

UV-C 殺菌檢測及效用

陳怡寧 獸醫博士

中原大學 生物科技系 副教授

中原大學 產學營運處 產業加速器暨育成中心 主任

台灣LED與照明標準調和會議

2021.06.23

講員介紹



陳怡寧 (Yi-Ning Chen)

中原大學 生物科技學系 副教授

中原大學 產業加速器暨育成中心 主任

美國普度大學 獸醫比較病理學研究所 博士後研究員/博士

國立臺灣大學 獸醫學 碩士/學士

專長

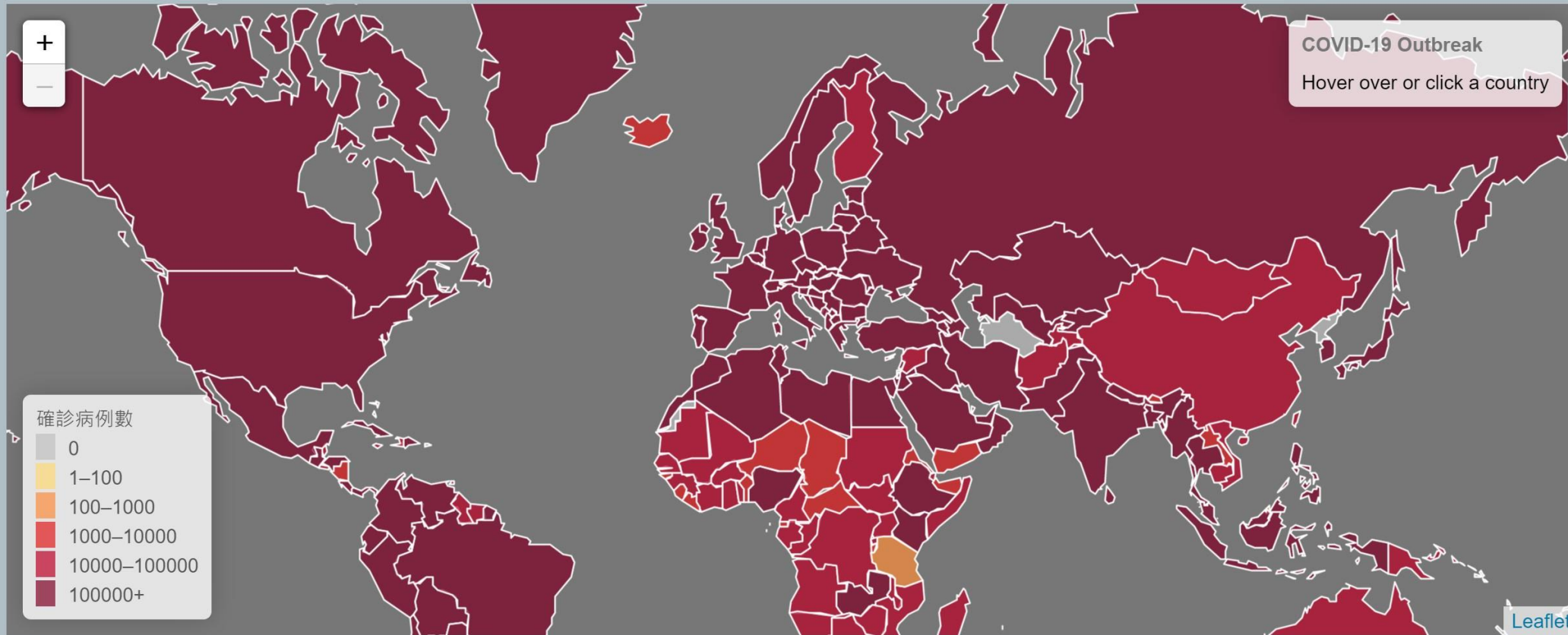
病毒檢測/病毒分離增殖/病毒細胞感染平台/病毒蛋白表達平台/ 產品抗微生物能力檢測

科研項目

病毒治病機轉/病毒跨物種感染機轉/ 病毒血清學測試/病毒疫苗研發/病毒基因體分析

研究成果

新興材料的抗菌及抗病毒能力測試及研發； 台灣蝙蝠冠狀病毒檢測分析及感染研究



全球確定病例數
177,287,735

全球死亡病例數
3,851,014

全球致死率
2.17%

國家/地區數
194

國內
通報
總計

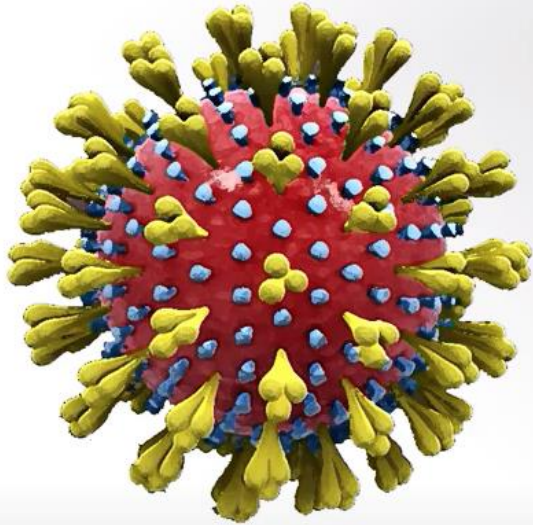
通報數
1,044,211

排除
1,028,898

確診
13,771

死亡
518

COVID-19病毒傳播途徑



COVID-19

CORONAVIRUS

Transmission of COVID-19 Virus
Aerosol vs Droplets



粒徑大小與停留時間

- 飛沫由患者噴出至空氣中，在空氣中沈降至地面所需的時間 (20°C, 1atm)

粒徑(μm)	時間	沈降速度(cm/s)
10	7~8 min	0.3
5	20~25 min	0.075
1	~14 Hr	0.003
0.1	~20 day	0.000087

粒徑大小與停留時間

- 不同粒徑的水滴完全揮發所需時間(溫度對其影響不大)
(RH: 50% vs 80%)

	RH: 50%	RH: 80%
粒徑 (μm)	時間(sec)	時間(sec)
10	0.15	0.375
5	0.02	0.05
1	0.0017	0.0043

病毒在環境中的存活率

1. 病毒在低溫環境下存活率大於高溫環境
2. 存活率最佳的濕度會隨病毒種類及環境溫度所影響

套膜病毒: 冠狀病毒 Human Coronavirus 229E

無套膜病毒: 小兒麻痺病毒

Relative humidity	HCoV 229E						Type 1-Poliovirus, Sabin strain			
	20 °C				6 °C		20 °C		6 °C	
	15 min	24 hrs	72 hrs	6 days	15 min	24 hrs	15 min	24 hrs	15 min	24 hrs
30%	87%	65%	>50%	n.d.	91%	65%	0%	0%	n.d.	n.d.
50%	★ 90.9%	75%	>50%	20%	96.5%	80%	0%	0%	n.d.	n.d.
80%	55%	3%	0%	n.d.	★ 104.8%	86%	★ 90%	30%	n.d.	n.d.

(n.d.: not done)

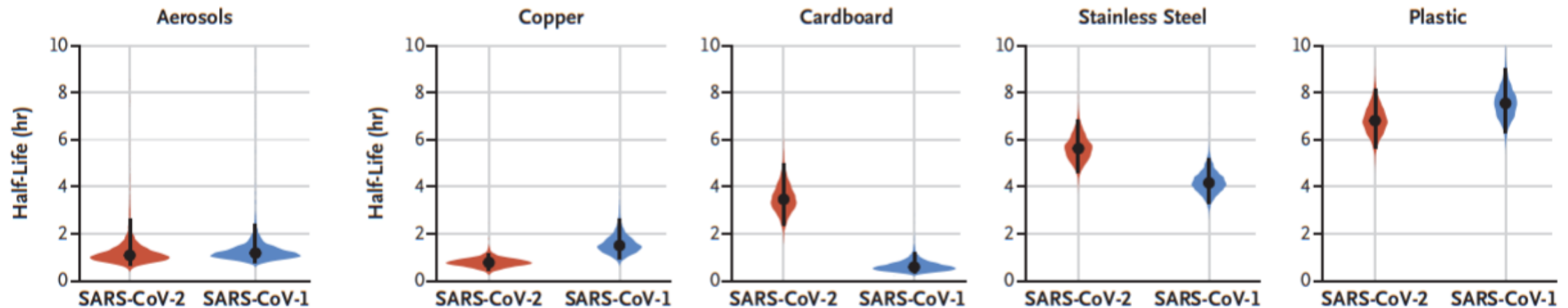
(Ijaz, MK et al., J Gen Virol 66, 1985)

Aerosol and Surface Stability of SARS-CoV-2 & SARS-CoV-1

SARS冠狀病毒的半衰期長度由長到短為

塑膠 > 不鏽鋼 > 銅 > 硬紙板 > 氣溶膠(懸浮微粒)

C Half-Life of Viable Virus

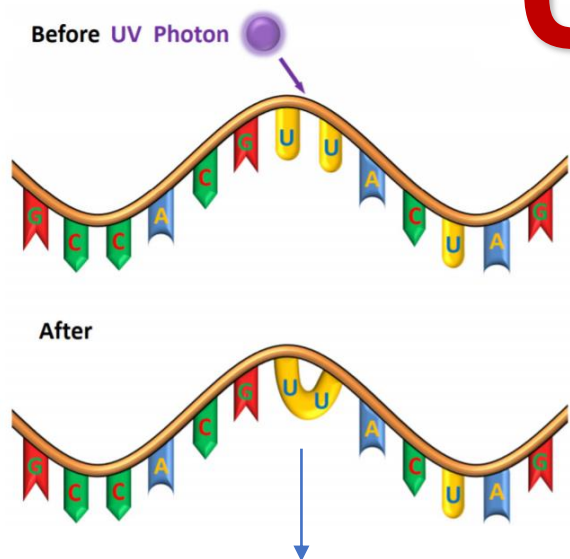


(van Doremalen N, et al. N ENGL J MED 382;16, 2020)

