

滅菌確效解決方案:生物指示劑的選擇指引及法規要求解析

Speaker: 張國飆 Ken Zhang

目錄



- A. 生物指示劑的基礎知識
- B. 滅菌確效面臨的挑戰以及解決思路探討
- C. D值測試-抗力儀

A

生物指示劑的基礎知識

A生物指示劑的基礎知識

威脅生命安全

監管高度關注

法律訴訟賠償

社會影響惡劣

浙江新闻网 news.zj.com
www.zj.chinanews.com.cn

首页 浙江 国内 国际 社会 长三角 汽车 房产 娱乐 财经 IT 体育

新闻

新闻热词: 台风 叙利亚局势 温州金改 神舟九号 黄岩岛 公租房 楼市调控 民

浙江新闻网 > 国内 > 正文

广东汕头一医院11名剖宫产妇产后感染

您的位置: 新华网主页 - 新华健康

山西临汾尧都区发生白内障患者医院感染

FDA爆出美国最脏药厂 产品每毫升5万多个菌落

欣弗事件原因查明

<http://www.100md.com> 2006年8月22日 《生命时报》 2006.08.22

8月15日, 国家食品药品监督管理局(以下简称药监局)召开新闻发布会, 通报了对安徽华源生物药业有限公司生产的克林霉素磷酸酯葡萄糖注射液(欣弗)引发的药品不良事件调查结果: 安徽华源违反规定生产, 是导致这起不良事件的主要原因。

“按照批准的工艺, 该药品应当经过105摄氏度、30分钟的灭菌过程。但安徽华源却擅自将灭菌温度降低到100摄氏度至104摄氏度不等, 将灭菌时间缩短, 明显违反规定。样品经培养后, 长出了细菌。”药监局安全监管司王者雄说。样品中具体含有何种细菌, 还有待进一步分析评价。

如何評價滅菌程式的有效性？

生物監測作為評價消毒/滅菌程式的“金標準”，廣泛應用於製藥行業、醫院、疾控中心等。ISO 11135 中明確指出，**必須使用生物指示劑**進行微生物殺滅效果評估，確保滅菌過程達到無菌保證水準。

USP指出，生物指示劑（Biological Indicator，簡稱BI）是一類特殊的**活微生物製品**，可用於確認滅菌設備的性能，滅菌程式的驗證，生產過程滅菌效果的監控等。也可用於隔離系統和無菌潔淨室除菌效果的驗證評估等。



〈1229.5〉 BIOLOGICAL INDICATORS FOR STERILIZATION

INTRODUCTION

A biological indicator (BI) is a well-characterized preparation of a specific microorganism that has known resistance to a specific sterilization process.¹ BIs are used to demonstrate the effectiveness of processes that render a product sterile in its final package or container, as well as the effectiveness of the sterilization of equipment, product contact materials, and packaging components as required. BIs may also be used to monitor established sterilization cycles and are used for periodic reassessment of sterilization process effectiveness. BIs are process aids and can support the correlation of physical parameters to microbiological destruction. Microorganisms recognized as suitable for BIs are spore-forming bacteria; the spores of these microorganisms are significantly more resistant than the vegetative cells that comprise the majority of bioburden in or on materials.

生物指示劑分類-滅菌方法

壓力蒸汽（濕熱）滅菌

過氧化氫滅菌

環氧乙烷滅菌

幹熱滅菌

氣體滅菌（消毒）



分類依據：EP 5.1.2. Biological indicators and related microbial preparations used in the manufacture of sterile products

生物指示劑分類（結構）

載體式生物指示劑

由**芽孢**和載體經包裝而成的生物指示劑。

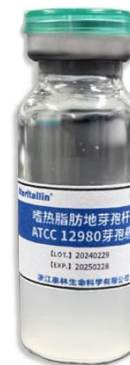
芽孢懸液式生物指示劑

該類生物指示劑是將**芽孢**混懸於液體中。

自含式生物指示劑

該類生物指示劑是由**芽孢**和恢復生長培養基組成的系統。

分類依據：ISO 11138-1:2017



生物指示劑核心指標

产品检测报告书

编号: SM-QR-8.6-240 检测报告书编号: 浙泰林检字第 (SM-SW2024118) 号
产品名称: 环氧乙烷灭菌生物指示剂 (片式) 产品型号: EP6-600
产品批号: 20240715 有效期至: 20250714
菌种编号: ATCC9372 菌种名称: 萎缩芽孢杆菌

检测类别: 出厂检验
检验依据: GB 18281.2、ISO 11138-2、Q/HTY 047 《生物指示剂》企业标准、SM-SOP-QC-165 《环氧乙烷灭菌生物指示剂 (片式) 检验规程》
检 验 员: 朱旦旦、方莹 报告日期: 2024-07-29

检测结果:

序号	检验项目	要 求	检验结果
1	外观	生物指示剂包装无破损、污渍, 包装印刷内容清晰准确, 批号等信息完整正确。	合格
2	总芽孢数	$1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^7$ cfu/pcs.	2.0×10^6 cfu/pcs
3	微生物纯度	菌落圆形, 凸面、粗糙、不透明, 颜色呈淡黄色或淡橘色, 菌落生长状态良好, 单一, 无杂菌。	合格
4	芽孢率	芽孢率: $\geq 90\%$ 。	合格
5	D 值	环氧乙烷浓度 600mg/L $\pm$ 30mg/L、54 $^{\circ}$ C $\pm$ 1 $^{\circ}$ C、60% $\pm$ 10%相对湿度条件下, D 值: 2.5min $\sim$ 5.8min。	D 值: 3.8min
6	存活时间和 杀灭时间	存活时间组的培养结果均为阳性; 杀灭时间组的培养结果均为阴性。	存活时间 ≥ 16.3 min 杀灭时间 ≤ 39.1 min
7	生长抑制*	载体和初级包装材料对生物指示剂所用微生物无抑制作用。	/

注: 生长抑制不作为逐批检验项目, 按型式检验要求进行验证。

结 论: 本批环氧乙烷灭菌生物指示剂 (片式) 各项性能均符合 GB 18281.2、ISO 11138-2、Q/HTY 047 《生物指示剂》企业标准、SM-SOP-QC-165 《环氧乙烷灭菌生物指示剂 (片式) 检验规程》的要求, 现准予出厂。

➤ 菌種

➤ 總芽孢數

➤ D值

➤ 存活時間和殺滅時間

菌種

滅菌方法	指示微生物
蒸汽滅菌	嗜熱脂肪地芽孢桿菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> (ATCC7953、ATCC12980)
液體滅菌	生孢梭菌 <i>Clostridium sporogenes</i> (ATCC 7953) 枯草芽孢桿菌 <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 35021) 萎縮芽孢桿菌 <i>Bacillus atrophaeus</i> (ATCC 9372)
乾熱滅菌	萎縮芽孢桿菌 <i>Bacillus atrophaeus</i> (ATCC 9372)
氣體滅菌	萎縮芽孢桿菌 <i>Bacillus atrophaeus</i> (EO)
化學滅菌	枯草芽孢桿菌 <i>Bacillus subtilis</i> 萎縮芽孢桿菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>
汽相滅菌	嗜熱脂肪地芽孢桿菌 <i>Geobacillus stearothermophilus</i> 萎縮芽孢桿菌 <i>Bacillus atrophaeus</i>

參考標準：USP <1229.5> Biological Indicators for Sterilization



中国认可
国际互认
检测
TESTING
CNAS L16356

杭州微数生物科技有限公司

基因检测实验室

检测报告

报告编号: Y23N015980

收样日期 2023 年 11 月 07 日	完成日期 2023 年 11 月 08 日	签发日期 2023 年 11 月 08 日
-----------------------	-----------------------	-----------------------

委托单位	浙江泰林生命科学有限公司		
联系地址	浙江省杭州市富阳区东洲街道七号路33号		
样品名称	环氧乙烷灭菌生物指示剂	样品类型	其它
样品编号	Y23DM2009-002	样品描述	外观完好
分样编号	A	检测项目	细菌16S rRNA基因特征序列鉴定
备 注	/	检测方法	细菌16S rRNA基因测序鉴定方法/1.0版

序 列 相 似 度 结 果		
相似性(%)	序列来源菌株拉丁名	中文名称
100.00	<i>Bacillus atrophaeus</i> CMCC(B)63534	萎缩芽孢杆菌
100.00	<i>Bacillus atrophaeus</i> ATCC 9372	萎缩芽孢杆菌
100.00	<i>Bacillus vallismortis</i> DSM 11031	死谷芽孢杆菌
100.00	<i>Bacillus vallismortis</i> NBRC 101236	死谷芽孢杆菌
99.80	<i>Bacillus atrophaeus</i> JCM 9070	萎缩芽孢杆菌
最高相似度	<i>Bacillus subtilis</i> group	

