

滅菌起源與生物指示劑的發展

詹明錦¹ 張靜美¹ 王甯祺^{1,2} 邱勝康² 張峰義³

三軍總醫院 ¹感染管制室 ²感染暨熱帶醫學科 ³行政院衛生署疾病管制局

滅菌最早期發展的目的在於保存食物，之後才漸漸因為科學家對細菌的認知，而衍生到手術的無菌概念及醫療器材的滅菌。本文介紹了滅菌的發展歷史，以及相關滅菌設備的發明，並探討生物指示劑的發展歷史以及製作、監測原理。最初發展的含孢紙片型生物指示劑，因為使用及操作不易且耗時，目前已少為人使用。生物指示劑是自含式生物指示劑，修正了之前的缺點，但因為需較長時間的培養(24-48小時)，仍無法克服因醫院醫療器械庫存不足，導致醫院可能在未得知生物指示劑結果前就發放物品，而無法維護病患安全的問題。最新發展的快速判讀自含式生物指示劑，乃利用孢子上的酵素在孢子萌芽過程中的作用，對其代謝產物進行偵測，因偵測時間點在孢子萌芽生長的過程，因此可大幅縮短等候生物指示劑培養的時間，以1或3小時的結果進行物品發放與否的依據。國內疾病管制局也修訂最新滅菌監測措施指引，並於2010年5月20日正式公告，使得用於病人相關器械與敷料的安全性也獲得更大保障。

滅菌的發展史

提到滅菌的發展史，不可避免的等於生物自生說(spontaneous generation)的推翻過程。滅菌最原始的目的是為了保存食物，避免發酵腐敗無法食用。在1683年，Antonj van Leeuwenhoek發明顯微鏡觀察到細菌後，大部分的人都認為細菌是自然產生的。在衆多學者為了證明細菌的來源是空氣或生命體或非生命體(例如：食物)，而利用許多煮沸法來研

究的過程中，因而產生了相關的設備，1861年被公認為細菌之父法國的化學細菌學家 Louis Pasteur(1822-1895)以他的預防炭疽病和狂犬病的研究著稱。他也推翻了生物自生說，並證明食物腐敗是微生物生長引起發酵所導致的。他也是巴士德滅菌法的起源，他假設了細菌在疾病所扮演的角色，並對現今無菌手術基礎的建立有很大的貢獻[1]。Louis Pasteur在1878年4月30日的慶生宴上，說：「如果我是位醫生，我確信因為所有

物品的表面都佈滿了細菌，尤其在醫院裏；所以我不只會使用絕對乾淨的器械，我的手在徹底洗淨後還要快速地在火燄烤過，並使用已經過加熱到 130-150 °C 後的絨布、繩帶、紗布。我只會使用加熱到 110-120 °C 後的水。但儘管如此，我還是會害怕懸浮在病人及病床周圍空氣中的細菌。」他的這段話對於滅菌的發展具有很大意義。整個滅菌發展的歷史時序整理如表一[1]。

除了以上滅菌史上的重要里程碑，近代的滅菌監測指引的歷史發展或起源則可由美國 Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI, 美國醫療儀器促進學會) 的相關出版品窺知一二。AAMI 在 1980 年就曾出版 AAMI ST1-1980 Good hospital practices: Steam sterilization and sterility assurance，作為滅菌監測方面的指引及建議措施。二版則於 1988 年出版。AAMI ST46:1993 則算是第三版[2]，在 2002 年則出版第四版 ST46:2002。AAMI 並在 2006 年將所有醫院蒸氣滅菌相關的建議措施指引集成大全，並加入新觀念而更改為 ST79:2006 Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities，且於 2008、2009 年分別有部份的更新或修訂，成為 ST79:2006/A1:2008 & A2: 2009[3]。

