ICS 11.060.20

CCS C 33

|  |
| --- |
|  |

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1411—XXXX

|  |
| --- |
| 代替YY/T 1411-2016 |

牙科学 牙科治疗机用于水路生物膜处理的试验方法

Dentistry — Test methods for dentalunit waterline biofilm treatment

(ISO 16954:2015, MOD)

|  |
| --- |
|  |
| （本稿完成日期：2021.05.10） |

××××-××-××发布

××××-××-××实施

国家药品监督管理局发布

目  次

[前言 II](#_Toc51693670)

[1　范围 1](#_Toc51693671)

[2　规范性引用文件 1](#_Toc51693672)

[3　术语与定义 1](#_Toc51693673)

[4　处理方法 2](#_Toc51693674)

[5　试验用水和微生物挑战菌悬液 2](#_Toc51693675)

[6　试验设备 4](#_Toc51693676)

[7　试验方法 6](#_Toc51693677)

[8　微生物取样和测试 9](#_Toc51693678)

[9　检验报告 11](#_Toc51693679)

[参考文献 12](#_Toc51693680)

前  言

本标准按照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。

本标准代替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》。

本标准修改采用ISO 16954:2015《牙科学 牙科治疗机用于水路生物膜处理的试验方法》（英文版）。

本标准与YY/T 1411—2016相比主要变化如下：

--删除了对生物膜的形成及特性的描述（见2016年版的5.2.2）；

--增加了试验用水的制备方法（见5.1,2016年版的8）；

—增加了“接种试验用水”（见5.3，2016年版的5.3.3）；

--增加了替代牙科治疗机用水系统重建的要素的规定（见6.1.1,2016年版的6.1）；

--增加了抗菌材料和防止微生物粘附的材料对评估试验方法的不同影响（见6.1.2）；

--增加了流速、流动模式、试验环境温度和时间的具体指标，删除了管理计划表、计划表和取样计划表（见6.2,2016年版的6.2）；

--增加了无菌试验用水在水路停留时间（见7.2.4,2016年版的5.3.4）；

--增加了微生物取样和测试的定义（见7.3.2和7.3.4,2016年版的5.2.4）；

--增加了取样的定义（见8.1.1,2016年版的9.1）；

—修改了活菌计数的方法（见8.1.2和8.1.3,2016年版的9.2）；

--修改了生物膜评估的方法（见8.2.2,2016年版的9.3）。

本标准按照GB/T 1.1对一些编排格式进行了修改：

——删除了国际标准前言；

——对于本文件中引用的其他国际标准，若已转化为我国标准，本文件将引用的国际标准号替换为相应的国家或行业标准号，并在本文件第2章中注明采用关系。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发行机构不承担识别这些专利的责任。

本标准由国家药品监督管理局提出。

本标准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/TC99 SC1）归口。

本标准主要起草单位：

本标准主要起草人：

牙科学 牙科治疗机用于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防止或抑制生物膜形成或去除存在于牙科治疗机水路系统中的生物膜的处理方法的有效性。

本文件不适用于输送无菌治疗用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。本标准也未建立用于评估可能由治疗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。

1. 规范性引用文件

以下文件全部或部分是本文件的规范性引用文件，对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅注日期的版本适用于本文件。凡是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 3696:1995，MOD)

GB 9706.1-2020 医用电气设备 第1部分：基本安全和基本性能的通用要求(IEC 60601-1:2021,MOD)

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

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

YY/T 1043.1-2016牙科学 牙科治疗机 第1部分：通用要求与测试方法(ISO 7494-1:2018,MOD)

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

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

1. 术语与定义

除下列术语与定义外，GB 9706.1-2020、GB/T 9937-2020、YY/T 1043.1-2016和YY/T 1043.2-2018中所给出的术语与定义适用于本文件。

* 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。

* 1. 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。

[资料来源：GB/T 9937-2020, 2.86]

* 1. 牙科治疗机内部供水系统dental unit procedural water delivery system

牙科治疗机元件系统，用于将水从供水源输送到用于牙科治疗的一个或多个出口。

* 1. 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。

[资料来源：YY/T 1043.2-2018, 3.1]

