

# 結核分支桿菌化學消毒劑效力 檢測標準與方法學之系統評估

陳星宇<sup>1</sup> 孫俊仁<sup>2</sup> 詹明錦<sup>3</sup> 李龍雄<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 台北市立聯合醫院 仁愛院區臨床病理科

<sup>2</sup> 三軍總醫院 臨床病理科 <sup>3</sup> 三軍總醫院 感染管制室

結核病 (tuberculosis; TB) 病原體為結核分支桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)，其細胞壁富含脂質，因此對外界環境與消毒劑之抵抗力甚強。本研究收集已發表之七篇結核分支桿菌相關之消毒劑研究文獻，整理並針對結核分支桿菌消毒劑效力的檢測標準與方法學進行系統分析。經由系統分析發現：文獻中所使用的測試菌株共有九種不同分枝桿菌，而其所測試之消毒劑多達十六種，依其化學特性可以分成六大類。各篇在作法上有許多差異，可以分別以下列數個方面做探討：(1) 菌株差異 (2) 選用中和劑不同 (3) 測試消毒劑種類 (4) 測試環境溫度與測試時間 (5) 模擬使用環境與狀態。結核病患照護及實驗室檢驗人員是結核分支桿菌感染之高危險族群，結核病防治工作者及實驗室同仁惟有了解消毒劑之效力與正確使用方法才能避免感染或傳播。

## 前 言

結核病 (tuberculosis; TB) 是一種只在人類之間傳播的古老疾病，肆虐人類已經超過五千年，病原體是結核分支桿菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)。根據 2006 年世界衛生組織 WHO 的統計，全球新增結核病患約有 920 萬名，約有 200 萬人死於結核病。根據衛生署資料：台灣每年約新增 1 萬 5 千名結核病患 [1]，其發生率為每 10

萬人中有 64.8 人 [2]，而死亡率為每 10 萬人中 5.7 人。根據 WHO 統計 95% 結核病病例，發生在缺乏充分資源及醫療不足的未開發貧窮國家，但是由於國際間往來越來越頻繁，所以結核病的防治在已開發國家也不能忽視 [3]。感染結核菌後在人體抵抗力抑制下通常不會馬上發病，直到因其他疾病感染或人體抵抗力降低時，病菌大量繁殖而發病。從潛伏感染到發病可能需要經過幾年到幾十年間，而且通常

與個人的免疫反應改變有關。肺外結核通常在愛滋病病人較常見，但是也有15%肺外的結核病並不是愛滋病病人[3]。

結核分支桿菌主要傳染途徑為空氣傳染，該菌最大特徵為細胞壁富含脂質和蛋白質結構，細胞壁通透性低，對外界環境抵抗力甚強[4]。結核分支桿菌對熱敏感，若加熱至65°C需要15分鐘，煮沸5分鐘即會死亡，但是於陰暗處痰液內的結核分支桿菌可以生存6-8個月。在無生命的物體上也能存活達數日之久[5]，因此若接觸未消毒完全之醫療器具或受污染之物品(如口罩、手套等)，再經由口、鼻、皮膚傷口等軟組織進入體內，就有被傳染的可能。有報告指出，病原菌污染物經由注射至皮下或食入亦會造成感染[3]，正確使用消毒劑可減少結核分支桿菌傳播與感染。

本研究利用 *M. tuberculosis*，disinfectant test 與 mycobacterium 等相關字句以網路搜尋引擎與 PubMed 醫學期刊搜尋引擎搜尋已經發表的相關文獻，共搜尋數十篇相關文獻。先挑選與消毒劑殺菌測試相關文獻，再篩選由1998年至2008年近十一年內之研究文獻，最後統計分析文獻數為七篇。針對這七篇進行系統分析。