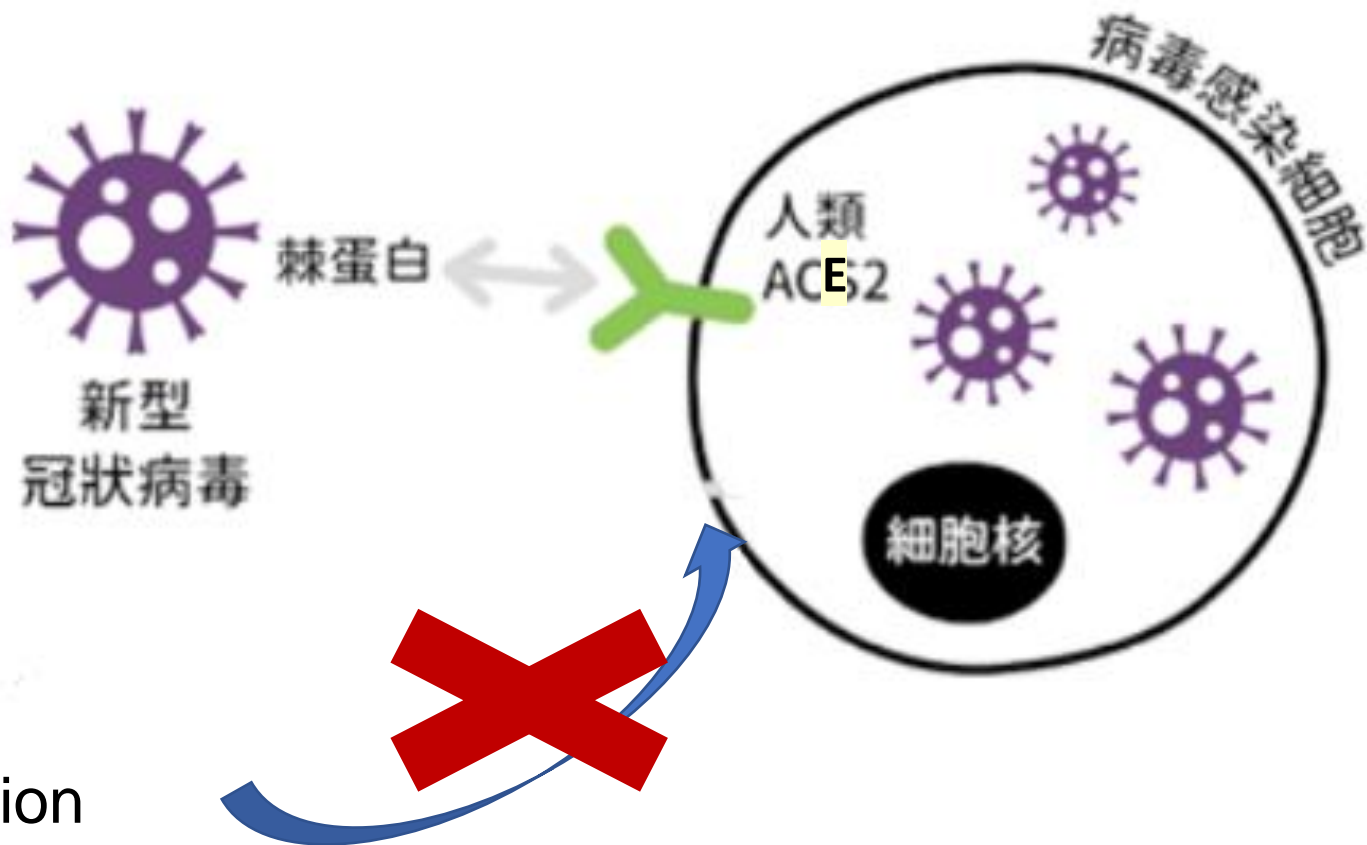


人類

UVC



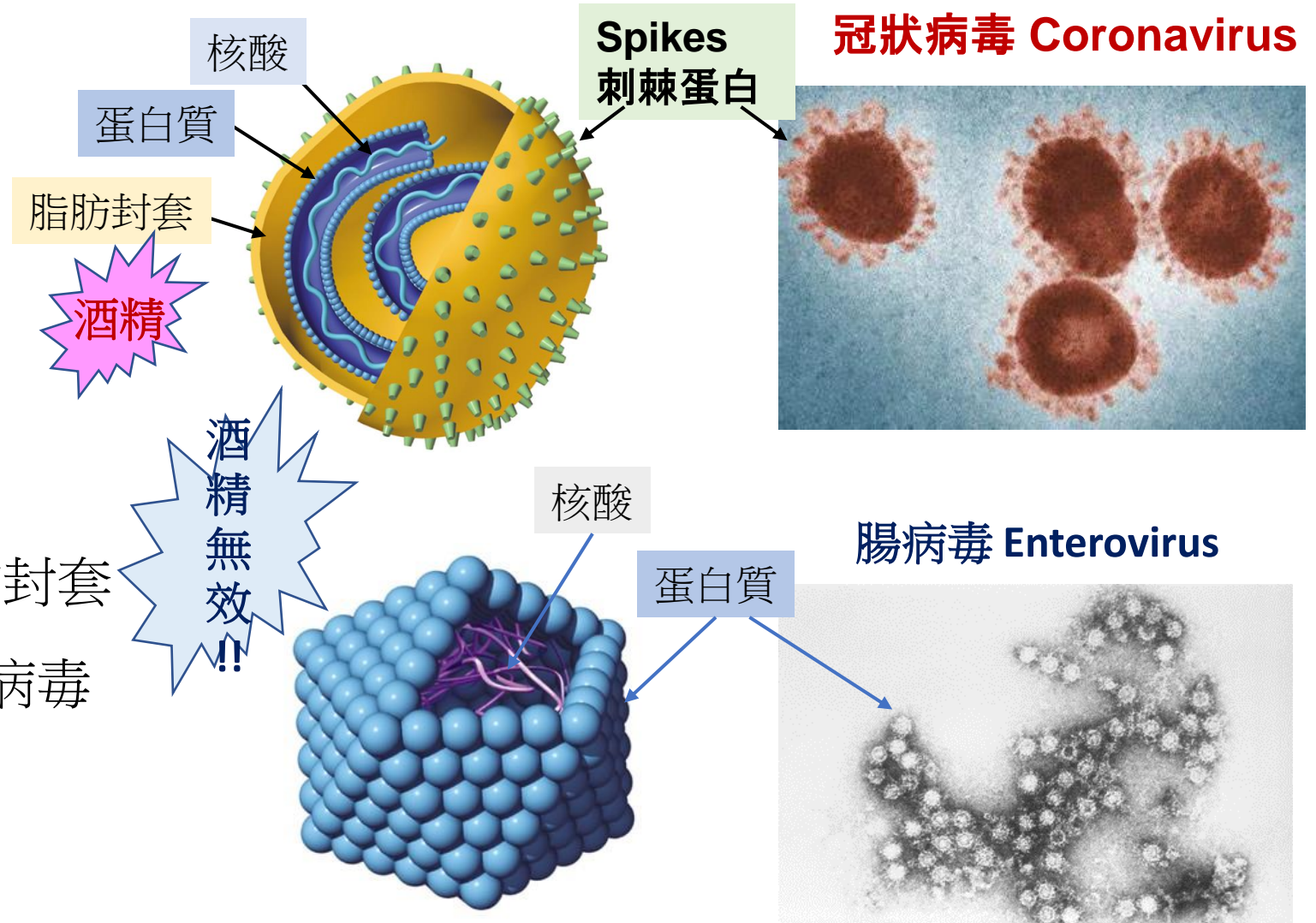
UV-RNA-damaging by dimer formation



病毒(Virus) 非細胞生物

- 20-300 nm (1 nm=10⁻⁹ m)
- 無完整細胞結構
- 需要細胞才能延續
- 病毒蛋白跟細胞表面蛋白有結合專一性

1. **套膜病毒**: 核酸 + 蛋白質 + 脂肪封套
新冠病毒 (COVID-19)、愛滋病毒
流行性感冒病毒(H1N1)
2. **無套膜病毒**: 核酸 + 蛋白質
諾羅病毒、腸病毒



危險群微生物與生物安全之對照表

危險群	生物安全等級	實驗室類型	實驗室操作規範	安全設備
第一級	第一等級 (P1)	基礎教學、研究	優良微生物學技術	無，開放式工作檯
第二級	第二等級 (P2)	初級衛生服務、 診斷服務、研究	優良微生物學技術 加上防護衣、生物 危害標誌	開放式工作檯加上防止氣霧 外流之生物安全櫃
第三級	第三等級 (P3)	特殊診斷服務、 研究	同第二等級加上特 殊防護衣、進入管 制及定向氣流	生物安全櫃及（或）其他所 有實驗室工作所需要之基本 防護裝備
第四級	第四等級 (P4)	具危險性病原體	同第三等級加上氣 密門、出口淋浴及 廢棄物之特殊處理	三級生物安全櫃或二級生物 安全櫃並穿著正壓防護衣、 雙門高壓蒸氣滅菌器（穿牆 式）及經過濾之空氣

