

簡介動物用消毒劑殺滅病毒效果檢驗

詹勳隆 本所檢定分所

前言

在養殖業中為防治各類傳染性疾病爆發，使用消毒劑進行飼養環境消毒是養殖業者最廣泛使用方式，且消毒劑使用亦不像抗生素容易產生公共衛生上的疑慮，就疾病控制投資成本上屬於立即且有效支出。一般消毒劑檢驗除以滴定、紫外線測試儀、高液相層析儀等方式進行基本含量檢驗外，另一種方式為直接檢測消毒劑對微生物之有效性，一般以石炭酸係數與殺滅試驗來評估消毒劑效果。行政院農業委員會動植物防疫檢疫局針對動物用消毒劑標籤仿單效能及用法用量登載能殺滅口蹄疫、豬瘟、水疱性疾病、家禽流行性感冒及新城病等 5 種病毒，規定申辦檢驗登記及許可證展延時，必需檢附此 5 種病毒消毒劑殺滅試驗結果。為此政策，本分所積極研擬消毒劑對此 5 種重要病毒之殺滅試驗檢驗方法，期能建立標準檢驗方法，提升國內動物用消毒劑品質，以符合動物防疫需求。

消毒劑種類

常用化學性消毒劑為重金屬類、鹽類、有機溶劑（醛類、酚類、醇類等）、鹵素類、染料和界面活性劑等。其作用機制分述如下：

一、重金屬類：

為含銀及汞等重金屬之製劑（如硝酸銀、昇汞），為重金屬離子與細菌菌體蛋白質結合，造成菌體蛋白質變性或與某些酵素蛋白的巰基（-SH）相結合而使酵素失去活性。

二、鹽類：

如酸性、鹼性消毒劑，與微生物蛋白酵素沈澱或與代謝產物發生螯合作用形成無效化合物。

三、有機溶劑類：

如醛類、醇類、酚類等消毒劑，可使酵素蛋白與核酸變性，也可破壞微生物細胞膜

通透性，而使細胞質內物質外溢。優點為對有機物滲透力強，不受有機物影響。缺點為刺激性、毒性與腐蝕性均大。

四、鹵素類

可分成氯劑及碘劑，含氯之鹵素類消毒劑可與水發生反應，產生具殺菌作用之過氧化物，而碘之鹵素類消毒劑可與酵素蛋白質之酪氨酸基不可逆結合而使蛋白質失去活性。優點為殺菌範圍廣，對細菌（包括芽孢菌）、病毒、黴菌、原蟲類等皆有效。缺點是安全性甚差。需注意因氯劑與碘劑同為鹵素製劑，但因酸鹼度不同，混合後中性化會失去作用，故不能混合使用。

五、染料類：

低濃度可抑制細菌生長，但對細菌作用具有選擇性，一般而言對革蘭氏陽性菌較革蘭氏陰性菌更敏感。染料型消毒劑如紅藥水、紫藥水、黃藥水等。

六、界面活性劑類：

界面活性劑類分成陰離子、陽離子與兩性離子，其作用為可降低溶液表面張力，作用於微生物細胞膜，改變細胞膜通透性，同時使酵素蛋白質變性。常見陰離子界面活性劑如肥皂，但不具殺菌力僅有洗淨力而已，故不能當消毒劑使用。而陽離子界面活性劑如四級胺類氯化物(或溴化物)，其四級胺之陽離子具有殺菌功能。另有一種為兩性肥皂，兼具陰、陽兩離子活性，作用更為廣泛。此類型消毒劑優點為對一般細菌、病毒之殺滅力強，且毒性、刺激性與腐蝕性均極低。而缺點為在有機物存在下效力大減，故消毒前必需先將有機物清洗乾淨才能發揮效果，對綠膿桿菌、抗酸性菌、芽孢性細菌與無封套病毒等效果差。

消毒劑效果評估

消毒劑對於微生物殺滅能力，是養殖業者常探討的問題。養殖業者針對微生物選用有效消毒劑後，皆會參照消毒劑產品標籤說明來使用，但標籤上所登載對某種疾病或對環境消毒之推薦有效稀釋劑量又是如何決定的呢？