#### 消毒劑評估標準

對於各種不同化學消毒劑之作用，結核分支桿菌遠比其他不產生孢子的細菌更具有抵抗性，因此在消毒

劑的選擇上更為重要[6]，消毒劑製造商於販售該商品之前，均須經過殺菌測試評估，以了解消毒劑對於結核分支桿菌作用的溫度、溼度與時間，最早訂立消毒劑評估標準為美國國際分析化學家學會 (Association of Official Analytical Chemists; AOAC) 訂立測試消毒劑對於結核分支桿菌殺菌效力之標準評估方法，其標準測定菌株為 *Mycobacterium bovis* BCG，測試標準為所使用菌株在使用消毒劑後須減少  $10^5$ cfu/mL 以上為有效[7]。隨後許多國家與單位紛紛制定該國適用之標準規範，各有其不同之名稱，其差異處多為中和劑的種類、加入中和劑的稀釋倍數、操作程序與測試標準。其中歐盟所制定測試方法在所有歐洲成員國甚至在世界各國均被承認，制定單位為歐洲標準化委員會 (European Union Committee, ComitC European de Normalisation; CEN) 成立第216技術委員會 (TC216)，所訂立化學消毒劑與防腐劑評估之測試方法，試驗結果依其分類原則可以分成三個階段，而針對結核分支桿菌活性測試為 EN14348 (第二階段第一步驟) 與 EN14563 (第二階段第二步驟)，分別為懸浮液與載體法，測試標準為所使用菌株在使用消毒劑後須減少  $10^4$ cfu/mL 以上為有效[8]。除此之外，還有其他國家也紛紛制定適合之評估標準，包含法國的 AFNOR (Association française de Normalisation)[9] 與德國的 DGHM (Disinfectants Commission

of the German Society for Hygiene and Microbiology)[7]。消毒劑殺菌測試標準規範因制定單位不同而有許多不同準則，本篇所選擇文獻根據歐洲標準最多佔四篇，而德國標準與法國標準各一篇。

### 測試菌種

結核分支桿菌為導致結核病之病原體且對外界環境具高抵抗性，因此針對結核分支桿菌化學消毒液效力檢測應以其為偵測標的，但結核分支桿菌生長速度慢且具高度傳染性[10]，許多早期研究者尋找其他替代菌種。*M. smegmatis*生長快速菌種即成為首選，但其對消毒劑抵抗力較差，因此不宜作為評估標準。非致病菌 *M. bovis* 常作為檢測菌種，AOAC 以其為標準菌株，特點在於對消毒劑抵抗力與結核分支桿菌相近。*M. terrae* 或 *M. avium-intracellulare* 因為對消毒劑具有較高的抗性所以亦有文獻選擇作為測試菌株[7]。雖然這些替代菌種與結核分支桿菌特性相似，但所偵測結果仍無法真正反映消毒劑對結核分支桿菌之效果，因此為了避免其他使用者質疑測試結果，近年許多研究仍改以結核分支桿菌作為測試菌種[5,7]。將所收集文獻之發表時間、作者、測試菌種、作法、溫度、時間與所測試消毒劑整理成表一。七篇研究文獻中，所測試之菌株不盡相同，包含 *M. tuberculosis*、*M. terrae*、*M. avium-intracellulare*、*M. chelonae*、*M. avium*、*M. kansasii*、*M. xenopi*、

*M. smegmatis* 與 *M. fortuitum* 共九種。其中以1999年 Meyer B等研究者於研究中共測試六種菌株為最多。而七篇文獻中最常使用之測試菌株為 *M. tuberculosis* (4篇/7篇)。

### 消毒劑殺菌測試法

消毒劑殺菌能力的標準測試方法為定量法，也就是將測試之消毒劑與一種微生物接觸特定時間後，取出菌液進行毒性中和並進行系列稀釋，並依序定量接著接種於培養基上，待細菌長出菌落後再計算比較消毒劑處理過與未經消毒處理過之微生物數量，本篇所選取的文獻均使用定量法。消毒劑殺菌測試作法主要可以分成兩種，一種為懸浮液法(suspension test)，另一種為載體法(carrier test)。前者是直接將菌液混合均勻後，加入消毒液中作測試，其優點為微生物暴露於環境中的時間較短，可減少污染與感染的機會，易操作，實驗之再現性較高，但所能測試之方法與消毒劑種類受限。而載體法為將菌液置於特定固體上(如毛玻璃，瓷器、乾棉球、玻璃杯、橡皮管等)待乾燥後再作測試，其優點為可模擬實際使用情況，能測試的方法與消毒劑種類更多更廣，但將微生物暴露於環境中，威脅實驗室與操作人員安全，實驗再現性較差。七篇文獻中有四篇為懸浮液法，其餘三篇為載體法，載體種類包含玻片、毛玻璃與乾棉球。

