGFR 表达上调,与患者临床病理特征有一定关系;KGFR 表达沉默可抑制宫颈癌 HeLa 细胞的增殖和迁移能力。

关键词: 宫颈癌;角质细胞生长因子受体;HeLa 细胞;增殖;迁移

中图分类号: R737.33 **文献标识码:** B **文章编号:** 1006-3110(2019)06-0755-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.06.035

宫颈癌的发生风险明显上升,流行病学研究证实,我国 2010-2017 年每年宫颈癌的平均发病率可达 374~583/10 万人左右^[1]。临床上宫颈癌发生转移能够导致患者无进展生存期和无瘤生存期的缩短,影响患者的整体临床预后水平^[2]。

基金项目: 河南省高等学校重点科研项目(15A321139)

作者简介: 娄欢(1985-),女,硕士,主治医师,研究方向:妇产科学。

通信作者: 杨小凤, E-mail: yinjingping@163.com。

在影响宫颈癌发生发展的相关因素中,肿瘤相关生物学因子的改变,能够导致癌细胞的浸润、增殖、分化等病理特征的变化,促进了恶性肿瘤的发生过程。角质细胞生长因子受体(KGFR)是成纤维生长因子受体家族的重要成员,其能够通过对于受体络氨酸激酶的活化作用,进而促进患者癌细胞内信号通路的激活,导致癌细胞核转录活性的增强。KGFR 的表达能够通过提高癌细胞的迁移和变形能力,提高癌细胞浸润临近正常组织的风险,导致宫颈癌患者的临床病情的进

室内空气和实验室内不同物体表面、以及不易看到的污染死角的消毒,而且消毒彻底、消毒效果好,因此过氧化氢蒸汽可以作为微生物实验室彻底消毒的一种方法进行使用。由于过氧化氢蒸汽的消毒效果与 H₂O₂ 剂量及消毒时间密切相关,因此在使用的过程中应该保持实验室的密封。

参考文献

- [1] 卫生法制与监督司. 消毒技术规范[Z]. 北京:中华人民共和国卫生部, 2002;26-28.
- [2] 赵治英, 张露丹, 张鸿, 等. 2011-2015 年上海市浦东新区养老机构消毒消毒效果监测分析[J]. 实用预防医学, 2018, 25(3):305-307.
- [3] 郑吟秋, 王云川, 何媛, 等. 5 种化学消毒剂对高等级生物安全实验室消毒效果研究[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(10):905-908.

- [4] 孔军伶, 邵长玲. 病原微生物实验室的消毒与灭菌[J]. 医学信息, 2016, 29(36):284-285.
- [5] 柳琴. 不同消毒方法在医学实验室消毒管理中应用的研究[J]. 中国保健营养, 2014, 2(中):498-499.
- [6] 杨华明, 易滨. 现代医院消毒学[M]. 北京:人民军医出版社, 2008:522-531.
- [7] 庞志钊, 马志辉. 石家庄市托幼机构物体表面消毒效果分析[J]. 实用预防医学, 2016, 23(2):219-220.
- [8] 李闽真, 林坚, 叶玲清. 微生物实验室空气紫外线消毒效果监测[J]. 海峡预防医学杂志, 2014, 20(1):57-58.
- [9] 龙显科, 汤丽霞. 医院微生物实验室空气细菌污染与消毒现状[J]. 右江民族医学院学报, 2009, 52(2):283-284.
- [10] 帖金凤, 王长德, 陈金龙, 等. 过氧化氢蒸汽对生物安全实验室灭菌效果观察[J]. 中国消毒学杂志, 2012, 29(6):463-465.

收稿日期:2018-09-30