總芽孢數

- **定義：** 生物指示劑中，可被計數的總存活芽孢數。
- **測試方法：** 生物指示劑所含菌種及載體類型不同，計數方法也不相同。
- **品質控制：** 生物指示劑的芽孢數一般為**標示值**的 50% ~ 300%。

(參考標準：ISO 11138-1:2017)



图 1



图 2



图 3

2.7. 应同步做阳性对照，具体操作为生物指示剂不进行灭菌，按压上端帽塞并夹破安瓿瓶培养，经 55℃~60℃ 培养 48h，阳性对照必须呈阳性，测试结果才有效。

注：该指示剂适用于 121℃，F₀ 值 > 12min 的灭菌程序。

3. 注意事项

- 3.1. 生物指示剂应远离灭菌剂，避免日光或紫外线照射，不能冷冻；
- 3.2. 生物指示剂培养过程中需保持直立；
- 3.3. 为避免生物污染，生物指示剂和使用后的培养基建议经高压蒸汽灭菌后再处理。

执行标准：GB 18281.1, 3、Q/HTY 047

企业卫生许可证号：浙卫消证字（2021）第（0196）号

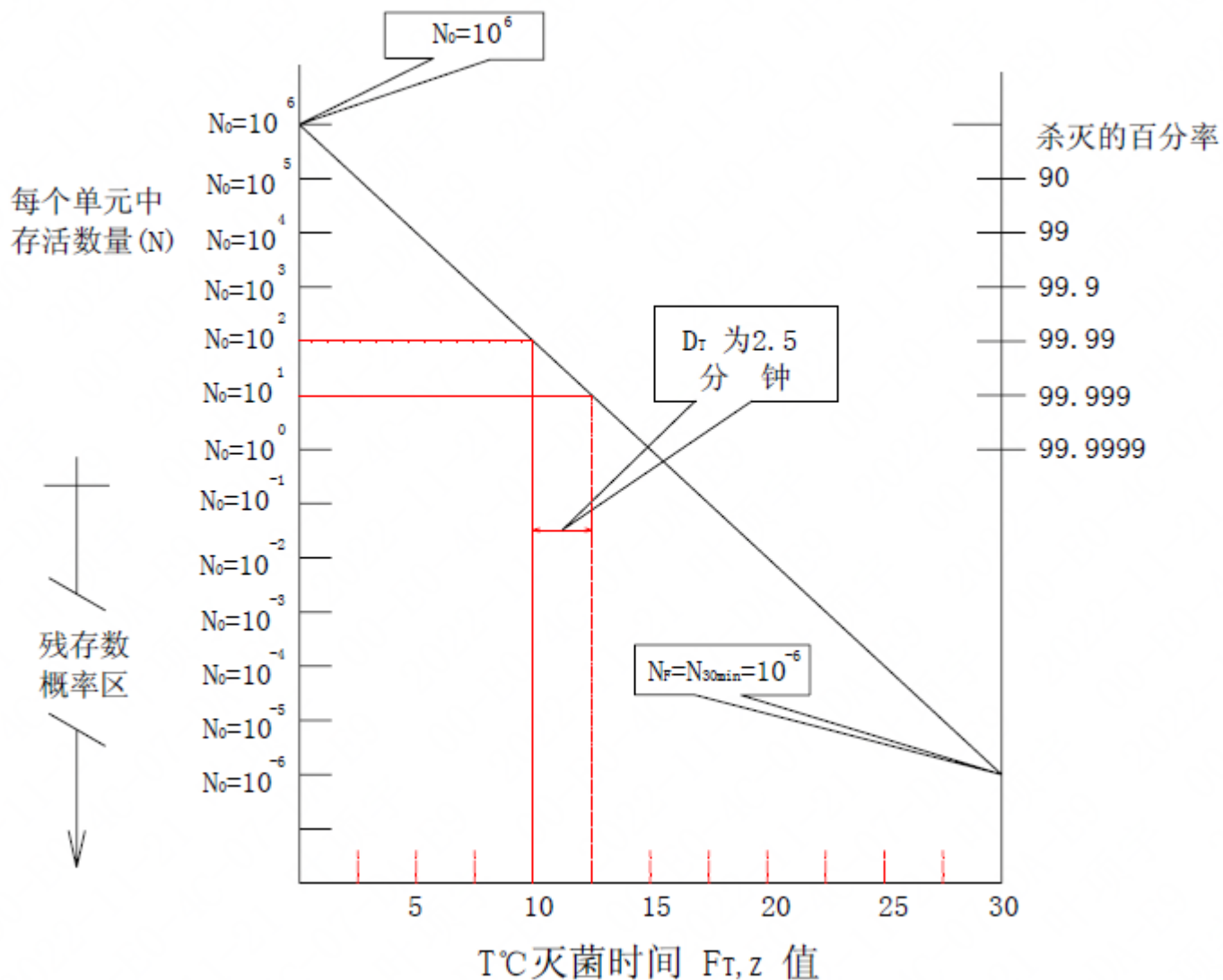


扫码查看芽孢计数方法

D值

- **定義：**指將試驗微生物殺滅90%所需的滅菌時間或滅菌劑量。體現的是微生物的耐受性。
 - **測試方法：**陰性數法或殘存曲線法。
 - **測試設備：**抗力儀。
 - **品質控制：**在指示劑有效期內，按製造商提供的檢測方法，檢測標定的D值，範圍應在±20%之內。
- (參考標準：ISO 11138-1:2017)

半對數模型的微生物存活曲線



源自：PDA-TR1 Validation of Moist Heat Sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control

生物指示劑相關法規



ISO11138: Sterilization of health care products-Biological indicator 醫療產品的滅菌生物指標

USP 55 BIOLOGICAL INDICATORS—RESISTANCE PERFORMANCE TESTS 生物指示劑 抗性測試

USP 1229 BIOLOGICAL INDICATORS FOR STERILIZATION 滅菌生物指示劑

EP 5.1.2 Biological Indicators and related microbial preparations used in the manufacture of sterile products

用於無菌產品生產的生物指示劑及相關微生物製品

PDA TR1 Validation of Moist Heat sterilization Processes: Cycle Design, Development, Qualification and Ongoing Control

濕熱滅菌驗證 滅菌程式的設計-開發-確認和日常監控

PDA TR51 Biological Indicator for Gas and Vapor-Phase Decontamination Processes: Specification,

Manufacture, Control and Use 氣體和氣相淨化工藝規範、製造、控制和使用的生物指示劑

B

滅菌確效面臨的挑戰及解決思路探討

挑戰1-自含式生物指示劑培養基蒸發問題

自含式壓力蒸汽滅菌生物指示劑需55~60°C

下培養，在其必需的培養週期內（通常是48小時），培養基中水分的蒸發難以避免。而失去大量水份後培養基的滲透平衡被破壞，進而可能影響受損微生物的恢復生長，產生假陰性。又或者延長培養時間後，培養基完全蒸發，無法觀察結果。

2023年版GMP指南要求，製藥企業在進行壓力蒸汽滅菌時，生物指示劑的培養時間至少為7天。

- 培养温度：接种后按使用说明书的培养温度进行培养。
- 观察：在培养过程中定期观察，若已发现生物指示剂呈阳性，则记录结果，该阳性指示剂可停止培养，并进行相关调查。只有阴性指示剂需要培养整个培养周期。
- 培养时间：对于经典灭菌工艺（例如湿热灭菌、环氧乙烷灭菌），其标准培养时间为7天；对于一个新型灭菌工艺，7天的培养时间是不充分的，需要基于验证来确定培养时间，建议至少培养14天。ISO 11138-8: 2021《缩短生物指示剂培养时间的验证方法》中描述了缩短培养时间的方法，只适用于特定行业（如医院或者医疗保健机构）下和某些生物指示剂，并不适用于制药行业。
- 生孢梭菌或其他厌氧微生物用作生物指示剂时，要注意厌氧条件。