### 添加有機物

有機物存在下可以提供微生物養

份與屏障，因此測試時同時加入有機物質，可作為實際使用情況的模擬，以確定有機物存在下是否會影響消毒劑作用。七篇文獻中有四篇添加有機物，所添加之有機物為3%牛白蛋白(BSA)與5g/L組織培養萃取物。

### 操作之溫度與時間

有些消毒劑需要提高溫度才具有殺死結核分支桿菌之效力，如：衛康要將溫度提高至40°C才符合結核分支桿菌消毒劑之標準[11]，但作用溫度高於室溫，不適合作為一般環境消毒，使用上也未能普及，因此測試消毒劑作用之環境溫度應選擇於室溫，才符合實際消毒情況。七篇文獻測試溫度均為20°C-23°C，唯有2001年Schwebach JR等人於測試戊二醛與三聚甲醛時，使用溫度為4°C(該篇其他消毒劑殺菌測試溫度仍為室溫)。消毒劑與微生物接觸時間越短，使用者越容易達成消毒劑作用時間之要求，更能達成完全消毒之目的。所收集文獻中，Hernandez A測試Tristel Sporicidal Wipe作用於*M. avium*時間最短只須30-60秒[12]，其他文獻測試消毒劑作用時間最長為一小時，Grare M等研究者測試過氧化氫乾式噴霧對生物安全第三等級防護實驗室(BSL3)結核分支桿菌去汙染作用時間最長需120分鐘[9]。

### 中和劑

中和劑主要成分為鹽類，其作用為終止消毒劑對微生物之作用，選用中和劑前須先確認中和劑本身對微生

物沒有傷害方可使用，研究文獻中僅有2篇文獻使用林格氏液(Ringer's solution)為基質之中和劑，其餘文獻所用之中和劑包含有無菌水、磷酸緩衝液等均不相同。

### 消毒劑之種類

所測試之消毒劑共有16種，包含二氯基異氰尿酸鈉(sodium dichloroisocyanurate, NADCC)、戊二醛(glutaraldehyde)、70%工業用酒精(industrial methylated spirits, IMS)、甲醛與丁二醛混合液(商品名：Gigasept)、0.35%過醋酸(商品名：Nu-Cidex)、二氧化氯(商品名：Tristel)、Glucoprotamin(L-glutamine acid and cocospropylene-1,3-diamine)、衛康(Virkon)、三聚甲醛(paraformaldehyde)、三聚甲醛-2%戊二醛(paraformaldehyde-2% Glutaraldehyde)、疊氮化物(azide)、福馬林(formalin)、Vesphine、Virsolve+、二氧化氯殺菌擦拭布(商品名：Tristel Sporicidal Wipe)、過氧化氫乾式噴霧(dry mist of hydrogen peroxide; DMHP)。以1999 Griffiths PA等研究者於單篇研究中測試七種消毒劑為最多。

整理文獻結果得知，大部分的消毒劑對測試菌株均具有消毒作用，唯有下列消毒劑與測試菌株作用為無效，1,000ppm二氯基異氰尿酸鈉、2%戊二醛(於乾淨環境條件下)、10%Gigasept與3%衛康對臨床分離*M. avium-intracellulare*無效；3%衛康對*M. chelonae* (NCTC 946)無效；2%

戊二醛、3% 衛康與 10% Gigasept 對臨床分離 *M. chelonae* 無效；3% 衛康對 *M. tuberculosis* H37 Rv (NCTC 7416) 與 *M. fortuitum* (NCTC 10394) 無效 [4,7]；10mM 以下疊氮化物對 *M. tuberculosis* Erdman 無效。

