



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1411—2023

代替 YY/T 1411—2016

牙科学 牙科治疗机水路生物膜 处理的试验方法

Dentistry—Test methods for dental unit waterline biofilm treatment

(ISO 16954:2015, MOD)

2023-03-14 发布

2024-05-01 实施



国家药品监督管理局 发布

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替 YY/T 1411—2016《牙科学 对改善或维持牙科治疗机治疗用水微生物质量的措施进行评估的试验方法》，与 YY/T 1411—2016 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了适用范围(见第1章,2016年版的第1章)；
- 增加和更改了部分术语和定义(见第3章,2016年版的第3章)；
- 增加了试验用水的制备方法(见5.1)；
- 增加了“接种试验用水”(见5.3)；
- 增加了牙科治疗机水路系统模拟装置重建的要素的规定(见6.2.1)；
- 增加了抗菌材料和防止微生物黏附的材料对评估试验方法的不同影响(见6.2.2)；
- 增加了流量、水流模式、试验环境温度和预时间的具体指标(见6.3)；
- 增加了无菌试验用水在水路停留时间(见7.2.4)；
- 增加了微生物取样和测试的规定(见7.3.2和7.3.4)；
- 增加了取样的规定(见8.1.1)；
- 更改了活菌计数的方法(见8.1.2和8.1.3,2016年版的9.2)；
- 更改了生物膜评估的方法(见8.2.2,2016年版的9.3)；
- 删除了对生物膜的形成及特性的描述(见2016年版的5.2.2)；
- 删除了管理计划表、计划表和取样计划表(见2016年版的6.2)。

本文件修改采用 ISO 16954:2015《牙科学 牙科治疗机水路生物膜处理的试验方法》，本文件与 ISO 16954:2015 的技术差异及其原因如下：

- 用规范性引用的 GB 9706.1 替换了 IEC 60601-1(见第3章)；
- 用规范性引用的 GB/T 9937 替换了 ISO 1942(见3.2)；
- 用规范性引用的 YY/T 1043.1 替换了 ISO 7494-1(见第3章)；
- 用规范性引用的 YY/T 1043.2 替换了 ISO 7494-2(见3.4)；
- 用规范性引用的 GB/T 6682—2008 替换了 ISO 3696:1995(见5.1.1.1)；
- 用规范性引用的 GB/T 22592 替换了 ISO 10523(见5.1.4)；
- 更改了美国菌种保藏中心(ATCC)系列标准菌种号为中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)系列标准菌种号(见5.2),依据为《中华人民共和国药典(2020年,四部)》的1100和9203；
- 删除了 ATCC 对分离源的规定。

本文件做了下列编辑性改动：

- 按照 GB/T 1.1—2020 的要求,将第6章悬置段的内容单独列为6.1内容,原条号6.1和6.2顺延修改为6.2和6.3；
- 将6.1第二段中“去除生物膜的试验方法(7.2)”更改为“去除生物膜的试验方法(7.3)”，ISO 16954:2015 中的原文有误。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国口腔材料和器械设备标准化技术委员会齿科设备与器械分技术委员会(SAC/TC 99/SC 1)归口。

YY/T 1141—2023

本文件起草单位：广东省医疗器械质量监督检验所、西诺医疗器械集团有限公司、四川大学华西口腔医学院、浙江新亚医疗科技有限公司、广东福肯科技工业有限公司、北京大学口腔医院。

本文件主要起草人：杨立峰、李梦洁、何灼华、赵丽君、舒睿、陈贤明、雷康宁、陈霄迟、钟静。

本文件及其所代替文件的历次版本发布情况为：

——2016年首次发布为 YY/T 1411—2016；

——本次为第二次修订。

牙科学 牙科治疗机水路生物膜 处理的试验方法

1 范围

本文件提供了型式检验的方法,主要用于评估在实验室条件下对牙科治疗机水路系统中的生物膜防止、抑制其形成或去除的处理方法的有效性。

本文件不适用于输送无菌处理水或无菌溶液的设备,也不适用于在牙科治疗机内输送压缩空气的管线、管道或软管。

本文件对相应的微生物学指标不做限度规定。所述方法不适用于临床条件。本文件也未建立用于评估可能由处理方法引起的任何有害副作用的试验方法。

本文件提供的试验方法可用于测试其他向口腔输送非无菌水的牙科设备。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 6682—2008 分析实验室用水规格和试验方法(ISO 3696:1987,MOD)

GB 9706.1 医用电气设备 第1部分:基本安全和基本性能的通用要求(GB 9706.1—2020, IEC 60601-1:2012,MOD)