源自：《GMP指南》品質控制實驗室

挑戰1-自含式生物指示劑培養基蒸發問題



品牌A

部分自含式壓力蒸汽滅菌生物指示劑培養前需使用封口膜或其他封口材料對透氣孔進行封堵，否則48小時內培養基大量揮發。



品牌B

部分自含式壓力蒸汽滅菌生物指示劑設計了活動的帽蓋減少培養基揮發量，但仍然無法有效控制揮發情況。



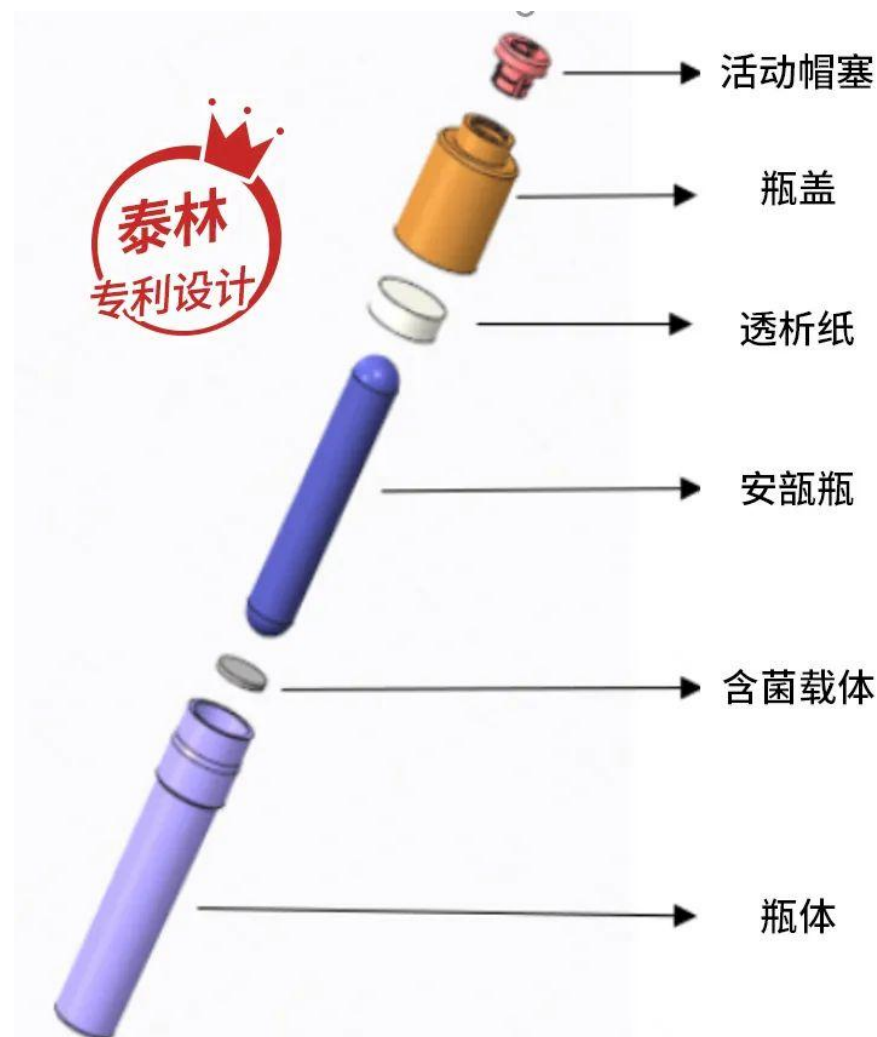
泰林BIs

泰林專利設計-活動帽塞，可有效減少生物指示劑培養過程中的培養基蒸發率。

培养基防蒸发控制解决思路

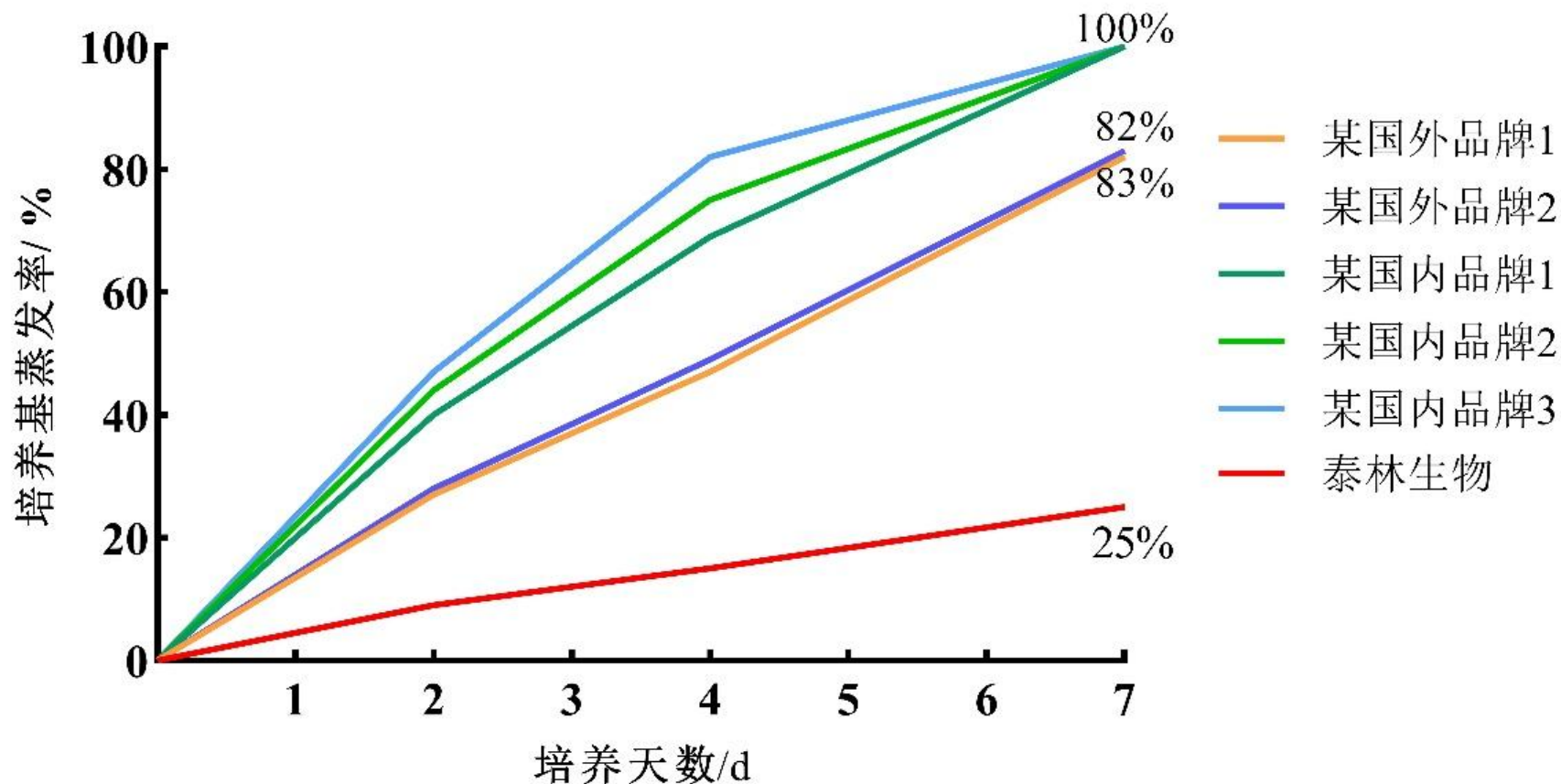
適用於滅菌鍋及其他固體樣品的滅菌效果確認。

- 高純度的芽孢及穩定的抗力；
- 變色培養基，48h獲得準確結果；
- 纖維素載體，便於計數；
- 醫用包裝透析紙，在保證微生物阻隔性的同時又兼顧了蒸汽穿透性能；
- 活動式帽塞，有效控制培養基蒸發；
- 配備專用接種夾具；
- 可定制 $10^3 \sim 10^6$ cfu/支的生物指示劑。



培养基防蒸发控制解决思路

生物指示剂培养基蒸发率对比



操作流程——自含式壓力蒸汽滅菌生物指示劑



1. 将生物指示剂放置于测试区域



2. 取出指示剂并按压帽塞



3. 用夹子夹碎安瓿管



4. 按规定温度时间培养, 观察结果

挑戰2-過氧化氫滅菌驗證效率低



製藥企業**無菌隔離器中過氧化氫滅菌**指示劑大部分為菌片式，需要使用者滅菌結束後再進行接種，驗證效率低。



此類自含式過氧化氫指示劑僅適用於醫院、醫療器械等行業中**過氧化氫低溫等離子體滅菌驗證**，不適用於製藥企業。主要原因為這類產品含菌載體在指示劑最下方，隔離器中過氧化氫穿透效果差，無法作用到載體上的芽孢。

隔離器過氧化氫和等離子體過氧化氫滅菌的區別

常壓 (汽化過氧化氫)



多用於製藥企業，如無菌隔離器。

除濕

調節濃度

滅菌

排殘

抽真空

調節濃度

滅菌

排殘

負壓 (過氧化氫低溫等離子體)