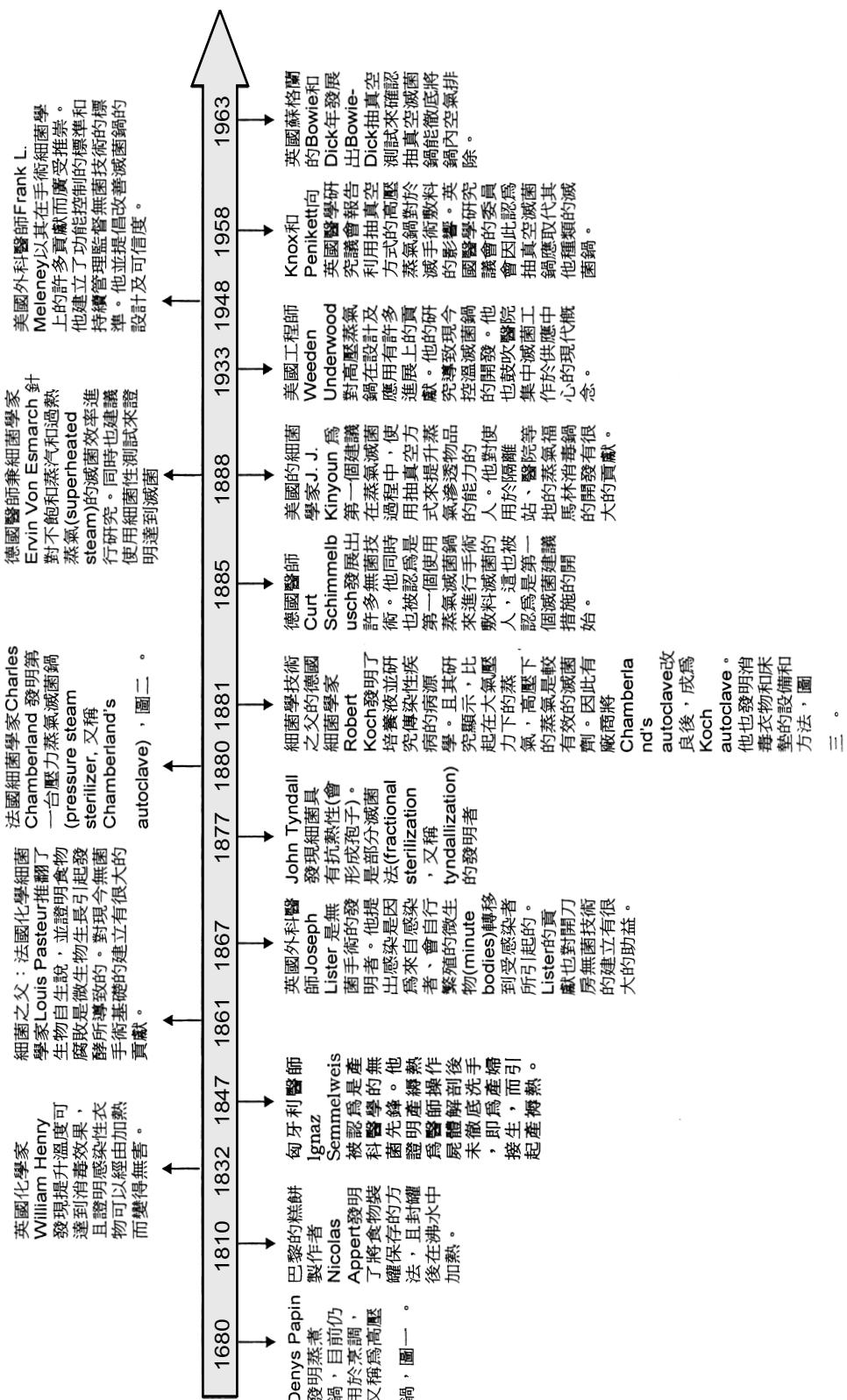
生物指示劑的發展歷史

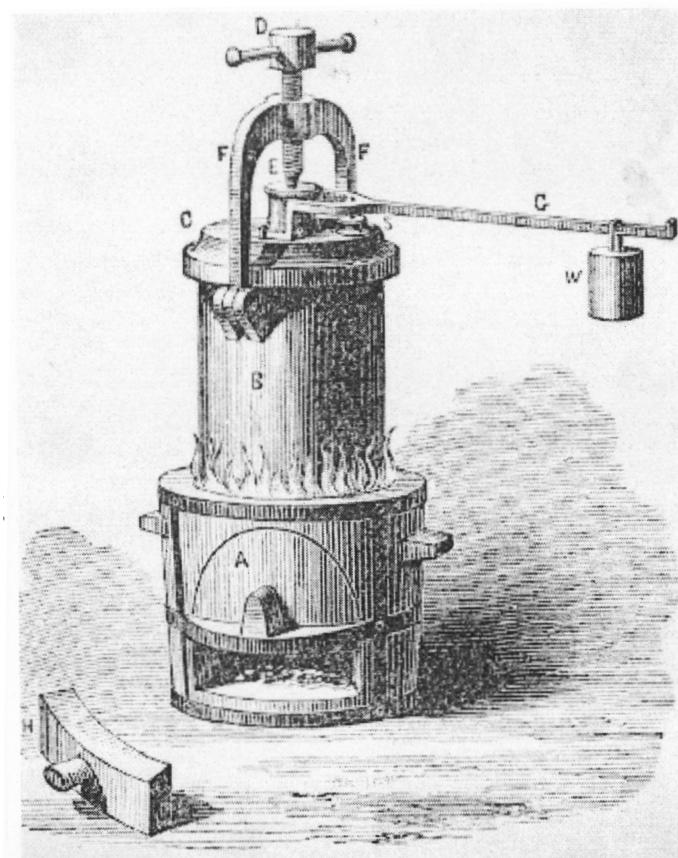
生物指示劑是含有活性微生物的測試系統，以清楚提供對特殊滅菌過程之抵抗力 [4]。如前所述，早在 1888 年，Ervin Von Esmarch 就建議了使用細菌性測試來證明滅菌是否達到無菌 [1,5]。由於科學家們對微生物的了解越來越多，也就發現蒸氣對不同細菌或生長階段不同的細菌之殺菌能力有所不同，因而現在的生物指示劑都是使用能形成孢子、對該種滅菌劑最具有抗性的細菌來進行滅菌監測。