目前位置：首頁 > 單位資料維護 > 實驗室/保存場所資料查詢

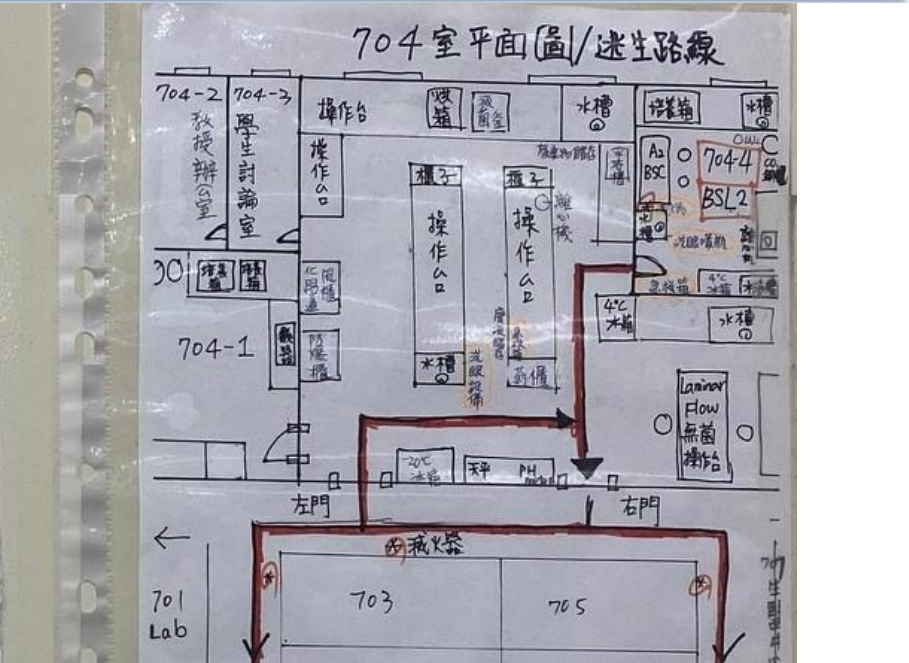
※查詢條件

設置單位全銜	<input type="text"/>	實驗室/保存場所所在縣市	全部
設置單位類別	全部	實驗室/保存場所生物安全等級	全部
實驗室/保存場所全銜	<input type="text"/>	實驗室/保存場所營運狀態	運作
實驗室/保存場所類型	全部	是否未定期回報	<input type="checkbox"/> 僅顯示未定期回報

查詢結果資料

設置單位全銜	實驗室/保存場所名稱	所在縣市	類型	生物安全等級	主管姓名	最近確認回報日期
中原大學	微生物及免疫學實驗室	桃園市	實驗室	BSL-2	陳怡寧	2020-04-17

10 第 1 頁共 1 頁



生物安全櫃(Biosafety Cabinet, BSC) vs. 無菌操作台

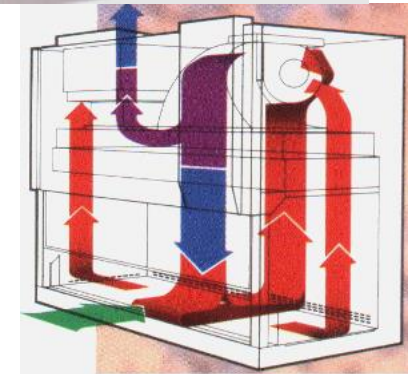
- BSC

- 利用乾淨之**負壓層流**空氣來隔絕其內部空氣外洩
- 主要目的：保護使用人及實驗室，順便保護產品

- 依防護效能：

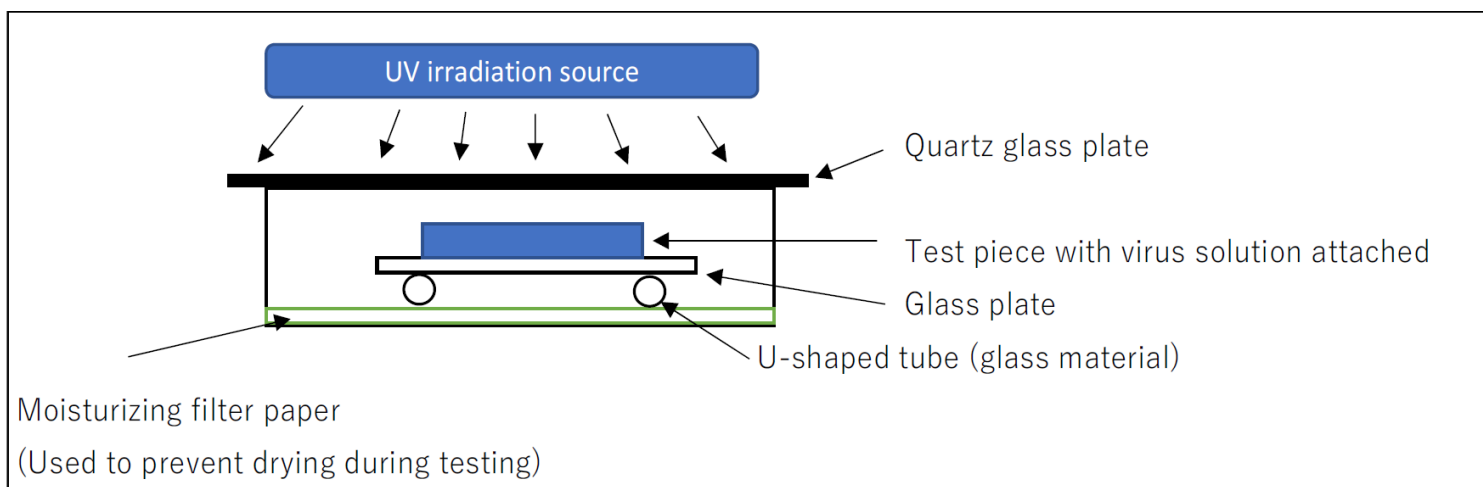
- Class I：不常見
- Class II：較常見
 - A. 應有NSF/ANSI 49-2007(美規)/BS EN 12469:2000(歐規)認證
 - B. 分類及效能排序：A1, A2(原B3), B1, B2
- Class III：生物安全等級第4級適用

- 正壓無菌操作台：保護產品，空氣會外洩



抗病毒檢驗方法與標準

- 歐盟標準NF EN 14476：器材表面消毒劑，洗手乳，熱 / 化學消毒法
若病毒的感染力經測試產品作用後降低 $4 \log_{10}$ 就具有抗病毒能力
- 美國標準ASTM E1053-97：環境表面消毒，洗手乳
若病毒的感染力經測試產品作用後降低 $3 \log_{10}$ 就具有抗病毒能力
- 日本標準JIS R 1706: 2013：光觸媒抗病毒能力測試



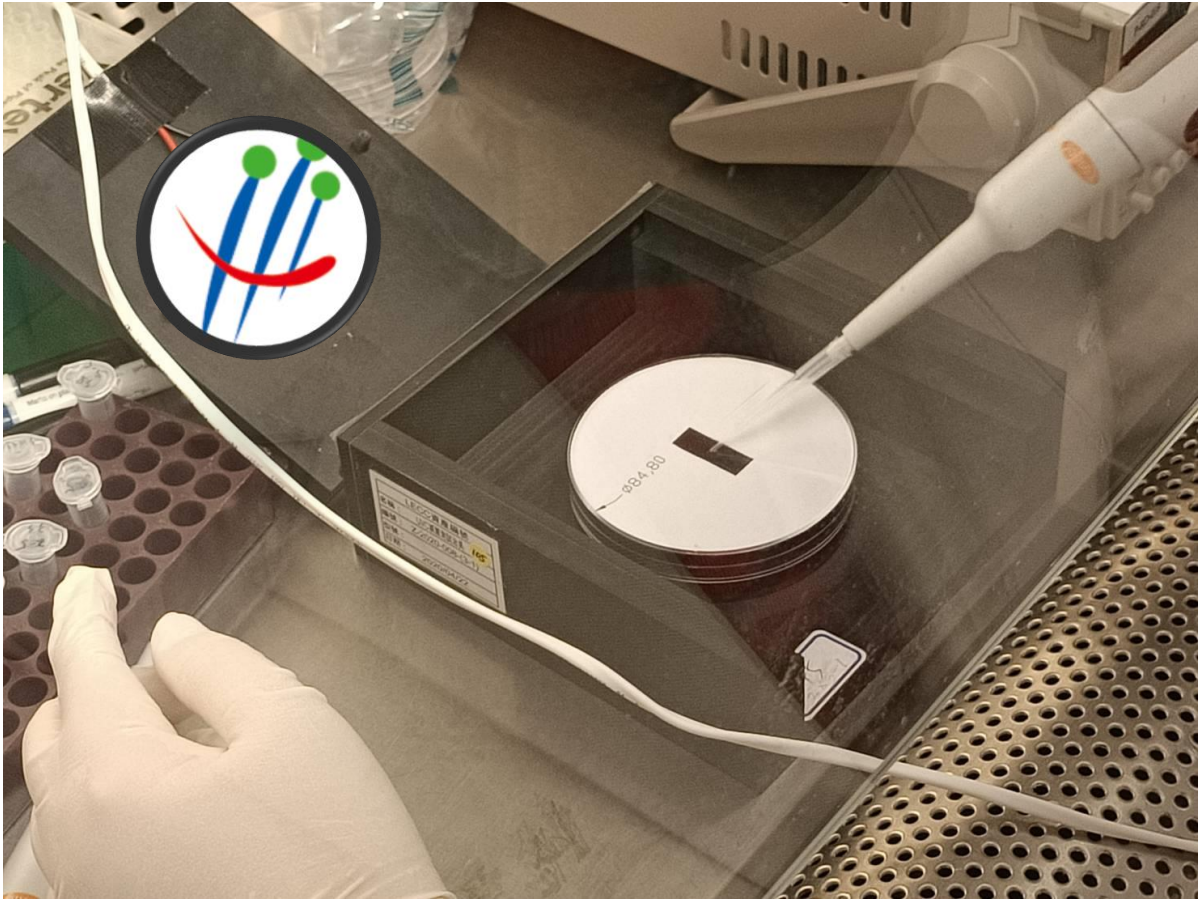
test sample	Irradiation conditions	Irradiation time	
		0 hours (initial)	4 hours(※)
Unprocessed product	Dark place	●	●
	Light irradiation	△	●
Catalyst processed product	Dark place	△	●
	Light irradiation	△	●