多用於醫療器械滅菌。

解決思路-泰林專利設計自含式過氧化氫滅菌生物指示劑



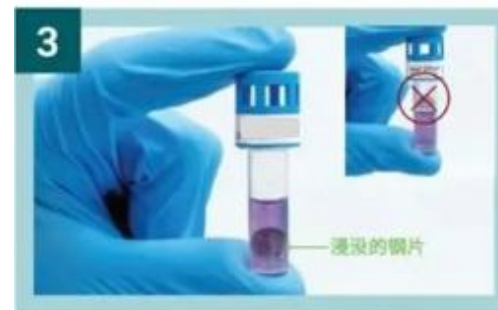
VS



用专用破碎机压碎培养基安瓿瓶



确保不锈钢片完全浸没在培养基中



确保不锈钢片完全浸没在培养基中



下压盖子,直到听到并感觉到咔嚓声



55-60°C 培养7天

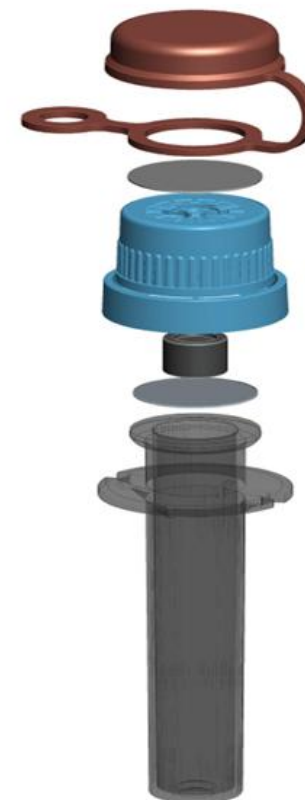


如果有芽孢存活,培养基变为黄色,表示阳性结果

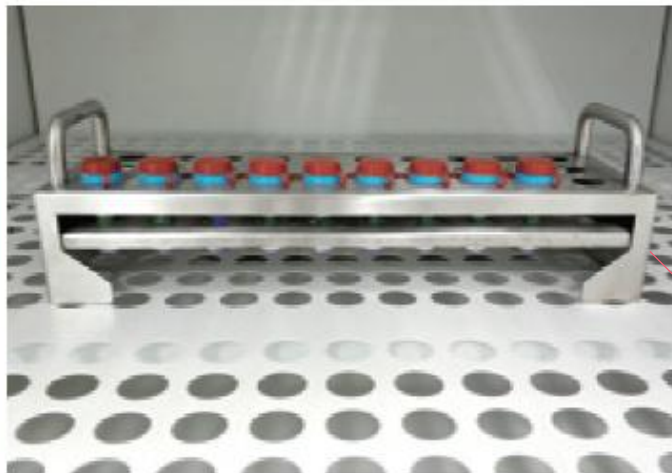
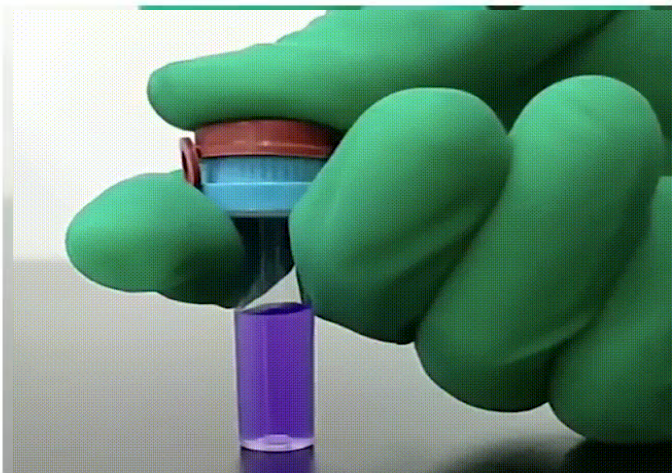
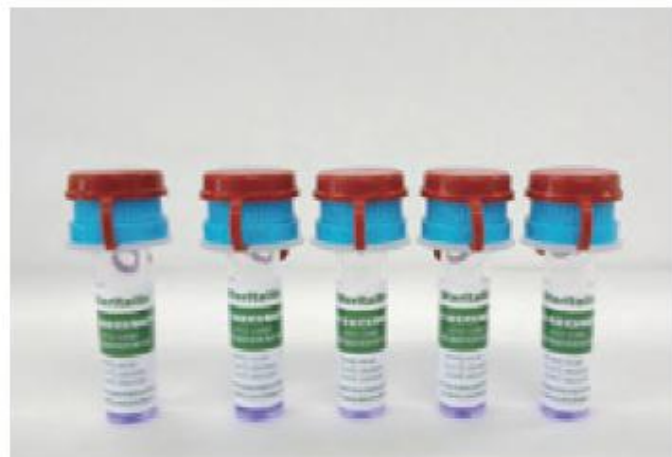
操作簡便，僅一步按壓即可培養。

解決思路-泰林專利設計自含式過氧化氫滅菌生物指示劑

- 高純度的芽孢及穩定的抗力；
- 變色培養基，48h獲得準確結果（自含式）；
- 採用不銹鋼片作為染菌載體，過氧化氫吸附性低，能夠保證測試結果準確性；
- 載體呈現為碗狀結構，減少芽孢疊層，降低假陽性出現的概率；
- 高透氣率Tyvek特衛強材質作為產品的初級包裝，保證微生物阻隔性兼顧過氧化氫穿透性能；
- 設計了方便懸掛的開孔；
- 配備專用接種工裝；
- 可定制 $10^3 \sim 10^6$ cfu/支的生物指示劑；
- 專利設計的結構。



操作流程



A、將生物指示劑放在待滅菌位置，開啟滅菌程式；

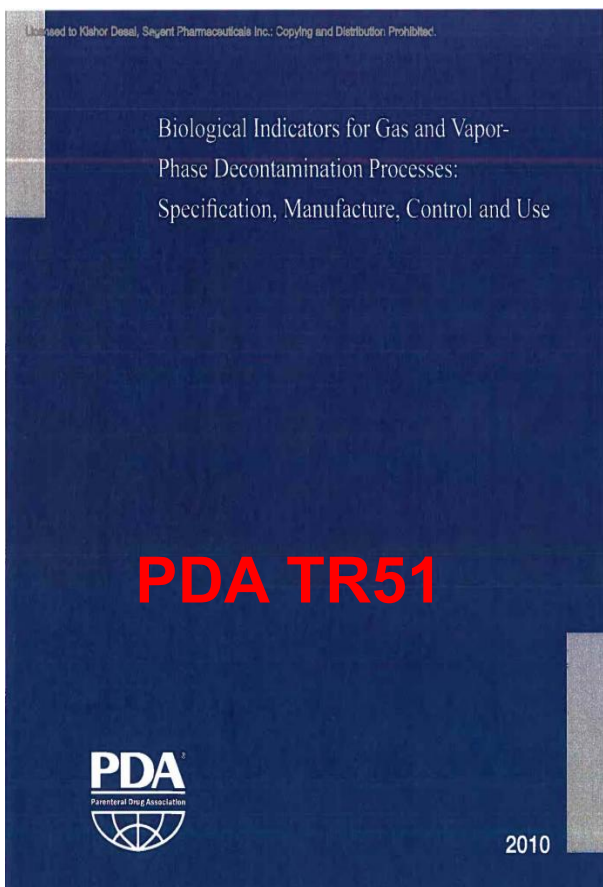
B、滅菌結束後，蓋上紅色帽塞；

C、向下按壓上端蓋，使載體掉落至培養基中；

D、將生物指示劑轉移至培養箱中，培養結束後觀察結果。培養基保持紫色為陰性，培養基變為黃色為陽性。



挑戰3-流氓BI影響滅菌驗證進度



將由於生物指示劑品質波動或其他未知因素導致難以殺滅的指示劑稱為“Rogue BIs”，即“流氓生物指示劑”

8.1 異常結果調查

如果工藝流程失敗，則應實施調查。調查可能包括，但不局限於，以下內容：

- 迴圈參數的確認
- 審查提供的生物指示劑的COC和內部測試數據的結果
- 審查過程記錄是否符合相關SOP
- 審查提供的殺孢子劑的COC
- 審查設備校準數據

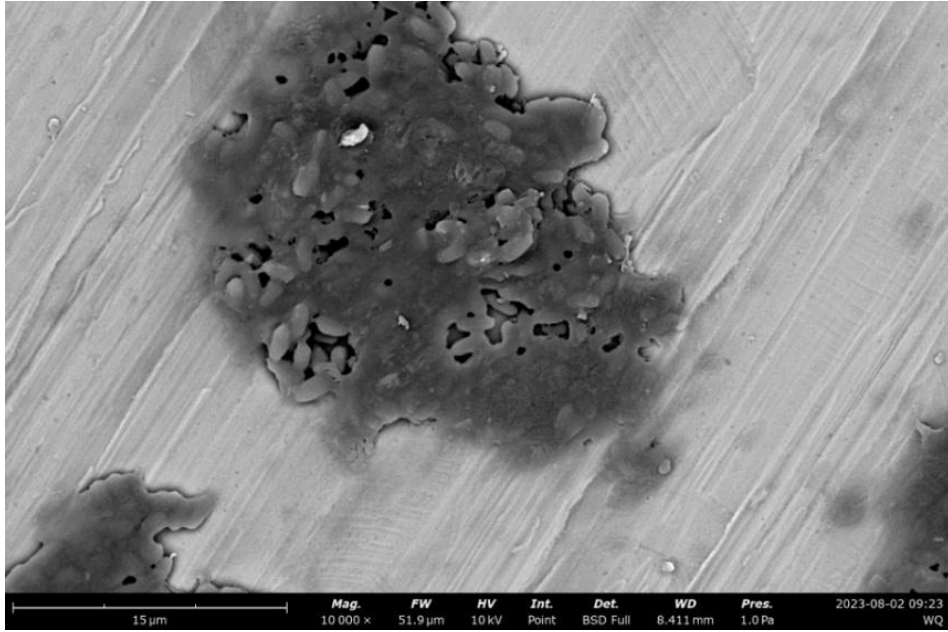
調查還應考慮生物指示劑挑戰失敗的點位以及鄰近和類似點位的之前的迴圈和歷史情況。一種調查方法是在問題點位暴露多個BI,並確認存活的數量。

