

季铵盐消毒剂中检出一株洋葱假单胞菌

魏兰芬 林军明 申屠金胜 许激

【摘要】 目的 观察从复合季铵盐消毒剂中分离得到的洋葱假单胞菌对常用消毒剂的抗力。方法 以常用的氯和戊二醛消毒剂对其进行杀菌试验,并与对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌相应的杀菌效果进行比较,以除菌后污染样液对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌进行了杀菌试验和 HBsAg 抗原性破坏试验,对芽孢和白色念珠菌进行抑菌试验。结果 该洋葱假单胞菌对氯和戊二醛的抗力与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接近,污染样液除菌后 1 000 倍稀释对大肠杆菌和金黄色葡萄球菌仍有较好的杀菌效果,20 倍稀释可完全破坏 HBsAg 抗原性,和抑制枯草杆菌黑色变种芽孢的生长,1 600 倍稀释可抑制白色念珠菌生长,而原液则不能抑制分离菌株的生长。结论 洋葱假单胞菌可在高浓度(1.6%)季铵盐消毒剂中大量生长,其对该类消毒剂抗力明显高于大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、枯草杆菌黑色变种芽孢和 HBsAg,其对氯和戊二醛的抗力与大肠杆菌和金黄色葡萄球菌接近。

【关键词】 季铵盐 洋葱假单胞菌 化学消毒剂

The detection of a strain of *Pseudomonas cepacia* in quaternary ammonium disinfectant WEI Lanfen, LIN Junming, SHEN TU Jinsheng, et al. Zhejiang Province Sanitary and Anti-epidemic Station, Hangzhou 310009

【Abstract】 Objective To observe the resistance of *Pseudomonas cepacia* isolated from quaternary ammonium disinfectant to the disinfectants in common use. **Method** Germicidal test and antigenic disruption test of HBsAg with filtered quaternary ammonium disinfectant. **Result** A strain of *Pseudomonas cepacia* was detected in 1.6% compound quaternary ammonium disinfectant before application. The amount of the germ was 1.21×10^5 cfu/ml. The strain had the similar resistance to chlorine-containing disinfectants and glutaraldehyde compared with *Staphy aureus*. The contaminated disinfectant could still thoroughly destroy the antigenicity of HBsAg with 60min's contact after diluted for 5-20 times. After sterilized with filtration, 1:1 000 solution of disinfectant had good bactericidal efficacy on vegetative bacteria and 1:20 solution could inhibit the growth of the spore of *Bacillus subtilis* var. Niger. **Conclusion** The survival of *P. cepacia* indicated that it had higher resistance to disinfectant than the spore of *Bacillus subtilis* var. Niger and HBsAg.

【Key words】 Double-chain quaternary ammonium *Pseudomonas cepacia* chemical disinfectant Bactericidal efficacy

双链季铵盐是一种较新型的消毒剂,因其结构比单链季铵盐多含一个碳数为 8~10 的烷基,故在杀菌效果等方面优于单链季铵盐。双链季铵盐与单链季铵盐的混合物被称

为第四代季铵盐消毒剂,对 HBsAg 抗原性的破坏效果也优于新洁尔灭等单链季铵盐^[1,2]。作者在含复合季铵盐 1.6% 消毒剂中检出一株革兰氏染色阴性菌,该菌在 4℃ 下不生长,41℃ 迟缓生长,氧化酶、触酶、枸橼酸盐利用试验均阳性;精氨酸双水解酶阴性,能分解麦芽糖、甘露醇、苹果酸、木糖、赖氨

酸、鸟氨酸、乳糖, 不分解葡萄糖、阿拉伯糖、棉子糖、蔗糖、鼠李糖, 经 VITEK—A_{ms} 和 API 20 NE 系统鉴定为洋葱假单胞菌, 样液中含菌为 1.21×10^5 cfu/ml, 为了解该菌对消毒因子的抗性, 以常用消毒剂对其进行了杀灭试验。