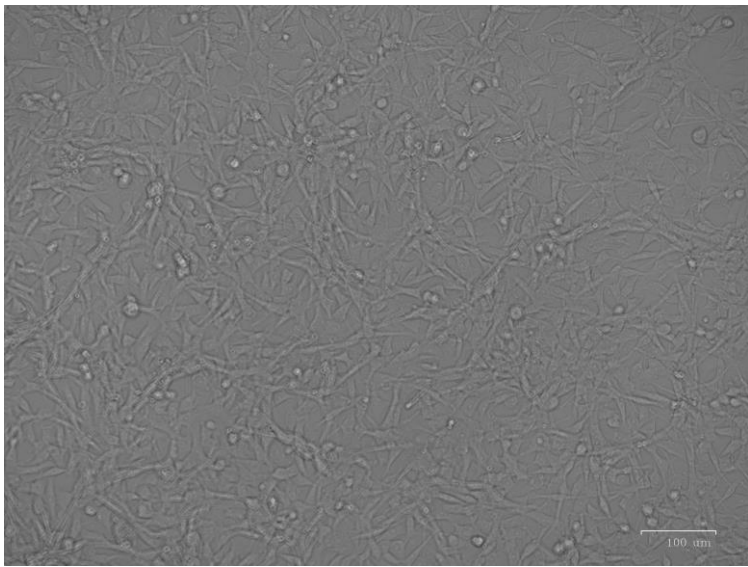
抗病毒試驗方法及標準

• 抗病毒試驗流程主要包含了五個部分：

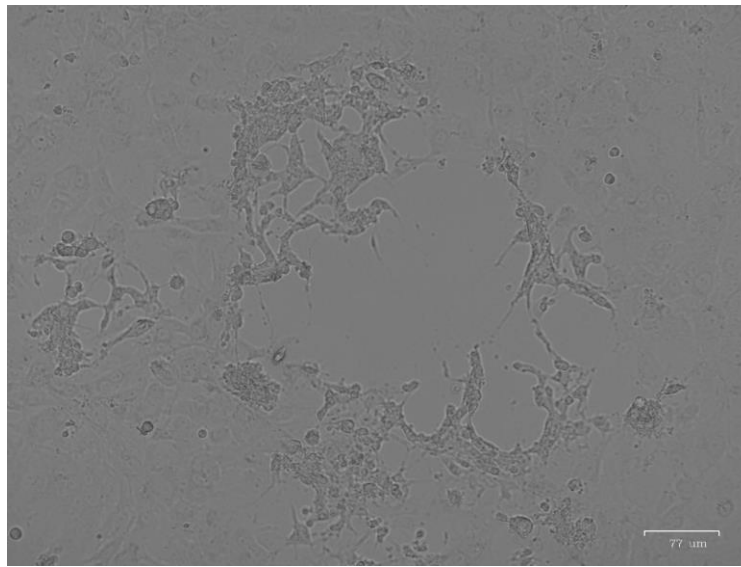
- 1、檢體前處理：檢體清潔及消毒。
- 2、**病毒增殖用細胞製備：細胞增生及數量準備。（成本最高）**
- 3、試驗病毒液製備：病毒增殖及試驗病毒液懸浮液調製。
- 4、試驗病毒液作用：依標準方法將試驗濃度的病毒液與測試產品依測試條件進行要求的作用時間。
- 5、測試病毒感染力：檢測試驗組及對照組作用完後的病毒液感染細胞的能力。
- 6、抗病毒能力效能評估：計算病毒力價及病毒抑制率以推演出抗病毒效能。

