

ICS 11.080
C 50



中华人民共和国国家标准

GB/T 33419—2016

环氧乙烷灭菌生物指示物检验方法

Test method of biological indicator for ethylene oxide 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 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	I
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 技术要求	2
5 检验方法	3
附录 A (规范性附录) 抗力测定仪要求及抗力试验	4
附录 B (规范性附录) 活菌培养计数方法	5
附录 C (规范性附录) 存活曲线方法测定 D 值	6
附录 D (规范性附录) 部分阴性分析法测定 D 值	7
附录 E (规范性附录) 验证法测定 D 值	10

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卫生和计划生育委员会提出并归口。

本标准起草单位：江苏省疾病预防控制中心、中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所、国家卫生计生委卫生和计划生育监督中心、徐州市疾病预防控制中心。

标准起草人：徐燕、孙俊、吴晓松、陈越英、张流波、段亚波、史绍毅、王洪敏、黄靖雄、谈智、张剑、王玲、孙巍、张伟、褚宏亮、常桂秋。

环氧乙烷灭菌生物指示物检验方法

1 范围

本标准规定了环氧乙烷灭菌生物指示物的术语和定义、技术要求和检验方法。
本标准适用于对环氧乙烷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 18281.2 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第2部分:环氧乙烷灭菌用生物指示物

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。包含菌片和自含式生物指示物。

3.2

载体 **carrier**

试验微生物的支持物。

3.3

指示微生物 **test organism**

用于制备染菌载体的微生物。

3.4

活菌计数 **viable test organism count**

在规定的培养条件下,测定细菌悬液、染菌载体等样本中含有的活菌数量。通过计算长成的单个菌落数,而得到单位体积菌悬液或染菌载体上的存活试验菌菌数。

3.5

D值 **D value**

在设定的条件下,杀灭微生物数量达90%所需的时间。

注:单位为分(min)。

3.6

存活曲线 **survivor curve**

在设定的条件下,微生物的存活情况与对灭菌介质暴露变化的关系曲线。

3.7

菌落形成单位 colony-forming unit; CFU

在活菌培养计数时,由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落,以其表达活菌的数量。

3.8

存活-杀灭区间 survival-kill window

在规定的条件下灭菌处理时,生物指示物从全部长菌(存活暴露)过渡到全部不长菌(杀灭暴露)的暴露程序。

3.9

自含式生物指示物 self-contained biological indicator

内层包装中含有细菌复苏生长所需培养基的生物指示物。

3.10

存活时间 survival time; ST

用于生物指示物抗力鉴定时,受试指示物样本经杀菌因子作用后全部样本有菌生长的最长作用时间。

3.11

杀灭时间 killing time; KT

用于生物指示物抗力鉴定时,受试指示物样本经杀菌因子作用后全部样本无菌生长的最短作用时间。

4 技术要求

4.1 指示微生物

4.1.1 菌种

环氧乙烷灭菌指示微生物应采用枯草杆菌黑色变种 (*Bacillus atrophaeus* ATCC 9372, NCTC 10073, NCIMB 8058, DSM 2277, NRRL B-4418, CIP 77.18) 芽胞。

4.1.2 菌量

回收菌量大于等于 1.0×10^6 CFU/片,回收菌量同时应在制造商标明菌量的 $-50\% \sim +300\%$ 范围内。

4.1.3 抗力

当暴露于环氧乙烷浓度 $600 \text{ mg/L} \pm 30 \text{ mg/L}$, 温度 $54 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, 相对湿度 $60\% \pm 10\%$ 时, D 值大于等于 2.5 min, 测试的 D 值应在制造商规定的 D 值 $\pm 20\%$ 范围内。

4.2 载体

符合 GB 18281.1 和 GB 18281.2 的要求;同时,暴露于温度大于等于 $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 环氧乙烷浓度大于等于 800 mg/L , 相对湿度大于等于 70% 、暴露时间大于等于 6 h 等条件下灭菌过程中不会变形、熔化、腐蚀和其他损坏。

4.3 培养基

4.3.1 培养基和培养条件应能稳定地生产出符合 4.1 和 GB 18281.1 和 GB 18281.2 性能要求的试验菌

悬液。培养基应不影响试验菌的稳定性,同时要与染菌载体和生物指示物制造工艺和材料相兼容。

4.3.2 恢复培养基:

- a) 使 10 CFU~100 CFU 的微生物恢复生长;
- b) 使损伤的微生物生长;
- c) 经过环氧乙烷灭菌处理后应确保可以抵消任何可能影响指示微生物活性的化合物,并在有效期内性能和颜色不发生改变。