100%存活率可能表明迴圈條件發生變化，偶爾或偶發的存活可能表明生物指示劑的抗性發生了變化。

如果用於驗證指定殺傷水準的評估方法顯示偶爾隨機的出現陽性生長，且未在同一個位置出現陽性生長，則可能會認為該結果是由“流氓”BI造成的。持續的隨機陽性表明該週期並不穩定，需要進一步調查。

目前的行業經驗表明，即使在明確定義的迴圈內，偶然也可能出現陽性的生物指示劑。此類異常結果可能並不表示迴圈失敗。適當的統計方法可用於支持在主要驗證和再驗證計畫中接受此類異常結果。

流氓BI

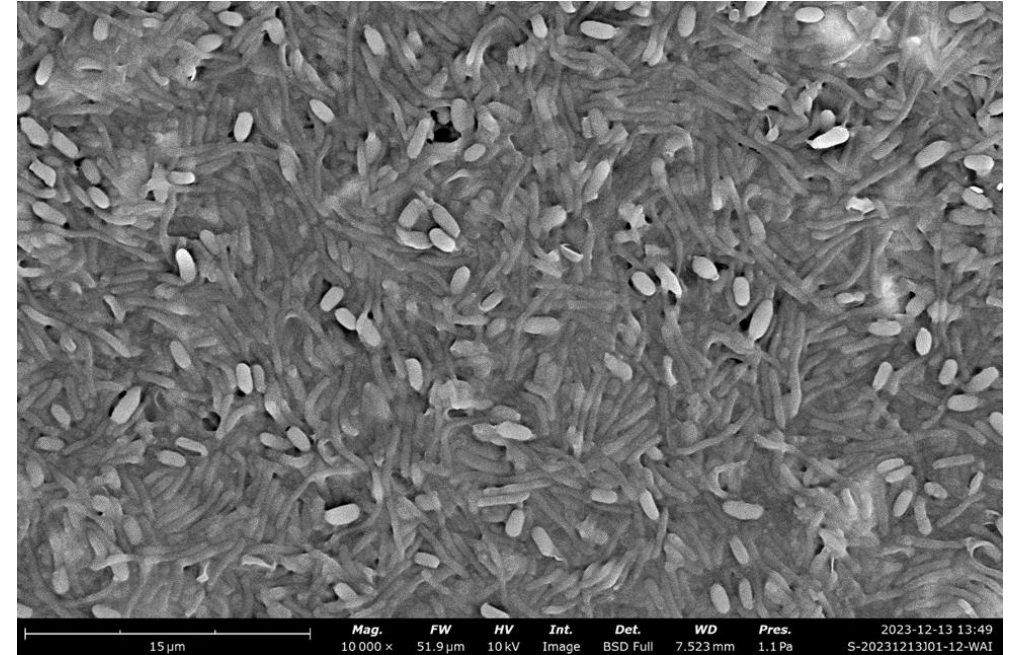


品牌B過氧化氫滅菌生物指示劑
掃描電鏡觀察結果

流氓BI特徵1：芽孢聚集



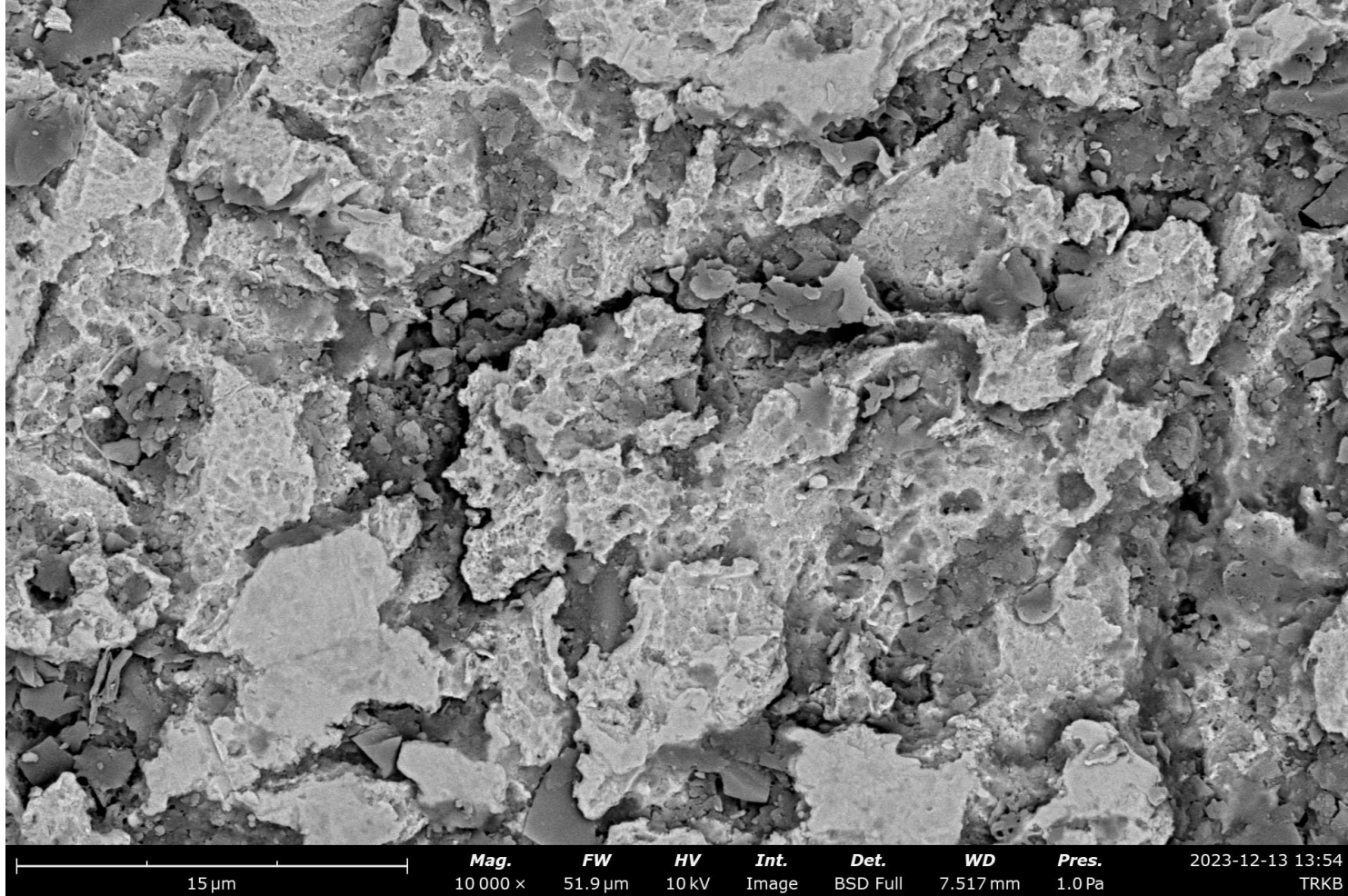
生物指示劑的載體上含有大量芽孢，其分佈情況對於過氧過氧化氫滅菌的效果會產生重大影響。以含芽孢量為 10^6 的生物指示劑為例，載體上有數百萬芽孢，如局部芽孢過於集中，甚至產生堆積、聚團，也會導致指示劑難以殺滅。