### 消毒劑之化學特性

針對結核分支桿菌最常使用之化學消毒劑多藉由有機溶劑或氧化劑的特性，破壞結核分支桿菌頑強外膜以達到殺菌效果 [13]。根據文獻中消毒劑之化學特性分類，戊二醛、甲醛混合液、三聚甲醛、三聚甲醛-2% 戊二醛與福馬林屬醛類 (aldehydes)，醛類消毒劑具毒性易刺激黏膜與皮膚，應避免接觸。3.5% 過醋酸、衛康、過氧化氫為過氧化物 (peroxides) 或超氧化物 (superoxides)，其優點為不具毒性但其不穩定，需時常更新，需足夠空間貯存。二氯基異氰尿酸鈉、二氧化氯與二氧化氯殺菌擦拭布為氯化物 (chloride)，氯化物消毒劑於配製及使用時有強烈的臭氣產生，對黏膜、皮膚及呼吸道具刺激性。Glucoprotamin、Virsolve+ 為胺類化合物 (amines)，其殺菌活性易受環境影響而降低，且不易進行生物分解，易累積於環境中。70% 工業酒精屬醇類 (alcohols)，為最廣泛使用之消毒劑，具有高揮發、易燃、使橡膠硬化與溶解某些膠類的特性，須適當的貯存管理，避免用於消毒之外的目的。Vesphine 為酚化合物 (phenolic compounds)，會吸附於橡膠和穿透皮膚 [13]。

### 結 論

由資料顯示台灣是屬於結核病高盛行與多重抗藥增加的地區 [14,15]，各中、大型醫院多設有其獨立之結核分支桿菌實驗室，肩負鑑定、診斷與研究之重責大任。而結核分支桿菌實驗室是結核分支桿菌濃度最高的區域，因此將實驗室內外受污染的醫療器械、操作區域、實驗器具等物品，完全消毒非常重要，不僅可以避免檢體間互相污染、更能保護員工避免結核分支桿菌之感染與傳播 [10]。此外臨床照護者接觸感染者時間久且距離近，除了須做好防護措施外，也需做好醫療器材之消毒滅菌。一旦未完全做好隔離與消毒，就有被感染之危險。現今許多消毒劑不單單只有一種成份，往往是兩、三種不同化合物之混合，使用者除必須詳讀操作說明外，應對消毒劑之組成有初步了解，以期能正確且安全使用消毒劑，以避免結核分支桿菌之感染與傳播 [16]，又能減少消毒劑對人體與環境之傷害。

本研究目的為藉由收集已發表之結核分支桿菌相關消毒劑研究文獻，整理並針對結核分支桿菌消毒劑效力的檢測標準與方法學進行系統分析。希望藉此了解臨床常使用消毒劑之種類、對結核分支桿菌殺菌之作用與殺菌測試方法，以適當且正確使用消毒劑，杜絕該菌污染與感染之機會。

表一 七篇針對結核分支桿菌化學消毒劑效力檢測相關文獻

參考文獻	測試菌種	作法	添加有機物	時間與溫度	中和劑	消毒劑
Griffiths PA et al. 1998 <sup>7</sup>	<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv (ATCC 9360), <i>M. terrae</i> (ATCC 15755), <i>M. avium-intracellulare</i> (clinical isolate).	懸浮液法	5g/L 組織培養 萃取物 (Tissue culture Services Ltd.)	1-60 分鐘, 20 °C	林格氏液加入 0.5% Tween 80	NADCC, Glut- araldehyde, IMS, Gigasept, NuCidex, Tristel
Meyer B et al. 1999 <sup>16</sup>	<i>M. chelonae</i> , <i>M. avium</i> , <i>M. kansasii</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. smegmatis</i> CIP 7326, <i>M. terrae</i> (ATCC 15755)	懸浮液法	無	15-60 分鐘, 20 °C	M/15 磷酸鹽緩衝液 (pH7) 加入 1% Tween 80, 3% 皂素, 0.1% 組 氨酸, 0.5% 硫代硫酸鈉	Glucoprotamin
Griffiths PA et al. 1999 <sup>4</sup>	<i>M. chelonae</i> (NCTC 946, clinical isolate), <i>M. fortu- itum</i> NCTC 10394, <i>M. avium-intracellulare</i> (clin- ical isolate), <i>M. tubercu- losis</i> H37 Rv (NCTC 7416)	懸浮液法	5g/L 組織培養 萃取物 (Tissue culture Services Ltd.)	1-60 分鐘, 20 °C	林格氏液加入 0.5% Tween 80	NADCC, Glutaraldehyde, IMS, Gigasept, Nu-Cidex, Tristel, Virkon
Schwebach JR et al. 2001 <sup>10</sup>	<i>M. tuberculosis Erdman</i>	載體法 (玻璃)	無	60 分鐘, 20 °C (戊二 醛與三聚甲 醛為 4 °C)	磷酸緩衝液	Glutaraldehyde, para- formaldehyde-2% Glutaraldehyde, para- formaldehyde-0.5%, azide, formalin, Vesphine
Erin. T et al. 2006 <sup>6</sup>	<i>M. terrae</i> (NCTC 10856)	懸浮液法	0.3% 牛白蛋白 (bovine albumin)	1-60 分鐘, 20 °C	30 g/l Tween 80, 3g/l 卵磷脂, 皂素與 4g/l 陰離 子界面活性劑	Virsolve+
Hernandez A et al. 2008 <sup>12</sup>	<i>M. avium</i>	載體法 (毛玻璃)	0.3% 牛白蛋白 (bovine albumin)	30-60 秒, 20 °C	食鹽水溶液加入 3% Tween 80, 3 g/l 卵磷脂, 3% 皂素與 4 g/l 陰離子界面活性劑	Tristel Sporic- idal Wipe
Grare M et al. 2008 <sup>9</sup>	<i>M. tuberculosis</i> H37Ra (ATCC 25177)	載體法 (無菌棉花)	無	2 小時, 20-23 °C	無菌蒸餾水	dry mist of hydrogen peroxide

