

醫院中環境微生物監測 的檢驗方法介紹

黃愛惠

成功大學醫學院附設醫院 病理部

前 言

醫院環境微生物監測的目的主要在於藉著平日資料的收集加以統計與分析，以便了解感染發生之狀況，同時在流行之初得以迅速控制甚至杜絕其發生。監測的方法依測定目的的不同而有不同，如欲知飲用水之檢體是否遭受糞便污染，可採用 MPN 多管發酵法測其大腸桿菌類的含量，並測其總菌落數；對使用血液透析液、奶水、奶粉及飲用水等，可以總生菌數測定檢體中的總菌落量；注射液、供應中心的無菌製劑則可採用過濾法得到較準確的檢驗結果；呼吸管路、潮濕瓶、餐具等無法以上述方法測定之檢體可考慮使用管道浸潤法及棉棒沾濕採檢法等。

測定方法

一、多管發酵法

測定方法可分為假設性，確定及完全試驗三個階段。第一階段假設性試驗：是將水檢體進行各種稀釋，然後加到 lactose broth（內含杜蘭氏管 Durham tube）內，於 35 °C 培養 24 - 48 小時，若 lactose 被發酵產生氣體，將被

收集在杜蘭氏管內，此為陽性反應。第二階段確定試驗：將第一階段呈陽性之 lactose broth 取一個接種環，轉接種至 brilliant green lactose bile broth (BGLB) 含杜蘭氏管內，亦經 35 °C 培養 24 - 48 小時，若杜蘭氏管內仍有氣體，則確定試驗可判讀為陽性。第三階段完全試驗：自第二階段呈陽性之 BGLB 管內取一個接種環，轉接種至 eosin-methylene blue agar (EMB)，35 °C 培養 24 - 48 小時後有金屬光澤且在革蘭氏染色呈陰性桿菌，不帶內生性芽胞者視為大腸桿菌群。最後將確定為大腸桿菌群的試管數，依稀釋濃度的不同分別記錄下來，利用查表或以計算方式取得 MPN 值。此法可應用於欲知水質是否受大腸菌類污染之檢驗，如飲用水、奶粉及廢水等。

二、總生菌數檢查

在於測定水污染的程度。其定義為 1 mL 的檢體在一般的培養條件下，含有可計數的菌落量。最常使用的測定方法有標準平板法，其方法為：取 1 mL 水檢體放入空的、無菌的培養皿內，再將已配製好且冷卻至 45-50 °C 之培養基倒入培養

皿內，混合均勻，待冷卻凝固後置於 35 °C 溫箱內培養 48 小時，再計算菌落數，此種測定法常用於飲用水、奶粉及血液透析液之細菌含量測定。

三、過濾法

常用於無菌製劑或含菌量少的檢體，但近來亦有人建議以此種方式取代 MPN 及總生菌數之測定法，其步驟：將 100 mL 的水檢體直接通過 0.2 μm 或 0.45 μm 之濾膜後，再將此濾膜移至適當的培養基上，於 35 °C 溫箱內培養 48 小時，再計算菌落數。

四、管道浸潤法

預先配製好液體培養基，如 thioglycollate broth，然後以無菌技術將其倒入欲測試之管道內，來回搖盪數次後，再將其倒回試管內，放入 35 °C 培養箱內培養，第二天次培養至 typticasesoy agar with 5% sheep blood/eosin methylene blue agar (BAP/EMB) 或其它適當之培養基內，第三天再加以判讀及鑑定。

五、棉棒沾濕採檢法

與管道浸潤法一樣，預先配製好液體培養基，以棉棒沾濕液體培養基後，來回擦拭欲測試的器械或物品，再將棉棒插回試管內並將手持部份折斷，於 35 °C 培養箱內培養，第二天次培養至 BAP/EMB 或其它適當之培養基內，第三天再加以判讀及鑑定。

六、滅菌鍋生物測試

滅菌鍋的效能測定是醫院環境監測中另一個重要的課題，因為供應中心經常提供院內各單位無菌物品，如開刀房使用之

無菌布包、無菌棉棒、無菌生理食鹽水、無菌棉球，開刀器械之用前、用後滅菌等，或是醫院內各單位產生之感染性廢棄物等都需使用滅菌鍋，因此滅菌鍋的效能必須經常測試。在醫院內最常使用的滅菌方式有兩種，一種為高溫高壓蒸氣滅菌法，另一種則為氧化乙烯氣體滅菌法，但近來又多了過氧化氫電漿滅菌法，其測試方式均分為機械性、化學性、以及生物培養測試法等，其中以生物培養測試法為最可靠的滅菌監視系統，惟需注意的是高溫高壓蒸氣滅菌法及氧化乙烯氣體滅菌法二者所使用的菌種不同，前者為嗜熱桿菌 (*Bacillus stearothermophilus*)，培養溫度為 56 °C，後者為枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*)，培養溫度為 35 °C，過氧化氫電漿滅菌法則兩者都可使用，但一般還是使用枯草桿菌。

七、空氣採樣測定

當醫院懷疑有群突發或已經發生群突發時，環境空氣的檢查及手部微生物檢查有時是不能避免的。目前較常使用的環境空氣的測定方法有平板曝露法及空氣菌落取樣測定法兩種。A. 平板曝露法是將數個培養皿放置於欲測試的房間，放置 30 分鐘後，將培養皿放入 35 °C 溫箱內培養 18-24 小時，計算菌落數，並將可疑菌落做進一步鑑定，此種方法的優點為方便、容易操作且便宜，缺點則是無法定量、收集之空氣量少，代表性較低。B. 空氣菌落取樣機測定法則是將特殊規格之培養皿置於空氣採樣機內，再依測定環境的清潔度，於設定時間內吸入一定量之空氣，然後將培養皿放入 35 °C 溫箱內培養 18-24

