

臭氧对物体表面 IBV 冠状病毒的杀灭效果的研究*

冯遵成¹, 赵可胜¹, 张希东², 徐万群³, 洪波¹

(1. 中国海洋大学, 山东 青岛 266003; 2. 青岛市疾病控制中心, 山东 青岛 266033; 3. 青岛大学医学院附属医院, 山东 青岛 266003)

摘要: 本文利用强氧化剂臭氧 O₃ 对物体表面的冠状病毒进行杀灭试验。不同物体表面经不同臭氧浓度、湿度、温度处理灭活的冠状病毒于 10 日龄鸡胚培养一代, 进行对流免疫电泳试验检测。结果表明, 臭氧浓度在高于 60.3mg/m³, 作用时间超过 15min 时就可将表面皿表面的病毒完全杀灭。温度对臭氧的杀毒效果也有影响, 即温度越高杀毒效果越明显, 而湿度对臭氧消毒效果则没有影响。同时, 表面的材料不同对臭氧的消毒效果也存在一定影响, 对金属材料和玻璃器皿的消毒效果较好; 对纸片和布片的杀毒效果较差。

关键词: 臭氧; 冠状病毒; 杀灭实验

中图分类号: R183.3

文献标识码: A

文章编号: 1672-5174(2004)06-1045-04

自 2003 年初爆发非典型性肺炎以来, 世界各国对冠状病毒的研究更加深入和全面。同时, 如何有效的切断 SARS 病毒的传播, 防止 SARS 病人对医护人员及其他人的感染, 也是一个亟待解决的问题。目前, 生活中和医院里用于冠状病毒消毒的试剂主要为甲醛溶液和次氯酸盐溶液, 也有使用四氧乙酸的。以上消毒液的杀毒效果较好, 但都有严重的缺陷。首先, 杀菌消毒速度慢; 其次, 对环境产生二次污染, 且后果严重。同时残留在空气中和物体表面的药物有强烈的腐蚀性, 对人的呼吸道和鼻黏膜产生强烈的刺激和损伤, 在使用和推广上受到一定的限制^[1]。关于消毒剂的选择, 必须兼顾杀毒和不污染环境以及无有害残留等几个方面的问题。

臭氧(O₃, ozone)是氧(O₂)的同素异形体, 为暗蓝色气体, 1840 年由德国的 Schorbein C. 发现并命名。该气体是 1 种强氧化剂, 在消毒学上属于过氧化物类消毒剂, 同时具有使用方便, 刺激性低, 作用快速, 杀灭病原种类多, 不污染环境等特点。欧洲在 100 多年前既有用臭氧消毒饮水者, 随后又有用于空气消毒的报告。臭氧不稳定, 可自行分解成 O₂。过去该化合物产生有一定难度, 且无法保存, 消毒应用受到一定的限制。近年来臭氧的产生方法和途径有了较大的发展, 如化学法、电解法、无声放电法和紫外线等, 使其在消毒方面的应用已日渐广泛, 不仅用于饮水、空气消毒, 也用于物体表面的消毒, 不但能用其气体消毒, 也可制成臭氧水进行消毒^[2]。臭氧具有广泛杀灭微生物的作用, 包括金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、无色杆菌等各种

细菌, 以及枯草杆菌黑色芽孢和变种芽孢等各类细胞芽孢, 同时对真菌和各种病毒, 如乙肝、甲肝, 流感病毒等都有杀灭作用^[3]。随着消毒技术的日臻完善, 臭氧将在医疗、畜牧、水产等方面得到更大的应用。

本文选择冠状病毒科冠状病毒属的代表种——鸡传染性支气管炎病毒(IBV)^[3]为实验对象, 对不同浓度臭氧对物体表面 IBV 的杀灭效果进行试验。以期对消灭 SARS 的研究提供重要参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 IBV 由农业部动物检疫所易邦生物公司提供, 为鸡胚培养的尿囊腔液病毒, 其半数发病量为 10⁻⁸mL, 接种量为 10⁻²mL。IBV 标准抗原和血清均由大连三仪生物公司提供。臭氧发生器由安丘市臭氧发生器制造厂生产, 臭氧发生量为 5mg/h。试验用 1m³ 的气雾柜由本测试中心制作, 内设有调温、调湿装置、通风设备以及喷样、采样传递窗口。试验前消毒灭菌。底部测试对象置于气雾柜底部中央处, 悬挂测试对象置于距底部 50cm 高度处。