流氓BI特徵2：芽孢純度低



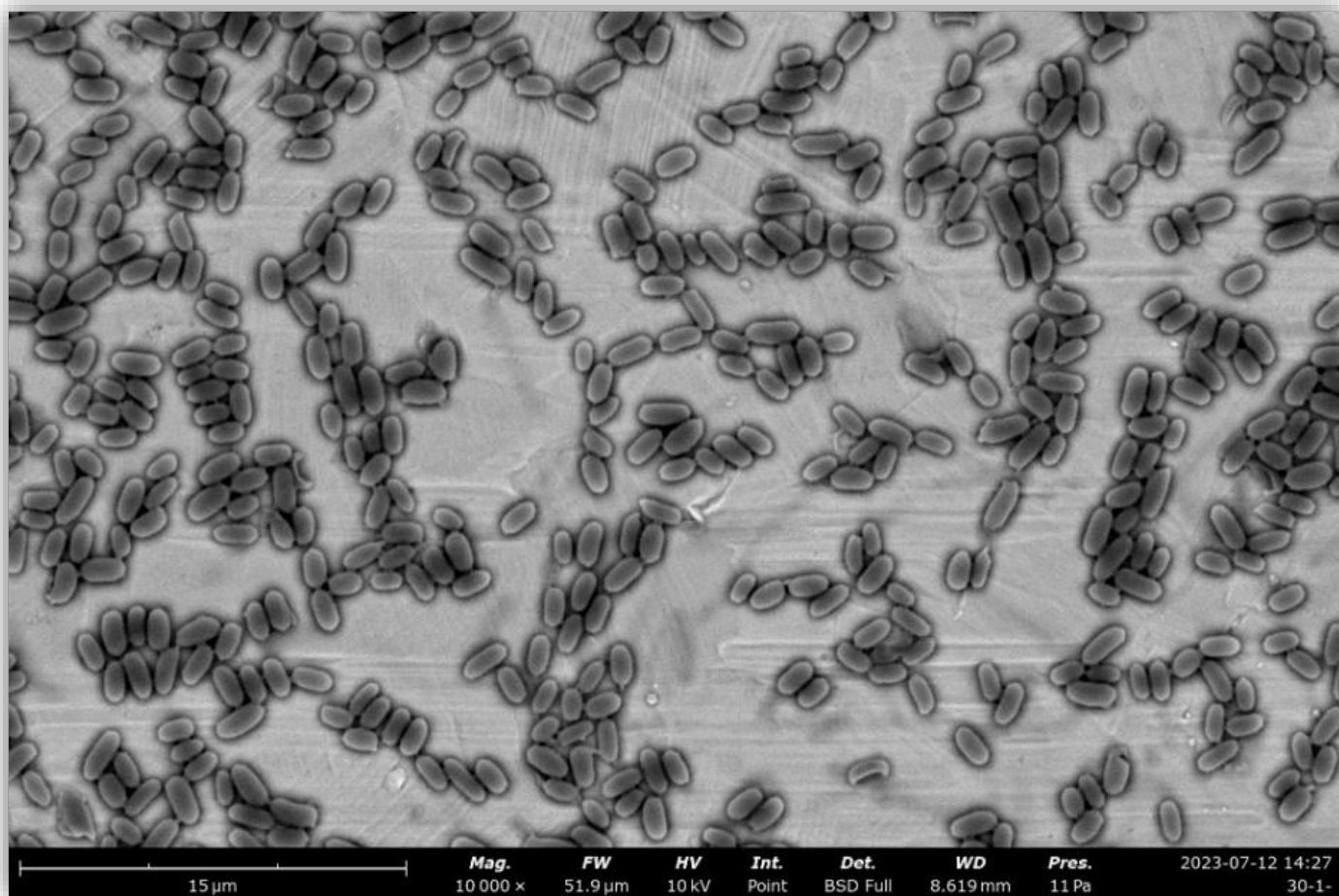
品牌B過氧化氫滅菌生物指示劑
掃描電鏡觀察結果



流氓BI特徵3：載體品質差

**品牌C過氧化氫滅菌生物指示劑載體
掃描電鏡觀察結果**

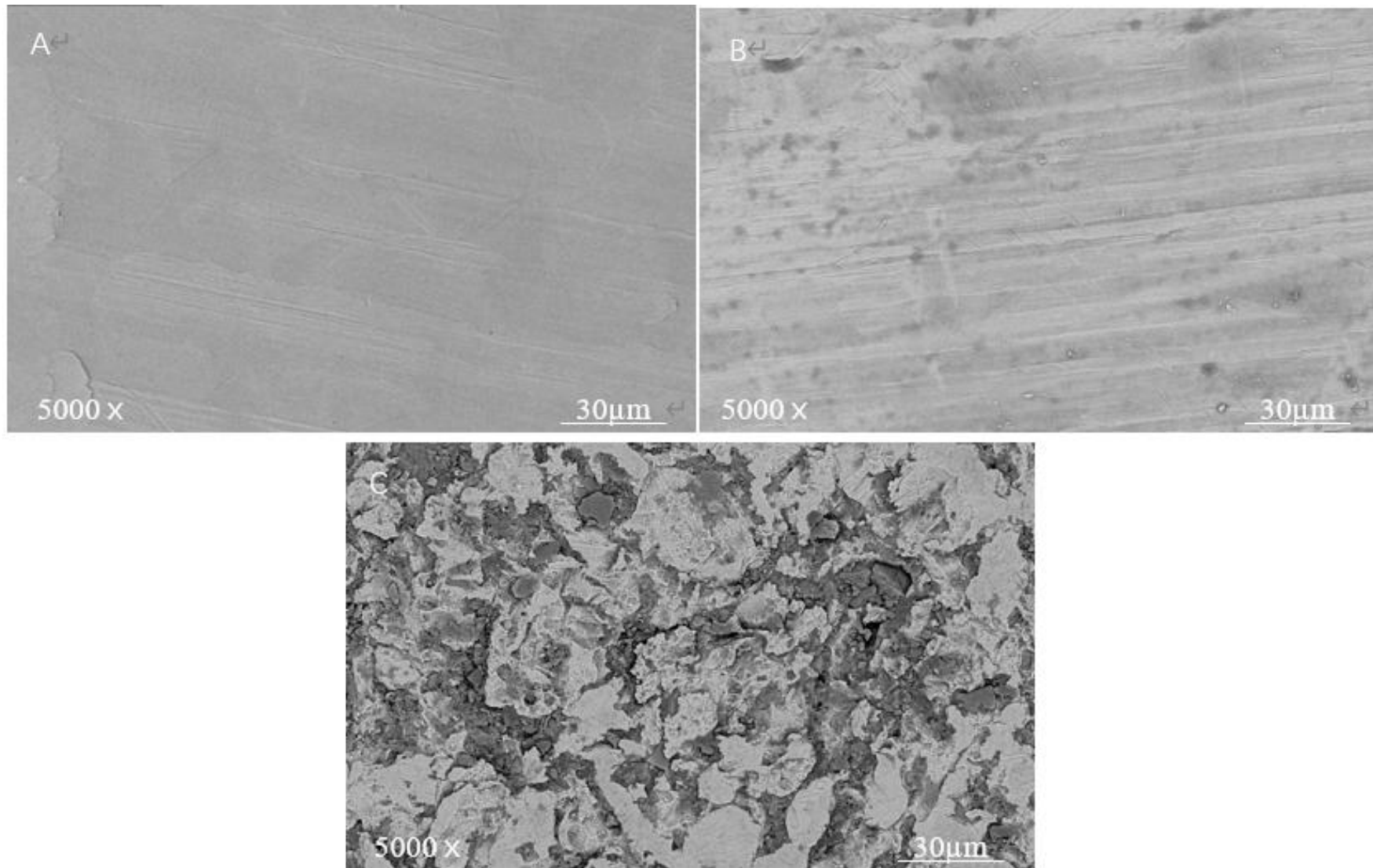
提升芽孢純化工藝有效避免流氓BI



無菌隔離器滅菌過程中，過氧化氫穿透性差，主要對物體表面進行滅菌，**對生物指示劑的產品品質要求極高。**

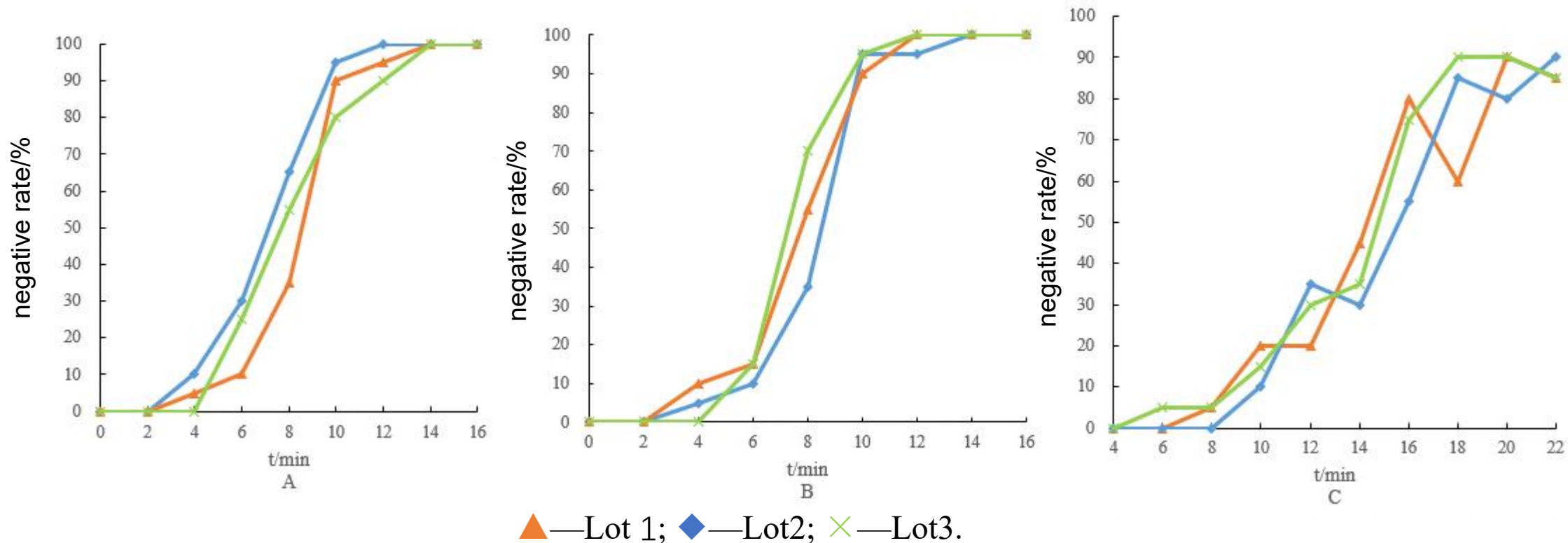
在生物指示劑生產過程中，優質的芽孢純化工藝顯得尤為重要，如圖所示，掃描電鏡觀察的片式過氧化氫生物指示劑芽孢分散情況良好，芽孢純度高，能滿足日常監測需求。