材料与方法

一、季铵盐含量测定及菌株鉴定: 消毒剂为浙江省某厂生产的年检产品, 批号为 970328。主要杀菌成分为双癸基氯化铵和正烷基二甲基苄基氯化铵(烷基为 12~16 碳), 平均分子量为 355.57。以溴酚蓝法测定, 季铵盐含量为 1.6%。样品 pH 值为 5.6, 使用范围为器械消毒、手术室地面及空气、医护人员手及妇科冲洗等。在对产品进行消毒效果检测中, 发现送检的批号 12 瓶样品均有大量革兰氏阴性(G^-)杆菌生长, 留取菌株进行消毒学试验。

二、定量杀菌试验和 HBsAg 抗原破坏试验: 定量杀菌试验和 HBsAg 抗原破坏试验分

别采用试管内定量混悬法和不锈钢载体法, 严格按 GB15981—1995《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》进行检测。实验用中和剂使用前均进行筛选, 合格后方可采用。

三、最低抑菌浓度(MIC)测定: 以无菌蒸馏水将样液对倍稀释后, 加入等量双料营养肉汤, 加入 $100 \mu\text{l}$ 菌液, 使含菌量为 10^4 cfu/ml, 37°C 24h 观察结果, 同时以单料营养肉汤设阳性、阴性对照, 以最高稀释度管透明澄清为无菌生长, 该浓度即为 MIC 值。实验重复 3 次。

结 果

一、杀菌试验结果:

1. 戊二醛对细菌繁殖体的杀灭效果: 戊二醛为强化中性戊二醛, 以三乙醇胺法检测原液含戊二醛为 2.00%, 临用前以 NaHCO_3 调 pH 值为 7.2 左右。经检测该菌株对戊二醛抗力与金黄色葡萄球菌相近(表 1)。(中和剂为 1%甘氨酸+0.5%吐温-80 磷酸盐缓冲液(PBS))。实验重复 5 次, 结果取均值。

表 1 戊二醛对细菌杀灭效果

试验菌株	菌悬液浓度 (cfu/ml)	作用浓度 (戊二醛%)	各作用时间(min)杀灭率(%)			
			2	5	10	20
大肠杆菌 (ATCC 25922)	4.50×10^6	0.1	99.99	100.00	100.00	100.00
		0.05	99.79	99.99	100.00	100.00
		0.025	95.00	99.93	99.99	100.00
金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)	1.12×10^6	0.2	99.99	100.00	100.00	100.00
		0.1	99.69	99.98	100.00	100.00
		0.05	94.96	96.51	99.97	99.99
洋葱假单胞菌 (分离株)	1.61×10^6	0.4	100.00	100.00	100.00	100.00
		0.2	100.00	100.00	100.00	100.00
		0.1	99.99	99.99	100.00	100.00

2. 氯对细菌繁殖体的杀灭效果: 氯制剂为二氯异氰尿酸钠。原粉有效氯含量为 10.02%。以一定浓度上清液进行杀菌试验。结果表明, 该菌株对氯的抵抗力与金黄色葡萄球菌相似(表 2)。(中和剂为 1%硫代硫酸钠+0.5%吐温-80PBS)。实验重复 5 次, 结果取均值。

3. 过滤除菌样液对细菌的杀灭效果: 含菌样液以滤膜除菌后, 进行杀菌试验, 结果表明, 样液经 1 000 倍稀释后(相当于季铵盐含量为 16mg/L), 作用 5min 仍能完全杀灭大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(表 3)。(中和剂为 0.3%卵磷脂+3%吐温-80PBS)。实验重复 5 次, 结果取均值。

表 2 氯对细菌杀灭效果

试验菌株	菌悬液浓度 (cfu/ml)	作用浓度 (AV, Cl ₂ mg/L)	各作用时间(min)杀灭率(%)			
			2	5	10	20
大肠杆菌 (ATCC 25922)	3.28×10 ⁶	300	100.00	100.00	100.00	100.00
		200	99.97	100.00	100.00	100.00
		100	99.89	99.99	100.00	100.00
金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)	2.95×10 ⁶	400	100.00	100.00	100.00	100.00
		300	99.97	99.99	100.00	100.00
		200	99.12	99.99	100.00	100.00
洋葱假单胞菌 (分离株)	2.14×10 ⁶	400	99.99	99.99	100.00	100.00
		300	99.94	99.97	99.99	100.00
		200	99.90	99.95	99.97	99.99

