

9207 灭菌用生物指示剂指导原则（新增）

生物指示剂是一种对特定灭菌程序有确定及稳定的耐受性的特殊微生物制品，可用于灭菌设备的性能确认~~—~~，特定物品的灭菌工艺研发~~及~~、建立、~~产品灭菌程序的验证—~~，生产过程灭菌效果的监控~~—~~，~~灭菌程序的定期再验证—也可用于~~隔离器系统和无菌洁净室~~灭菌除菌~~效果的验证评估等。

生物指示剂的分类

生物指示剂主要有以下三种类型，其特征需符合《医疗保健产品灭菌生物指示物》GB18281 的要求。

（1）由微生物芽孢和载体经包装而成，载体可以是碟形或条状的滤纸、玻璃、塑料或其它材料。

载体和内层包装不得含有物理、化学或微生物的污染物，避免影响生物指示剂的性能和稳定性；不得被特定的灭菌工艺降解；能被灭菌介质（蒸汽、射线、化学试剂等）穿透并使灭菌介质与生物指示剂能充分接触。载体和包装的设计应保证生物指示剂不受污染、并使其所含的微生物在贮存~~—及~~运输~~和使用过程中~~损失最小，且方便取样、转移和接种。

（2）芽孢悬液生物指示剂，该类生物指示剂是将芽孢混悬于液体中。若用于液体物品灭菌，~~必须建议~~测定生物指示剂在灭菌液体物品中的芽孢数和 D 值。

（3）自含式生物指示剂，该类生物指示剂是由芽孢和能够恢复微生物生长的培养基组成的系统，~~其耐受性是针对整个系统而言~~。系统中的培养基用于培养灭菌后的生物指示剂，应制定程序确认该培养基能保证残存微生物的生长。

~~自含式生物指示剂的耐受性是针对整个系统而言。~~

自含式系统所采用的材料不应该含有或在使用过程释放出抑制残存微生物生长的物质。该系统的设计应能够承受运输和使用过程中的影响，不发生破损，并使原始接种的微生物损失减少到最小。

生物指示剂用微生物的基本要求

生物指示剂含有对灭菌模式有明确耐受性的~~一种或两种~~微生物。除了电离辐射外，微生物芽孢较菌体有更强的耐受性。一般认为含芽孢的细菌更适合用于制备生物指示剂。

不同灭菌工艺使用不同的生物指示剂，制备生物指示剂所选用的微生物应具备以下特性：

- (1) 菌种的耐受性应大于需灭菌物品中所有可能污染菌的耐受性。
- (2) 菌种应无致病性。
- (3) 菌株应稳定，存活期长，易于保存。
- (4) 易于培养。生物指示剂的芽孢含量要在 90%以上

生物指示剂的制备

生物指示剂应按程序进行制备和质控。制备前，需先确定所使用微生物的特性。

制备生物指示剂时，将所用的微生物在适宜条件下进行大规模培养、收集和纯化，然后将休眠（未萌发状态）芽孢悬浮于无营养的液体中保存。生物指示剂应避免其它微生物的污染，制备后需进行各性能参数测定。应建立和保存相关的微生物鉴定和制备记录，包括菌株来源，鉴别，与生物指示剂直接相关的材料和成分的溯源记录，传代次数，培养基和其制备方法，以及热激处理前后数据，芽孢的耐受性（D 值）等信息。

商品化的生物指示剂应具备详细的生物指示剂的性能特征和使用说明，包括明确其可用于何种灭菌程序、灭菌后的微生物培养条件和培养基、对灭菌程序的耐受性包括 D 值，D 值测定方法、效期内的微生物总数，以及储存条件（包括温度，相对湿度和其它储存要求）、有效期和使用后的废弃措施等信息。

用户亦可根据需求选择可作为生物指示剂的微生物自制供内部使用的生物指示剂。用户应确定自制生物指示剂的纯度、芽孢数、D 值等参数，并制定有效期，以保证灭菌验证和监控的有效性。

生物指示剂应在标签条件或验证条件下进行储存，避光，远离毒性物质，防止过热和潮湿。

生物指示剂的应用

生物指示剂的性能评估

在灭菌程序的验证中，生物指示剂的被杀灭程度，是评价一个灭菌程序有效性最直观的指标。

用户应根据使用目的制定商品化生物指示剂的验收标准，以保证生物指示剂

的性能符合相关要求。在生物指示剂验收前，可考虑对 D 值进行评估，必要时可进行 D 值测定，确认 D 值和微生物数量的稳定性对于长期存放的生物指示剂尤为重要。接收商品化生物指示剂时，应进行微生物纯度和形态的鉴定及测定微生物数量。生物指示剂应在有效期内使用，必要时应重新进行耐受性检查。