小時，計算菌落數，並將可疑菌落做進一步鑑定，此種方法的優點為可定量，吸入之空氣量多，代表性高，缺點則是儀器價格昂貴。

八、手部微生物檢查

作法之一可依棉棒沾濕採檢法---取得檢體後立刻與液體培養液混合均勻，並取 1 mL 之混合液加 9 mL 的水做 10 倍稀釋，再由原液及 10 倍稀釋之溶液中各取 1 mL，置於無菌塑膠培養皿內，再倒入 20 ml 冷卻至 50 °C 之培養基，經冷卻凝固後置於 35 °C 溫箱內培養 48 小時，再判讀可疑菌落。另一作法則可先泡製好一定量之液體培養基置於無菌袋內，令欲測試人員於其袋內洗手，再由此液體培養基分別取 0.1 mL 及 1 mL 置於無菌塑膠培養皿內，其餘做法與上述方法相同。

結果判讀

血液透析液微生物含量

依美國疾病防制中心 (CDC) 之訂定標準為：調配透析用水---每毫升所含菌落數應小於 200，流出透析器的透析液---每毫升所含菌落數應小於 2000。

滅菌鍋之滅菌測試

依美國疾病防制中心 (CDC) 於 1985 年之建議為：機械性測試法及化學性測試法於每一次滅菌週期需測定一次，生物培養測試法則每週測試一次即可。

飲用水檢體

依中華民國八十三年六月“飲用水管理條例及其台北市施行細則”之規定---大腸桿菌群之最大容許量為 6.0 (濾膜

法，個 / 100 毫升) 單一個；生菌數之最大容許量為 100 個 / 毫升。

嬰兒奶粉

依中央標準局---總生菌數應少於每毫升 5×10^4 個，大腸桿菌陰性，且不得含有金黃色葡萄球菌、B 族鏈球菌、致病性大腸桿菌等致病性細菌。

靜脈留置針

應小於 15 個菌落數。

呼吸器、空氣採樣測定、手部檢體、餐具

一般不建議定期測試，唯有在第一次建立標準值或懷疑有群突發時才須測試，因此其標準值可依各醫院要求或目的而訂定。

群突發菌種之確定試驗

事實上，在群突發時，除了尋找感染源外，也需了解分離出的感染菌是否為同一菌種，目前有以下七種方法：生物型 (biotype)、微生物的抗藥性型式 (antibiogram)、血清分型 (serotype)、噬菌體型 (phage typing)、殺菌素型 (bacteriocin type)、質體分析 (plasmid analysis) 及限制酵素分型 (restriction enzyme analysis) 等方法。生物型並非一個穩定的遺傳性質，它可能受到環境條件、胞漿和其他天然或非天然因素的干擾；微生物的抗藥性型式則可受微生物範圍及環境因素或胞漿有關的抗微生物劑感受性而有所改變；血清分型雖然性質較為穩定，但會受微生物的操作方式、噬菌體和胞漿的影響，且因試劑種類繁多，製備不易，價錢昂貴，因此不常被使用；噬菌

體型、殺菌素型則因取得不易及品管不易執行，也不常被使用，因此，目前被認為可實行且值得信任的還是屬於質體分型及限制酵素分型兩種。但因為質體內的基因會因環境或宿主體內其它菌株的影響而改變，因此變異性較大，甚至有些菌株並不含質體，更不可能以此方法測得；傳統限制酵素分型因操作方法較為麻煩，得到的圖譜較為複雜因此不易判讀，近年來利用往復式電泳法 (pulse field gel electrophoresis) 來分離大分子 DNA 的技術以及隨意引子聚合酶反應 (AP-PCR)，已廣泛的被用來做流行病學調查。此兩種方法操作簡單且容易判讀，對院內感染之調查提供莫大的幫助！

結 論

由於醫院環境的檢體種類繁多，雖然都有可能直接或間接的造成感染，但在 1970 年代美國疾病防治中心、美國公共衛生協會、美國醫院協會及其他學者經一連串的研究評估認為環境表面、空氣、呼吸治療裝製之消毒效果、嬰兒奶粉與奶水之微生物含量測定的培養結果與病患或工作人員的感染缺乏直接的相關性，因此建議當有群突發時才測試。至於血液透析液的微生物含量，則因革蘭氏陰性桿菌可以在水中及其他與血液透析系統有關的溶液中快速增長，當細菌數量多時，容易造成洗腎病人的致熱反應或是菌血症，因此建議須每個月測試一次。

感染管制的工作需要醫師、醫檢師及感染管制護理人員的專業知識，方能達到時時監測、適時預防及有效控制的目的。

因此，感染管制人員必須熟悉各項環境採檢之原則、正確的採檢方法、結果的判斷與熟知微生物的特性與分佈，方能於感染流行之時，立即掌握可能來源並加以控制甚至撲滅，才能使病患於治療期間得以安心無慮！

參考文獻

1. Patrick R. Murray, Elle Jo. Baron, Michael A. Pfaller, et al: Laboratory procedure for epidemiologic analysis, Manul of Clinical Microbiology. 6th edition. 190-208
2. 林金絲等：醫院感染與環境監視（第一版）。台北。藝軒圖書出版社，1994
3. 藍志堅，邱蘭芳，張智華等：院內感染管制原理與實務，第一版，台北：合記出版社，1994。
4. 中華民國醫院感染管制學會：醫療機構院內感染微生物監測研習會講義摘要（1997年5月19日至5月21日）
5. 中華民國微生物學會：退伍軍人桿菌、重要院感病原菌之偵測和快速鑑定及藥敏試驗研習會講義（87年3月19-20日）