當細菌為 vegetative type (細菌繁殖體) 時，通常能輕易地被許多殺菌劑殺死或抑制其生長活性。spore(孢子) 則是較為缺水的圓形或橢圓型休止細胞，其細胞質和細胞核是濃縮的，並由具不滲透性的細胞壁或套膜所環繞。孢子對於消毒劑或滅菌劑以及乾燥的過程是抗性較高的，尤其是 Bacillus 及 Clostridium 屬。一般染色方法無法染到孢子。欲進行孢子的染色時，需使用 Malachite Green 並加熱來進行染色。

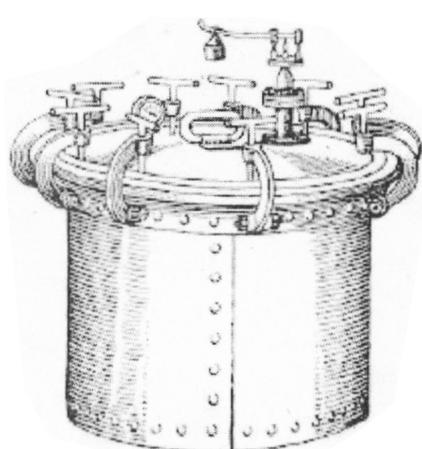
理想的生物指示劑 (Biological Indicator, BI) 所需具備的要素是(1) 使用簡單，(2) 價格便宜合理，(3) 沒有外源性污染，(4) 滅菌後可以盡快提供陽性結果，(5) 只有滅菌參數不足以殺死內含的細菌時，才顯示陽性結果 [6,7]。而目前各種滅菌法所使用的生物指示劑之細菌不外嗜熱桿菌或枯草桿菌。蒸氣/過氧化氫電漿/臭氧/過醋酸滅菌法所採用的為嗜熱桿菌 (>

表一 [1]





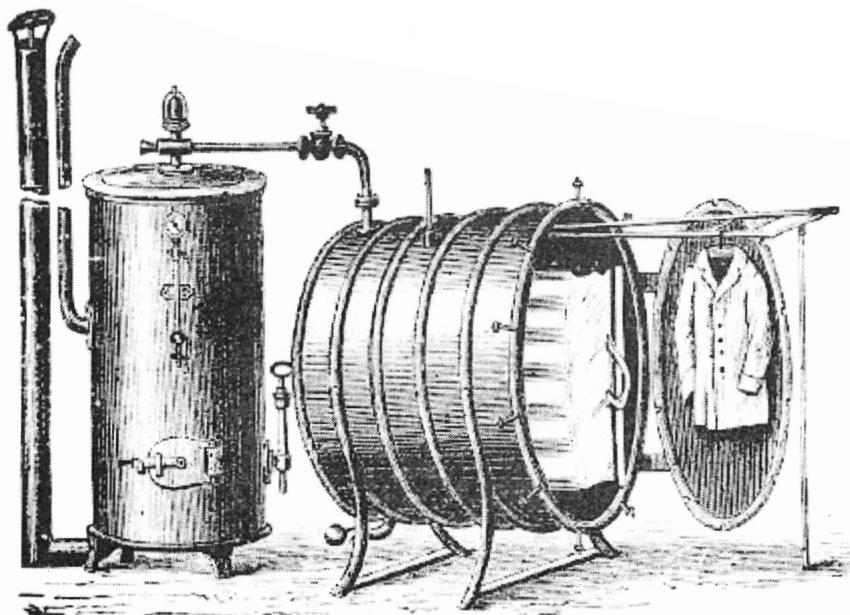
圖一 Papin 所發明的蒸煮鍋 (Papin's digester)[1]