在生物安全櫃內進行抗病毒能力測試

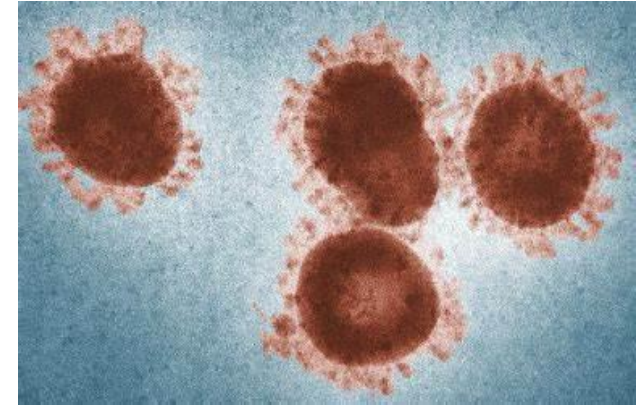




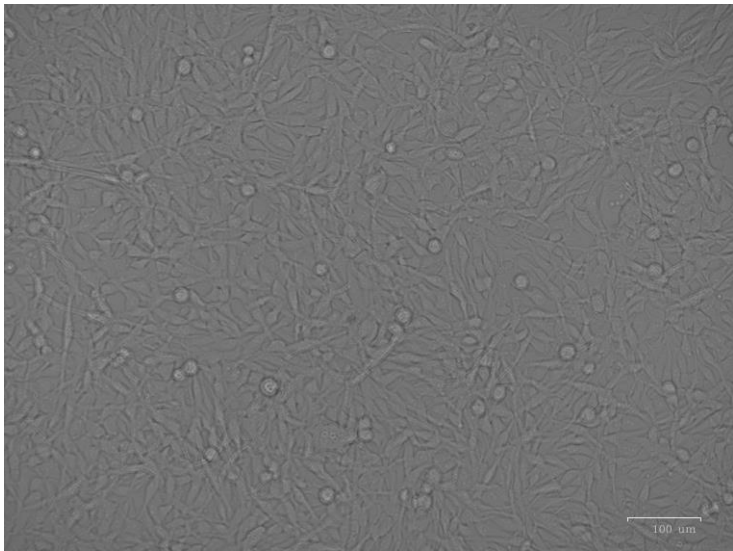
➤ 未感染冠狀病毒的細胞



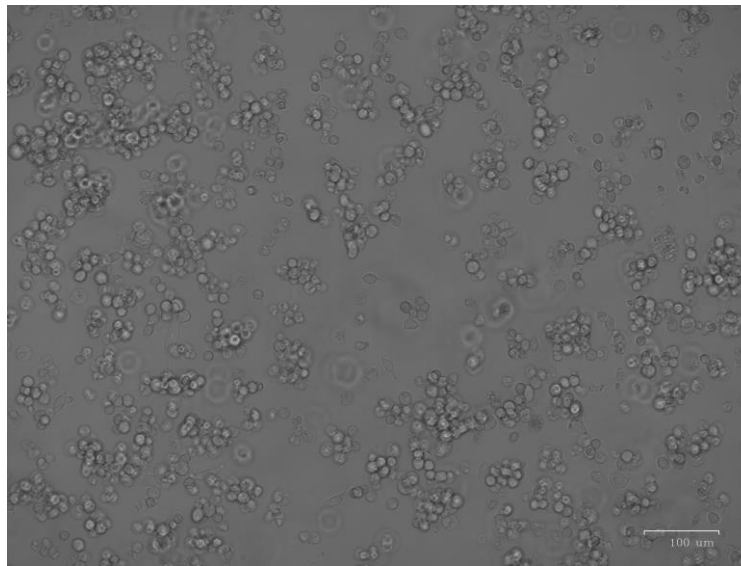
➤ 感染冠狀病毒的細胞



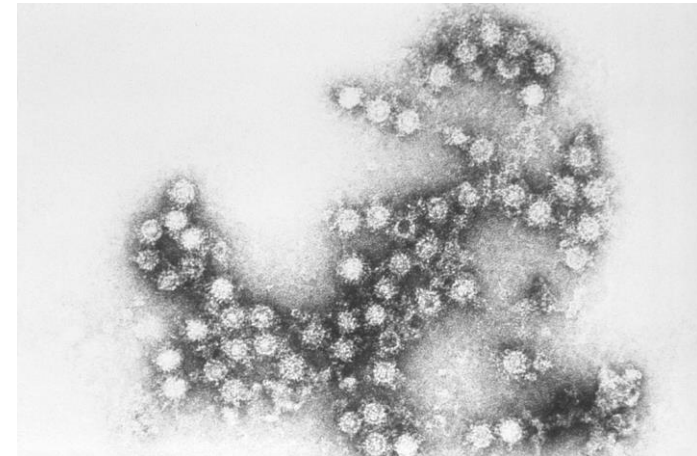
➤ 冠狀病毒的電顯圖



➤ 未感染腸病毒的細胞



➤ 感染腸病毒的細胞

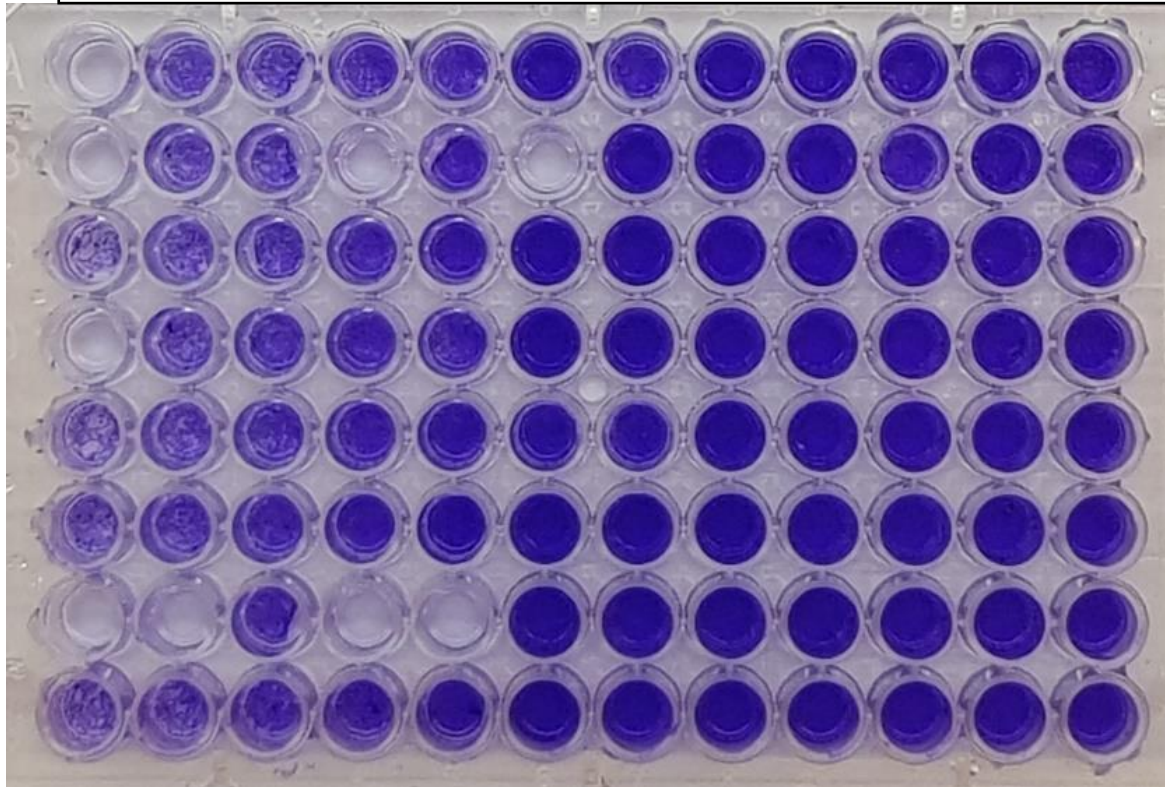


➤ 腸病毒的電顯圖

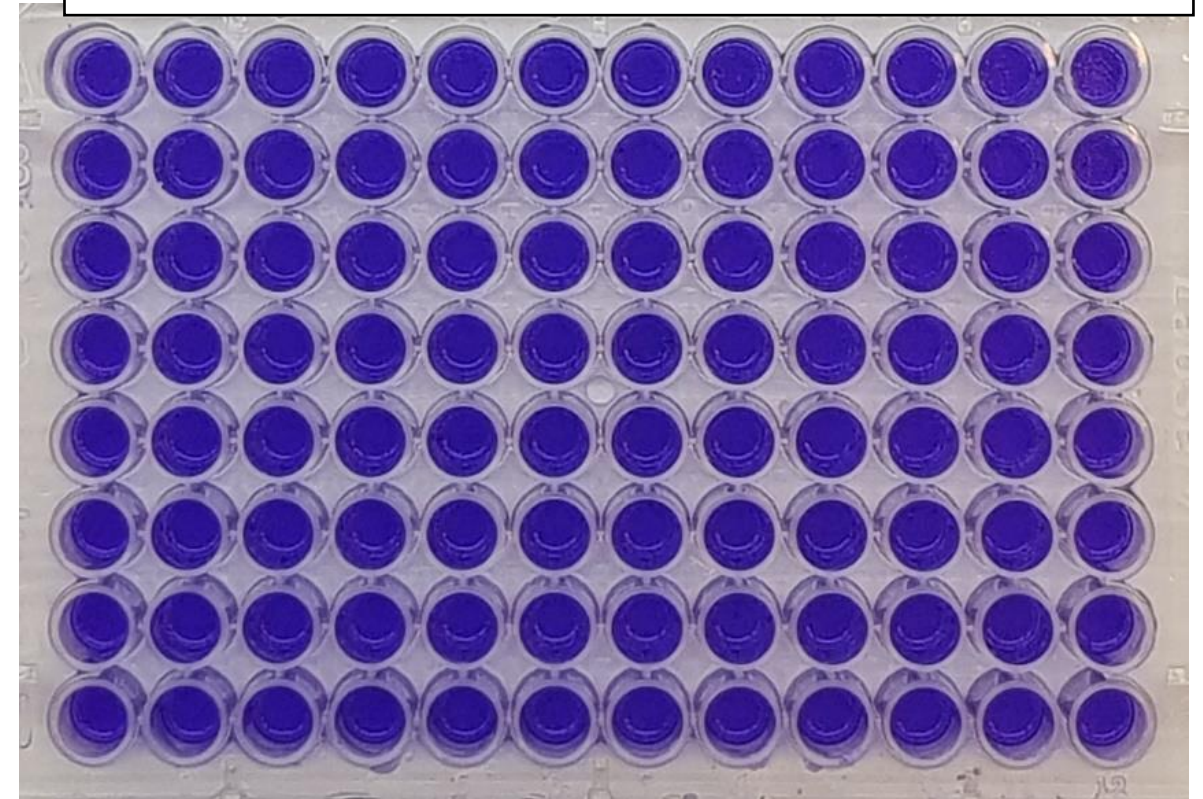
➤ 未處理的冠狀病毒: $TCID_{50}=10^{4.67}$

➤ UV C 處理 3秒, $TCID_{50}=0$

1×10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} 10^{-10} NC



1×10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} 10^{-8} 10^{-9} 10^{-10} NC



$TCID_{50}$: 病毒感染細胞後，導致50%細胞死亡或病變的最高病毒稀釋度

計算

- **TCID₅₀計算方法：**

$$\text{Inhibition\%} = \frac{[\log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml of virus}) - \log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml of treatment})]}{\log_{10}(\text{TCID}_{50}/\text{ml of virus})} \times 100\%$$

- **抑制率計算方法：**

$$\text{Infectivity\%} = \frac{\text{number of well with virus-infected cells}}{\text{number of wells with virus-inoculated cells}} \times 100\%$$

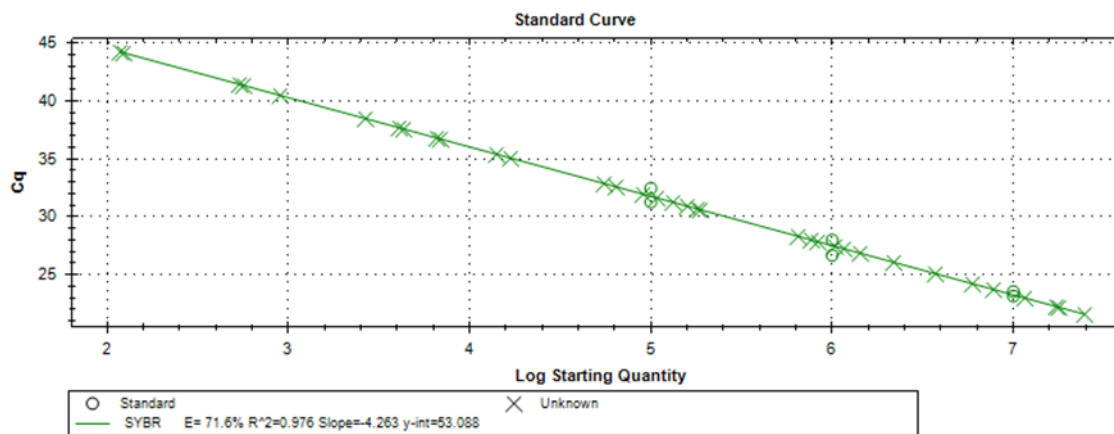
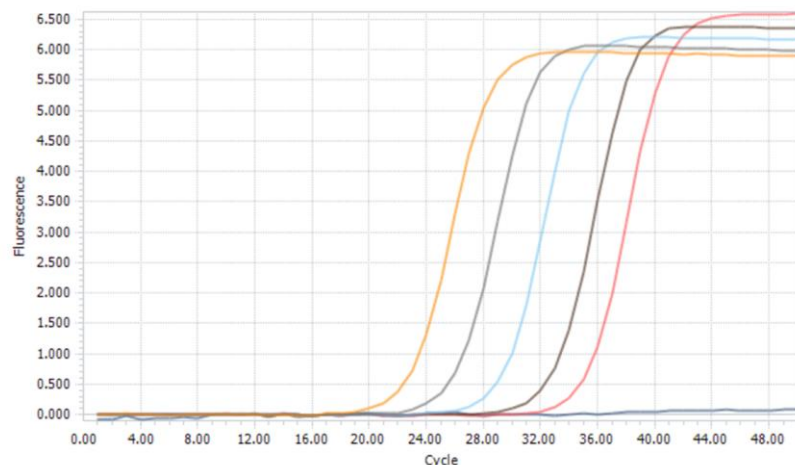
UV C 作用3及8秒具抗冠狀病毒及腸病毒能力

測試條件 (TCID ₅₀)	重複 1	重複 2	平均	減少病毒力價 (log10)	病毒抑制率 (%)
冠狀病毒 FCoV	10 ^{3.4}	10 ^{3.57}	10 ^{3.49}		
UV C, 3 秒	0	0	0	3.49	100 %
UV C, 8 秒	0	0	0	3.49	100%
腸病毒 EV71	10 ^{3.8}	10 ⁴	10 ^{3.91}		
UV C, 3 秒	<1	<1	<1	3.91	100 %
UV C, 8 秒	0	0	0	3.91	100%