對於消毒劑效果，一般常以石炭酸係數與殺滅試驗兩者來表示。石炭酸係數是指在固定條件、固定時間內被測試消毒劑能殺死全部試驗菌之最高稀釋濃度與達到同樣效果石炭酸最高稀釋度之比值，石炭酸係數越大，表示該消毒劑殺菌力越強；而殺滅試驗，

是藉由病原微生物直接與消毒劑作用，檢測所推薦消毒劑濃度對此微生物是否有效。但殺滅試驗迄今尚無國際公認與一致的標準檢驗方法，各國對病毒之消毒劑殺滅試驗方法，大略可分成兩種方式，歐盟各國與美國採用代替（Surrogate）病毒方式，而英國則採用指定病毒方式進行相關消毒劑殺滅試驗。

代替病毒方式是指在消毒劑殺滅實驗中，以某種病毒代替具有傳染性、危險性或者培養很困難的微生物，以評估消毒劑與滅菌效果。儘管在測試消毒劑對細菌芽孢、分支桿菌、真菌殺滅效果方面，應用代替物已是全世界認可的方式，但在殺滅病毒試驗中所用代替病毒卻仍有爭議。目前世界各國皆積極尋找各種核酸類型之致病性病毒做為代替病毒，如美國共有 21 個實驗室展開消毒劑效果實驗研究，所使用的病毒包括腺病毒、疱疹病毒、多黏液病毒、乳突病毒、痘病毒、小 RNA 病毒等 8 個科共 39 種病毒，但沒有一個實驗室能同時具有如此眾多病毒消毒劑效果試驗條件，來測試所有消毒劑對全部已知病毒的殺滅作用，故採用參考病毒或代替病毒方式為一種合理的途徑。在現有文獻中，代替病毒有多種英文名稱，如 indicator virus 或 virus indicator；也有稱之為模型病毒（model for virus）或替代病毒或測試病毒（test virus）等。選擇代替病毒的原則如下：

一、安全性

安全性對實驗人員非常重要。除可避免被感染外，為方便操作可用生物安全防護等級較低病毒代替，但生物安全等級高於 2 級以上之病毒不能用來作為代替病毒。

二、可操作性

代替病毒應該要容易處理，而且其感染能夠方便在細胞培養系統進行定量檢測。

三、穩定性

代替病毒應該能容易保存及存活，在試驗時能夠保持良好活性。

四、易增殖性

代替病毒能夠大量培養對於消毒劑殺滅試驗非常重要。一般殺滅試驗中都需要較高病毒量，用以代償殺滅試驗中的稀釋作用。

五、抵抗性

代替病毒應該具備一定抵抗性，以便能在實驗條件下替代同一等級的病毒。

六、標準化

在實驗標準化中，使用特定且明確代替病毒，方便不同實驗室間資料比對，其所得結果也更有意義，而且還可以提供標準化的檢測條件。

七、未知病毒病原體

隨著新型傳染病不斷發現，許多新發生病原體對實驗室來說具有極高的危險性，或者難以在實驗室中操作。故通過選擇合適的代替病毒，用以預測專一消毒劑對此類新發生病原體之活性。

因消毒劑除能殺滅微生物外，有些消毒劑本身具有刺激性、毒性或腐蝕性，在執行殺滅試驗中，必需考量到對細胞株與雞胚胎傷害性，這帶給殺滅試驗一定的困難。故在消毒劑殺滅病毒試驗中，殘存消毒劑去除方法有化學中和法、稀釋法、離心法、凝膠過濾法等。稀釋法需要病毒力價較高，離心法不能控制消毒劑作用時間，凝膠過濾法不能完全回收病毒且成本較高。在美國 ASTM E 1482-92 標準中，推薦消毒劑殺滅病毒試驗採用凝膠過濾法與離心法結合去除殘存消毒劑活性，使接種細胞與雞胚胎傷害性減到最小，才可精確判讀試驗結果。但世界各國對中和劑選擇性試驗尚未訂定統一的標準，且不同種類消毒劑所添加中和劑亦不同，故造成殺滅試驗執行上困難。

消毒劑實際使用於養殖場中，常因有機性物質存在而影響效力，故在消毒劑殺滅病毒試驗中，各國在殺滅試驗標準中，皆有敘述實驗室中模擬有機物存在條件下效力評估，大多添加胎牛血清、其它蛋白質性物質或泥土等物質，藉此模擬真實環境狀態，提高殺滅試驗準確性。另外如歐美等國亦有明訂相關消毒劑對各國環境材質種類消毒效果試驗，如水泥地、木板、不銹鋼、鐵製等地板材質，亦藉以模擬現場真實消毒情形。