圖二 第一台壓力蒸氣滅菌鍋，又稱 Chamberland's autoclave [1]

10^5 CFU)，原名 *Bacillus stearothermophilus* ATCC 7953，現改稱 *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953。若是環氧乙烷 / 乾熱滅菌則使用枯草桿菌 ($>10^6$ CFU)，原名 *Bacillus subtilis* var. *niger* ATCC 9372，現改稱 *Bacillus atrophaeus* ATCC 9372。

最早期利用細菌測試來進行滅菌監測的方法為：將孢子懸浮液塗抹在器械上，經滅菌程序後，以無菌水或培養液沖洗該器械，將任何可能存活的細菌沖到培養液中，之後進行培養。如果存活的孢子可以生長、複製



圖三 廠商將 Chamberland's autoclave 改良，成為 Koch autoclave，可消毒衣物 [1]

到一定數量，將會使培養液變混濁。此操作方法不易，且不易在醫療院所使用 [5]；而一般常用對細菌數量的計數法 (Enumeration techniques) 有其極限，且經培養後繁殖數量必須要達到 5×10^1 CFU 以上才適用 [8]，因此不是很精確的方法。以下分別敘述不同時期生物指示劑的發展與使用方法。

含孢紙片型生物指示劑

為了在醫療院所方便使用，最早生物指示劑為含孢紙片型生物指示劑的發明。例如，American Sterilizer Co. 的含孢紙片型生物指示劑的產品製造流程 [1] 為：以斜面法 (slant

culture) 培養欲選用的菌種 24 小時後，將其懸浮液轉種到含有 nutrient agar 的錐形瓶中繁殖，之後添加 0.01 % 的硫酸錳 (Manganese Sulphate)，以促進細菌孢子化。持續培養 5-7 天後，以染色及顯微鏡檢測的方式確認細菌是否已形成孢子態。若已形成孢子態，則將細菌以少量的無菌水沖洗，並以無菌過濾的技術過濾。此時，這些呈孢子狀態的細菌懸浮液就可以進行標準的測試程序。首先，採用 1:100 的無菌水稀釋懸浮液後，以 84 °C 热水加熱 5 分鐘，並馬上冷卻。這步驟可以摧毀細菌繁殖體，以及較低抗性的該細菌。之後從中取出部份的懸浮液進行一連串的稀釋，並塗佈

在 nutrient agar 上，培養 48 小時，以進行細菌數量的計算。裁切成小紙片的濾紙則浸泡在測量好、已知數量的呈孢子狀態之細菌懸浮液中，以便每一紙片上能有預期數量的菌落數。之後在室溫下進行乾燥數小時，並裝入可滅菌的小玻璃紙信封內密封，至此完成含孢紙片型生物指示劑的製備工程 [1,5,9]。之後，使用者將之經過滅菌過程後，再經傳送到實驗室，移到無菌的培養液內，再開始後續的培養流程。此培養時間通常需要 7 天，並由培養液是否混濁，來判斷滅菌成功或失敗。其缺點為：送培養過程及培養時間過久容易受污染、須等候 7 天時間，醫院在使用上不方便且考量器械週轉率等因素皆不容易配合、再者，因以玻璃紙做包裝，滅菌劑幾乎馬上就接觸孢子，挑戰性低 [5,10,11]。

自含式生物指示劑

在 1970 年代左右，改良早期生物指示劑的部分缺點發展出新的生物指示劑，稱之為自含式生物指示劑 (Self-Contained Biology Indicator; SCBI)；其設計為管身內含有含孢紙片以及密封了培養液的玻璃管、因此使用上較為方便，使用者只需受過簡單訓練即可操作，不需再另外運送到實驗室進行培養。此外，培養液內含有酸鹼值指示劑，它會因孢子生長所產生的酸性代謝物質而變成黃色，因而能以肉眼辨別培養液的顏色變化而偵測到細