表 3 过滤除菌样液对细菌的杀灭效果

试验菌株	菌悬液浓度 (cfu/ml)	作用浓度 (季铵盐 mg/L)	各作用时间(min)杀灭率(%)			
			2	5	10	20
大肠杆菌 (ATCC 25922)	1.58×10 ⁶	32	100.00	100.00	100.00	100.00
		16	99.98	100.00	100.00	100.00
		8	99.96	99.98	99.99	99.99
金黄色葡萄球菌 (ATCC 6538)	1.48×10 ⁶	32	100.00	100.00	100.00	100.00
		16	99.99	100.00	100.00	100.00
		8	99.60	99.90	99.90	99.98

二、对 HBsAg 抗原性破坏作用: 经检测, 原含菌样液 5~20 倍稀释作用 60min 均能完全破坏 HBsAg 抗原性(表 4)。(中和剂为 0.3% 卵磷脂 + 3% 吐温 - 80 + 小牛血清 PBS, 以 S/N < 2.1 为完全破坏 HBsAg 抗原性)。实验重复 5 次, 结果取均值。

表 4 原样液对 HBsAg 抗原破坏效果

HBsAg 染量 (μg/片)	作用浓度 (季铵盐 mg/L)	各作用时间(min)S/N 值			
		10	20	30	60
2.0	3200	28.0	20.0	9.0	< 2.1
	1600	30.7	20.0	9.2	< 2.1
	800	39.7	23.0	9.8	< 2.1

注: 阴性对照 A 值为 0.03

三、MIC 结果: 过滤除菌后样液对枯草杆菌黑色变种芽胞(ATCC 9372)的 MIC 值为 800mg/L 季铵盐, 相当于原样 20 倍稀释。对大肠杆菌(ATCC 25922)、金黄色葡萄球菌(ATCC 6538)、白色念珠菌(ATCC 10231)的 MIC 值分别为 2.4mg/L、0.6mg/L、9.8mg/L 季铵盐, 相当于分别将样液稀释 6 400、25 600 和 1 600 倍。对检出菌株的最高管仍为阳性。表明除菌后样液对该菌仍无抑菌效果。

讨 论

一、根据 GB15981-1995, 对消毒剂消毒效果评价时, 细菌繁殖体一般以大肠杆菌、金黄色葡萄球菌为代表菌株进行试验。本文实验结果表明, 在 1.6% 季铵盐消毒剂中可有大量洋葱假单胞菌生长, 该菌对戊二醛、二氯异氰尿酸钠的抗力与金黄色葡萄球菌相近, 而污染洋葱假单胞菌的样品经过滤除菌后, 对大肠杆菌、金黄色葡萄球菌仍有较好的杀灭作用。对白色念珠菌和枯草杆菌黑色变种芽胞仍有较好的抑制作用, 污染样品对 HBsAg 的抗原性也能完全破坏。假单胞菌在临床病例的检出已多见报道^[3~5], 洋葱假单胞菌也曾经在院内重复感染患者体内检出^[6]。因而在对消毒剂消毒效果进行鉴定时, 应加测对代表假单胞菌属菌株的杀菌效果, 临床在使用该类消毒剂时应该注意其使用范围。

二、GB15981-1995《医院消毒卫生标准》规定, 应用中消毒剂的菌落总数不得超过 100cfu/ml。而在消毒剂出厂 60 天后, 使用前含洋葱假单胞菌已达 1.21×10⁵cfu/ml。在实际使用中应引起高度的重视, 生产单位

在生产、保存消毒剂时应加强卫生意识,以保证消毒剂的安全性。

三、通常认为细菌芽胞和乙肝表面抗原对化学消毒剂的抗力高于细菌繁殖体,而本文检测结果表明洋葱假单胞菌对作者分离到该菌株的季铵盐类消毒剂的抗力明显高于细菌芽胞和 HBsAg。在实际应用中应引起注意。

参 考 文 献

1 曹亚峰. 新一代杀菌剂双癸基二甲氨基化铵的合成. 精

细化工, 1994, 11:9-11.

2 林克忠, 凯威 1210 新型高效灭菌剂的功效检测. 中国兽医科技, 1993, 23:31-32.

