

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.22.019

脉动真空灭菌器灭菌效果验证

牛振东,路银环,刘文杰,陈卓,井良义[△]

(北京市药品检验研究院·中药成分分析与生物评价北京市重点实验室,北京 102206)

摘要:目的 验证脉动真空灭菌器的灭菌效果。方法 选择嗜热脂肪地芽孢杆菌 *Geobacillus stearothermophilus* 的芽孢及培养基的压力蒸汽灭菌生物指示剂(BI)进行生物指示剂挑战试验,灭菌器1,2号锅上下层分别布置9个监测点。试验分为试验组、阳性对照组、阴性对照组。试验组BI经121.0℃灭菌15 min,置换6 min后释放芽孢杆菌,于56℃培养48 h;阳性对照组芽孢杆菌于56℃培养48 h;阴性对照组仅有培养基,于56℃培养48 h;检测灭菌效果。并以B-D测试法进行对照。结果 生物指示剂挑战试验中,试验组(灭菌器1,2号锅各点位)及阴性对照组灭菌前后均呈紫红色、澄清状,阳性对照组呈黄色、混浊状;B-D测试结果显示试纸由黄色转为黑色。结论 生物指示剂挑战试验适用于检查脉动真空灭菌器的灭菌效果。

关键词:脉动真空灭菌器;高压灭菌;生物指示剂挑战试验;B-D测试法

中图分类号:R953;R187

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)22-0075-03

Validation of Sterilization Effect of Pulsant Vacuum Sterilizer

NIU Zhendong, LU Yinhuan, LIU Wenjie, CHEN Zhuo, JING Liangyi

(Beijing Institute Drug Control · Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, Beijing, China 102206)

Abstract: **Objective** To verify the sterilization effect of pulsant vacuum sterilizer. **Methods** The spores containing *Geobacillus stearothermophilus* and the pressure steam biological indicator (BI) of the culture medium were selected for the bioindicator challenge test. The upper and lower layers of sterilizer 1 and 2 pots were respectively arranged with nine monitoring points. The test group, positive control group and negative control group were set in this test. In the test group, BI was sterilized at 121.0℃ for 15 min, the bacillus was released after 6 min of replacement, and the BI was cultured at 56℃ for 48 h. In the positive control group, *Geobacillus stearothermophilus* was cultured at 56℃ for 48 h. In the negative control group, there was only a culture medium, which was incubated at 56℃ for 48 h. The sterilization effect was tested, and the B-D test method was used for comparison. **Results** In the biological indicator challenge test, the test groups at each point of sterilizer 1 and 2 pots and the negative control group were purple-red and clear before and after sterilization, while the positive control group was yellow and turbid. B-D test method showed that the test paper turned from yellow to black. **Conclusion** Biological indicator challenge test and B-D test are suitable for checking the sterilization effect of pulsant vacuum sterilizer.

Key words: pulsant vacuum sterilizer; high-pressure sterilization; biological indicator challenge test; B-D test method

国家食品药品监督管理局药品安全监管司/药品认证管理中心《药品生产验证指南》要求,药品生产过程中使用的灭菌设备安装、调试结束后,在正式投入使用前和使用一定时间后必须确认性能,可进行期间核查,应采用经过验证的灭菌工艺、操作规程和检测方法进行操作。高压灭菌器应经过生物指示剂挑战试验和B-D试验测试灭菌效果,合格后方可使用。生物指示剂挑战试验是验证灭菌器灭菌效果的重要手段,2020年版《中国药典(四部)》中将生物指示剂(BI)定义为一种对特定灭菌程序有确定及稳定耐受性的特殊活微生物制成品^[1]。脉动真空灭菌器采用湿热灭菌法灭菌,即利用饱和蒸汽使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性从而杀灭微生物。蒸汽穿透力强,灭菌效果可靠,使

用方便,广泛应用于病原微生物实验室,尤其是对器械、培养基、感染性废弃物等的消毒灭菌^[2]。灭菌程序的建立、确定、验证和日常监控中,实验室需合理选择和使用BI,全面了解灭菌产品,确保灭菌参数能达到所需无菌保障水平。BI的耐受性及标准化应用等问题是决定灭菌工艺验证效果是否合理的关键,而合理有效的灭菌工艺直接关系医药产品的安全^[3]。本研究中通过生物指示剂挑战试验及B-D试验分析脉动真空灭菌器的灭菌效果。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:1300 Series A2型生物安全柜(美国 Thermo Fisher公司);BIOBASE型生化培养箱(山东博科科学仪

第一作者:牛振东,男,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品、生物制品的微生物限度和无菌检查,(电子信箱)dividniu@163.com。

[△]通信作者:井良义,男,副主任技师,研究方向为药品、化妆品、生物制品的微生物限度和无菌检查,(电子信箱)jingliangyi@hotmail.com。

器有限公司);BIST-A-D型电热脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司,含1号锅和2号锅,其装载车分上下两层)。