菌的生長。此外，它也搭配特殊的培養液，可以使細菌長得較快，讓培養時間由 7 天縮短成 24-48 小時以觀察顏色變化。它的優點是：減少使用含孢紙片型生物指示劑時的人為污染問題。缺點則是需肉眼判讀，以及仍需 24-48 小時的培養時間 [5,10,11]，這對醫院來說仍然難以在得知生物指示劑結果後再進行滅菌物品的安全發放。尤其當自含式生物指示劑出現陽性結果、回收機制開始啟動前，時間已消逝 24-48 小時，在目前常見醫院器械週轉率高、數量不足的狀況下，這些未確實完成滅菌的物品極有可能大多已使用在病患身上，那對病患安全、醫院聲譽、感染成本所造成的嚴重後果可想而知。回收過程包含要回收到上一次生物指示劑呈現陰性間的所有鍋次物品、追蹤受影響的病患、告知病患的醫師、感控人員、並應對病患施予預防性抗生素的投藥 [12]。即便使用只需培養 24 小時的自含式生物指示劑，因為現行抽真空高壓蒸氣鍋每完成一次滅菌約需 50 分鐘左右，則在得知培養結果為陽性前，可能最多已進行超過 24 鍋次物品的滅菌，可見需要回收的物品相當之多、對病患影響範圍之大。另外，自含式生物指示劑的管狀設計讓管內的空氣移除及蒸氣的徹底滲透更為困難。尤其若是重力式高壓蒸氣鍋，因其蒸氣是採擴散的方式，所以生物指示劑的擺放方式是會影響管內空氣移除效果的。若是排除空氣的能力較好的抽真空式高

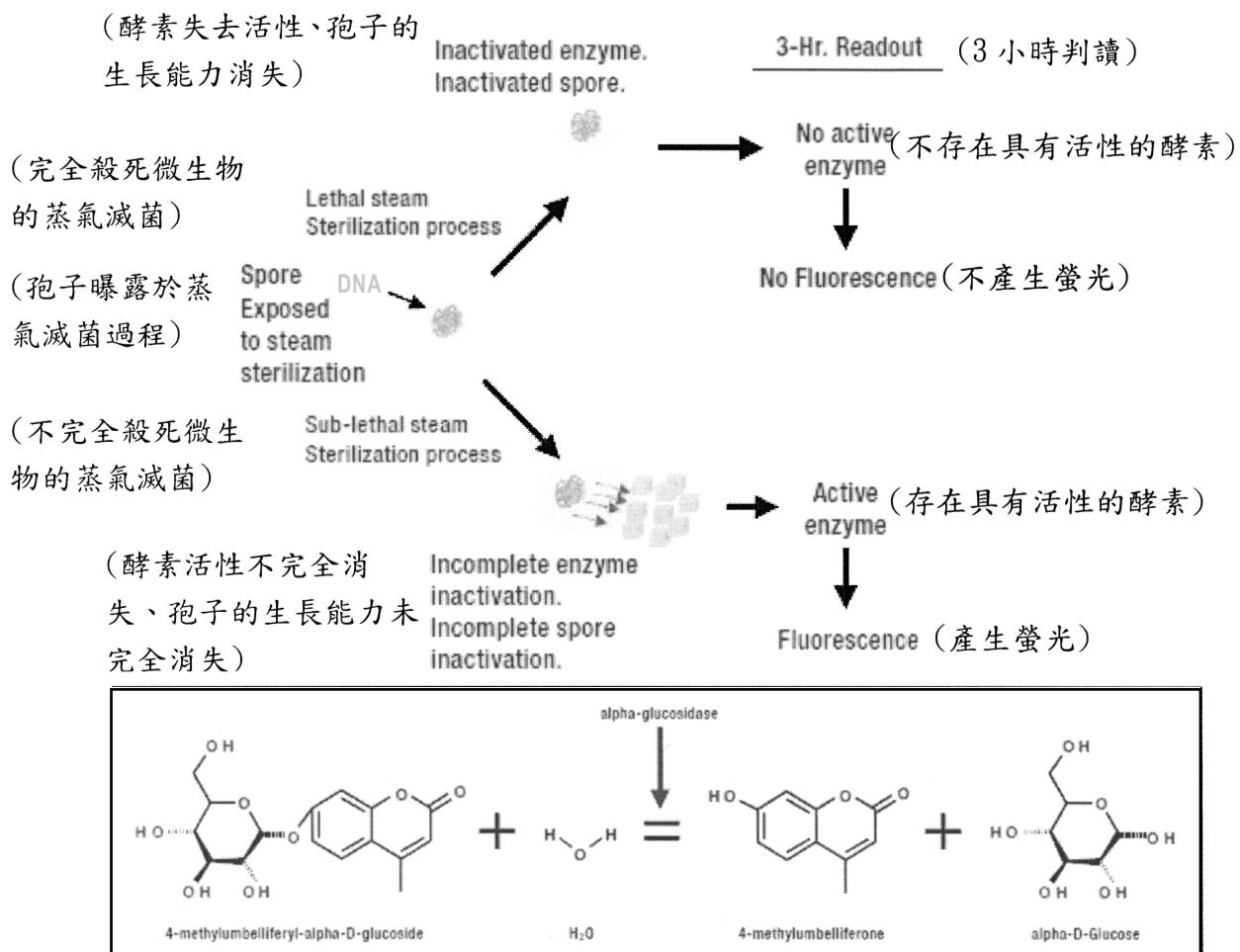
壓蒸氣鍋則沒有影響，仍可將管內的空氣移除。但如果是重力式高壓蒸氣鍋，則容易因為空氣殘留在管子底部而造成偽陽性結果。所以，在使用時須先確認所使用的生物指示劑是否可使用於重力鍋 [5]。此外，使用於自含式生物指示劑 SCBI 的過程挑戰包 (Process Challenge Devices; PCD) 之材質也必須考慮。對蒸氣滅菌而言，較緊密的 PCD 可以使空氣的移除較為緩慢，且避免蒸氣滲透太快 [5]，是較好的選擇。對環氧乙烷滅菌而言選擇以吸收性材質做成的 PCD，可降低環氧乙烷滲透速度，避免環氧乙烷太快與孢子接觸而太快把細菌殺死 [5]。使用方式為，滅菌後將自含式生物指示劑內的培養液安瓶擠壓折破，讓培養液與含孢紙片接觸後，放在適當溫度的培養鍋進行培養。當有細菌生長，產生酸性代謝物質，就可以使培養液中添加的酸鹼試劑變成黃色。由於細菌生長的特性，陽性結果會比陰性結果更快得知；但要確認細菌沒有生長，則需要較久的時間。自含式生物指示劑因為需用肉眼判讀培養液顏色的變化，因此在使用上需依照說明書所稱的培養時間做判讀。