3 薛国文, 冷泰俊, 邹英. 医院感染 7 年回顾与前瞻性监测. 中华医院感染学杂志, 1996, 6:18-20.

4 秦俊玲, 韩呈武, 王寺兰. 10 年临床感染细菌的病原学与常用抗生素调查分析. 中华医院感染学杂志, 1996, 6:243-245.

5 袁迎春, 陈静秋, 俞乃琴. 279 例透析患者医院感染调查报告. 中华医院感染学杂志, 1996, 6:146-149.

6 李云英, 陈丽芬, 梁雁芳. 1 例银环蛇伤患者医院内重复感染报告. 中华医院感染学杂志, 1997, 7:56-57.

(收稿: 1999-07-12 修回: 1999-08-31)

过 碳 酸 钠 消 毒 性 能 的 观 察

杨云海 周艳霞 赵生友 姜晓春

过碳酸钠(Sodium percarbonate)即过氧碳酸钠, 俗称固体双氧水, 它是由碳酸钠与过氧化氢形成的加成化合物. 分子式为 $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}_2$, 分子量 314.02. 是一种白色松散无味的颗粒状或粉状固体, 具有强氧化性. 为了解其消毒性能, 对其消毒效果和毒性进行了实验室试验观察, 结果如下。

一、材料与方法:

1. 试验材料: 过碳酸钠活性氧含量 13.50%, 由吉化集团公司合成树脂厂提供. 试验菌株为金黄色葡萄球菌(ATCC 6538), 大肠杆菌(ATCC 25922). 乙型肝炎表面抗原(HBsAg)为纯化抗原(0.4mg/ml). 试验动物为昆明种小鼠, 由白求恩医科大学实验动物部提供。

2. 杀菌试验、乙肝表面抗原灭活试验和经口急性毒性试验均按卫生部消毒技术规范规定的方法进行. 试验温度 20℃, 各组试验均重复 5 次。

二、结果:

1. 中和剂选择: 试验菌为金黄色葡萄球菌, 1% 过碳酸钠作用 10min, 6 个试验组结果表明可终止过碳酸钠的消毒作用, 且对实验菌无抑制作用, 对培养基无不良影响, 确定中和剂为 1% 硫代硫酸钠 + 0.5% 卵磷脂 + 0.5% 吐温-80 磷酸盐缓冲液。

2. 悬液试验杀菌效果: 0.5% 浓度作用 2min, 对

金黄色葡萄球菌和大肠杆菌杀灭率达到 99.9%。

3. 自然菌现场杀菌效果: 用 1% 浓度过碳酸钠作用 10min 消毒物体表面的自然菌, 采取样本 50 份, 消毒前菌落总数 896cfu/ml, 消毒后菌落总数 65cfu/ml, 杀菌率 92.64%。

4. 对乙型肝炎表面抗原破坏作用: HBsAg 残留量以 S/N 表示, $S/N < 2.1$ 为阴性. 5% 过碳酸钠作用 10min, 10% 作用 5min 其 S/N 值分别为 1.29、0.71。

5. 经口急性毒性: 选雌雄小鼠各 5 只, 按 0.1ml/10g 体重, 经口给小鼠灌胃, 观察 14 天. 各组小鼠均出现不同程度的中毒症状, 主要表现为活动减少, 步态不稳, 皮毛无光泽, 雌雄小鼠 LD_{50} 均为 5 010mg/kg 体重, 95% 可信限雌性小鼠为 3 440 ~ 7 300mg/kg, 雄性小鼠为 3 808 ~ 8 140mg/kg 体重。

三、讨论: 0.5% 过碳酸钠作用 2min, 对金黄色葡萄球菌和大肠杆菌杀灭率达到 99.9%。1% 浓度作用 10min 对物体表面自然菌的杀灭率达到 92.64%, 在有机物存在时对杀菌作用有影响. 10% 作用 5min, 5% 作用 10min 可破坏 HBsAg 的抗原性. 经稳定性加速试验, 56℃ 放置 14 天杀菌率无明显下降, 证明过碳酸钠原粉在 1 年内较为稳定. 小鼠 LD_{50} 为 5 010mg/kg 体重, 属于实际无毒。

(收稿: 1999-06-21)