



中华人民共和国国家标准

GB/T 33420—2016

压力蒸汽灭菌生物指示物检验方法

Evaluation standard of biological for moist heat sterilization processes

2016-12-30 发布

2017-07-01 实施



中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会

发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会提出并归口。

本标准起草单位：中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、中国人民解放军疾病预防控制中心、山东新华医疗器械股份有限公司、中国医学科学院协和医院、山东利尔康消毒科技股份有限公司、3M 中国有限公司、杭州鲁沃夫货物进出口有限公司。

本标准主要起草人：张流波、张剑、姚楚水、张青、王妍彦、沈瑾、黄靖雄、朱晓明、朱汉泉、史绍毅、马玲、班海群。

压力蒸汽灭菌生物指示物检验方法

1 范围

本标准规定了压力蒸汽灭菌生物指示物的检验方法。

本标准适用于压力蒸汽灭菌生物指示物的检验。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 18281.1 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第1部分:通则

GB/T 24628 医疗保健产品灭菌 生物与化学指示物 测试设备

消毒技术规范(2002年版)卫生部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物指示物 biological indicator; BI

对指定条件下的特定灭菌程序具有一定抗力,并装在内层包装中可供使用的染菌载体。

3.2

载体 carrier

试验微生物的支持物。

3.3

存活时间 survival time; ST

在规定的条件下暴露于杀菌因子,试验的生物指示物中微生物存活的最长时间。

3.4

杀灭时间 killing time; KT

测定生物指示物抗力时,受试样本经杀菌因子作用后,全部无菌生长的最短作用时间。

3.5

D 值 D value

在设定的暴露条件下,杀灭特定试验微生物总数的90%所需的时间。

3.6

存活曲线 survivor curve

在固定的灭菌因子作用下,微生物的存活情况与暴露变化的关联曲线。

3.7

生物指示物抗力测试仪 biological indicator evaluator resistometer

产生限定条件下灭菌过程中物理化学变化规定组合,以测量抗力的专用设备。

4 检验指标与方法

4.1 抗力

4.1.1 菌种

用于制作压力蒸汽灭菌生物指示物的菌株为嗜热脂肪杆菌芽孢 (*Geobacillus stearothermophilus* ATCC7953 或 SSI K31) 或被证明具有本标准所要求的同等性能的微生物。

4.1.2 菌量

回收菌量大于等于 1×10^5 CFU/片或大于等于 1×10^5 CFU/支, 对于成品的指示物, 载体回收的菌量与说明书上的菌量误差在 $-50\% \sim +300\%$ 之间, 悬液回收的菌量与说明书上的菌量误差在 $\pm 35\%$ 。测定菌量时, 应最少测试 4 个样本, 具体检测方法参见附录 A。

4.1.3 D 值

测试抗力时应使用生物指示物抗力测试仪, 生物指示物抗力测试仪要求见 GB/T 24628。在 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 时, D 值的要求: D 值大于或等于 1.5 min, 对于成品的指示物, 测试的 D 值应在说明书上的 D 值 $\pm 20\%$ 的范围内。应至少使用下列 2 种方法进行测试:

- 存活曲线法测试 D 值, 参见附录 B;
- 部分阴性法测试 D 值, 参见附录 C;
- 验证法测试 D 值, 将 a) 或者 b) 测试出的 D 值和 4.1.2 的回收菌量的平均数带入式(1)和式(2), 计算出 ST 值和 KT 值。参照附录 D 进行验证:

$$ST \geq (\log N_0 - 2) \times D \text{ 值} \dots\dots\dots (1)$$

$$KT \leq (\log N_0 + 4) \times D \text{ 值} \dots\dots\dots (2)$$

式中:

N_0 ——每批生物指示物的回收菌量的平均数。

4.1.4 存活时间与杀灭时间

在 $121\text{ }^\circ\text{C}$ 时, ST 值的要求: 大于或等于 4.5 min; KT 值的要求: 小于或等于 24 min。

4.2 载体的要求

符合 GB 18281.1 的要求。

4.3 恢复培养基的要求

4.3.1 恢复培养基应满足下列要求:

- 使 10 CFU~100 CFU 的微生物恢复生长;
- 使损伤的微生物恢复生长;
- 经过压力蒸汽灭菌后不会产生抑制微生物生长的物质。

4.3.2 恢复培养基按以下方法检验:

每个样本的恢复培养基中, 接种 10 CFU~100 CFU 的嗜热脂肪杆菌芽孢 (ATCC7953), 同时设置阴性对照和阳性对照, 培养至规定时间后观察有无嗜热脂肪杆菌芽孢生长 (一般观察培养基的颜色变化)。如果恢复培养基有菌生长, 并且阴性对照无菌生长和阳性对照有菌生长, 判断恢复培养液合格。

4.4 稳定性试验

取包装完好的同批次生物指示物放置于制造商建议的保存条件下, 存放至标签和说明书规定的有效期限, 取出再次进行评价, 生物指示物应符合 4.1、4.2 和 4.3 的要求。

