

不同消毒劑前處理牛結核病病材對病原菌分離影響之評估

蕭終融 林敬覆 張惟茗 吳義興

行政院農業委員會家畜衛生試驗所

摘要

選用 5 種常用消毒劑 hexadecylpyridinium chloride (H.P.C.)、benzalkonium chloride (Zepharin)、oxalic acid、sodium hydroxide 及 sodium hypochlorite 等，分別以適當濃度，應用於前置處理乳牛結核病病材。結果對結核菌以外雜菌之毒性（去污染效果）以 2 % NaOH 最好，其次依序為 0.25 % Zepharin 和 5 % oxalic acid、0.1 % NaOCl、0.075 % H.P.C.。而對牛型結核菌毒性則以 0.1 % sodium hypochlorite 及 0.075% (w/v) H.P.C. 為最小，其次為 0.25 % Zepharin、5 % oxalic acid、2 % NaOH。5 種不同消毒劑應用於牛結核病病材前置處理之效果，以 0.075 % (w/v) H.P.C. 及 0.1 % sodium hypochlorite 為最佳，其次為 0.25 % Zepharin、5 % oxalic acid、2 % NaOH。

關鍵詞：消毒劑；前置處理；結核病乳牛

緒言

採集結核病牛病材時，全程無法保持均為無菌狀態，為避免雜菌污染並提高牛型結核病菌之分離率，在進行分離步驟前，應用消毒劑前置處理病材是必要之手段。應用於前置處理之理想消毒劑；應具有對牛型結核菌毒性較小，而對結核菌以外雜菌之毒性較大等特點。據此，本試驗選用 5 種常用消毒劑 hexadecylpyridinium chloride (H.P.C.)、benzalkonium chloride (Zepharin)、oxalic acid、sodium hydroxide 及 sodium hypochlorite 等，並參考前人文獻分別以適當濃度，進行乳牛結核病病材之前置處理 [1,2,3]。以篩選出最佳消毒劑及其使用方法，並推廣應用於本所乳牛結核病病材之處理，減少污染並提高病原之分離率。

材料與方法

不同消毒劑對結核菌以外雜菌之毒性試驗：

選用 5 種常用消毒劑 0.075 % hexadecylpyridinium chloride (H.P.C.)、0.25 % benzalkonium chloride

(Zepharin) 、5 % oxalic acid、2 % sodium hydroxide (NaOH) 及 0.1 % sodium hydroxide (NaOCl) ，作乳牛結核病病材之前置處理 [1,2,3,5] 。

將同一病材除去周圍脂肪組織，分成 6 份，浸泡於無菌生理食鹽水，置室溫 2 小時後，於 4 C 過夜。翌日取出解凍，將其中 5 份分別浸泡於上述 5 種不同成分消毒劑。另 1 份作為陰性對照組，浸泡於新鮮之無菌生理食鹽水。6 份病材均於室溫中作用 3 小時後，進行結核菌分離。結核菌分離時，採無菌操作方式，並依照 Runyon 等 [6] 所述和美國農業部頒布之方法 [3]：將病材剪成小塊，加入 10 mL 含有 0.4 % phenol red (指示劑) 之 tryptic soy broth (TSB) ，製成乳劑，加入適量之 0.5 N NaOH 混合均勻，使乳劑顏色變紅，靜置 10 -- 30 分鐘，再加入適量之 6 N HCl 混合均勻，至顏色變黃，靜置 10 -- 30 分鐘，再加入適量之 1 N NaOH 混合均勻至顏色變紅。於 3000 rpm 離心 30 分，除去上清液，取沉渣接種在 Lowenstein -- Jensen 斜面培養基試管 (10 支/種) ，置於 37C 培養，逐週觀察，至少 12 週。若有菌落生長，先觀察菌落之形態、顏色及生長速率並行抗酸染色，以判斷是否有其它雜菌污染。

總計 10 批不同病材進行本項試驗，前 5 批來自野外病例病材 (由防治所於當地採材後轉送本所) ，後 5 批則於本所進行採材。

不同消毒劑對牛型結核菌之毒性試驗：

置每 mL 含有牛型結核菌 100 colony-forming units 之 Dubos broth 培養液 2 mL 各加於 30 支 10 mL 螺旋蓋試管中，再分別加入 2 mL 上述 5 種不同消毒劑或無菌生理食鹽水，每種接種 5 支試管，於室溫中混勻作用 30 分鐘。從總計 6 組 30 支試管中，重覆 2 次，各取出 0.2 mL，接種於含有 5 mL Lowenstein -- Jensen 平面培養基之 50mL 角瓶中每組 10 支，總計共接種 60 支角瓶。接種後，角瓶置於水平迴旋振盪器上，振盪 5 分鐘後，置於 37C 培養，逐週觀察，至少 12 週，記錄菌落數，分別總計 5 種不同消毒劑及無菌生理食鹽水等 6 組，在各組 10 支角瓶中菌落數之總和，並藉此比較不同消毒劑對牛型結核菌之毒性。