生物指示劑載體品質對過氧化氫滅菌效果的影響



市場上主流過氧化氫滅菌生物指示劑載體的掃描電鏡結果顯示，大部分生物指示劑的載體表面均平整，部分生物指示劑載體品質較差（圖C），影響生物指示劑產品品質。

生物指示劑載體對過氧化氫滅菌效果的影響

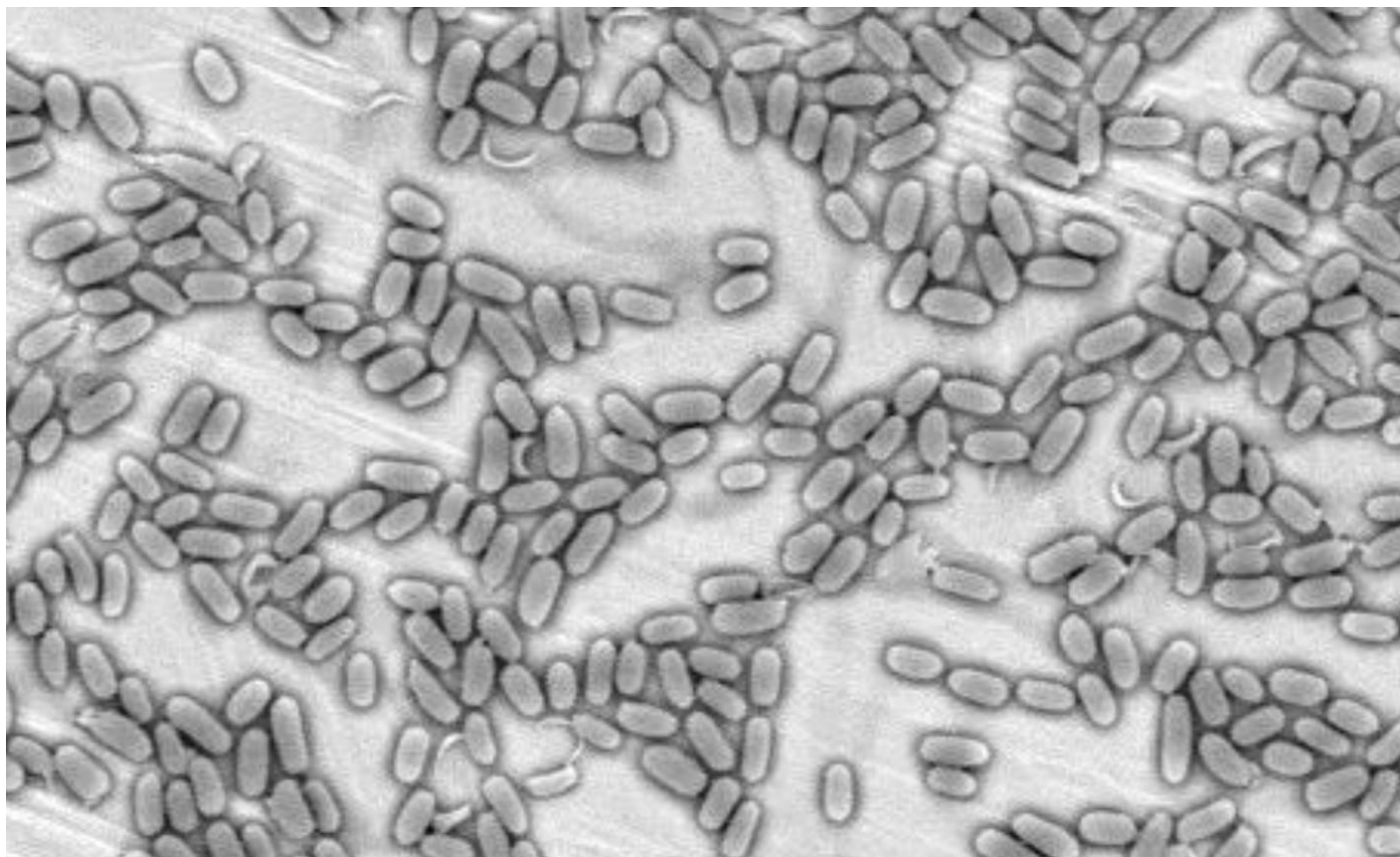


Resistance test results of different BI carriers

結論

載體品質對過氧化氫滅菌生物指示劑的抗力具有顯著影響。因此，在進行BI供應商選擇時，除孢子計數結果外，還有包含載體品質的考察。

優質BI



表面平整的不銹鋼
載體,芽孢分佈均勻.

優質BI過氧化氫滅菌生物指示劑載體
掃描電鏡觀察結果

C

D值測試-抗力儀

抗力儀



The resistance of each lot/batch of biological indicators shall be tested to demonstrate the conformance with the performance requirements –ISO11138 6.1



定義

抗力儀是用於指示劑性能測試的專用儀器，是一種被設計用於建立精確的、可複現的滅菌環境的設備。



要求

應符合 ISO 18472:2018 《Sterilization of health care products — Biological and chemical indicators — Test equipment》的要求。

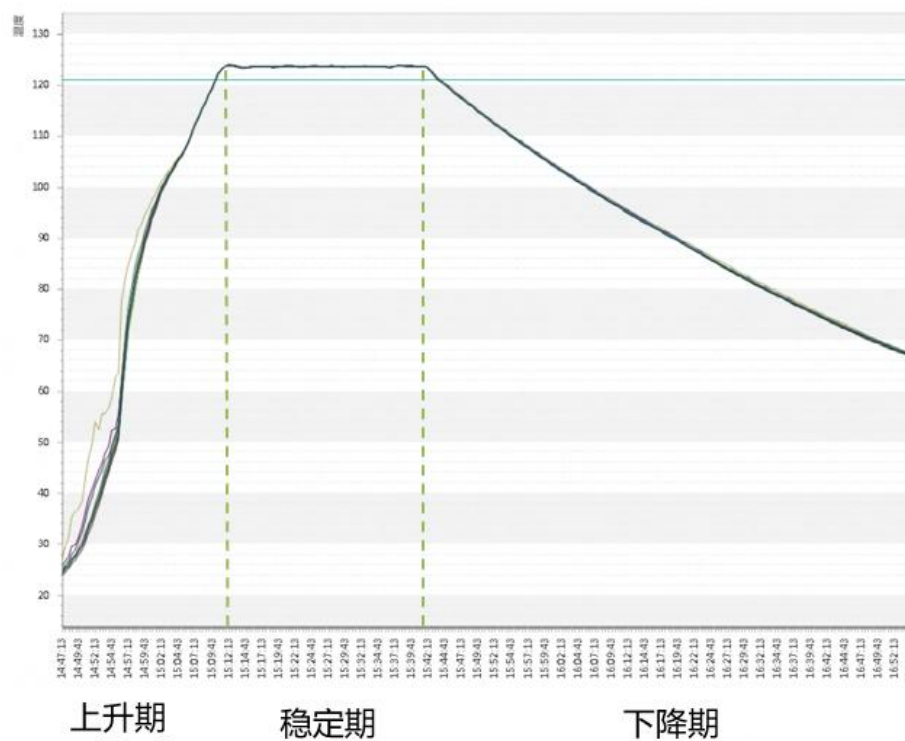


誤區

抗力儀不能直接測出微生物抗力，殺滅後的微生物需培養後統計結果、計算抗力。

抗力儀與滅菌器的區別

參數	上升期	穩定期	下降期	溫度允差
滅菌器	> 20min	(設定)	> 30min	$\pm 1^{\circ}\text{C}$
抗力儀	< 10s	(設定)	< 10s	$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$