GB/T 9937 牙科学 名词术语(GB/T 9937—2020,ISO 1942—2009,MOD)

GB/T 22592 水处理剂 pH值测定方法通则(GB/T 22592—2008,ISO 10523:1994,NEQ)

YY/T 1043.1 牙科学 牙科治疗机 第1部分:通用要求与试测方法(YY/T 1043.1—2016, ISO 7494-1:2011,MOD)

YY/T 1043.2 牙科学 牙科治疗机 第2部分:气、水、吸引和废水系统(YY/T 1043.2—2018, ISO 7494-2:2015,IDT)

ISO 19458 水质 微生物分析的抽样(Water quality—Sampling for microbiological analysis)

3 术语和定义

GB 9706.1、GB/T 9937、YY/T 1043.1 和 YY/T 1043.2 界定的以及下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物膜 biofilm

紧密黏附于物品表面的细菌团块与细胞外基质的复合体。

3.2

牙科治疗机 dental unit

由相互连接的牙科设备和器械构成功能组合的用于牙科治疗的设备。

[来源:GB/T 9937—2020,2.86]

3.3

牙科治疗机处理水输送系统 dental unit procedural water delivery system

牙科治疗机的组件,用于将水从输送源输送到用于牙科治疗的一个或多个出口。

3.4

处理水 procedural water

由牙科治疗机供给的、在口腔内使用的水。

示例:手机冷却水、喷枪用水、洁牙机冷却水或漱口水。

[来源:YY/T 1043.2—2018,3.18]

3.5

牙科治疗机水路系统模拟装置 surrogate dental unit water system

可准确地重建牙科治疗机处理水输送系统,包括牙科治疗机处理水输送系统中所有与水接触的组件的设计、构造、配置和操作,可不包括不直接接触处理水的组件或控制处理水的组件的试验设备。

3.6

试验用水 test water

在添加指定的微生物挑战菌悬液之前,用于试验的具有特定化学和物理特性的水。

3.7

微生物挑战菌悬液 bacterial challenge suspension

用于接种到试验用水的悬浮在营养生长培养基或缓冲液中的特定菌悬液的混合物。

3.8

接种试验用水 inoculated test water

用于试验的制备好的菌悬液,其中包含指定量的无菌试验用水和一种或多种微生物挑战菌悬液。

3.9

对照组的试验设备 test apparatus for the control group

不使用处理方法且在输送组件中不含抗菌材料的试验设备。

3.10

试验组的试验设备 test apparatus for the test group

用于试验的设备,除非试验要求中另有规定,都应使用牙科治疗机制造商指定的处理方法以及制造商指定的输送组件中的所有抗菌材料。

4 处理方法

根据处理方法的具体技术方法及其预期结果,牙科治疗机内部输送系统处理方法的性能指标可包括以下一项或两项:

- 对牙科治疗机内部输送系统表面生物膜形成的防止或抑制作用;
- 对牙科治疗机内部输送系统表面生物膜的去除。

本文件为上述每个性能指标规定了单独的试验方法。这些要求可以在此基础上进行扩展,例如包括更多的重复试验或试验方案。对试验方法的补充应遵循本文件的一般原则,并在试验报告中充分说明。

5 试验用水和微生物挑战菌悬液

5.1 试验用水

5.1.1 试剂

5.1.1.1 水:GB/T 6682—2008 中的三级水。

- 5.1.1.2 氯化钙(CaCl_2)或等摩尔量的氯化钙水合物。
- 5.1.1.3 氯化镁(MgCl_2)或等摩尔量的氯化镁水合物。
- 5.1.1.4 碳酸氢钠(NaHCO_3)。
- 5.1.1.5 胰蛋白酶大豆肉汤(TSB):每升肉汤含 10.0 g 胰蛋白酶大豆培养基。
- 5.1.1.6 氢氧化钠(NaOH):1 mol/L。
- 5.1.1.7 盐酸(HCl):1 mol/L。

5.1.2 制备硬度储备溶液 1

将 74.0 g 氯化钙(5.1.1.2)和 31.7 g 氯化镁(5.1.1.3)溶于 1.00 L 水(5.1.1.1)中。硬度储备溶液 1 应通过高温灭菌或使用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌,并在 24 h 内使用或在 $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ 下保存最多 6 个月。