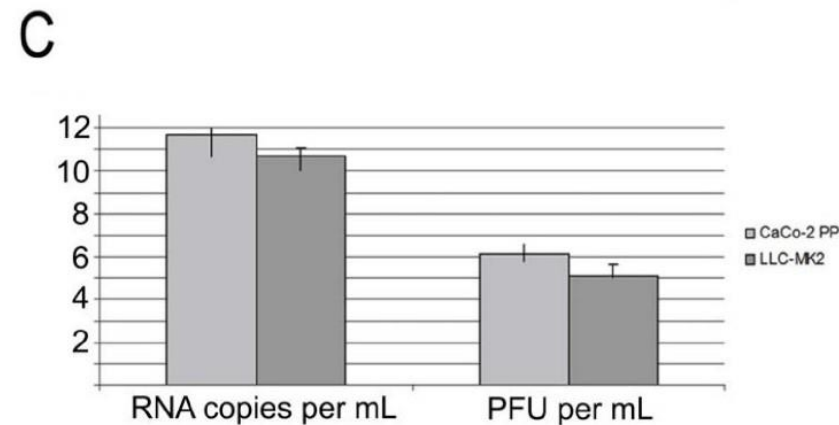
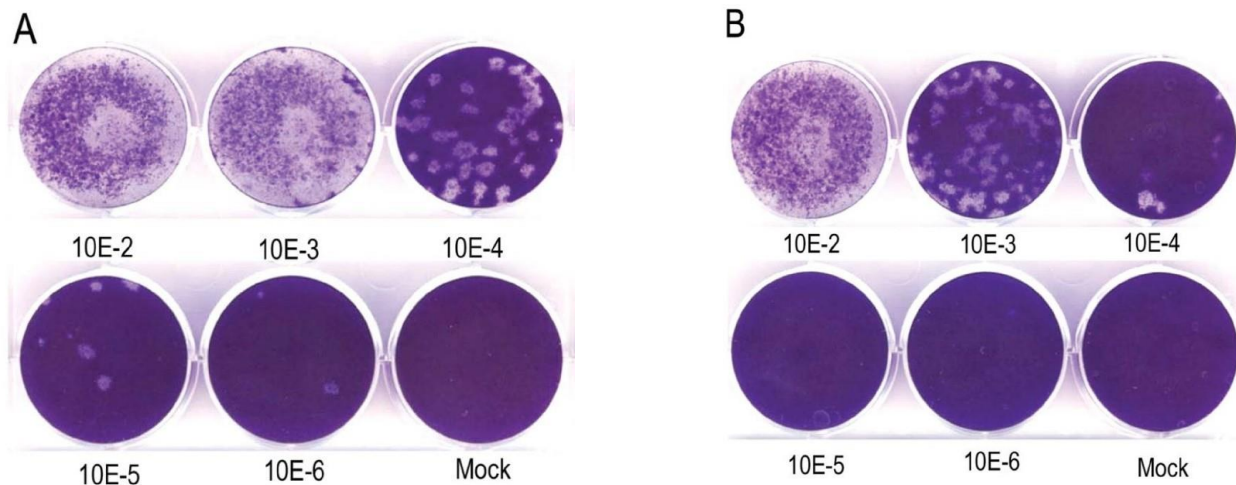
其他病毒定量的方法

- 即時定量聚合酶連鎖反應：樣本收集，核酸萃取，上機反應

Amplification Curves



- 病毒斑定量：準備細胞，連續稀釋測試後的病毒液進行感染，細胞染色

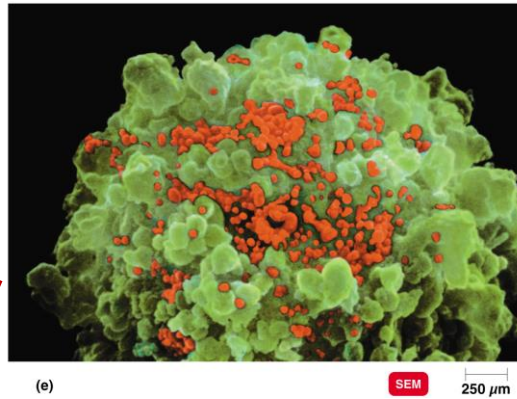


生物分類

微生物

- 非細胞生物

- 病毒



感染人類淋巴球的HIV病毒，造成愛滋病

→ 綠色的是淋巴球

→ 橘色的小很多很多的病毒

- 原核生物

- 古細菌域 (Archaea)

- 真細菌域 (Eubacteria)



細菌(桿菌)會造成疾病，
食物中毒及腐敗

- 真核生物(真核域)

- 真菌界 (Fungi)

- 原生生物界 (Protista或Protoctista)

- 類似植物的藻類 (Photosynthetic (plant-like) protists : algae)

- 類似菌類的原生菌類 (absorptive(fungus-like)protists，無特別名稱)

- 類似動物的原生動物類 (ingestive (animal like) protists : protozoa)

- 植物界 (Plantae)

- 動物界 (Animalia)

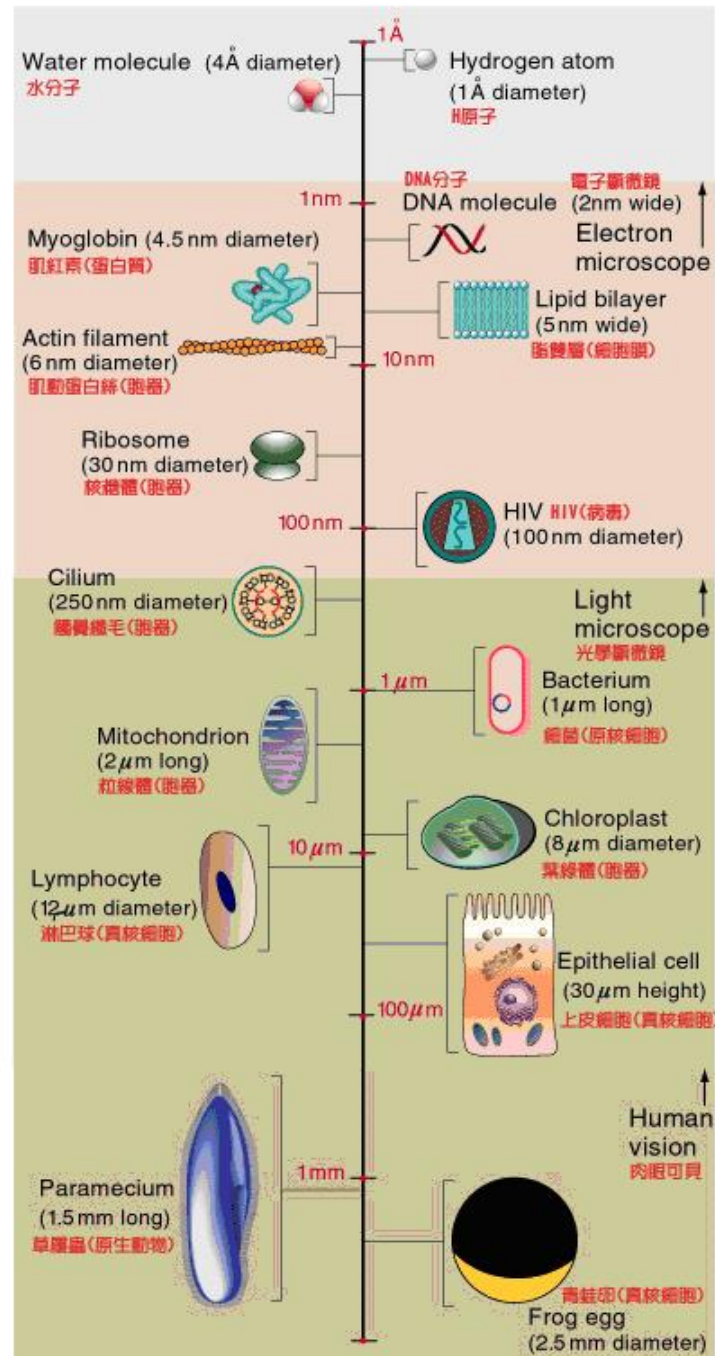
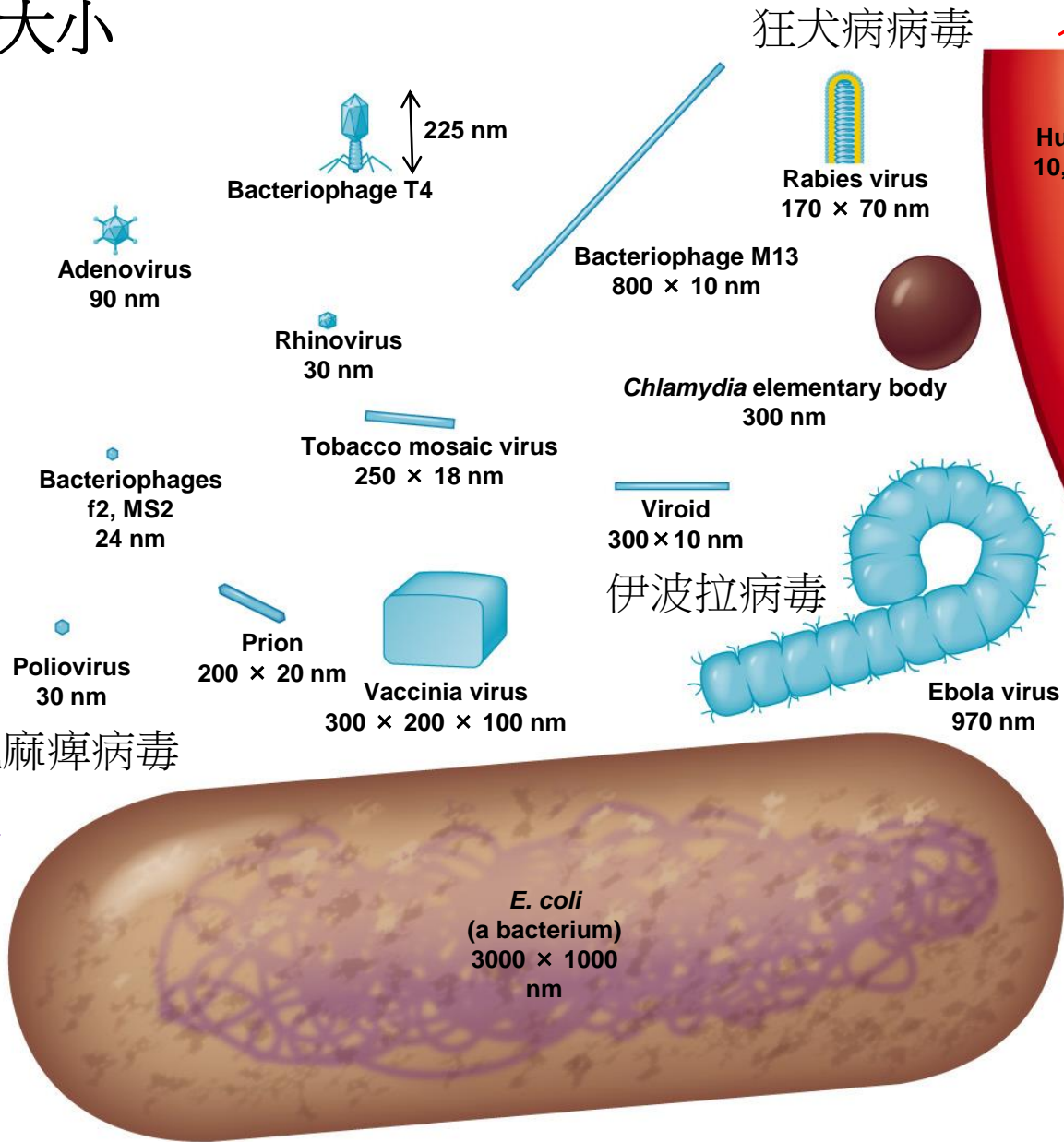