* 1. 替代牙科治疗机水处理系统 surrogate dental unit water system

可准确地重建牙科治疗机内部供水系统，包括治疗用水系统中所有含水元件的设计、构造、配置和操作，但不一定包括不直接接触或控制治疗用水流过牙科治疗机元件的试验设备。

* 1. 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。

* 1. 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。

* 1. 接种试验用水 inoculated test water

用于试验的制备好的水性菌悬液，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。

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

不使用处理方法且在供水元件中不含抗菌材料的试验设备。

* 1. 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供水元件中的任何抗菌材料。

1. 处理方法

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

1. 对牙科治疗机内部供水系统表面生物膜形成的防止和抑制作用；
2. 对牙科治疗机内部供水系统表面生物膜的去除。

本标准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标准的一般原则，并在试验报告中充分说明。

1. 试验用水和微生物挑战菌悬液
   1. 试验用水

本条款规定了接种前试验用水的制备。

* + 1. 试剂
       1. 水，GB/T 6682-2008中的3级水。
       2. 氯化钙（CaCl2）或等摩尔量的氯化钙水合物。
       3. 氯化镁（MgCl2）或等摩尔量的氯化镁水合物。
       4. 碳酸氢钠（NaHCO3）。
       5. 胰酶大豆培养基（TSB），1/3浓度，每升液体培养基含10.0g胰蛋白酶大豆培养基。
       6. 氢氧化钠（NaOH），1 mol/l。
       7. 盐酸（HCl）， 1 mol/l。
    2. 制备硬度储备溶液1

将74.0g氯化钙([5.1.1.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark5))和31.7g氯化镁([5.1.1.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark6))溶于1.00l水([5.1.1.1](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark4))中。硬度储备溶液1应通过高温灭菌或使用0.2μm的微孔滤膜过滤除菌，并在24小时内使用或在(5 ± 3) °C下保存最多6个月。

* + 1. 制备硬度储备溶液2

将56.0g碳酸氢钠(5.1.1.4)溶于1.00l水(5.1.1.1)中。硬度储备溶液2应使用0.2μm的微孔滤膜过滤除菌，并在24小时内使用或在(5 ± 3) °C下保存最多6个月。硬度储备溶液2不进行高温灭菌。

* + 1. 接种前试验用水的制备

对于要制备的每升试验用水，将1.00ml的1/3浓度TSB（5.1.1.5）和1.80ml的硬度储备溶液1（5.1.2）添加到1.00l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4.00ml用0.2μm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 22592-2008将测量的pH值调节至7.0至8.0。试验用水应在24小时内使用或在（5±3）°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1.8mmol钙离子（相当于180 mg/l 的CaCO3）。这相当于一般公认的硬水范围的上限[17]。

注2 试验用水的浓度约为每升10mg TSB，由此得出的总有机碳(TOC)含量约为4mg/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4mg/l相一致[1]，并包含在试验用水中以减少生物膜形成的时间。

* 1. 微生物挑战

用于接种试验用水的微生物挑战菌悬液必须使用美国菌种保藏中心(ATCC)或国际授权的ATCC分销商提供的下列细菌制备：

1. *铜绿假单胞菌*(ATCC #700888)；
2. *肺炎克雷伯菌*((ATCC #13882)。

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ATCC编号不同）代替，但ATCC所规定的分离源必须是水或供水系统。

菌种应分别在无菌的稀释TSB中复壮，浓度为每升0.3g TSB。复壮后的培养物应在八个转移通路内使用。培养用于接种试验用水的细菌应按照[5.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark14)的规定在接种试验用水前一天进行。

在处理这些细菌时，包括处理可能被这些细菌污染的废物时，遵守适当的实验室安全操作规范至关重要。

* 1. 接种试验用水

在试验设备运行期间，应在6.2.2中规定的日流量程序开始前两小时内，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）中来制备接种试验用水。以使接种试验用水中每种细菌的浓度达到5×101CFU/ml至5×102CFU/ml，细菌总浓度达到102CFU/ml至103CFU/ml。接种时无菌试验用水的温度应为（23±3）°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是有用的。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，还可以使用其他方法来达到指定的接种范围。

1. 试验设备

试验设备应包含指定数量的牙科治疗机或与牙科治疗机用水系统基本一致的替代牙科治疗机。

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(7.2)时，与治疗用水接触的试验设备的所有元件均应为新元件。

**注**：按照[7.3.1](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark27)的规定，每次进行防止或抑制生物膜的试验方法前（[7.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark20)），应先在试验设备中显影生物膜，再执行去除生物膜的试验方法（[7.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark26)）。