5.1.3 制备硬度储备溶液 2

将 56.0 g 碳酸氢钠(5.1.1.4)溶于 1.00 L 水(5.1.1.1)中。硬度储备溶液 2 应使用微孔滤膜过滤除菌,并在 24 h 内使用或在 $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ 下保存最多 6 个月。硬度储备溶液 2 不进行高温灭菌。

5.1.4 接种前试验用水的制备

对于要制备的每升试验用水,将 1.00 mL 的 TSB(5.1.1.5)和 1.80 mL 的硬度储备溶液 1(5.1.2)添加到 1.00 L 的水中(5.1.1.1),并进行蒸汽灭菌。灭菌溶液冷却后,每升试验用水加入 4.00 mL 用 0.2 μm 的微孔滤膜过滤除菌的硬度储备溶液 2。

通过添加氢氧化钠(5.1.1.6)或盐酸(5.1.1.7),根据 GB/T 22592 将测量的 pH 调节至 7.0~8.0。试验用水应在 24 h 内使用或在 $(5\pm 3)^\circ\text{C}$ 下保存不超过 1 周。

注 1: 制备的试验用水的硬度约为每升 1.8 mmol 钙离子(相当于 180 mg/L 的 CaCO_3)。这相当于一般公认的硬水范围的上限。

注 2: 试验用水中 TSB 的质量浓度约为 10 mg/L,由此得出总有机碳(TOC)含量约为 4 mg/L,但确切的 TOC 含量可能会有一些差异。这一近似的 TOC 水平与氯化饮用水中 TOC 的推荐上限 4 mg/L 相一致,并包含在试验用水中以减少生物膜形成的时间。

5.2 微生物挑战

用于接种试验用水的微生物挑战菌悬液建议使用中国医学细菌保藏管理中心(CMCC)提供的下列菌种制备:

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B)10 104];

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)[CMCC(B)46 101]。

如果没有指定菌种,可以用铜绿假单胞菌和肺炎克雷伯菌的替代菌种(即同一菌种的 CMCC 编号不同)代替。菌种应分别在无菌的稀释 TSB 中复壮,TSB 质量浓度为 0.3 g/L。

工作菌株的传代次数不应超过 8 代。培养用于接种试验用水的细菌应按照 5.3 的规定在接种试验用水前一天进行。

在处理这些细菌(包括被这些细菌污染的废弃物)时,应遵守相关的实验室安全操作规范。

5.3 接种试验用水

在试验设备运行期间,应在 6.3.2 中规定的日流量程序开始前 2 h 内,通过将两种制备好的细菌培养物(5.2)接种到无菌试验用水(5.1)中以制备接种试验用水。以使接种试验用水中每种细菌的浓度达到 5×10^1 CFU/mL~ 5×10^2 CFU/mL,细菌总浓度达到 10^2 CFU/mL~ 10^3 CFU/mL。接种时无菌试验用水的温度应为 $(23\pm 3)^\circ\text{C}$ 。

为了确保接种的试验用水中各菌种的准确浓度,将每种制备好的细菌培养物离心并重悬在无菌磷酸盐缓冲液中,并使用比浊法确定大概的细菌浓度。利用这些结果,可以计算出要加入到试验用水中的每个单一菌种的菌悬液的体积。或者,可以使用其他方法来达到指定的接种范围。

6 试验设备

6.1 通用要求

试验设备应包含指定数量的牙科治疗机,或与牙科治疗机处理水系统基本一致的牙科治疗机水路系统模拟装置。

为获得可重复的结果,每次进行防止或抑制生物膜的试验方法(7.2)或防止或抑制生物膜的试验方法顺序(7.2)和去除生物膜的试验方法(7.3)时,与处理水接触的试验设备的所有组件均应为新组件。

注:按照 7.3.1 的规定,生物膜去除试验方法(7.3)是在按照生物膜预防或抑制试验方法(7.2)在试验设备中首次显影生物膜后执行的。

6.2 试验设备的设计

6.2.1 通用要求

如果试验设备由牙科治疗机组成,则牙科治疗机应选用对试验最具挑战性的型号或配置(当制造商可提供一种以上的型号或配置时)。在确定最具挑战性的型号或配置时,应考虑水路的长度、分支水路的数量和停滞的可能性等因素。

如果试验设备由牙科治疗机水路系统模拟装置组成,则牙科治疗机水路系统模拟装置必须能够模拟正常工作的牙科治疗机的基本临床性能参数,包括 6.3 中所述参数。牙科治疗机水路系统模拟装置必须是牙科治疗机水路系统模拟装置所要代表的牙科治疗机中对试验最具挑战性的型号或配置(当制造商可提供一种以上的型号或配置时)。牙科治疗机水路系统模拟装置应准确地重建牙科治疗机内部输送系统,包括处理水系统中所有含水组件的设计、构造、配置和操作。其他不直接与处理水接触或控制处理水流量的组件,如结构性和装饰性组件,则不必包括在内。牙科治疗机水路系统模拟装置的组件应与其所代表的牙科治疗机中的组件处于相同的环境条件(即光照和温度)。