結 果

不同消毒劑對結核菌以外雜菌之毒性試驗：

雜菌常在接種後 12 -- 24 小時，即可生長。

不同消毒劑及無菌生理食鹽水對 10 批不同病材之去污染情形如表 1 所示。分子為雜菌生長之試管數，其數值愈大，表示對其它雜菌之毒性愈小，去污染之效果亦愈小。

應用 0.075 % H.P.C.作前置處理病材，其污染率為 11 % (11/100) 。於野外病例病材中，其污染率為 18 % (9/50) ，而在本所採取病材中，則降為 4 % (2/50) 。

應用 0.25 % Zepharin 作前置處理病材，其污染率為 6 % (6/100) 。於野外病例病材中，其污染率

為 10 % (5/50) ，而在本所採取病材中，則降為 2 % (1/50) 。

應用 5 % oxalic acid 作前置處理病材，其污染率為 6 % (6/100) 。於野外病例病材中，其污染率為 10 % (5/50) ，而在本所採取病材中，則降為 2 % (1/50) 。

應用 2 % NaOH 作前置處理病材，其污染率為 1 % (1/100) 。於野外病例病材中，其污染率為 2 % (1/50) ，而在本所採取病材中，則降為 0 % (0/50) 。

應用 0.1 % NaOCl 作前置處理病材，其污染率為 8 % (8/100) 。於野外病例病材中，其污染率為 14 % (7/50) ，而在本所採取病材中，則降為 2 % (1/50) 。

應用無菌生理食鹽水於前置處理病材，其污染率為 100 % (100/100) 。於野外病例病材及在本所採取病材中，均為 100 % (50/50) 。

表 1 不同消毒劑及無菌生理食鹽水對其它雜菌之毒性試驗

消毒劑	批 別*									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
0.075 % H.P.C	2/10	2/10	1/10	3/10	1/10	0/10	0/10	1/10	1/10	0/10
0.025 % Zepharin	1/10	1/10	1/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	1/10
5 % oxalic acid	1/10	1/10	0/10	2/10	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10
2 % NaOH	0/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
0.1 % NaOCl	1/10	2/10	1/10	2/10	1/10	0/10	0/10	1/10	0/10	0/10
無菌生理食鹽水	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10

* 1 -- 5 批來自野外病例病材。

6 -- 10 批於本所進行採材。

不同消毒劑對牛型結核菌之毒性試驗：

分別總計 5 種不同消毒劑及無菌生理食鹽水，每組 10 支角瓶中菌落數之總和。其結果如表 2 所示：菌落數之總和愈大，表示消毒劑對牛型結核菌之毒性愈小，而使牛型結核菌之存活率愈高，有利於牛型結核菌之分離。牛型結核菌存活率即為 10 支角瓶中菌落數之總和/2 mL 混勻作用液之原有 colony-forming units。混勻作用液之原有 colony-forming units/mL 為 50 個菌落。

0.075% H.P.C、0.25 % Zephari、5 % oxalic aci、2 % NaOH 及 0.1 % NaOCl 之 10 支角瓶中菌落數總和分別為 67、45、38、17 及 65。對照組無菌生理食鹽水組則為 98。

表 2 不同消毒劑及無菌生理食鹽水對牛型結核菌之毒性試驗

消毒劑	菌落數	牛型結核菌存活率%
0.075 % H.P.C	67	67.0
0.025 % Zepharin	45	45.0
5 % oxalic acid	38	38.0
2 % NaOH	17	17.0
0.1 % NaOCl	65	65.0
無菌生理食鹽水	98	98.0

由表 2 顯示，不同消毒劑對牛型結核菌之毒性以 0.075 % H.P.C.及 0.1 % NaOCl 較小，其對牛型結核菌存活率分別為 67.0 % 及 65.0 %。其次依序為 0.25 % Zepharin (45.0 %)、5% oxalic acid (38 %)、2 % NaOH (17 %)。而無菌生理食鹽水對牛型結核菌則無毒性 (98 %)。