试剂:压力蒸汽灭菌生物指示剂,包括嗜热脂肪地芽孢杆菌 *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 7953[芽孢数为 $(1\sim5)\times10^6$ cfu/片,D值为 $1.3\sim1.9$ min],以及培养基(上海福泽医药器材有限公司,批号为210720);B-D试验包(山东新华医疗器械股份有限公司,批号为21H02)。

1.2 方法

生物指示剂挑战试验:该试验能直接反映灭菌器在灭菌过程中的灭菌能力和效果,是灭菌器灭菌过程中最重要的监测手段^[4]。试验分为试验组、阳性对照组、阴性对照组。脉动真空灭菌器装载车分为上下两层(1,2号锅),分别对上下两侧布点进行生物指示剂测试,每层布置9个监测点,分别进行空载和满载测试。试验组BI经 $121.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌15 min,置换6 min后释放芽孢杆菌,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h;阳性对照组芽孢杆菌于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h;阴性对照组仅有培养基,于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养48 h。布点见表1,装载方式见图1。

表1 生物指示剂挑战试验结果

Tab.1 Results of the biological indicator challenge test

灭菌器 锅号	点位	试验组		阳性对照组	
		灭菌前	灭菌后	灭菌前	培养后
1号	上层前3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清	紫红色、澄清	黄色、浑浊
	上层中3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	上层后3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层前3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层中3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层后3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
2号	上层前3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清	紫红色、澄清	黄色、浑浊
	上层中3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	上层后3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层前3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层中3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	下层后3点	紫红色、澄清	紫红色、澄清		

B-D测试法:将试验包置灭菌器室内排气口处关闭柜门^[5], $134\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌3.5 min,脉动3次,完毕,取出测试图,观察测试结果(试验试纸由黄色转为黑色,表明灭菌有效)。实验室应根据灭菌器使用的年限和频率等因素制订相应的B-D监测规范。

指示胶带的使用:应在每次灭菌过程中使用,主要用于区分是否进行过灭菌处理。但不能据此结果判定灭菌是否合格^[6],只有结合其他手段综合评估才能判断灭菌效果。

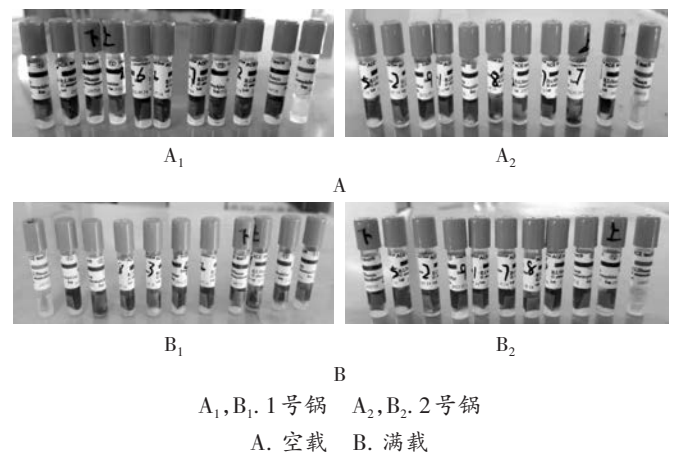


图1 灭菌锅不同装载方式试验结果

A₁,B₁. No. 1 pot A₂,B₂. No. 2 pot

A. No-load B. Full-load

Fig.1 Test results of different loading modes of sterilizer pots

2 结果

生物指示剂挑战试验结果见表1(试验组及阴性对照组灭菌前后均呈紫红色、澄清状)和图1。B-D测试结果显示,试验试纸由黄色转为黑色。

3 讨论

2020年初新型冠状病毒肺炎疫情(简称新冠疫情)的暴发,加深了人们对生物安全的认识,实验室生物安全也愈加凸显。我国出台《生物安全法》并于2021年4月15日起实施,该法细致详细,为生物安全领域首次立法,凸显国家对生物安全的重视。对此,病原微生物实验室应建立质量与生物安全管理体系、人员管理、菌(毒)种和阳性样本的管理、环境与设备管理、废弃物安全、个人防护和应急预案等。加强灭菌器性能验证及其规范操作对微生物实验室至关重要。

第40版《美国药典》及第8版《欧洲药典》均指出,BI是一种对特定灭菌程序有确定及稳定耐受性的特殊活微生物制成品,其常用于确认灭菌设备性能,及特定物品的灭菌工艺研发、建立和验证等。BI主要分菌片式和自含式,菌片式BI需要未灭菌的菌片和无菌培养基,本试验中所用的为自含式BI,本身含有菌种和培养基,可有效避免外界杂菌的污染。Bowie等发明的验证预真空灭菌器的真空系统是否功能正常的方法即B-D测试法^[7],适用于预真空压力蒸汽灭菌器空气排除效果的检测,及日常灭菌中空气排除效果监测、设计灭菌操作规程时的核查、灭菌器研制中及维修后性能的测定、新灭菌器安装调试后效果的测定等。医用消毒灭菌指示胶带是灭菌过程指示产品,通过胶带上的指示油墨在经过消毒灭菌作用后颜色发生变化,从而判定物品是否经消毒处理,直观简洁地反映物品灭菌状态。

随着生物安全要求越来越受到重视,有效的灭菌