试验设备中应包括符合 YY/T 1043.2 防回流要求的任一气隙系统或其他防回流装置,用于将处理水与输入水隔离。

牙科治疗机水路系统模拟装置应重建的关键要素包括:

- 水路的配置(组件的放置、支线的布置、盲管段等);
- 管直径;
- 管长度;
- 管材料;
- 与处理水接触或调节流量的其他组件(控制塞、阀门、配件等);
- 水处理装置的位置(过滤器、自动或被动处理系统)。

牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置应包括至少一条正常使用时向手机提供处理水的软管,以及一条正常使用时向多功能(气/水)喷枪提供处理水的软管。通常与牙科治疗机连接为其他设备供给处理水的软管能包括在牙科治疗机或者牙科治疗机水路系统模拟装置中。如果可行,通常从牙科治疗机上取下并在不同患者治疗之间进行灭菌的牙科手机或其他器械或附件应从软管上断开,不用于本试验。

示例:根据 YY 1045-2021,图 A.1,C

痰盂冲洗水路应与牙科治疗机断开连接,或从牙科治疗机水路系统模拟装置中排除。痰盂漱口水

路可以包括在牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置中。

注：基于其他水路在去除、防止和抑制生物膜方面将是更具挑战性的试验环境的假设，允许排除痰盂水路。

6.2.2 抗菌材料和防止微生物黏附的材料的具体注意事项

如果待试验的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置包括任何抗菌材料或防止微生物与处理水黏附的材料，则应对试验设备进行以下修改。

- a) 评估防止或抑制生物膜产生的试验设备：
 - 对照组的试验设备：对照组的或牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置中所有抗菌材料或防止微生物黏附的材料均应替换为不含抗菌剂或不具有防黏附作用的材料，在其他方面应与抗菌材料接近。
 - 试验组的试验设备：试验组中的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置应包括（如适用）抗菌材料或防止微生物黏附的材料。
- b) 评估生物膜去除的试验设备：试验组的试验设备。试验组的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置中所有抗菌材料或防止微生物黏附的材料均应替换为不含抗菌剂或不具有防黏附作用的材料，在其他方面应与抗菌材料接近。这对于评估试验去除生物膜处理方法的能力至关重要。

6.3 试验设备的操作

6.3.1 流动速率

手机处理水的流量应调整为 (30 ± 3) mL/min。

多功能（气/水）喷枪的水流量应调整为 (60 ± 6) mL/min。

如果试验设备包括其他提供处理水的仪器或器械，则应根据制造商的建议调整这些仪器或设备的流量。

所有流量应在试验开始之前进行设置。在整个试验期间，每周应至少检查 1 次流量，如有必要，则进行调整。

6.3.2 水流模式（开-关周期）

试验设备的水路应每周连续运行 5 d，并连续 2 d 处于闲置状态不运行。水路运行期间，应按 5.3 的规定新鲜制备接种的试验用水，供给试验设备。水流模式应由一个 30 个周期组成的自动日流量程序控制，每个周期根据以下细则定期运行试验设备水路。

- 每个周期手机处理水运行 30 s。如果存在一个以上提供处理水的手机，则每个周期中只能运行一个手机治疗水路。所选的手机治疗水路应随每个周期顺序改变，以确保在整个日流量程序中，每个手机治疗水路的操作大致相同。
- 每个周期喷枪用水应运行 30 s。如果存在一个以上的喷枪，则每个周期中只能运行一个喷枪。所选的喷枪应随每个周期顺序改变，以确保在整个日流量程序中每个喷枪的操作大致相同。
- 每个周期应有 9 min 无任何水流。