國外已核准消毒劑病毒殺滅試驗標準

目前世界各國針對消毒劑病毒殺滅試驗標準公告情形如下：

一、美國

美國材料試驗協會（American Society for Testing and Materials, ASTM）核准消毒劑對懸浮液中病毒殺滅效果的標準試驗方法，標準編號為 E 1052-96；消毒劑對無生命環境物表上病毒的殺滅效果的標準試驗方法，標準編號為 E 1053-96，該標準列入北美 4 種載體試驗方法目錄中第一種定量載體試驗，並列出對液體化學消毒劑有不同抵抗力之 10 種不同病毒，並對脊髓灰白質炎病毒、疱疹病毒與腺病毒等病毒殺滅結果符合要求者，才能宣稱該消毒劑對病毒有殺滅作用。

二、歐洲

歐洲標準委員會（European Committee for Standardization, CEN）制定並核准化學消毒劑與防腐劑的病毒殺滅懸浮液試驗標準。

三、加拿大

加拿大通用標準委員會（Canadian General Standards Board, CGSB）核准環境表面和醫療器械消毒劑殺菌效果的評價，標準編號為 CAN /CGS B-2.161- M97。

四、德國

德國獸醫學會已發布消毒劑殺滅病毒活性試驗標準。實驗方法使用含 20% 胎牛血清及含 10^6 病毒量懸浮液，試驗 4 種病毒，2 種有封套及 2 種無封套的呼吸腸道孤兒病毒、傳染性犬肝炎病毒、新城病病毒和牛痘病毒。在懸浮液試驗中，添加與不添加 20% 胎牛血清做為污染物試驗。在載體實驗中，對試驗物品也明定規範（如病毒於 37℃ 乾燥作用 90 分鐘），加入稀釋濃度之消毒劑，感作 15、30、60 和 120 分鐘後，再接種於細胞或雞胚胎，而消毒劑對細胞及雞胚胎的毒性必須單獨評估。

五、英國

英國環境食品暨農村事務部（Department for Environment, Food and Rural Affairs, DEFRA）於 1970 年發布消毒劑殺滅試驗方案，用以核准消毒劑殺滅家禽病毒與豬口蹄疫病毒之效果試驗。

檢定分所動物用消毒劑殺滅試驗簡介

一、實驗原理：

利用雞胚胎或細胞感染法測定消毒劑作用前後（含實驗組與對照組）樣本中 5 種病毒（口蹄疫、豬瘟、水痘性疾病、家禽流行性感冒及新城病）的力價差異。以雞胚胎感染後之死亡與否與測試殘餘的病毒含量作為判斷指標，計算消毒劑不活化對數值。針對消毒劑對雞胚胎與細胞之毒性，本試驗未添加中和劑，僅利用稀釋法將消毒劑毒性減弱，並且加入消毒劑毒力組別來判定消毒劑對細胞或雞胚胎傷害程度。

二、試驗方法：

試驗方法主要依循 EU 檢測法修訂，以 0.5 mL 3% BSA 與 0.5 mL 已知定量病毒液混合並置於 10℃，2 分鐘後，再加入 10℃ 4 mL 硬水配製之標示濃度、高濃度（標示稀

釋濃度高 2 倍) 及低濃度 (標示稀釋濃度低 2 倍), 共 3 組試驗之上述消毒劑稀釋液, 混合液放置於 10℃ 水浴作用 30 分鐘, 再接種於細胞與雞胚胎後, 觀察有無細胞病變或雞胚胎死亡, 再以計算 TCID₅₀ 與 EID₅₀ 值判定消毒劑殺滅效能。

三、判定標準：

依據英國 DEFRA 或美國 EPA 的評估標準, 消毒劑對病毒殺滅效果, 消毒劑殺病毒組與病毒對照組間的病毒力價差異, 如相差 4 log 以上, 即認定消毒劑對病毒有殺滅效果。如消毒劑對細胞或雞胚胎具有細胞毒性時, 於產生毒性的稀釋階之外, 消毒劑殺病毒組與病毒對照組間的病毒力價差異, 相差 3 log 以上, 即認定消毒劑具有殺滅效果。