自含式快速判讀生物指示劑

在 20 世紀末期，由於分子生物學、細胞生物學等科技的不斷進步，有了能快速判讀生物指示劑結果的技術發明 [6,10-11,13-15]，在此稱之為自含式快速判讀生物指示劑。國外文

獻常以 enzyme-based BI 、 rapid-read-out BI, enzyme-based early-readout BI 、 BIs contain spores with an enzyme-based early-readout capability 等名稱之 [5,9,12]。在 AAMI 及美國 CDC 發表的滅菌建議指引含括此類生物指示劑 [3,7,9]。它除了擁有自含式生物指示劑的基本特徵外，它還能搭配機器，以孢子外殼上自然存有的酵素活性來快速判斷滅菌的成功與否。它是利用判斷孢子外殼上的酵素(如： α -glucosidase)之活性並監測細菌的生長過程，來監測滅菌過程是否失敗。

α -glucosidase 乃存在於嗜熱桿菌孢子的外殼 [6,11]，並負責產生葡萄糖以提供細菌生長所需的能量，因此比起其他酵素的新合成階段， α -glucosidase 對於在嗜熱桿菌孢子的 germination (萌芽) 或 outgrowth 成細菌繁殖體的早期階段是必須的；同時該酵素的活性和細菌的生長、複製能力都具有關聯性。當細菌孢子未被滅菌物質完全殺死時，經給予培養液以及適當的培養溫度進行培養後，孢子會進入萌芽階段，開始一連串的生長反應。此時 α -glucosidase 會與培養液中的經 Modify 的 α -D-glucoside 結合，並分解成後續可產生 ATP 能量的 α -D-glucose，和會發出螢光的 4-methylumbelliflone 二種代謝產物 (圖四) [13]。當螢光強度持續增加時，就表示 α -D-glucose 持續被產生，亦即顯示細菌有持續代謝、生長的現象。因此藉由能偵測螢光的培養鍋機器之



圖四 α -glucosidase 酵素生化反應方程式 [13]

持續記錄螢光增加的幅度與自動判讀的功能，而能更快判定滅菌是成功或是失敗。根據該產品的使用說明書，適用於 132-134 °C 重力式蒸氣鍋的自含式快速判讀生物指示劑，其利用機器判讀陰性結果 (final negative reading) 的培養時間為 1 小時。適用於 132-134 °C 抽真空蒸氣鍋或 121 °C 重力式蒸氣鍋者，其利用機器判讀陰性結果的培養時間為 3 小時 [13]。