如果试验设备中包括手机和喷枪以外的其他器械，则其操作应以与其预期临床用途一致的方式纳入日流量程序。

6.3.3 试验环境温度和预处理时间

试验环境的温度应保持在 (23 ± 3) °C。在开始试验前，所有设备应处于此温度条件范围内至少 24 h。

7 试验步骤

7.1 试验顺序

试验应按以下顺序进行：

- 根据 7.2 进行评估生物膜的防止或抑制的试验；
- 根据 7.3 进行评估生物膜去除的试验。

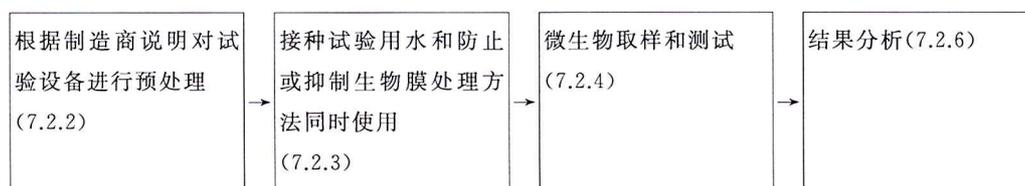
注：该顺序可减少试验设备和方法步骤的数量，因为在完成 7.2 后，已建立的生物膜对照组设备可用作 7.3 中的试验组设备。

7.2 防止或抑制生物膜的形成

7.2.1 通则

图 1 描述了用于评估旨在防止或抑制牙科水路中生物膜形成的处理方法的试验方法。

试验组：



对照组：

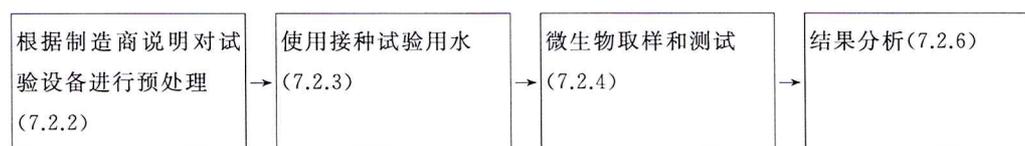


图 1 防止或抑制生物膜产生的评估试验方法流程图

由于自然条件下生物膜结构存在差异，因此试验应在不同的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置内重复进行。对于生物膜防止和抑制的试验方法，试验组应包括至少两个牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置，对照组应包括至少两个牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置。

7.2.2 试验设备的预处理

如有规定，试验设备在试验正式开始前应按照牙科治疗机制造商的说明书进行预运行。

示例：如果制造商的说明书指出，在牙科治疗机安装后及使用前需执行指定的消毒程序，则应在执行此试验方法之前执行指定的消毒程序。

7.2.3 接种试验用水和防止或抑制生物膜处理方法同时使用

对于试验组，应结合每个制造商说明中的处理方法向牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置提供 5.3 中规定的接种试验用水。对于对照组，无需处理方法即可向牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置提供接种试验用水。所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置均应按照 6.3 中的规定操作。应每天在启动自动日流量程序前 2 h 内制备接种试验用水。在供给试验设备之前，需按照 8.1

的规定对供给试验设备的接种试验用水进行微生物取样和测试,至少每周1次。

7.2.4 微生物取样和测试

为确认处理方法的有效性,试验组和对照组中的所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的微生物取样和测试过程应按照8.1和8.2的规定进行。在整个试验过程中,应至少每周1次按照8.1中的规定对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的活菌总数进行取样和测试。收集用于微生物试验的样品时,应向试验设备提供无菌试验用水(无接种物)。为清洗试验设备的所有水路,应让足够量的无菌试验用水流出。然后,在进行微生物测试取样之前,应将无菌试验用水在水路中放置5 min。试验结束时,应按照8.2中的规定对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置进行至少1次的水路管取样和生物膜的形成评估。

7.2.5 试验持续时间

应继续按照7.2.3和7.2.4的规定进行试验,直到满足以下所有规定:

- 至少进行了4周的试验;
- 当将无菌试验用水代替接种试验用水临时提供给试验设备时,对照组所有试验设备流出的处理水中的活菌总数至少为 10^4 CFU/mL。用无菌试验用水冲洗水路并等待5 min后再采集样品,然后用接种试验用水恢复正常操作;
- 按照8.2的规定,在对照组的所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置中都确认存在生物膜,而对照组中的所有样品管中,微生物和/或生物膜被分类为半融合覆盖或大量融合覆盖。

在满足以上所有规定后,应尽快按照7.3的规定进行评估生物膜去除情况的试验方法。应继续执行本条款规定的对照组使用接种试验用水的日常程序,直到按照7.3的规定进行试验为止。

7.2.6 结果分析

防止或抑制生物膜的处理方法的有效性,应通过报告以下内容来评估:

- 在试验期间,试验组和对照组每周间隔1次按照8.1的规定对流出的处理水中的活菌总数经对数转换后计数(平均值、标准差和重复次数);
- 在试验期间,试验组和对照组的每种类型的水路出口的活菌总数经对数转换后平均值之间的差值;
- 在试验结束时,采用双侧 t 检验对试验组和对照组的活菌总数经对数转换后的结果进行统计分析比较,执行的显著性标准为 $P < 0.05$;
- 按照8.2的规定在试验结束时对试验组和对照组每种类型水路的取样的生物膜覆盖率进行比较。

7.3 生物膜去除

7.3.1 通则

图2描述了用于评估旨在去除牙科治疗机水路生物膜的处理方法的试验方法的流程图。

试验组：

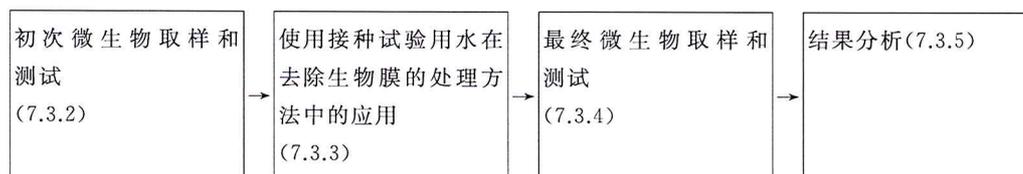


图2 评估生物膜去除的试验方法流程图

对于生物膜去除试验方法，试验组应至少包括两个牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置，而在单独的对照组中则不需要牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置。试验组设备应由 7.2 中规定使用的对照组设备组成，在 7.2 完成后，说明其含有已建立的生物膜。

注：对于生物膜去除试验方法不需要单独的对照组，因为在采取处理方法之前，生物膜形成期可用于证明在不采取处理方法时生物膜也能够形成。

7.3.2 初次微生物取样和测试

在采取生物膜去除处理方法之前，应立即按照 8.1 的规定对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置进行微生物取样和测试。收集用于微生物测试的样品时，应向试验设备提供无菌试验用水（无接种物）。为清洗试验设备的所有水路，应让足够量的无菌试验用水流出。然后，在进行微生物测试取样之前，应将无菌试验用水在水路中放置 5 min。

在采取生物膜去除处理方法之前，应立即按照 8.2 的规定对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的水路管进行取样并对生物膜进行评估。

7.3.3 生物膜去除处理方法的应用

去除已形成的生物膜的处理方法应当根据牙科治疗机或水处理系统制造商提供的说明书进行。如果制备或实施处理方法需要用水，则应使用接种试验用水。

7.3.4 最终微生物取样和测试

为确定处理方法的有效性，在采取生物膜去除处理方法后，应立即按照 8.1 和 8.2 对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置进行微生物取样和测试。收集样品时，应按照 8.1 的规定向试验设备提供无菌试验用水（无接种物）。为清洗试验设备的所有水路，应让足够量的无菌试验用水流出。然后，在进行微生物测试取样之前，应将无菌试验用水在水路中放置 5 min。

采取生物膜去除处理方法后，应按照 8.2 的规定对所有牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的水路管进行取样，并对生物膜进行评估。

应考虑确定实施处理之后按照 8.1 和 8.2 的规定在最适的时间取样。若制造商规定使用处理水或其他溶液进行冲洗，则此过程应在取样和测试之前进行。

7.3.5 结果分析

生物膜去除处理方法的有效性应通过报告以下内容来评估：

- 在实施生物膜去除处理方法之前和之后，根据 8.1 的规定对流出的处理水中的活菌总数经对数转换后的计数（平均值、标准差和重复次数）；
- 流出的处理水中活菌总数经对数转换后计数的减少值（即实施处理方法之前的平均值与实施该处理方法之后的平均值之间的差值）；
- 在实施处理方法前后，采用双侧 t 检验对活菌总数经对数转换后的计数结果进行统计分析比

较,执行的显著性标准为 $P < 0.05$;

——按照 8.2 的规定在实施生物膜去除处理方法前后对取样的每个水路的生物膜覆盖率进行比较。

8 微生物取样和测试

8.1 处理水中细菌水平的计数

8.1.1 取样

8.1.1.1 通用要求

取样应符合 ISO 19458 的规定。如果不能在取样后 30 min 内开始计数,则应将样品保存在 $(4 \pm 2)^\circ\text{C}$ 的环境中。计数应在取样后 24 h 内进行。

如适用,所有试验样品在采集时应立即进行处理,以中和所有残留的抗菌剂。可采用的方法包括:使用中和剂或用 $0.2 \mu\text{m}$ 薄膜过滤器对试验样品进行薄膜过滤,然后用无菌磷酸盐缓冲液冲洗。如果使用了中和剂,应通过中和作用验证其有效性和与细菌的相容性。对照组样品和试验组样品应做相同的处理。