* 1. 试验设备的设计
     1. 概述

如果试验设备由牙科治疗机组成，则牙科治疗机应是最不利的型号或配置（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。

如果试验设备由替代牙科治疗机用水系统组成，则替代牙科治疗机用水系统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[6.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark17)中所述参数。替代牙科治疗机用水系统必须是替代牙科治疗机用水系统所要代表的牙科治疗机中最不利的型号或配置（当制造商可提供一种以上的型号或配置时）。替代牙科治疗机用水系统应准确地重建牙科治疗机内部供水系统，包括治疗用水系统中所有含水元件的设计、构造、配置和操作。其他不直接与治疗用水接触或控制治疗用水流量的元件，如结构性和装饰性元件，则不必包括在内。替代牙科治疗机用水系统的元件应与其所代表的牙科治疗机中的元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 1043.2-2018防回流要求的任一气隙系统或其他防回流装置，用于将治疗用水与进水隔离。

替代牙科治疗机用水系统应重建的关键要素包括：

1. 水路的配置（元件的放置、支线的布置、盲管段等）；
2. 管直径；
3. 管长度；
4. 管材料；
5. 与治疗用水接触或调节流量的其他元件（控制塞、阀门、配件等）；
6. 水处理装置的位置（过滤器、自动或被动处理系统）。

牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统应包括至少一条正常使用时向手机提供治疗用水的软管，以及一条正常使用时向多功能（气/水）喷枪提供治疗用水的软管。通常可将治疗用水供应给连接到牙科治疗机的其他器械的软管包括在牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统中。通常从牙科治疗机上取下并在患者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，如果可行，请勿用于本试验。

示例根据ISO 14457:2017，图A.1，C点示例根据ISO 14457:2017，图A.1，C点

痰盂冲洗水路应与牙科治疗机断开连接，或从替代牙科治疗机用水系统中排除。痰盂漱口水路可以包括在牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统中。

**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。

* + 1. 抗菌材料和防止微生物粘附的材料的具体注意事项

如果要试验的牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统包括任何抗菌材料或防止微生物与治疗用水粘附的材料，则应对试验设备进行以下修改。

评估防止或抑制生物膜产生的试验设备：

1. 对照组的试验设备：对照组中任何抗菌材料或防止牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统中微生物粘附的材料均应替换为不含抗菌剂或具有防粘附作用的材料，否则应与抗菌材料基本一致。
2. 试验组的试验设备：试验组中的牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统应包括（如适用）抗菌材料或防止微生物粘附的材料。

评估生物膜去除的试验设备：

1. 试验组的试验设备：试验组中任何抗菌材料或防止牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统中微生物粘附的材料均应替换为不含抗菌剂或具有防粘附作用的材料，否则应与抗菌材料基本一致。这对于评估试验处理方法去除生物膜的能力至关重要。
   1. 试验设备的操作
      1. 流动速率

手机治疗用水的流速应调整为(30 ± 3) ml/min。

多功能（气/水）喷枪的水流速应调整为(60 ± 6) ml/min。

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

所有流速应在试验开始之前进行设置。在整个试验期间，如有必要，应每周至少检查和调整一次流速。

* + 1. 流动方式（开-关循环）

试验设备的水路应每周连续运行五天，并连续两天处于闲置状态不运行。水路运行的几天，应按 [5.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark14)的规定新鲜制备接种的试验用水，供给试验设备。水流模式应由一个循环30次组成的自动日流量程序控制，该程序根据以下细则定期运行试验设备水路。

1. 每个循环手机治疗用水运行30s。如果存在一个以上提供治疗用水的手机，则每个循环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循环顺序改变，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。
2. 每个循环运行喷枪用水30s。如果存在一个以上的喷枪，则每个循环中只能运行一个喷枪。所选的喷枪应随每个循环顺序改变，以确保在整个日流量程序中每个喷枪的操作大致相同。
3. 每个循环应有9min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。

* + 1. 试验环境温度和预处理过程

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小时。

1. 试验方法
   1. 试验顺序

试验应按以下顺序进行：

1. 根据7.2进行评估生物膜的防止或抑制的试验；
2. 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程序步骤的数量，因为在完成[7.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark20)后，已建立的生物膜对照组设备可用作[7.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark26)中的试验组设备。

* 1. 防止或抑制生物膜的产生
     1. 概述

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：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 根据制造商说明对试验设备进行预处理  (7.2.2) |  | 接种试验用水和防止或抑制生物膜处理方法同时使用  （7.2.3） |  | 微生物取样和测试  (7.2.4) |  | 结果分析  (7.2.6) |
|  |  |  |