附录 A
(资料性附录)
活菌培养计数方法

- A.1 取含有 10 mL TPS(0.1%胰蛋白胨的生理盐水溶液)的无菌试管,加入适量无菌玻璃珠,将计数菌片投入试管,用电动混合器混合,到菌片被完全打碎,制成菌悬液。
- A.2 将试管按需要数量分组排列于试管架上,每管加入 4.5 mL TPS。各组由左向右,逐管标上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ……等。
- A.3 将菌悬液用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上用力振打 80 次,随即吸取 0.5 mL 加至 10^{-1} 管内。
- A.4 将 10^{-1} 管依前法用电动混匀器混合 20 s,或在手掌上用力振打 80 次,混匀,再吸取出 0.5 mL 加入 10^{-2} 管内。如此类推,直至最后一管。必要时,还可作某稀释度的 1:1 或 1:4 稀释。
- A.5 选择适宜稀释度试管(以预计生长菌落数每平板为 15 CFU~300 CFU 者为宜),吸取其中混合均匀的悬液 1.0 mL 加于无菌平皿内。每一稀释度接种 2 个平皿。一般需接种 2 个~3 个不同稀释度。
- A.6 将 40 °C~45 °C 熔化的嗜热脂肪杆菌芽孢恢复培养基参见《消毒技术规范(2002 年版)》,倾注于已加入样液的平皿中,每平皿 15 mL~20 mL。
- A.7 将平皿盖好,即刻轻轻摇动混匀,平放。待琼脂凝固后,翻转平皿使底向上,置 56 °C±2 °C 恒温培养箱内培养。
- A.8 培养至 72 h,计数菌落数。一般以肉眼观察,必要时用放大镜检查。以每平板菌落数在 30 CFU~300 CFU 的稀释度为准记录结果。
- A.9 根据稀释倍数和接种量计算每毫升菌液或每一菌片(染菌载体)上的平均菌落数。
- A.10 菌液计数从 A.3 步骤开始操作。

附 录 B
(资料性附录)
存活曲线法测试 D 值

- B.1** 随机抽取 50 个样本。
- B.2** 根据不同的暴露温度设置 10 个暴露时间点,每个时间点测试 5 个样本,最短的暴露时间可以设定为 0 s,最长的暴露时间使菌量减少到小于或等于初始菌量的 0.01%。
- B.3** 测试之前,首先对生物指示物抗力测试仪进行预热。
- B.4** 按照生物指示物抗力测试仪操作说明书的流程进行操作,分别对 10 个暴露时间分别处理。
- B.5** 处理完毕,参照附录 A 对各组样本随机抽取 3 个进行活菌计数。
- B.6** 用所得的全部存活菌数的常用对数值,对时间(min)作图,用最小二乘法进行回归分析,确定最佳线性曲线。回归分析时不应包括原先菌落数 $0.5\log$ 范围内的存活数据点。计算所得直线斜率的负倒数,即等于以分钟表示的指定暴露条件下的 D 值,同时所得线性曲线相关系数应不小于 0.8。

附 录 C
(资料性附录)
部分阴性法计算 D 值

C.1 随机选取 120 个样本。分成 6 组, 每组 20 个样本。

C.2 生物指示物抗力测试仪参数设置:

- a) 暴露温度设置 121 °C;
- b) 暴露时间至少为 6 个时间点, 至少 1 个时间点全部有菌生长, 至少 2 个时间点部分有菌生长, 至少 2 个时间点全部无菌生长。

C.3 对 6 组样本分别暴露。

C.4 暴露完成后将 6 组生物指示物在 56 °C ± 2 °C 温度下, 按照说明书要求培养到规定时间, 记录阴性和阳性结果。当最短暴露时间点全部为阳性, 最长暴露时间全部为阴性, 并且中间至少 2 组有部分样本阳性, 试验结果有效, 带入式(C.1)和式(C.2)计算 D 值。

C.5 Limited Spearman-Kärber 法(LSKP), 达到无菌生长平均时间的计算见式(C.1):

$$U_{\text{HSK}} = U_K - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{i=6} r_i \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

D 值的计算见式(C.2):

$$D = \frac{U_{\text{HSK}}}{\log_{10} N_0 + 0.2507} \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

式中:

- U_{HSK} —— 达到无菌生长平均时间, 单位为秒(s);
- U_K —— 首次显示所有样本无菌生长的暴露时间, 单位为秒(s);
- d —— 暴露时间的固定间隔, 单位为秒(s);
- n —— 每组的样本量, 单位为个;
- r_i —— 每次暴露无菌样本数量, 单位为个;
- N_0 —— 回收菌落数, 单位为 CFU;
- 0.2507 —— 计算系数。

附 录 D
(资料性附录)
验证法测试 *D* 值

D.1 ST 值验证

将 50 个试验样本放入压力蒸汽灭菌生物指示物抗力测试仪中,作用浓度为 $2.3 \text{ mg/L} \pm 0.4 \text{ mg/L}$,在 $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,暴露时间设定为计算出的 ST 值,暴露完成后,将 50 个生物指示物样本取出,置于 $56 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养至说明书规定时间。若全部有菌生长,则计算的 ST 值通过验证;若有样本无菌生长,则计算的 ST 值没有通过验证。

D.2 KT 值验证

将 50 个试验样本放入压力蒸汽灭菌生物指示物抗力测试仪中,作用浓度为 $2.3 \text{ mg/L} \pm 0.4 \text{ mg/L}$,在 $50 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$ 时,暴露时间设定为计算出的 KT 值,暴露完成后,将 50 个生物指示物样本取出,置于 $56 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养至说明书规定时间。若全部无菌生长,则计算的 KT 值通过验证;若有样本有菌生长,则计算的 KT 值没有通过验证。

D.3 判定

计算的 ST 值和 KT 值都通过验证,则判定测出的 *D* 值有效。

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
压力蒸汽灭菌生物指示物检验方法
GB/T 33420—2016

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址 www.spc.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238
读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 14 千字
2017年2月第一版 2017年2月第一次印刷

*

书号: 155066·1-56908 定价 16.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68510107



GB/T 33420—2016