8.1.1.2 对供给试验设备的水取样

在规定的取样时间内,应采集并分析 1 个至少 50 mL 供给试验设备的接种试验用水的样品。

8.1.1.3 对从试验设备输出的水取样

在规定的取样时间内,应从每个规定的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的各个出水口无菌采集 1 个处理水的复合样品,每个出水口中采集大约相等的体积,使每个牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的复合样品的总体积为 50 mL~100 mL。另外,也可以从每个规定的牙科治疗机或牙科治疗机水路系统模拟装置的每个出水口单独采集样品并进行单独分析。

8.1.2 活菌总数计数试验方法

活菌总数计数应通过涂布平板培养法确定。每个试验样品应制备从 10^0 (即未稀释)到 10^{-3} (在无菌磷酸盐缓冲生理盐水中)的十倍系列稀释液,一式三份。如果预期结果落在一定范围内,则可以制备较少的稀释液,一式三份。每种稀释液取 1.0 mL 或 0.10 mL 涂在 R2A 琼脂培养基上,留出足够的时间使样品吸收到琼脂中,然后倒置并在 $(23 \pm 3)^\circ\text{C}$ 的有氧条件下培养 7 d。培养结束后,应对菌落进行计数,并以 CFU/mL 为单位记录活菌总数。每组样品应报告活菌总数经对数转换后的平均值和标准差(即活菌总数取以 10 为底数的对数)。

8.1.3 备选活菌总数计数试验方法

浮游细菌的水平也可以通过薄膜过滤法进行计数。例如,如果没有已知或可用的中和样品中残留的抗菌剂的可行方法,则此方法适用。具体步骤为:制备从 10^0 (即未稀释)到 10^{-4} (在无菌磷酸盐缓冲生理盐水中)的十倍系列稀释液,一式三份,并对每种稀释液取 10 mL 进行测试。如果预期结果落在一定范围内,则可以制备较少的稀释液,一式三份。样品或稀释的样品经过薄膜过滤后,如果所有样品都可能存在抗菌剂,则应过滤 10 mL 等量的无菌磷酸盐缓冲生理盐水对薄膜进行两次冲洗。将薄膜转移到 R2A 琼脂培养基上,确保薄膜和培养基之间没有气泡,并在 $(23 \pm 3)^\circ\text{C}$ 的有氧条件下培养 7 d。培养结束后,应对菌落进行计数,并以 CFU/mL 为单位记录。应报告每组样品的活菌总数经对数转换后的

平均值和标准差。

8.2 水路表面的生物膜

8.2.1 取样

在规定的取样时间内,应通过无菌方式从每个水路出口端附近剪取一段至少 1 cm 的水路管。如适用,应使用经灭菌的配件重新连接留在试验设备上的剩余管段,以使试验能够继续进行。

在固定后和脱水前,应将样品管纵向分成大致相等的两半(见 8.2.2)。为了减少纵向分割样品时从管表面去除所有生物膜的可能性,切割方向应平行于管轴线。

8.2.2 生物膜评估试验方法

应使用扫描电镜(SEM)检查每个样品管的两半管腔表面上的生物膜覆盖率。应以适用于对管表面生物膜进行 SEM 分析的方式,通过固定、脱水、干燥、安装和用导电材料溅射涂覆来制备 SEM 样品。

示例:以下是 SEM 制备步骤的一种可能方法:

- 室温下,用含 2%戊二醛的 0.1 mol/L 二甲胍酸钠缓冲液固定样品管 30 min~4 h,然后用不含戊二醛的二甲胍酸钠缓冲液冲洗 3 次;
- 在一系列乙醇浓度不断增加的乙醇水溶液(包括 30%、50%、70%、90%、95%和 100%)中对样品管分别进行 10 min 的脱水;
- 样品管的临界点干燥;
- 使用双面导电胶带将样品管固定到电镜样品台上;
- 用金-钼对样品管进行溅射涂覆。

SEM 仪器和操作参数的选择应能够产生图像,以分辨用于接种试验用水的规定细菌(如果细菌存在于样品管表面)。

另外,环境扫描电镜(ESEM)在分析前可不经固定、脱水、干燥或溅射涂覆而使用。

最初以小于 1 000 倍的放大率扫描样品管。对于每个样品管的每一半,选择至少 3 个具有代表性的生物膜覆盖(或无覆盖)的位置,并以 1 000 倍~5 000 倍的放大率进行检查。在每个选定位置拍摄并记录具有代表性的显微照片。