1.2 试验方法

1.2.1 臭氧消毒

(1) 吸取病毒原液 0.5mL 平铺于半径为 5cm 的培养皿中, 保持温度为 21℃, 湿度为 70%。打开臭氧发生器, 使试验空间中臭氧浓度分别为 60.3mg/m³, 40.6mg/m³, 16.5mg/m³。对每个浓度的臭氧都分别作用 0min, 5min, 15min, 20min, 30min, 40min 后取样,

* 基金项目: 青岛市病房负压集中灭菌消毒系统项目(03-1-ny-19)资助
收稿日期: 2004-03-10; 修订日期: 2004-08-18
作者简介: 冯遵成(1949-), 男, 高工。E-mail: fzch@ouc.edu.cn

待检测。

(2) 臭氧作用浓度均为 $40.6\text{mg}/\text{m}^3$, 湿度为 70% 保持不变, 调节柜内温度分别为 15°C , 20°C , 30°C 。对每个温度都分别作用 0min, 5min, 15min, 20min, 30min, 40min 后取样, 待检测。

(3) 臭氧作用浓度均为 $40.6\text{mg}/\text{m}^3$, 温度为 28°C 保持不变, 调节柜内湿度分别为 30%, 50%, 70%。对每个湿度都分别作用 0min, 5min, 15min, 20min, 30min, 40min 后取样, 待检测。

(4) 将 2 组消毒后的玻片、铝片、纸片、布片作为试验载体, 浸入病毒原液中放置 5s, 分 1 组悬挂于距气雾柜底面 50cm 高度处, 1 组平放于气雾柜底部中央处。保持温度为 21°C , 湿度为 70%。臭氧作用浓度为 $40.6\text{mg}/\text{m}^3$ 作用 30min 后用 0.8% 生理盐水冲洗取样, 待检测。

1.2.2 灭活病毒检测 臭氧灭活后的病毒样品接种于 10 日龄鸡胚培养一代, 取尿囊腔液进行 ELISA 检测。

1.2.2.1 多克隆抗体的制备 用提纯的病毒做抗原, 免疫 1.5kg 左右的健康雄性新西兰白兔 4 只。免疫程序如下: 初次免疫取 2mL 抗原与等量完全福氏佐剂乳化均匀, 在兔子的颈部、背部、后腿内侧多点皮下注射。4 周后用 1mL 抗原与不完全福氏佐剂混合, 皮下多点注射。以后每隔 10 天免疫 1 次, 共 2 次, 免疫方式同第 2 次。

采集血清 末次免疫后 10 天, 耳动脉和心脏采血。全血在室温放置凝固后, 4 度冰箱过夜。血清以 $10\ 000\text{g}$ 离心 20min, 收集上层血清。

非特异性吸收 鸡胚尿囊腔液, 加入 10 体积 PBS 缓冲液, 以 $10\ 000\text{g}$, 离心 20min。取上清液用于从抗血清中去除交叉反阳性抗体。

1.2.2.2 ELISA 检测方法 阳性对照为未经臭氧处理的 IBV; 阴性对照为感染的鸡尿囊腔液。

(1) 取待测样品冻融 3 次, PBS ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$) 稀释并包被于酶标板中过夜, $150\mu\text{L}/\text{孔}$ 。每个检测样品设置 4 组平行。

(2) PBST ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$) 洗 3 次, 5min/次, 将酶标板倒扣于滤纸上, 吸去多余水分。

(3) 取 5% 牛血清白蛋白 ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$ 配制), 加入样品孔, 37°C 封闭 1h 或 4°C 封闭过夜。

(4) PBST ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$) 洗 3 次, 5min/次, 将酶标板倒扣于滤纸上, 吸去多余水分。