对照组：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 根据制造商说明对试验设备进行预处理  (7.2.2) |  | 使用接种试验用水  (7.2.3) |  | 微生物取样和测试  (7.2.4) |  | 结果分析  (7.2.6) |
|  |  |  |

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替代牙科治疗机用水系统内重复进行。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替代牙科治疗机用水系统，对照组应包括包括至少两个牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统。

* + 1. 试验设备的预运行

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。

例如，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。

* + 1. 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替代牙科治疗机用水系统提供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替代牙科治疗机用水系统提供接种试验用水。所有牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统均应按照6.2中的规定操作。应每天在启动自动日流量程序前两小时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，至少每周一次。

* + 1. 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替代牙科治疗机用水系统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，应至少每周一次按照8.1中的规定对所有牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统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分钟。试验结束时，应按照8.2中的规定对所有牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统进行至少一次的水路管取样和生物膜的形成表征。

* + 1. 试验持续时间

应继续按照 [7.2.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark23)和 [7.2.4](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark24)的规定进行试验，直到满足以下所有标准：

1. 至少进行了四周的试验；
2. 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治疗用水中的活菌总数至少为104 CFU/ml。用无菌试验用水冲洗水路并等待5分钟后再采集样品，然后用接种试验用水恢复正常操作；
3. 按照8.2的规定，在对照组的所有牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统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流体覆盖或大量流体覆盖。

在满足以上所有标准后，应尽快按照[7.3](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark26)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](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark26)的规定进行试验为止。

* + 1. 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表征：

1. 在试验期间，试验组和对照组每周间隔一次按照8.1的规定对流出的治疗用水中的对数转换活菌总数计数（平均值、标准差和重复次数）；
2. 在试验期间，每种类型的水路出口的试验组和对照组的平均对数转换活菌总数之间的差值；
3. 在试验结束时，采用双尾t检验对试验组和对照组的对数转换活菌总数结果进行统计分析比较，执行的显著性标准为P＜0.05；
4. 按照8.2的规定在试验结束时对试验组和对照组取样的每种类型水路的生物膜覆盖率进行比较。
   1. 生物膜去除
      1. 概述

[图2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark28)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：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 初次微生物取样和测试  (7.3.2) |  | 使用接种试验用水在去除生物膜的处理方法中的应用  (7.3.3) |  | 最终微生物取样和测试  (7.3.4) |  | 结果分析  (7.3.5) |

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替代牙科治疗机用水系统，而在单独的对照组中则不需要牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统。试验组设备应由[7.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark20)中规定使用的对照组设备组成，在[7.2](file:///C:\Users\SWXNS-YANGLIFENG\Documents\WeChat%20Files\wxid_l67r9b875dsb21\FileStorage\File\2020-08\新标准ISO16954（译文）(1).docx#_bookmark20)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。

* + 1. 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替代牙科治疗机用水系统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分钟。

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替代牙科治疗机用水系统的水路管进行取样并对生物膜进行表征。

* + 1. 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。

* + 1. 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替代牙科治疗机用水系统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分钟。

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替代牙科治疗机用水系统的水路管进行取样，并对生物膜进行表征。

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。若制造商规定使用治疗用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。

* + 1. 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表征：

1. 在实施生物膜去除处理方法之前和之后，根据8.1的规定对流出的治疗用水中的对数转换活菌总数计数（平均值、标准差和重复次数）；
2. 流出的治疗用水中对数转换活菌总数计数的减少值（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数值差）；
3. 在实施处理方法之前和之后，采用双尾t检验对对数转换活菌总数计数结果进行统计分析比较，执行的显著性标准为P＜0.05；
4. 按照8.2的规定在实施生物膜去除处理方法之前和之后对取样的每个水路的生物膜覆盖率进行比较。
5. 微生物取样和测试
   1. 治疗用水中细菌水平的计数
      1. 取样
         1. 概述

取样应符合ISO 19458的规定。计数应在取样后24小时内开始。如果不能在取样时间的30分钟内开始计数，则应将样品保存在(4 ± 2) °C下。

如适用，所有试验样品在采集时应立即进行处理，以中和任何残留的抗菌剂。可采用的方法包括：使用中和剂或用0.2μm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处理。