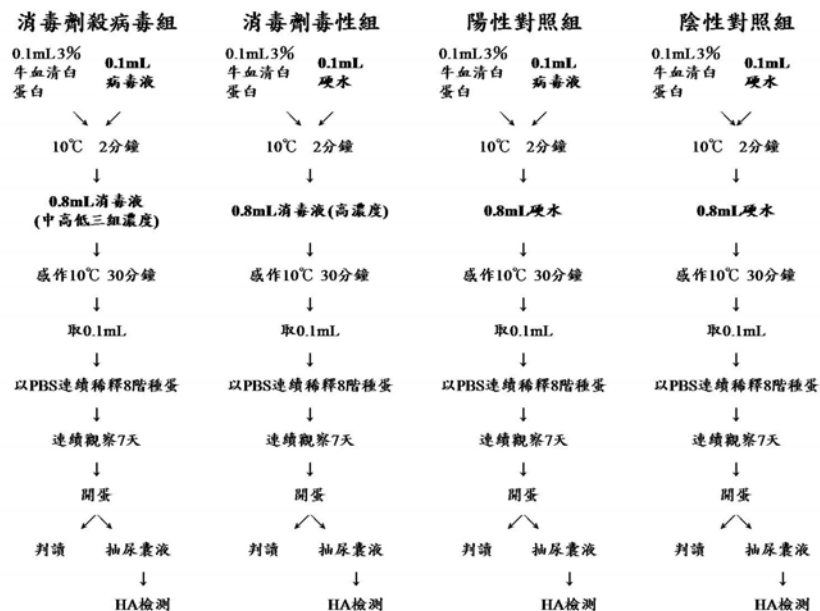


圖 1、消毒劑效果試驗流程。



圖 2、以雞胚胎存活測試消毒劑效果試驗。

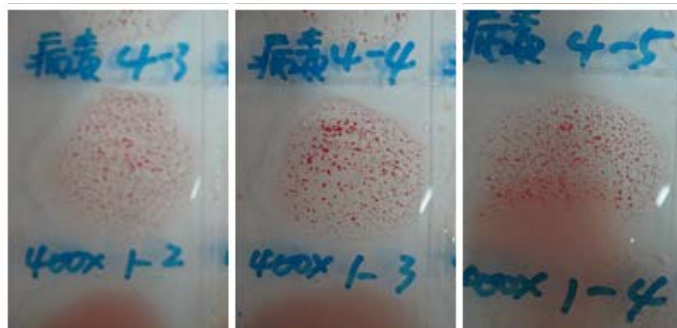


圖 3、以血球凝集法測試病毒是否已不活化。

某消毒劑對新城病病毒不活化作用的測定結果。

樣本 稀釋度	接種 蛋數	雞胚胎蛋感染		累積值		感染比	感染率 (%)
		-	+	雞胚胎蛋感 染(-)	雞胚胎蛋感 染(+)		
10 ⁻⁴	6	0	6	0	18	18/18	100
10 ⁻⁵	6	0	6	0	12	12/12	100
10 ⁻⁶	6	2	4	2	6	6/8	75
10 ⁻⁷	6	4	2	6	2	2/8	25
10 ⁻⁸	6	6	0	12	0	0/12	0

本例，高於50%組感染率(%)為75；低於50%感染率(%)為25；高於50%組稀釋度對數值6。

$$\text{距離比} = \frac{75 - 50}{75 - 25} = 0.5$$

$$\text{EID}_{50} \text{ 對數值} = 6 + 0.5 = 6.5$$

圖 4、消毒劑效果試驗計算方式。

結論

目前國內動物用消毒劑並無公告之殺滅效果試驗檢驗標準，故本分所在進行消毒劑殺滅病毒試驗時，在實驗技術上面臨幾點困難需解決，例如：如何獲得較高病毒力價、有效消除殘存消毒劑、準確評估消毒劑與病毒作用時間、排除消毒劑及其產物的細胞毒性及低濃度殘存病毒活性檢測等問題，若能加以解決並建立一套殺滅效果試驗檢驗標準，則未來消毒劑標籤仿單能明確載明已進行試驗之重要病原殺滅效果，不但能保障畜禽業者正確使用消毒劑，亦能成為國內動物防疫重要利器。