黴菌會造成食物腐敗，
產生的毒素會造成疾病

微生物與人類細胞的相對大小

人類紅血球

小兒麻痺病毒
大腸桿菌



抗菌試驗方法及標準

- 公平交易委員會曾針對商品宣稱具有防黴、抗菌效果，疑涉虛偽不實，判罰製造廠商及協助製播廣告、販售之通路商罰鍰，以此為鑑，產品之抗菌防黴功效並非隨意可宣稱及標註使用的，必需經由公正單位制訂方法，並由專業可信賴的實驗室進行抗菌試驗評估而得之。
- **抗菌**：抑制微生物之發生成長或繁殖。能在一定時間內，使微生物（包含細菌）的生長或繁殖保持在必要水平以下之化學作用。
- **殺菌**：殺死微生物
- **滅菌**：殺滅或除去所有微生物
- **制菌**：阻礙或抑制特定微生物的繁殖
- **消毒**：消滅具特定病原性之微生物，並未殺死所有微生物
- **除菌**：去除微生物
- **靜菌**：阻礙或阻止微生物的增殖

抗菌試驗方法及標準

- 常見檢驗方法有 JIS、AATCC、ASTM、ISO 與 CNS，不同的檢體型態各有其適用之檢驗方法
- 抗菌試驗流程主要包含了五個部分：
 - 1、檢體前處理：檢體清潔及消毒。
 - 2、試驗菌液製備：菌株活化及試驗菌株懸浮液調製。
 - 3、試驗菌液接種：依試驗文獻接種菌液體積及符合培養條件。
 - 4、檢測步驟：檢測試驗組及對照組所殘留之菌量。
 - 5、抗菌效能評估：經由殘留菌量推演出抗菌效能。

抗菌試驗菌株種類及材料對照表

	固體_硬材	固體_紡織品	液體
細菌	JIS Z 2801 ^a ASTM E2149-13a ^a	AATCC 100 ^a AATCC 147 ^b JIS L 1902 ^c ASTM E2149-13a ^a ASTM E2315 ^a	ASTM E2111:12 ^a
黴菌	ASTM G21 ^b JIS Z 2911 ^b	CNS 2690 ^b	ASTM E2111:12 ^a

a. 定量試驗方法，利用培養前後菌數之差異計算抗菌率。

b. 定性試驗方法，觀察菌絲生長面積或抑制情形。

c. 具有定量及定性試驗流程。

台美檢驗公司

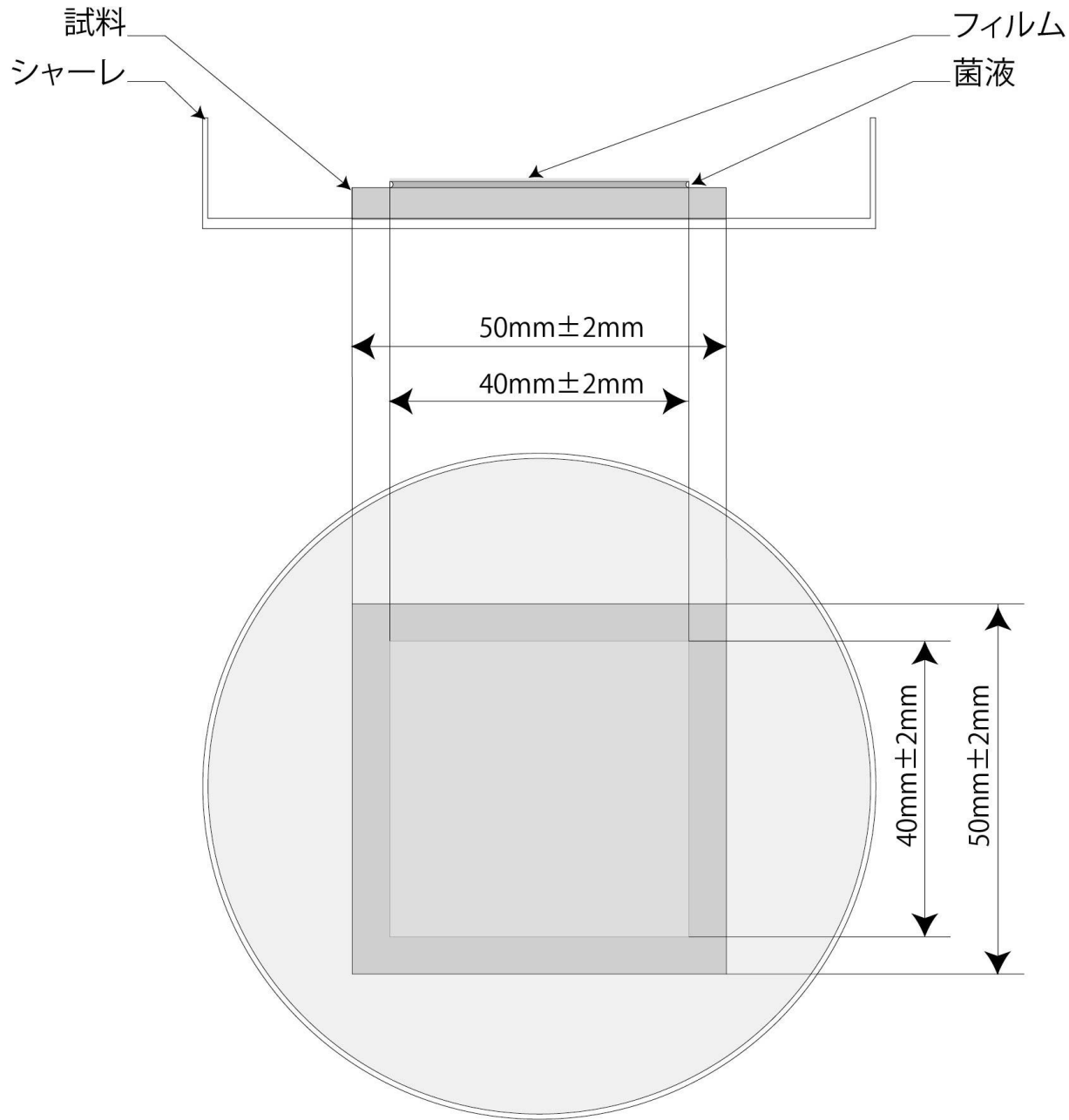
<https://www.superlab.com.tw/anti-bacterial-mould/>

JIS Z2801: 2010 及 JIS L 1902: 2015 試驗方法比較表

方法	JIS Z2801: 2010 (薄膜密著法)	參考 JIS Z2801: 2010	JIS L1902 定性	JIS L1902 定量
檢體種類	不吸水製品 (玻璃、金屬、塑膠及陶瓷等製品)	固、液體皆可	紡織品	紡織品
試驗菌株	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538P) 2. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	依指定	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352) 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027) 4. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) 5. Methicillin resistant <i>S. aureus</i>	
作用時間	24 ± 1 小時	依指定	無	18 ± 1 小時
菌量濃度 (CFU/mL)	$2.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$	$2.5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$	$10^6 \sim 10^7$	$1 \sim 3 \times 10^5$
執行重複次數	立即沖刷組及 反應後各三重複	一重複	反應後三重複	立即沖刷組及 反應後各三重複
檢體規格 (單一菌株)	5 × 5 cm 正方形	液體 20 mL	28 mm 圓片	0.4 g
操作方法	混稀法	塗抹法 計數範圍 25 ~ 250 CFU/mL	--	塗抹法 計數範圍 25 ~ 250 CFU/mL

ASTM E2315-03: 2008、AATCC 100: 2012及ASTM E2149-13a: 2015 方法比較表

方法	ASTM E2315-03 : 2008	AATCC 100:2012 (紡織品抗菌程序)	ASTM E2149-13a : 2015
檢體種類	體外試驗之檢體	紡織品	紡織品、紙張、粉粒狀以及其他檢體
試驗菌株	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352) 3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 9027) 4. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739)	1. <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538) 2. <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 4352)	1. <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8793)
作用時間	18 ~ 24 小時	18 ~ 24小時	60 分鐘
菌量濃度 (CFU/mL)	10 ⁶ 以上	1.0 ~ 2.0 × 10 ⁵	1.5 ~ 3.0 × 10 ⁵
執行重複 次數	立即沖刷組及 反應後各三重複	立即沖刷組及 反應後各二重複	立即沖刷組及 反應後各三重複
檢體規格 (單一菌株)	48 mm 圓片	48 mm 圓片	紡織品、紙張、粉粒狀材料秤取 1.0 ± 0.1g 其他固體裁切成面積 25.8 cm ² (長、寬皆為 5.08 cm) 之正方形
操作方法	塗抹法 計數範圍 25 ~ 250 CFU/mL	塗抹法 計數範圍 25 ~ 250 CFU/mL	塗抹法 計數範圍 30 ~ 300 CFU/mL