对于每个样品管,应按照以下类别定性评估生物膜覆盖率:

- 无微生物,无生物膜;
- 微生物和/或生物膜的单独出现(即通常在样品管整个表面上的覆盖率小于约 10%);
- 微生物和/或生物膜的半融合覆盖(即通常在样品管整个表面上的覆盖率小于约 50%);
- 微生物和/或生物膜的大量融合覆盖(即通常在样品管整个表面上覆盖大于约 50%)。

试验报告中应包括每个样品管覆盖最严重区域的代表性图像。

9 报告

试验报告应包括如下内容:

- a) 试验的牙科治疗机或试验中使用的牙科治疗机水路系统模拟装置所代表的牙科治疗机;
- b) 牙科治疗机内部输送系统处理方法的试验;
- c) 试验设备的设计和操作;
- d) 使用的试验方法,包括具体的试验参数;
- e) 试验中使用的细菌;
- f) 试验中使用的微生物取样和试验方法;
- g) 试验结果、分析和结论;

- h) 所有可能影响结果及其有效性的情况和条件；
- i) 试验中所有偏离规定试验方法的情况；
- j) 参考本文件；
- k) 试验负责人姓名和检验室名称；
- l) 试验人员和检查员姓名；
- m) 试验日期；
- n) 检查员的观察结果；
- o) 授权签字人签发的日期。



参 考 文 献

- [1] YY 1045—2021 牙科学 手机和马达
- [2] ISO 2174 Surface active agents—Preparation of water with known calcium hardness
- [3] ISO 8199:2005 Water quality—General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture
- [4] ISO 16266 Water quality—Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa*—Method by membrane filtration
- [5] ASTM E 1427-00 Standard Guide for Selecting Test Methods to Determine the Effectiveness of Antimicrobial Agents and Other Chemicals for the Prevention, Inactivation and Removal of Biofilm
- [6] AINSWORTH R.ed.World Health Organization.Safe Piped Water:Managing Microbial Water Quality in Piped Distribution Systems.IWA Publishing,2004
- [7] BRENNER K.P., & RANKIN C.C.New screening test to determine the acceptability of 0.45-micron membrane filters for analysis of water.Appl.Environ.Microbiol.1990,56(1)pp.54-64
- [8] Curtin J.J., & Donlan R.M.Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated Biofilms by *Staphylococcus epidermidis*.Antimicrob.Agents Chemother.2006,50(4)pp.1268-1275
- [9] HANNIG C., FOLLO M., HELLMIG E., AL-AHMAD A.Visualization of adherent micro-organisms using different techniques.J.Med.Microbiol.2010,59 pp.1-7
- [10] WALKER J.T., BRADSHAW D.J., BENNETT A.M., FULFORD M.R., MARTIN M.V., MARSH P.D.Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice.Appl.Environ.Microbiol.2000,66(8)pp.3363-3367
- [11] WALKER J.T., BRADSHAW D.J., FULFORD M.R., MARSH P.D.Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system.Appl.Environ.Microbiol.2003,69(6)pp.3327-3332
- [12] OFFICIAL METHOD A. O. A. C. 960.09, Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants.AOAC International,2000
- [13] Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption.Official Journal of the European Communities.L330:32-54
- [14] DVGW W 270, Microbial Enhancement on Materials to Come into Contact with Drinking Water-Testing and Assessment. German Association for Gas and Water Industry Association (DVGW),2007
- [15] Method 9215 Heterotrophic Plate Count, Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation,2004
- [16] Method 2340 Hardness(Methods 2340B and 2340C), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation,1997
- [17] WHO/HSE/WSH.10.01/10, Hardness in drinking-water: background document for development of WHO guidelines for drinking-water quality.World Health Organization.WHO,2011

中华人民共和国医药
行业标准
牙科学 牙科治疗机水路生物膜
处理的试验方法
YY/T 1411—2023

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

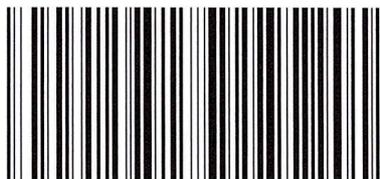
*

开本 880×1230 1/16 印张 1.25 字数 32 千字
2023年3月第一版 2023年3月第一次印刷

*

书号: 155066·2-36754 定价 31.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



YY/T 1411-2023



码上扫一扫 正版服务到