4.3.3 生物指示物的设计,应有利于初始微生物数量在储存、运输和装卸过程中的基本稳定并防止外界微生物对菌片的污染。

4.4 稳定性

生物指示物存放至标签和说明书规定的条件及有效期限后所有技术参数应符合 4.1、4.2、4.3。

4.5 生物指示物抗力测定仪要求

生物指示物抗力测定仪应符合 GB/T 24628 的要求,其余要求见附录 A。

5 检验方法

5.1 活菌计数

5.1.1 通过菌落形成单位检测方法统计菌片或自含式生物指示物上的试验活菌。这种方法常用于预期回收菌量在 50 CFU 以上的情况。

5.1.2 本方法适用于初始活菌数(未处理的样品)的检测以及利用存活曲线(处理过的样品)检测 D 值。

5.1.3 测定回收菌量时,最小检测数量应每批量/批次至少使用 4 个测试样品,检测方法见附录 B。

5.1.4 相关使用材料及配置方法。见《消毒技术规范》2002 年版。

5.2 抗力试验

5.2.1 测试抗力时应使用生物指示物抗力测试仪,要求见附录 A。

5.2.2 D 值测定应至少使用以下两种方法:

- a) 存活曲线法测定 D 值(见附录 C);
- b) 部分阴性分析法测定 D 值(见附录 D);
- c) 验证法测试 D 值将 a)或 b)测试出的 D 值和 5.1 的菌量进行计算,计算出 ST 值和 KT 值,进行试验验证(见附录 E)。

5.3 恢复培养基对少量菌恢复能力的测试

每个样本的恢复培养基中,接种 10 CFU~100 CFU 的枯草杆菌黑色变种芽胞,同时设置阴性对照和阳性对照培养至规定时间后观察变色情况,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,判断恢复培养基合格。

5.4 材料对灭菌过程兼容性测试

按 GB 18281.1 进行。

5.5 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,生物指示物应满足 4.1、4.2、4.3。

附 录 A
(规范性附录)
抗力测定仪要求及抗力试验

A.1 抗力测定仪要求

A.1.1 参数要求

时间常数精确度 ± 1 s,分辨率1s;温度范围 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 80\text{ }^{\circ}\text{C}$,精确度 $\pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$,分辨率 $0.1\text{ }^{\circ}\text{C}$,响应时间小于等于500 ms;真空度范围 $0\text{ kPa}\sim 100\text{ kPa}$,精确度 $\pm 1.0\text{ kPa}$,分辨率 0.1 kPa ,响应时间小于等于30 ms;压力范围 $100\text{ kPa}\sim 200\text{ kPa}$,精确度 $\pm 3.5\text{ kPa}$,分辨率 0.1 kPa ,响应时间小于等于30 ms;相对湿度范围 $20\%\sim 90\%$,精确度 $\pm 5\%$,分辨率 1% ,响应时间15 000 ms;环氧乙烷浓度范围 $25\text{ mg/L}\sim 1\ 200\text{ mg/L}$,精确度为 \pm 设定浓度的 5% 。

A.1.2 记录范围

抗力测定仪应能自动记录上述参数,不少于10 s一个数据点。相对湿度和环氧乙烷浓度可由传感器直接测量,或者由压力参数推算。

A.1.3 其他要求

抗力测定仪应配备有抽真空装置,让反应室的真空度低于 10 kPa ,以便在通入环氧乙烷之前充分排除室内空气,并与暴露阶段结束时把环氧乙烷全部排出,其中通入环氧乙烷气体达到规定的气体浓度,所需时间小于等于60 s,排出环氧乙烷气体达到真空(10 kPa),所需时间亦小于等于60 s。周期结束时输入的空气应经滤器滤过,该滤器应能清除不少于 99.9% 的 $0.5\text{ }\mu\text{m}$ 颗粒。

A.2 抗力试验

A.2.1 放置样品于合适的载样器材上。

A.2.2 预热抗力测定仪反应室至选定测定条件($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 或 $54\text{ }^{\circ}\text{C}$)。

A.2.3 放置已有样品的载样器材于反应室内,关闭反应室并开始试验过程。

A.2.4 按以下顺序进行操作:

- a) 反应室抽真空,达 $10\text{ kPa}\pm 0.5\text{ kPa}$ (或根据制造商提供的信息);
- b) 充入足量水蒸气,使反应室内相对湿度达到 $60\%\pm 10\%$,维持该条件 $30\text{ min}\pm 1\text{ min}$,样品应在充入水蒸气之前加温到露点以上以避免潜在的水汽凝结;
- c) 往室内通入环氧乙烷,在60 s内使浓度达到规定浓度 $600\text{ mg/L}\pm 30\text{ mg/L}$,在零气体暴露周期不需要通入环氧乙烷;
- d) 在规定的暴露时间 $\pm 5\text{ s}$ 保持测试条件;
- e) 在暴露阶段结束时反应室抽真空,在1.5 min内达到 10 kPa ,接着注入经滤过的空气或惰性气体(如氮气),达到外界气压;
- f) 重复e)步骤4次。

在上述周期结束时,将指示物从抗力仪中迅速移出,并按要求进行处理。

附 录 B
(规范性附录)
活菌培养计数方法

B.1 在无菌试管内加入 5 mL 含有 0.5% 吐温-80 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液,加入适量无菌玻璃珠,将待计数染菌载体投入试管,用电动混匀器振荡直至染菌载体被完全打碎,制成菌悬液。

B.2 将无菌试管按需要数量分组排列于试管架上,每管加入 4.5 mL 含有 0.5% 吐温-80 的 0.03 mol/L 磷酸盐缓冲液。各组由左向右,逐管标上 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} ……。

B.3 将菌悬液样本用电动混匀器混合 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。

B.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。

B.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。

B.6 将 40 °C~45 °C 熔化的培养基,倾注于已加入样液的平皿中,每平皿 15 mL~20 mL。

B.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 36 °C±1 °C 恒温培养箱内培养。

B.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 15 CFU~300 CFU 的稀释度为准记录结果。

B.9 根据稀释倍数和接种量计算每一染菌载体上的平均菌落数。

附 录 C
(规范性附录)
存活曲线方法测定 D 值

C.1 总则

本方法是建立在通过直接计数菌落形成单位(CFU)检测存活试验菌的数量上,利用活菌计数法检测存活被测微生物的数量。这种方法可行的最低限约为 5×10^1 CFU,见附录 B。

C.2 步骤

C.2.1 测试样本应暴露于规定的暴露条件。

C.2.2 应至少有 5 次暴露,而且应包括以下几方面:

a) 有 1 次暴露中样本未经环氧乙烷处理(0 暴露时间)。

注:环氧乙烷可不存在或由惰性气体或介质替代。

b) 至少有 1 次暴露使活菌数降低到最初接种量的 0.01%(减少 4 lg)。

c) 至少有 3 次暴露介于 a)和 b)情况之间。

C.2.3 每次测定中每次暴露所用的试验样本应不少于 4 个,每次暴露应采用相同的数量试验样本。

C.2.4 每次暴露 2 h 内,应对测试样本进行处理,让试验菌从载体上脱落。见附录 B。

C.2.5 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 lg 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 D
(规范性附录)
部分阴性分析法测定 D 值

D.1 总则

本方法是通过直接观察指示微生物在液体培养基中的生长情况,来间接确定试验菌的存活情况。

D.2 检测方法**D.2.1 Holcomb-spearman-karber 法(HSKP)****D.2.1.1 试验次数与样本数量要求**

至少应进行 5 组试验,至少包括 1 组所有样本出现生长情况的试验、2 组部分样本出现生长情况的试验、2 组经过连续暴露后没有观察到出现生长情况的试验。每组试验最少使用 20 个样本。

D.2.1.2 样本培养要求

样本经过暴露后应按照制造商指定的方法培养。根据试验菌的特点,液体培养基的浑浊度、培养基表面的生长情况或试管底部沉淀物将表明试验菌的生长情况。如果生长培养基属于生物指示物的一部分,如自含式生物指示物,则应按照制造商提供的使用说明判断试验菌是否出现生长情况(通过观察 pH 值颜色变化,从而显示自含式生物指示物中试验菌的生长情况)。

D.2.1.3 利用 HSKP 计算

D.2.1.3.1 此计算方法是建立在应至少有 5 组暴露试验,而且应包含以下条件:

- 其中 1 组样本应是全部测试菌生长;
- 其中 2 组样本应有部分样品生长;
- 其中 2 组样本应是全部不生长菌(见表 D.1)。

表 D.1 HSKP 计算时所需要的样本数据

灭菌剂暴露时间(t)	暴露样本数量(n)	无菌生长的样本数量(r)
$t_1(U_1)$	n_1	r_1^a
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5(U_{K-1})$	n_5	r_5
$t_6(U_K)$	n_6	$r_6(r=n_6)$