討 論

本試驗中 5 種不同消毒劑所選用之最適當濃度，係參考蔡文城 [1] Corner 等 [2] 及美國農業部動植物防疫單位 [3] 所使用之濃度。

由上述結果顯示，去污染效果（對其它雜菌之毒性）以 2 % NaOH 最佳，其次依序為 0.25 % Zepharin 和 5 % oxalic acid、0.1 % NaOCl、0.075 % H.P.C.，而無菌生理食鹽水則無去污染效果。不同消毒劑應用於野外病例病材或本所採取病材時，去污染效果均以 2 % NaOH 最佳，其次依序為 0.25 % Zepharin 和 5 % oxalic acid、0.1 % NaOCl、0.075 % H.P.C.，而無菌生理食鹽水則仍無去污染效果。不同消毒劑應用於野外病例病材，其污染率均高於其應用在本所採取病材，顯示出採材時應儘可能無菌操作，及採材後儘早進行病原分離，方能降低污染率。10 批病例中以第 4 批之污染情形最嚴重 (9/50，18 %)，5 種不同消毒劑均無法完全抑制雜菌之生長。10 批病材與無菌生理食鹽水作用則無去污染效果，均呈現污染狀況，顯示出採材時均無法避免污染之發生，因此病材進行病原分離前，先以消毒劑前置處理病材是必需的。

由表 2 顯示，5 種不同消毒劑對牛型結核菌之毒性以 0.075 % H.P.C.及 0.1% NaOCl 較小，其次依序為 0.25 % Zepharin、5 % oxalic acid、2 % NaOH。其中以 2 % NaOH 毒性最大，其牛型結核菌存活率僅為 17 %。無菌生理食鹽水則無毒性，其牛型結核菌存活率則為 98 %。

Corner 等人 [3] 亦曾進行不同消毒劑對牛型結核菌毒性之效果評估亦得如下之結果，以 0.075 % H.P.C 最佳，其次依序為 0.75 % H.P.C、0.25 % Zepharin、5 % oxalic acid、2 % NaOH。本實驗之結果與其一致。

綜合上述之結果，同時考量對牛型結核菌毒性較小，而對其它雜菌毒性較大之要求，5 種消毒劑中以 0.1 % NaOCl 及 0.075 % (w/v) H.P.C.為最佳，其次為 0.25 % Zepharin、5% oxalic acid、2 % NaOH。

參考文獻

1. 蔡文城. 微生物學. 台北，藝軒，352. 1993
2. Corner, L. A., 1994. Post Mortem diagnosis of Mycobacterium bovis infection in cattle. Vet. Micro. 40 : 53-63.
3. Laboratory methods in veterinary Mycobacteriology, 1974. Veterinary service Lab. Animal and Plant Health inspection service U.S. Dept. Agriculture. Ames, Iowa.
4. Lesslie, I. W., 1959 The comparaisn of some media for the primary isolation of Mycobacterium tuberculosis. J. Comp. Pathol., 69 : 1-10.
5. Vestal, A. L., 1975 Procedures for the Isolation and Identification Mycobacteria.US Public Health Service, Centers for Disease Control, Atlanta, Georgia. 136pp.
6. Runyon, E. H., A. G. Karlson, G. P. Kubica and L. G. Wavne. Manual of Clinical Microbiology. 3rd.ed. America society for Microbiology Washington, D.C. U.S.A. 150-179.

The Evaluation of Five Decontaminants Used to Pretreat the Pathogen Isolation Samples from Dairy Tuberculin Reactors

Jong-Rong Shiau, King-Fu Lin, Wei-Ming Chang, Yi-Shing Wu

National Institute for Animal Health, Council of Agriculture, Executive Yuan

SUMMARY In this study, a total of five decontaminants, hexadecylpyridinium chloride (HPC), benzalkonium chloride (Zepharin), oxalic acid (OA), sodium hydroxide (NaOH) and sodium hypochlorite (NaOCl), were applied to pretreat the samples from dairy tuberculin reactors. The results showed that the five decontaminants had various inhibition activities to the contaminated bacteria and to the *Mycobacterium bovis*. The inhibition activities studied on the contaminated bacteria were 2 % NaOH > 0.25 % Zepharin > 5 % OA > 0.1 % NaOCl > 0.075 % HPC. However, the inhibition activities performed on the *Mycobacterium bovis* were 2 % NaOH > 5 % OA > 0.25 % Zepharin > 0.1 % NaOCl = 0.075 % HPC, respectively. Our results suggest that the 0.075 % HPC and 0.1 % NaOCL were the best decontaminants for pretreating the samples from dairy tuberculin reactors.

Keywords : *Decontaminant ; Pretreatment ; Dairy tuberculin reactor*