



中华人民共和国国家标准

GB/T 33417—2016

过氧化氢气体灭菌生物指示物检验方法

Test method of biological indicator for hydrogen peroxide vapour
sterilization processes

2016-12-30 发布

2017-07-01 实施

中华人民共和国质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

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、中国医学科学院协和医院。

本标准主要起草人：张流波、张剑、姚楚水、张青、王立飞、张玮、王香、王洪敏、史绍毅、王妍彦、邱侠、马玲、朱亭亭。

过氧化氢气体灭菌生物指示物检验方法

1 范围

本标准规定了过氧化氢气体灭菌生物指示物的检验方法。

本标准适用于过氧化氢气体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

过氧化氢气体灭菌 **hydrogen peroxide vapour sterilization**

以汽化的过氧化氢作为主要杀灭微生物因子的灭菌方式。

3.3

载体 **carrier**

试验微生物的支持物。

3.4

存活时间 **survival time; ST**

测定生物指示物抗力时,受试样本经杀菌因子作用后,全部有菌生长的最长作用时间。

3.5

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。

3.6

D 值 **D value**

杀灭微生物数量达到 90%所需要的时间。

3.7

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

含有微生物复苏生长所需培养基的生物指示物。

3.8

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

用于制作过氧化氢气体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

回收菌量大于或等于 1×10^6 CFU/片,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。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。在使用浓度为 $59\% \pm 2\%$ 过氧化氢,灭菌舱内作用浓度为 $2.3 \text{ mg/L} \pm 0.4 \text{ mg/L}$,作用温度 $50^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ 的条件下,D 值的要求为 $0.75 \text{ s} \sim 8 \text{ s}$ 。对于成品的生物指示物,测试的 D 值应在说明书上的 D 值 $\pm 20\%$ 范围内。应使用下列 2 种方法进行测试:

- a) 部分阴性法测试 D 值,参见附录 B;
- b) 验证法测试 D 值,将 a) 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。参见附录 C。

$$ST \geq (\log N_0 - 2) \times D \text{ 值} \dots\dots\dots (1)$$
$$KT \leq (\log N_0 + 4) \times D \text{ 值} \dots\dots\dots (2)$$

式中:
 N_0 ——每批生物指示物的回收菌量的平均数。

4.2 载体

按 GB 18281.1 的要求进行灭菌过程兼容性的测试。

4.3 恢复培养基

4.3.1 恢复培养基应满足下列要求:

- a) 有使 10 CFU~100 CFU 的微生物恢复生长的能力;
- b) 有使损伤的微生物恢复生长的能力,并且有中和残留的灭菌因子对微生物抑制生长的能力;
- c) 经过过氧化氢气体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。
- 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 将熔化的 40 °C~45 °C 嗜热脂肪杆菌芽孢恢复培养基,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中或每一菌片(染菌载体)上的平均菌落数。

附 录 B
(资料性附录)
部分阴性法计算 D 值

B.1 随机选取 120 个样本。分成 6 组,每组 20 个样本。

B.2 生物指示物抗力测试仪设置如下:

- a) 暴露温度: $50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$;
- b) 暴露剂量: $2.3\text{ mg/L} \pm 0.4\text{ mg/L}$;
- c) 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。

B.3 对 6 组样本分别暴露。

B.4 暴露完成后将 6 组生物指示物在 $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 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,最长的 2 个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(B.1)和式(B.2)计算 D 值。

B.5 部分阴性法(Limited Spearman-Kärber 法) D 值的计算见式(B.1)、式(B.2):

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

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

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。

附 录 C
(资料性附录)
验证法测试 *D* 值

C.1 ST 值验证

将 50 个试验样本放入过氧化氢气体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。

C.2 KT 值验证

将 50 个试验样本放入过氧化氢气体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。

C.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。