表 D.1 (续)

灭菌剂暴露时间(t)	暴露样本数量(n)	无菌生长的样本数量(r)
t_7	n_7	$r_7(r=n_7)$
注： t_1 定义为所有测试样本均出现生长情况的暴露组中，暴露在灭菌剂下的最长暴露时间； $t_2 \sim t_5$ 是部分阴性区域的增加时间； t_6 和 t_7 是所有样本均没出现生长情况的连续暴露时间(U_K 为最终暴露， U_{K-1} 为在 U_K 之前的一次暴露)。		
* 如果未出现阴性单元，即，未出现阴性试样($r=0$)，且所有单元在暴露时间 t_1 前出现生长情况；同时，在暴露时间 t_6 之后的过程中全部为阴性试样($r=n_7$)，即未出现生长情况，则测试有效。		

D.2.1.3.2 对于暴露在灭菌剂下的暴露时间 t_i ，因子 χ_i 和 γ_i 分别按式(D.1)、式(D.2)计算：

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2} \dots\dots\dots (D.1)$$

式中：

χ_i ——用于计算 U_i 的因子；

t_i ——第 i 次暴露时间。

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i} \dots\dots\dots (D.2)$$

式中：

γ_i ——用于计算 U_i 的另一因子；

r_i ——在暴露时间 t_i 时出现未生长试样的数量；

n_i ——在暴露时间 t_i 下暴露的数量。

在 t_1 时间下，所有样本表现出生长，所以 $\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1}$

从以上 χ_i 和 γ_i 的计算值中，在第 i 次暴露时间 t_i 的 U_i 值可以按式(D.3)计算：

$$U_i = \chi_i \gamma_i \dots\dots\dots (D.3)$$

式中：

U_i ——第 i 次暴露时间下时间与未存活样本的关系值；

γ_i ——用于计算 U_i 的另一因子；

χ_i ——用于计算 U_i 的因子。

D.2.1.3.3 任何试样的平均无菌时间 U_{HSK} ，可以通过对每一次暴露时间 $t_i, i=1 \dots k$ 的 U_i 值的求和来计算[见式(D.4)]：

$$U_{HSK} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i \dots\dots\dots (D.4)$$

U_{HSK} ——平均无菌时间；

U_i ——每次暴露时间下时间与未存活样本的关系值。

D.2.1.3.4 D 值用式(D.5)计算：

$$D = \frac{U_{HSK}}{\lg N_0 + 0.2507} \dots\dots\dots (D.5)$$

式中：

D —— D 值；

U_{HSK} ——平均无菌时间；

N_0 ——每批生物指示物的回收菌量的平均数，用活菌培养计数方法计算(见附录 B)。

注：lg(Euler 常量)=lg(0.577 2)=-0.250 7。

D.2.1.3.5 当暴露时间间隔 d 是一个常量,在每一个暴露时间下,测试样品数量 n 也是一样的,平均无菌时间的 U_{HSK} 可以用式(D.6)计算:

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

D.2.2 Limited Holcomb-spearman-karber 法(LHSKP)

D.2.2.1 LHSKP 计算方法的建立条件与 HSKP 相同,见 D.2.1.3.1。

D.2.2.2 U_{HSK} 计算公式见式(D.6)。

D.2.2.3 D 值计算公式见式(D.5)。

D.2.2.4 LHSKP 法需要暴露时间间隔为恒定,并且每次试验样本的数量应相同。

附 录 E
(规范性附录)
验证法测定 D 值

E.1 应分别使用不少于 50 个相同的样本,通过存活时间和杀灭时间证实 D 值。

E.2 样本暴露后应按照制造商给出的方法进行培养。

E.3 存活时间(ST)和杀灭时间 (KT)用式(E.1)、式(E.2)计算:

$$ST \geq (\lg N_0 - 2) \times D \text{ 值} \quad \dots\dots\dots(\text{E.1})$$

$$KT \leq (\lg N_0 + 4) \times D \text{ 值} \quad \dots\dots\dots(\text{E.2})$$

式中:

N_0 ——每批生物指示物的回收菌量的平均数。

E.4 暴露时间设定为 ST 值时,若全部有菌生长,则符合要求,若有样本无菌生长,则不符合要求;暴露时间设定为 KT 值时,若全部无菌生长,则符合要求,若有样本有菌生长,则不符合要求。