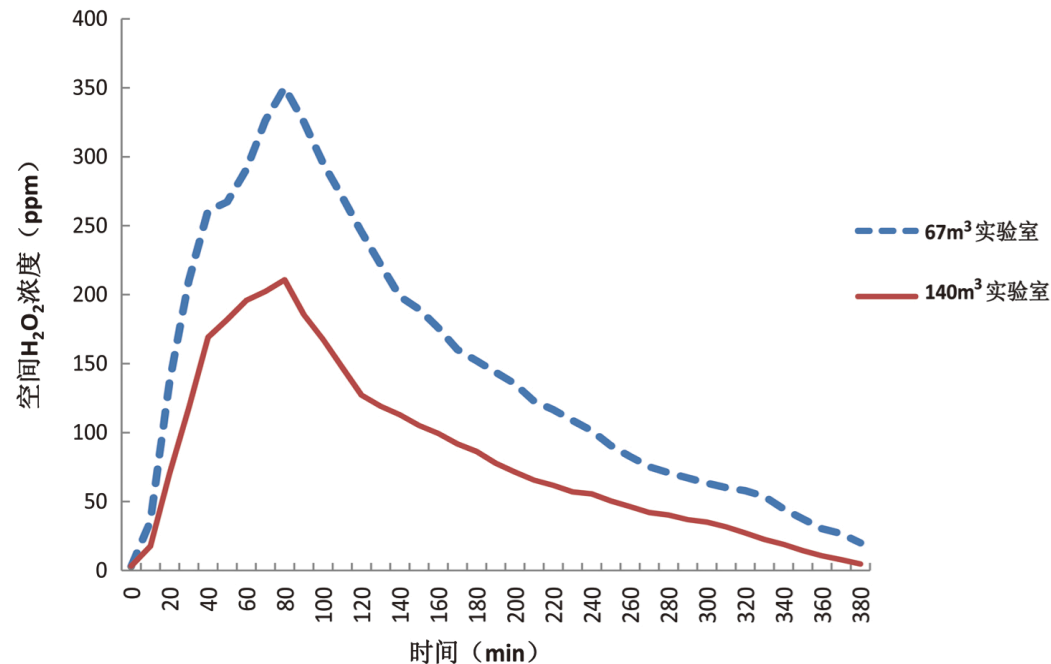
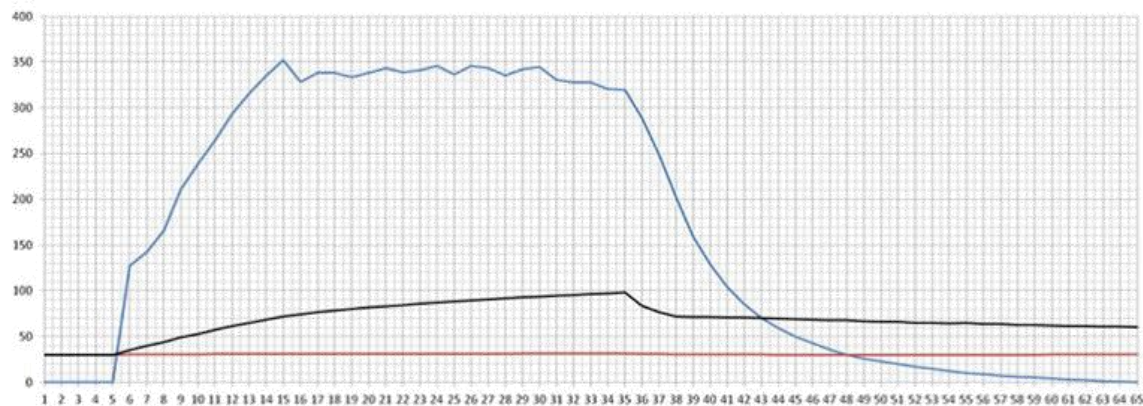


典型的滅菌器溫度曲線



典型的抗力儀溫度曲線

過氧化氫滅菌抗力儀技術難點：過氧化氫濃度監測



H_2O_2 濃度監測是滅菌效果的重要參數之一

- 如何持續的監測滅菌過程中的 H_2O_2 濃度？

目前大多使用電化學的過氧化氫濃度感測器作為檢測手段，無法在高溫、高濃度、低壓下進測量。

- 如何選擇具有代表性的檢測位點？

電化學方法的感測器基於空間某點來進行檢測；而光學法可以基於某個區域進行檢測。

- 沒有標準過氧化氫氣體，如何校準？

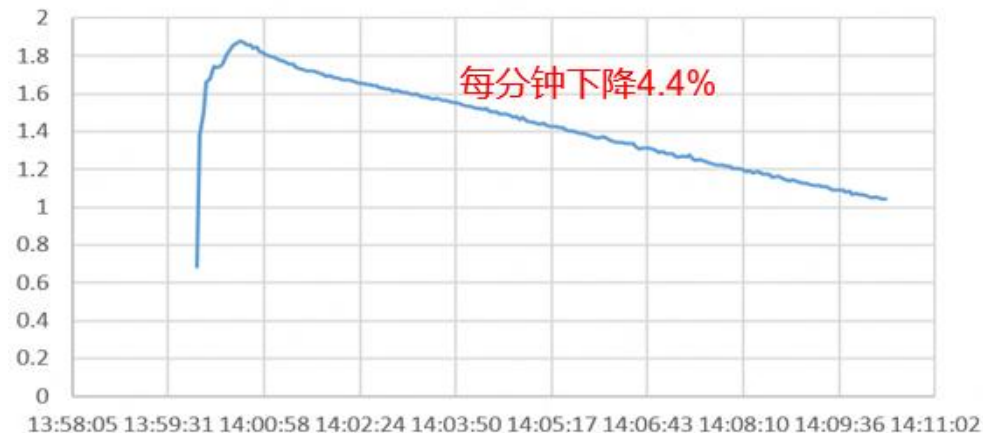
過氧化氫檢測標準化中，沒有標準過氧化氫氣體，且過氧化氫氣體本身具有不穩定性，易分解。

創新型-高效的表面處理技術

艙體內壁未涂层

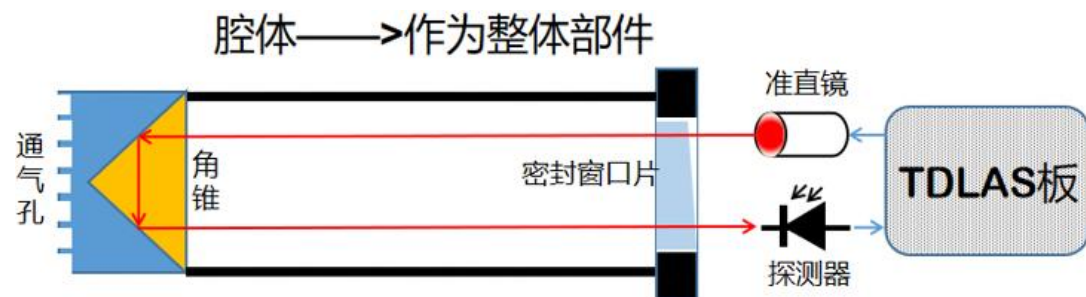
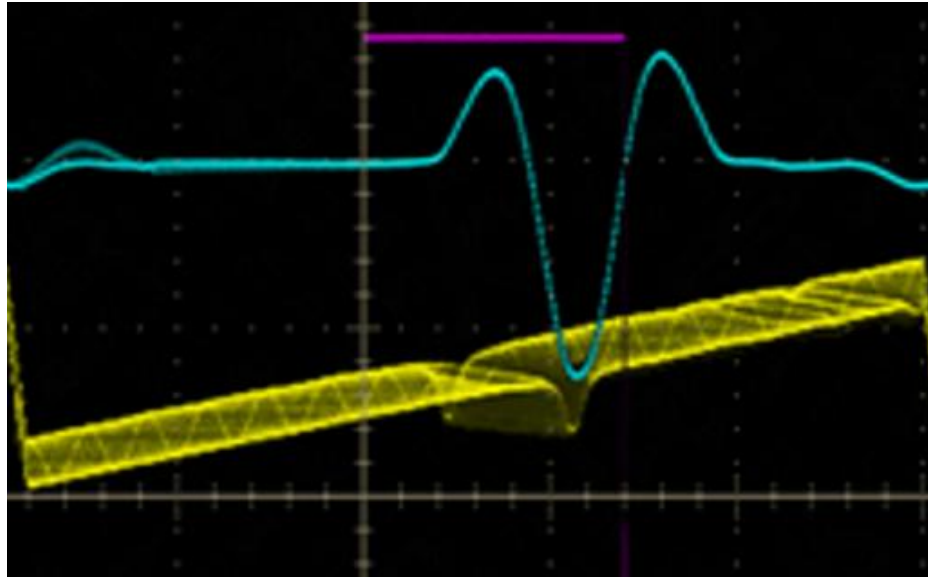


艙體內壁已涂层



通過噴塗特殊塗層，極大程度緩解了汽化過氧化氫分解，配合保溫防冷凝措施，為抗力檢測提供穩定可複現的檢測條件。

过氧化氢灭菌抗力儀



操作流程

2 引入BI(生物指示劑)



4 滅菌完成，確認滅菌參數



5 培養、觀察，計算得到D值



1 設置參數，啟動預熱



3 啟動滅菌



歡迎交流與討論