* + - 1. 对供给试验设备的水取样

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

* + - 1. 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替代牙科治疗机用水系统的各个出水口无菌采集一个治疗用水的复合样品，并从每个出水口中采集大约相等的体积，使每个牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统的复合样品的总体积在50ml至100ml之间。另外，也可以从每个规定的牙科治疗机或替代牙科治疗机用水系统的每个出水口单独采集样品单独进行分析。

* + 1. 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100(即未稀释)到10-3(在无菌磷酸盐缓冲液中)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1.0ml或0.10ml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 ± 3) °C的有氧条件下培养7天。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。每组样品应报告对数转换活菌总数的平均值和标准差（即以10为基数的活菌总数的对数）。

* + 1. 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实用方法，则此方法适用。应制备三组从100(即未稀释)到10-4(在无菌磷酸盐缓冲液中)的十倍系列稀释液，并对每种稀释液进行10ml的测试。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，如果任何样品中都可能存在抗菌剂，则应过滤10ml等量的无菌磷酸盐缓冲液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±3）°C的有氧条件下培养7天。培养结束后，菌落应进行计数，并以CFU/ml为单位记录。每组样品应报告对数转换活菌总数的平均值和标准差。

* 1. 水路表面的生物膜
     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取样一段至少1cm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长度的管段，以使试验能够继续进行。

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任何生物膜的可能性，切割方向应平行于管轴线。

* + 1. 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：

1. 用含2%戊二醛的0.1mol/l二甲胂酸钠缓冲液中于室温下固定样品管30分钟至4小时，然后用不含戊二醛的二甲胂酸钠缓冲液冲洗3次；
2. 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分钟的脱水；
3. 样品管的临界点干燥；
4. 使用双面导电胶带将样品管固定到SEM短柱上；
5. 用金-钯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（如果存在于样品管表面）。

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

最初以小于1 000X的放大率扫描样品管。对于每个样品管的每一半，至少选择三个具有代表性的生物膜覆盖（或无覆盖）的位置，并以1000 X至5000 X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：

1. 无微生物，无生物膜；
2. 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％）；
3. 微生物和/或生物膜的半流体覆盖（即通常在样品管整个表面上的覆盖率小于约50％）；
4. 微生物和/或生物膜的大量流体覆盖（即通常在样品管整个表面上覆盖大于约50％）。

检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。

1. 检验报告

检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替代牙科治疗机用水系统所代表的牙科治疗机；

b)牙科治疗机内部供水系统处理方法的检测；

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检验方法；

g)检验结果、分析和结论；

h)任何可能影响结果及其有效性的情况和条件；

i)试验中任何偏离规定测试方法的情况；

j)参照的标准，（如YY/T XXXX/ISO 16954:2015, MOD）；

k)检验负责人姓名和检验室名称；

l)检验人员姓名；

m)检验日期；

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] AINswORTH R. ed. World Health Organization.Safe Piped Water:Managing Microbial Water Quality in Piped Distribution Systems.IWA Publishing, 2004

[2] 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

[3] Curtin J.J., &DonlanR.M.Using Bacteriophages To Reduce Formation of Catheter-Associated

[4] Biofilms by Staphylococcus epidermidis.Antimicrob.Agents Chemother.2006, 50 (4) pp. 1268–1275

[5] HANNIg C., FOLLo M., HELLWIg E., AL-AHMAD A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques.J. Med.Microbiol.2010, 59 pp. 1–7

[6] WALKER J.T.,BRADsHAW D.J.,BENNETT A.M.,FULFORD M.R.,MARTIN M.V.,MARSH P.D.Microbialbiofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice.Appl.Environ.Microbiol.2000, 66 (8) pp. 3363–3367

[7] 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

[8] OFFICIAL METHOD A.O.A.C.960.09, Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants.AOAC International, 2000

[9] 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

[10] 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

[11] 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

[12] ISO 2174, Surface active agents — Preparation of water with known calcium hardness

[13] ISO 8199:2005, Water quality —General guidance on the enumeration of micro-organisms by culture

[14]ISO 14457:20121), Dentistry —Handpieces and motors

[15] ISO 16266, Water quality — Detection and enumeration of Pseudomonas aeruginosa— Method by membrane filtration

[16] 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

[17] 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

[18] WHO/HSE/WSH.10.01/10,Hardness in drinking-water:background document for developmentof WHO guidelines for drinking-water quality.World Health Organization.WHO, 2011

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_