JIS Z 2801:2010

Antibacterial products-

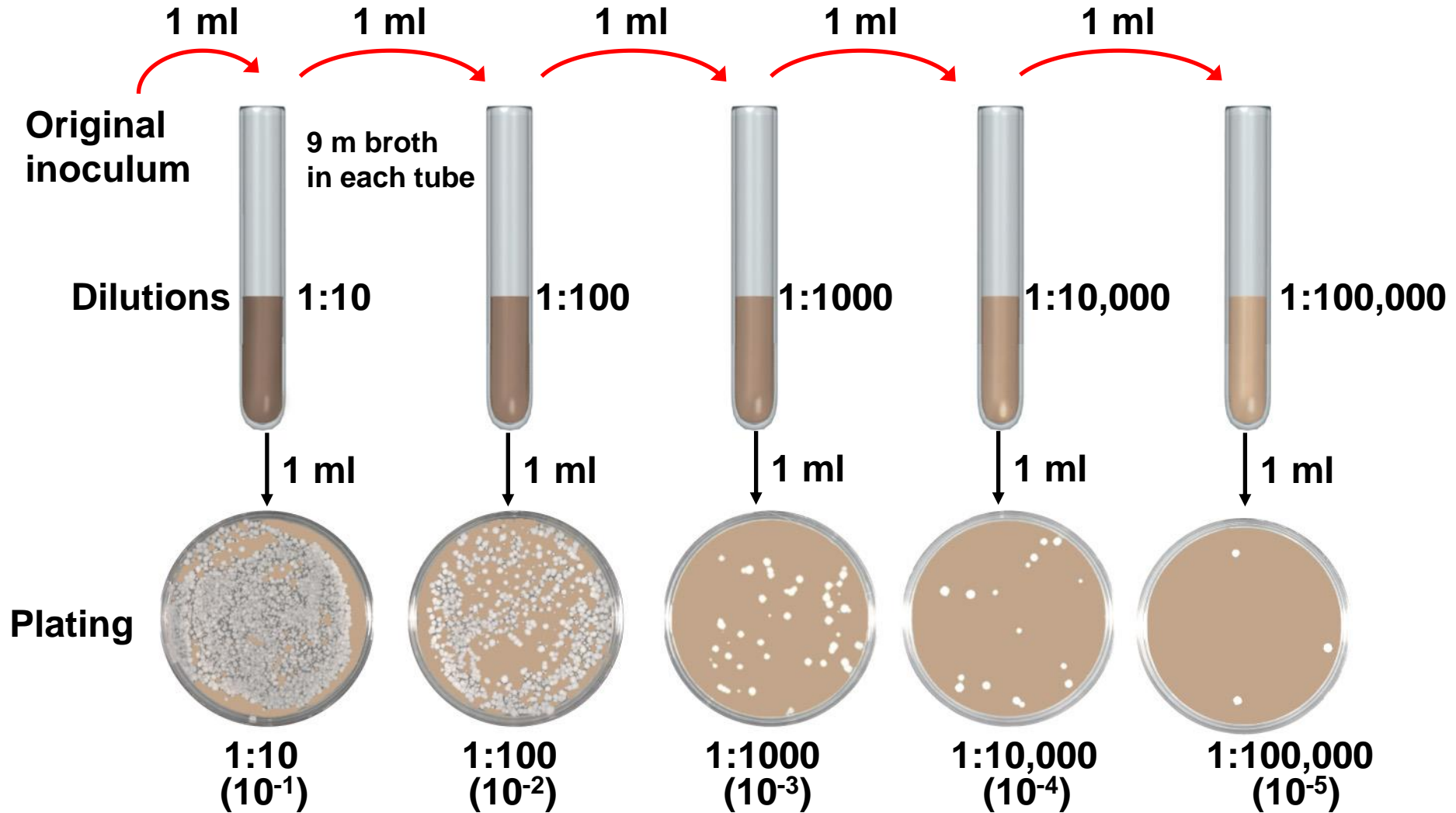
Test for antibacterial activity and efficacy

Bacterial suspension on Test Plate

→ Time, Concentrations

→ Collect suspension for CFU

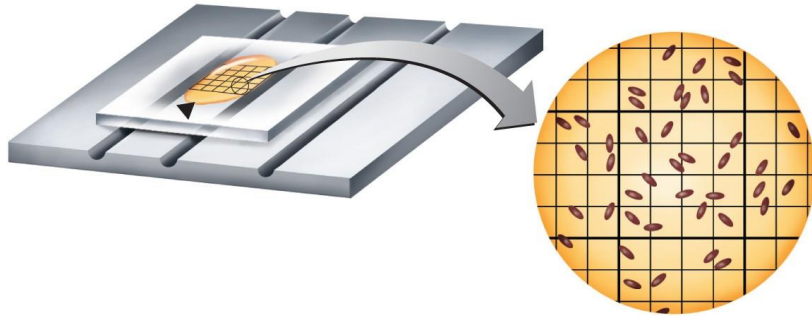
Serial dilutions and plate counts.



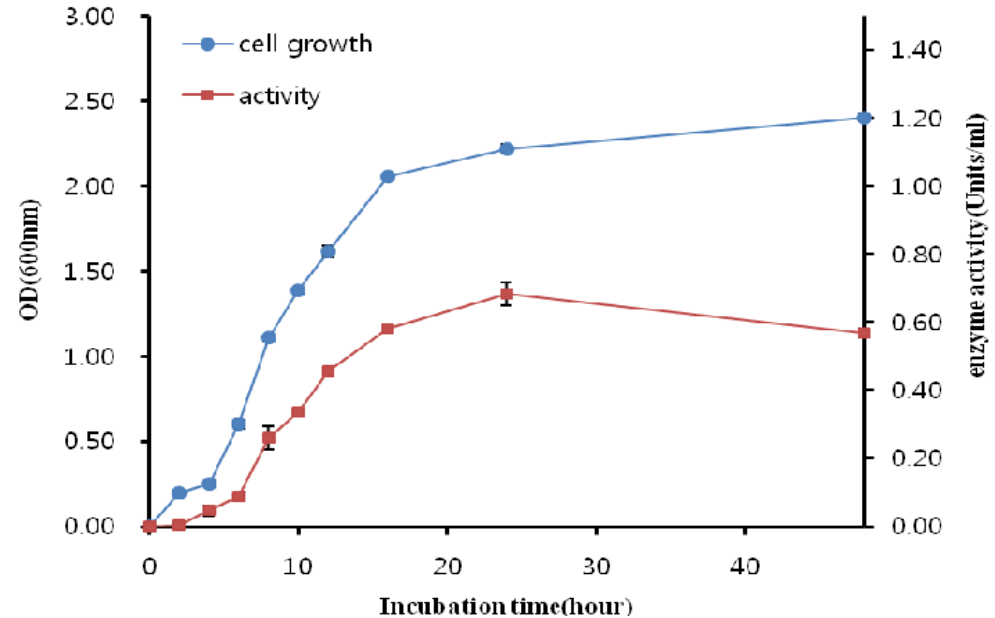
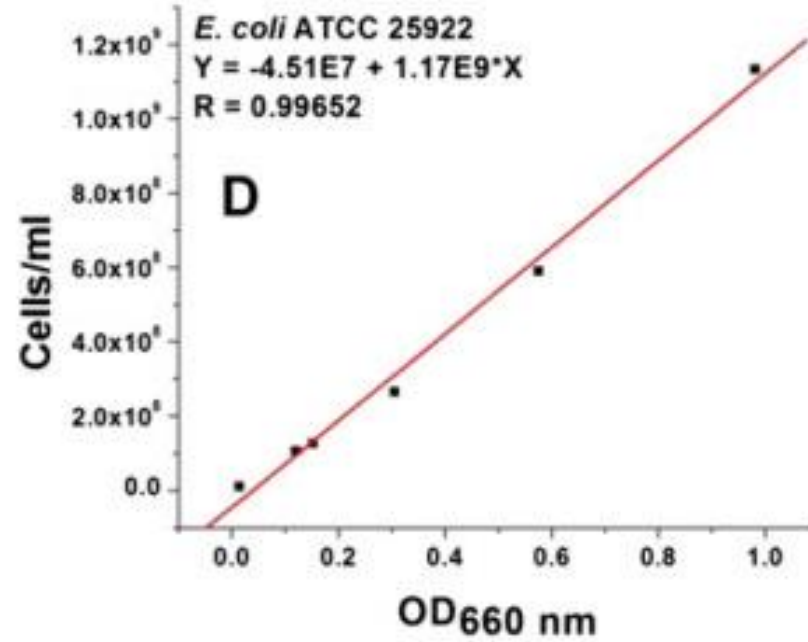
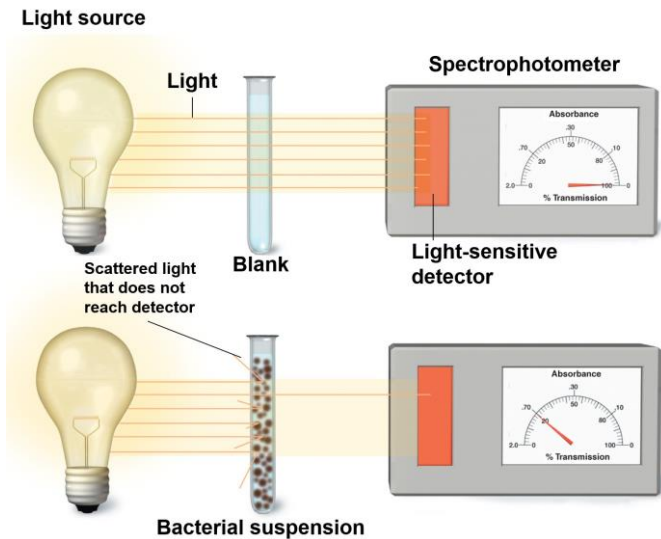
Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 54 colonies are on a plate of 1:1000 dilution, then the count is $54 \times 1000 = 54,000$ bacteria/ml in sample.)

其他細菌定量的方法

- 顯微鏡直接計數法：



- 吸光值估算法：





THANK YOU