(5) 加多克隆抗体于样品孔中, $150\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 1h。

(6) PBST ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$) 洗 3 次, 5min/次, 将酶标板倒扣于滤纸上, 吸去多余水分。

(7) 加入 HRP 标记羊抗兔血清 ($1:500$, PBS 稀释), $150\mu\text{L}/\text{孔}$, 37°C 孵育 1h。

(8) PBST ($\text{pH}7.4$, $0.01\text{mol}/\text{L}$) 洗 3 次, 将酶标板倒扣于滤纸上, 吸去多余水分。

(9) 加入 TMB 底物应用液, $150\mu\text{L}/\text{孔}$, 1~2min 后, 反应孔变蓝。

(10) 加入 $50\mu\text{L}/\text{孔}$ $2\text{mol}/\text{L}$ H_2SO_4 反正终止液终止反应, 反应孔变黄。

(11) 使用酶标仪测定 492nm 处 OD 值。计算 4 组平等的平均值。

(12) 计算 P/N 值, $\text{P}/\text{N} < 1.5$ 为阴性用“-”表示; $\text{P}/\text{N} > 1.5$ 为阳性用“+”表示。

2 结果

2.1 臭氧浓度对物体表面 IBV 的作用效果 温度为 28°C , 湿度为 70%。试验结果见表 1。

表 1 臭氧浓度梯度试验检测结果

Table 1 Effect of ozone density on the survival of IB virus

臭氧浓度 Zone density	作用时间 Treatment time/min					
	0	5	15	20	30	40
60.3	+	+	-	-	-	-
40.6	+	+	+	-	-	-
16.5	+	+	+	+	+	-

由试验结果可以看出, 臭氧浓度是影响臭氧杀毒效率的重要因素。浓度越高, 杀死病毒所需要的时间越短, 臭氧杀毒的效率越高。

2.2 温度对臭氧消毒效果的影响 湿度为 70%, 臭氧浓度为 $40.6\text{mg}/\text{m}^3$, 试验结果见表 2。

表 2 温度梯度试验检测结果

Table 2 Effect of temperature on the sterilize efficiency of ozone

温度 Temperature	作用时间 Treatment time/min					
	0	5	15	20	30	40
15	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	-	-
30	+	+	+	-	-	-

由试验结果可以看出, 温度对臭氧杀毒的作用效果有一定的影响。温度越高臭氧杀毒的效果越好。

2.3 湿度对臭氧消毒作用的影响 温度为 28°C , 臭氧浓度为 $40.6\text{mg}/\text{m}^3$, 试验结果见表 3。

表3 湿度梯度试验检测结果

Table 3 Effect of humidity on the sterilize efficiency of ozone

湿度 Humidity	作用时间 Treatment time/min					
	0	5	15	20	30	40
/ %						
30	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	-	-	-
70	+	+	+	-	-	-

从以上的实验结果可以看出,3个湿度条件下,臭氧对液体表面病毒的杀灭效果是一致的。湿度的改变对臭氧杀灭表面病毒的效果没有影响。

2.4 不同材料表面对臭氧消毒效果的影响 湿度为70%,温度为28℃,臭氧浓度为40.6mg/m³,试验结果如表4。

表4 不同表面材料测试结果

Table 4 Result of test on sterilization efficiency of ozone for different surfaces

不同材料的表面 Material	作用时间 Treatment time/min					
	0	5	15	20	30	40
玻片 Glass sheet	+	+	+	-	-	-
铝片 Aluminium sheet	+	+	+	-	-	-
纸片 Paper sheet	+	+	+	+	+	-
布片 Cloth sheet	+	+	+	+	+	-

实验结果表明表面材料对臭氧消毒的效果有一定的影响。臭氧对玻片铝片等无机材料表面上的冠状病毒杀灭效果较好,而对于纸片和布片等有机材料表面上的效果较差。

2.5 不同位置对臭氧消毒效果的影响 纸片为病毒液载体,湿度为70%,温度为28℃,臭氧浓度为40.6mg/m³,试验结果如表5。

表5 不同位置测试结果

Table 5 Result of test on sterilization efficiency of ozone for different positions

