

生物指示剂耐受性检查法指导原则（新增）

生物指示剂的耐受性是指其所含的微生物能够耐受各种灭菌程序的能力。一般来说，生物指示剂的耐受性用 D 值来表示。D 值是指将生物指示剂中的微生物杀灭 90% 所需的灭菌时间或灭菌剂量。生物指示剂的主要质量参数包括总芽胞数、D 值和存活时间、杀灭时间。

本指导原则用于指导生物指示剂的耐受性以及相关质量参数的测定，也可用于生产过程污染微生物的耐受性测定。

总芽胞计数

培养基

芽胞计数可用胰酪大豆胨琼脂培养基或其它适宜的培养基。胰酪大豆胨琼脂培养基照无菌检查法（通则 1101）制备，其它培养基照生物指示剂使用说明书进行制备。芽胞计数用培养基应进行培养基适用性检查。

稀释液

灭菌纯化水（或其他经过验证的无菌溶液）

芽胞悬液制备

芽胞悬液制备方法如下，如果下列方法经确认不适用，应建立其他适宜的方法。

根据生物指示剂的载体和初级包装情况，采取适宜的制备方法将载体上的细菌芽胞充分洗脱并混悬于稀释液中。

（1）液体芽胞悬液生物指示剂

将芽胞悬液生物指示剂样品充分混匀后，或经过超声处理后，取 1ml，用稀释液制成 1:10 的供试液。

（2）纸质载体生物指示剂或自含式生物指示剂

取不少于 3 个最小单位生物指示剂，将纸片载体从初级包装中取出，置适量的稀释液中，采用搅拌、涡旋或其它适当的方式，使容器里的纸片成纤维状（建议至少需要 15 分钟的浸泡和搅拌以使芽胞能充分回收），充分混合制成均一的混悬液。

(3) 非纸质载体的生物指示剂

取不少于 3 个最小单位的生物指示剂，将载体从初级包装中取出，置适量的稀释液中，可采用超声波(振荡器)反复振摇，或其他适宜的方法将载体上的芽胞充分分散于稀释液中。

热激活

取上述制备的芽胞悬液 10ml，置灭菌试管中，按照表 1 的要求进行热激活处理，时间达到后将芽胞悬液转移至 0~4℃的冰水浴中迅速冷却至室温。

培养和计数

取上述经热激活的芽胞悬液，用灭菌纯化水进行 10 倍系列稀释，取芽胞数在 30~300 cfu/皿稀释级的芽胞悬液 1ml，置直径 90mm 的无菌平皿中，注入 15~20ml 温度不超过 45℃熔化的胰酪大豆胨琼脂培养基，混匀，凝固，倒置培养，按照表 1 的推荐的培养温度和培养时间培养。每稀释级每种培养基至少制备 2 个平板。逐日点计和记录各平板的菌落数，并计算每个最小单位生物指示剂的平均芽胞数。

生物指示剂的总芽胞数一般为标示值的 50%~300%。

征求意见稿

表 1 生物指示剂的芽胞计数的试验条件

生物指示剂的种类		热激活参数		培养基	培养条件	
灭菌方式	所含菌种	温度 (°C)	时间 (分钟)		温度 (°C)	时间 (小时)
湿热灭菌	嗜热脂肪地芽胞杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	95~100	15	胰酪大豆胨琼脂培养基	55~60	24~48
湿热灭菌	生孢梭菌 (<i>Clostridium sporogenes</i>)	80~85	10	血琼脂平板	30~35	48~72 (厌氧培养)
湿热、干热 或环氧乙 烷灭菌	萎缩芽胞杆菌 (<i>Bacillus atrophaeus</i>)、枯草芽胞杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)、凝结芽胞杆菌 (<i>Bacillus coagulans</i>)	80~85	10	胰酪大豆胨琼脂培养基	30~35	48~72

D 值测定

仪器

湿热灭菌用生物指示剂的 D 值测定，可采用两种设备实现灭菌条件，一种是抗力仪（能够实现短时升温和降温的灭菌器），该设备适用于纸片式、自含式、芽胞悬液形式等的生物指示剂。另一种是油浴仪（能够设定到 100℃ 以上的恒温设备），该设备适用于芽胞悬液生物指示剂。为保证测定结果的准确性，抗力仪的各项参数应满足 GB/T 24628 的要求。

测定方法

生物指示剂的 D 值测定可采用阴性分数法（LHSP 法，也叫部分阴性法）或残存曲线法，测定方法参见 GB18281.1（医疗保健产品灭菌生物指示物第 1 部分：通则）。