此外，Vesley、Rutala、Schneider 氏等人以部分滅菌法，利用一些未達成滅菌設定條件的狀況，進行自含式快速判讀生物指示劑準確度的測試時，可以發現在許多滅菌失敗條件下，自含式快速判讀生物指示劑所能顯示滅菌失敗的比例，都比自含式生物指示劑來得高，這些研究結果已證明 α -glucosidase 的活性存在與否，能有效的偵預測孢子是否存活，甚或細

菌是否繁殖；並比細菌孢子本身對蒸氣滅菌更具有抗性，挑戰性更高，準確度也更高 [6,10,14-16]。而由於平日的滅菌條件及情況可以使 α -glucosidase 及孢子失活，所以一旦發生該類生物指示劑經滅菌後，其 α -glucosidase 判讀結果呈現陽性時，應可認定為滅菌過程發生異常。因為偵測 α -glucosidase 的方式對滅菌監測成功與否的準確度是比孢子來得高的 [6,10,14-16]。

至於自含式快速判讀生物指示劑是否應進行後續培養，新版的 AAMI ST79:2006 已刪除其 2002 年舊版中平時或特殊條件下需後續培養的建議，並在 10.5.3.1 指出：可以依廠商說明書或醫院政策，定期確認早期的結果（但此步驟之進行並非必要的）[3]。依 AAMI 其前後版的意思以及前言中對使用文字的定義所採的總結，AAMI 已經不要求對自含式快速判讀生物指示劑再進行後續培養；若欲進行定期培養，則可參照製造商說明書和醫院政策及步驟進行。2007 年發表的 AORN Journal 期刊資料亦表示，「作為醫院蒸氣滅菌建議措施指引的 ANSI/AAMI ST79:2006 已經不再建議對快速判讀生物指示劑進行定期培養（periodic verification）。可根據快速判讀生物指示劑製造商的說明書，由工作人員記錄 1 小時或 3 小時的結果以後，根據說明書或醫院政策丟棄」[12]。該問題在國內也常被討論；是否要定期培養，2010 台灣滅菌監測之

感染控制措施指引所言，是建議依據製造廠的產品使用說明及醫院政策及程序來進行。所以並沒有規範醫院一定要把所有的自含式快速判讀生物指示劑都培養 24 至 48 小時才能做為發放依據。而「定期」並非指每一支自含式快速判讀生物指示劑都須進行後續培養，而是指醫院可自行依醫院政策，於每個月、每一季或每一年執行一次。

由於自含式快速判讀生物指示劑的偵測方式可大幅縮短等候的培養時間 [6,10,14-16]，能使得滅菌單位盡快得知生物指示劑結果、了解滅菌過程是否成功之後再發放物品，以保障使用重覆滅菌醫材、器械的各種病人之安全。2010 台灣滅菌監測之感染控制措施指引也提到對植入性醫材而言，不等生物指示劑結果就發放的緊急使用情形都應屬於例外事件，醫院要定義緊急情形和定期檢討。

此外，若是環氧乙烷滅菌用的自含式快速判讀生物指示劑亦是利用相同的原理，偵測與枯草桿菌孢子生長相關聯的 β -glucosidase 之活性，而達到快速判讀的結果。根據製造商說明書，其利用機器判讀陰性結果的培養時間為 4 小時。目前市面上過氧化氫電漿滅菌鍋所用的生物指示劑則屬需培養 24 小時的自含式生物指示劑。

結 論

隨著滅菌技術發展的進步，伴隨著各項滅菌監測項目的輔佐，國內疾

病管制局也修訂最新滅菌監測措施指引，並於 2010 年 5 月 20 日正式公告，使得用於病人相關器械與敷料的安全性也獲得更大保障，生物指示劑用於滅菌監測也是目前認為最後判斷滅菌物品是否成敗的最後依據。而生物指示劑培養監測的科技日新月異，不論採用哪間廠商的產品，使用者應依據產品使用說明書所述的培養時間，來進行所使用的生物指示劑之培養，以得到最準確的判讀結果，之後才把滅菌物品發放給醫療單位使用於病患治療或照護，如此一來，接受手術、住院或就診的病患安全才能受到保障。