不同位置 Different position	作用时间 Treatment time/min					
	0	5	15	20	30	40
距底面50cm处 50cm above the bottom	+	+	+	-	-	-
底面中央处 Center of the bottom	+	+	+	-	-	-

实验结果表明,臭氧对表面冠状病毒的杀灭效果与其所在的测试位置没有相关性,即臭氧对不同位置的表面冠状病毒的杀灭效果是相同的。

3 讨论

臭氧是1种较理想的化学消毒剂,一定浓度的臭氧经适当的作用时间可以将IBV病毒彻底杀灭。同时,臭氧还可以灭活多种病毒。伍学洲报道,在0.7m³的无菌罩中,乙型肝炎表面抗原经臭氧作用20min滴度可降低一半^[6]。史江报告,臭氧浓度13.6作用30min,使HBSAg破坏99.9%以上,使甲型肝炎病毒抗原HAAg破坏100%。Wolott证明,10.5mg/m³的臭氧可灭活空气中的甲型流感病毒^[7]。同时,臭氧对空气中的金黄色葡萄菌、大肠杆菌、绿脓杆菌具有良好的杀灭作用。翟发林等报道,在(34±1)℃条件下,5.5mg/m³的臭氧作用可将100mL塑料瓶内滴染的枯草杆菌黑色变种芽孢全部消灭^[6]。相对于空气中的冠状病毒^[8],物体表面的病毒的杀灭需要更高的作用浓度和更长的作用时间。对于表面SARS病毒的杀灭,如病人使用和接触过的物品等,根据本实验结果推荐使用浓度为高于60.3mg/m³和作用时间>40min的臭氧。

参考文献:

- [1] 吴惠贤,魏文康.长效清消毒剂对鸡NDY和IBDV的消灭效果[J].广东农业科学,1997,2:47-48.
- [2] 王天星.臭氧消毒效果评价方法[A].‘97北京臭氧应用技术研讨会论文集[C].北京:北京电子报社,1997.44-51.
- [3] 丁兰英.臭氧杀菌效果及其有关特性[A].‘97北京臭氧应用技术研讨会论文集[C].北京:北京电子报社,1997.52-62.
- [4] 殷震.动物病毒学[M].北京:科学出版社,1997.673.
- [5] 刘建文,李月辉.用对流免疫电泳试验检测鸡传染性法式囊病血清抗体[J].动物科学与动物医学,1999,16(1):17-18.
- [6] 王芳.臭氧消毒研究进展[A].‘97北京臭氧应用技术研讨会论文集[C].北京:北京电子报社,1997.10-14.
- [7] 薛广波.臭氧消毒‘97北京臭氧应用技术研讨会论文集[C].北京:北京电子报社,1997.36-43.
- [8] 洪波,王品虹.臭氧对空气中冠状病毒的杀灭效果研究[J].中国海洋大学学报,2003,33(6):861-864.

Study on the Sterilization Efficiency of Ozone Acting on the IB Virus on Object Surfaces

FENG Zun-cheng¹, ZHAO Ke-sheng¹, ZHANG Xi-dong², XU Wan-qun³, HONG Bo¹

(1. Ocean University of China, Qingdao 266003, China; 2. Qingdao Disease Control Center, Qingdao 266003, China; 3. Medical College Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, China)

Abstract: In the experiments, ozone, as a kind of oxidizing agent, is used to kill IB virus, a representative type of coronary viruses. After receiving different treatments, the coronary virus was cultivated in embryonic chickens of 10 days old, and tested by means of CIE. The results show that ozone density is an important factor, which affects the oxidizing capacity of ozone. When the density of ozone was larger than $60.3\text{mg}/\text{m}^3$, the treating time more than 15min, the virus was put into inactivation completely. The temperature and surface type both affect the efficiency of sterilization. The higher the temperature and the slicker the surface are, the higher the efficiency is.

Key words: ozone; coronary virus; sterilize experiment