阴性分数法 取不少于 5 组生物指示剂，每组数量相同（一般不少于 20 支），将每组生物指示剂暴露于特定灭菌条件下，各组对应的灭菌时间（剂量）递增，其余灭菌工艺参数应保持一致。相邻 2 组灭菌时间（剂量）间隔相同，且不大于标示 D 值的 75%。在不少于 5 组的生物指示剂中，至少 1 组在灭菌后培养各支均呈阳性，2 组在灭菌后培养部分呈阴性部分呈阳性，2 组在灭菌后培养各支均呈阴性，详见表 2。生物指示剂灭菌后培养条件应与产品使用说明中的培养条件一致。根据各组的阴性与阳性结果来计算 D 值。

表 2 相同时间间隔和相同样品数量的 LHSP 法计算所需的数据示例

灭菌时间（剂量）/min	每组样品数量 n	灭菌后培养为阴性结果数量 r_i
$t_1(U_1)$	n_1	$r_1(r=0)$
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	$r_6(r=n)$
t_7	n_7	$r_7(r=n)$

计算公式:

(1) 直至全部为阴性结果的平均灭菌时间 (剂量) (U_{HSK}) 计算公式

$$U_{HSK} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

式中 U_k ——最初显示全部样品为阴性结果的灭菌时间 (剂量)。

d ——相邻 2 组的灭菌时间 (剂量) 间隔。

n ——每组灭菌时的样品数量(每组的样品数量应相同, 例如 20)。

r_i ——每组灭菌后培养为阴性结果数量。

$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$ ——在 U_2 和 U_{k-1} 之间所有灭菌后培养为阴性结果数量的总和。

(2) D 的平均值 \bar{D} 的计算公式

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

式中 N_0 ——总芽胞数。

U_{HSK} ——直至全部为阴性结果的平均灭菌时间 (剂量)。

(3) 变量 V 和标准偏差 (SD) 的计算公式

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i)$$

$$SD = \sqrt{V}$$

(4) \bar{D} ($p=0.05$) 的 95% 置信区间 D_{calc} , 及置信下限 D_{low} 和置信上限 D_{up} 的

计算公式:

$$D_{calc} = \bar{D} \pm 2SD$$

$$D_{low} = \frac{U_{HSK} - 2SD}{\lg N_0 + 0.2507}$$

$$D_{up} = \frac{U_{HSK} + 2SD}{\lg N_0 + 0.2507}$$

残存曲线法 取不少于 5 组生物指示剂（每组不少于 4 支），其中有 1 组不经灭菌处理，其余每组暴露于特定灭菌条件下，至少有 1 组灭菌后芽胞数下降不少于 $4lg$ 值，其余 3 组的灭菌条件介于上述 2 组之间。将上述 5 组生物指示剂按照“总芽胞计数”的方法进行芽胞计数，以每组计数结果的平均值作为该组的芽胞数。以灭菌时间（剂量）作为横坐标，以芽胞数的对数值为纵坐标作图，并进行直线拟合（或用最小二乘法进行回归分析），进行回归分析或直线拟合时不应包括未灭菌组芽胞数 lg 值 $\pm 0.5lg$ 范围内的数据点，所得直线斜率的负倒数即为 D 值。

存活时间和杀灭时间的确认

生物指示剂的耐受性 D 值可以用存活时间和杀灭时间来对确认。

仪器

见 D 值测定项下“仪器”。

存活时间 测定时，将生物指示剂暴露于灭菌条件下一定时间（尽可能长时间）后，使所有生物指示剂培养均呈阳性。存活时间可以按下式计算：

$$\text{存活时间} \geq D \text{ 值} \times (lgN_0 - 2)$$

式中 N_0 为单位生物指示剂的初始芽胞数。

杀灭时间 测定时，将所有生物指示剂暴露于灭菌条件下一定时间（尽可能短时间）后，使所有生物指示剂培养均呈阴性。杀灭时间可以按下式计算：

$$\text{杀灭时间} \leq D \text{ 值} \times (lgN_0 + 4)$$

式中 N_0 为单位生物指示剂的初始芽胞数。

存活时间和杀灭时间的确认

根据说明书中标示的或计算出的存活时间或杀灭时间，取两组生物指示剂（每组不少于 10 支），其中一组按照存活时间进行灭菌，另一组按照杀灭时间进行灭菌，灭菌后按照表 1 的条件或使用说明中的培养条件进行培养，并观察结果。

存活时间组的培养结果均应为阳性。杀灭时间组的培养结果均应为阴性。