## 參考文獻

1. 行政院衛生署疾病管制局：行政院迅速響應全球結核病防治計畫核定 170 億展現台灣結核病 10 年減半決心。Sentinel Surveillance Weekly Report 2006;2:1。
2. Liu CE, Chen CH, Hsiao JH, et al: Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* complex in central Taiwan. J Microbiol Immunol Infect 2004;37:295-300.
3. WHO: Global Tuberculosis Control. WHO Report 2005:1-247.
4. Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP: Mycobactericidal activity of selected disinfectants using a quantitative suspension test. J Hosp Infect 1999;41:111-21.
5. Sattar SA, Best M, Springthorpe S, et al: Mycobactericidal testing of disinfectants: an update. J Hosp Infect 1995;30:372-82.
6. Erin T, Christina B, Adam PF: Mycobactericidal efficacy tests (EN14348) (Phase2, step1) VIRUSOLVE+. [http://www.virusolve.com/downloads/1149162272-EN14348%20Mycobacteri a%20Virusolve%20April%202006pdf](http://www.virusolve.com/downloads/1149162272-EN14348%20Mycobacteri%20a%20Virusolve%20April%202006.pdf) 2006.
7. Griffiths PA, Babb JR, Fraise AP: *Mycobacterium terrae*: a potential surrogate for *Mycobacterium tuberculosis* in a standard disinfectant test. J Hosp Infect 1998;38:183-92.
8. Fraise AP: European norms for disinfection testing. J Hosp Infect 2008;70:1:8-10.
9. Grare M, Dailloux M, Simon L, Dimajo P, Laurain C: Efficacy of dry mist of hydrogen peroxide (DMHP) against *Mycobacterium tuberculosis* and use of DMHP for routine decontamination of biosafety level 3 laboratories. J Clin Microbiol 2008;46:2955-8.
10. Schwebach JR, Jacobs WR, Casadevall A: Sterilization of *Mycobacterium tuberculosis* Erdman samples by antimicrobial fixation in a biosafety level 3 laboratory. J Clin Microbiol 2001;39:769-71.
11. Hernandez A, Martro E, Matas L, et al: Assessment of in-vitro efficacy of 1% Virkon against bacteria, fungi, viruses and spores by means of AFNOR guidelines. J Hosp Infect 2000;46:203-9.
12. Hernandez A, Carrasco M, Ausina V: Mycobactericidal activity of chlorine dioxide wipes in a modified prEN 14563 test. J Hosp Infect 2008;69:384-8.
13. 林明滢：高程度消毒劑應用新趨勢。Infection Control Journal 2001;11:119-27。
14. Su WJ: Extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) raises challenges in TB control in Taiwan. J Formos Med Assoc 2008;107:827-9.
15. Yu MC, Wu MH, Ruwen Jou: Extensively drug-resistant tuberculosis, Taiwan. Emerg Infect Dis 2008;14:849-50.
16. Meyer B, Kluin C: Efficacy of Glucoprotamin containing disinfectants against different species of atypical mycobacteria. J Hosp Infect 1999;42:151-4.