參考文獻

1. Perkins JJ. Principles and Methods of Sterilization in Health Sciences, 2nd ed. Springfield, Illinois: Charles C Thomas. 1983:1-43,494-5.
2. AAMI. Good hospital practice: Steam sterilization and sterility assurance (ANSI/AAMI ST46-1993) Arlington: AAMI. 1993:x.
3. AAMI. ANSI/AAMI ST79:2006/A1:2008/A2:2009 Comprehensive guide to steam sterilization and sterility assurance in health care facilities. Arlington: AAMI. 2009:83-118.
4. AAMI. ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006 Sterilization of health care products-Biological indicators -Part 1: General requirements. In Sterilization, part 2 Sterilization equipment design and use. Arlington: AAMI. 2009:14.
5. Ames H, Linda C: Evolution, a biological indicator story. Healthcare purchasing news 2007: 46-9.
6. Rutala WA, Gergen MF, Weber DJ: Evaluation of a rapid readout biological indicator for flash sterilization with three biological indicators and three chemical indicators. Infect Control Hosp Epidemiol 1993;14:390-4.
7. Rutala WA, Weber DJ, HICPAC committee. Guideline for disinfection and sterilization in healthcare facilities. Atlanta, GA:CDC. 2008: 76-7.
8. AAMI. Annex A: Determination of viable count. ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006 Sterilization of health care products-Biological indicators -Part 1: General requirements. In Sterilization, part 2 Sterilization equipment design and use. Arlington: AAMI. 2009:24.
9. AAMI. Annex F: Relationship between components of biological indicators. ANSI/AAMI/ISO 11138-1:2006 Sterilization of health care products-Biological indicators -Part 1: General requirements. In Sterilization, part 2 Sterilization equipment design and use. Arlington: AAMI. 2009:53.
10. Rutala WA, Jones SM, Weber DJ: Comparison of a rapid readout biological indicator for steam sterilization with four conventional biological indicators and five chemical indicators. Infect Control Hosp Epidemiol 1996;17:423-8.
11. Albert H, Davies DJ, Woodson LP, et al: Biological indicators for steam sterilization: characterization of a rapid biological indicator utilizing *Bacillus stearothermophilus* spore-associated alpha-glucosidase enzyme. J Appl Microbiol 1998;85:865-74.
12. Carlo A: The new era of flash sterilization. AORN J 2007:86,58-68;69-72.
13. 3M™ Attest™ 1292-S Biological Indicator for Steam Product Profile
14. Vesley D, Nellis MA, Allwood PB: Evaluation of a rapid readout biological indicator for 121 degrees C gravity and 132 degrees C vacuum-assisted steam sterilization cycles. Infect Control Hosp Epidemiol 1995;16:281-6.
15. Vesley D, Langholz AC, Rohlffing SR, et al: Fluorimetric Detection of a *Bacillus stearothermophilus* Spore-Bound Enzyme, alpha-d-Glucosidase, for Rapid Indication of Flash Sterilization Failure. Appl Environ Microbiol 1992;58:717-9.
16. Schneider PM, Reich RR, Kirckof SS, et al: Performance of various steam sterilization indicators under optimum and sub-optimum exposure conditions. Am J Infect Control 2005;33: 55-67.

The History of Sterilization and Biological Indicator

*Ming-Chin Chan¹, Ching-Mei Chang¹,
Ning-Chi Wang^{1,2}, Sheng-Kang Chiu², Feng-Yee Chang³*

Tri-Service General Hospital ¹Infection Control Office; ²Infectious Diseases and Tropical Medicine Division; ³Centers for Disease Control, Taiwan

The original objective of sterilization was food storage. After scientists discovered bacteria and understood the concepts of sterilization and aseptic surgical practices, they realized the need for sterile medical devices. In this report, we provide the history of sterilization, steam sterilizers, development and manufacture of biological indicators (BI), and monitoring principles of different generations of BIs. The spore strip type of BI is not user-friendly and is also time consuming; hence, it is no longer use in hospitals. The next generation SCBI still needs 24-48 hrs to get the result of sterilization and that still will compromise the patient safety as the inventory issue of medical devices. Another rapid readout BI could get the sterilization result in 1-3 h by detecting the activity of enzymes present in the outer spore coat, followed by monitoring the end-product of enzyme involved germination biological reaction. By this way, the rapid readout BI could shorten the incubation time to 1 or 3 h and as the evidence for load release. The Taiwan Centers for Disease Control (TW-CDC) also announced the new sterilization guideline on May 20, 2010. This guideline could help to ensure patient safety for using reprocessed medical devices and dressing.