自制的生物指示剂的性能应符合应用的要求。

生物指示剂的选择

用户应根据特定的灭菌工艺选择适宜的生物指示剂。生物指示剂对灭菌过程的挑战必须超出产品内外的自然微生物负荷量及耐受性的挑战，以保证灭菌程序有更大的安全性。

湿热灭菌法：湿热灭菌工艺常用的生物指示剂为嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*）。其他耐热芽孢菌，如生孢梭菌（*Clostridium sporogenes*），枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）和凝结芽孢杆菌（*Bacillus coagulans*）的生物指示剂也被用于湿热灭菌工艺的建立和验证。

干热灭菌法：干热灭菌工艺，一般使用萎缩芽孢杆菌生物指示剂（*Bacillus atrophaeus*）进行验证，但更多则采用去热原方法加以验证，因为去热原所需的温度远高于灭菌温度。

电离辐射法：评价辐射灭菌工艺曾采用短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus*）生物指示剂，但现在一般采用剂量设定方法包含辐射灭菌前初始菌的评估以及辐射剂量评估，无需使用生物指示剂。此外，也出现了比短小芽孢杆菌更抗辐射的微生物。

环氧乙烷灭菌法：环氧乙烷灭菌工艺，最常使用萎缩芽孢杆菌（*Bacillus atrophaeus*）生物指示剂进行验证。

过氧化氢（VHP）汽相灭菌法：VHP 已被证明是一种有效的表面灭菌剂或消毒剂。生物指示剂可以用于验证表面灭菌效果，一般要求芽孢数下降 3~6 个 lg 值。

过氧化氢蒸汽灭菌工艺用生物指示剂一般选用嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*），也可用枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）、生孢梭菌（*Clostridium sporogenes*）或其它微生物。

过氧化氢蒸汽灭菌工艺用生物指示剂可以使用各种含有玻璃、金属或塑料的

不透气载体系统。像纤维基质或其它易于吸收 VHP 或水分的高吸附性表面，可能对用于微生物灭活的 VHP 的浓度产生不利影响，因此，这类材料不适宜作为 VHP 生物指示剂的载体。

商品化生物指示剂的典型特征实例，见表 1。

表 1. 商业化生物指示剂的典型特征实例

灭菌方式	经典微生物	D 值的参考范围 (min)	耐受性(一定条件下测定的 D 值, min)	
			存活时间	杀灭时间
干热灭菌 ① 160℃	萎缩芽孢杆菌 (<i>Bacillus atrophaeus</i>)	1.0~3.0	4.0~14.0	10.0~32.0
环氧乙烷 灭菌② 600mg/L 54℃ 60%相对湿度	萎缩芽孢杆菌 (<i>Bacillus atrophaeus</i>)	2.5~5.8	10.0~ 27.033.0	25.0~68.0
湿热灭菌 ③ 121℃	嗜热脂肪地芽孢杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)	1.5~3.0	4.5~14.0	13.5~32.0

① 芽孢数范围在 1.0×10^6 至 5.0×10^6 。

② 芽孢数范围在 1.0×10^6 至 5.0×10^7 。

③ 芽孢数范围在 1.0×10^5 至 5.0×10^6 。

生物指示剂的应用

用户应合理科学的选择和使用生物指示剂。在灭菌程序的建立、确定、验证和日常监控中, 需对灭菌产品(包括其材料和包装)进行全面了解, 确保灭菌参数能达到所需的 SAL-无菌保障水平。生物指示剂的初始微生物的数量、耐受性(菌

体耐受性)和放置的位置、方式等情况都会影响其灭活效果。~~需通过实验室研究确定产品各组成部分是否比产品内的溶液或药品更难灭菌。根据产品中最难灭菌的部位,制定不同的工艺参数以确保达到预设的无菌保证水平小于 10^{-6} 。在产品性能验证阶段,应确定产品最难灭菌部位的微生物灭活工艺参数。在进行产品灭菌工艺验证时,最难灭菌部位的灭菌工艺参数应作为最低灭菌条件。生物指示剂的初始微生物数量和耐受性都会影响到灭菌后的培养结果。~~在湿热灭菌工艺中,生物指示剂的使用是通过生物学的方法来验证其~~灭菌物理杀灭力效果~~,只要D值足够,即使初始微生物数量低于 10^6 ,使用生物指示剂仍然可以验证其灭菌效果。对湿热灭菌耐受性差的物品,其无菌保证应通过比较生物指示剂与物品灭菌前微生物的污染水平(耐受性及微生物污染数量)及灭菌程序验证所获得的数据进行评估。