

环氧乙烷灭菌生物指示剂 D 值测定方法研究

曹炜, 沈泓, 李珏*, 吴鑫, 梁法勇, 李超, 孙晗(浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052)

摘要: 目的 研究环氧乙烷灭菌指示剂 D 值测定方法。方法 采用部分阴性法测定不同厂家产品的 D 值, 用存活灭杀时间进行验证, 两者一致说明部分阴性法测定 D 值结果有效。若无法验证, 则采用残存曲线法重新测定 D 值, 再进行验证。结果 5 个样本中, 3 个用部分阴性法测定的 D 值可以被存活灭杀时间验证。另 2 个样本用残存曲线法测定的 D 值与验证结果一致。结论 D 值是评价环氧乙烷灭菌生物指示剂产品质量的关键性技术参数, 部分阴性法和残存曲线法的 D 值测定结果存在差异, 为确证 D 值测定结果的准确性, 应采用存活灭杀时间对测定结果进行验证。

关键词: 环氧乙烷; 生物指示剂; D 值

中图分类号: R945 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2017)12-1672-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.12.006

引用本文: 曹炜, 沈泓, 李珏, 等. 环氧乙烷灭菌生物指示剂 D 值测定方法研究[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(12): 1672-1674.

Study on the Test Method of D Value of Ethylene Oxide Detergent Biological Indicator

CAO Wei, SHEN Hong, LI Jue*, WU Xin, LIANG Fayong, LI Chao, SUN Han(Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To research the test method for D value determination of ethylene oxide sterilization indicator. **METHODS** The D value of products from different companies were determined by limited Sperman-Karber (LSKP) method and proved by survival and killing time. The consistency of these two results indicated the validity of D value. If D value couldn't be proved by LSKP method, survival-curve method should be selected to examine D value. **RESULTS** Among the D value of the 5 samples, three of them using LSKP method could be validated by survival and killing time. The results of other two samples examined by survival-curve method were validated by survival and killing time successfully. **CONCLUSION** D value is the key technical parameter to evaluate the product quality of ethylene oxide sterilization biological indicator. The results of D value examined by LSKP method and survival-curve method show the difference. Survival and killing time is recommended to be applied in validation to assure the accuracy of D value.

KEY WORDS: ethylene oxide; biological indicator; D value

生物指示剂是指一类特定微生物经过特定方法制备的生物制品, 这些特定微生物比普通微生物具有更强的耐受性。生物指示剂常用于制药工艺中灭菌设备的性能确认以及气体灭菌法、过滤除菌法的灭菌程序的验证。

D 值是评价灭菌生物指示剂产品质量的关键性技术参数。D 值是指在规定的暴露条件下, 灭活 90% 的试验菌所需的时间或辐射剂量^[1]。D 值是细菌死亡率的倒数, D 值越大表示死亡速度越慢, 该菌的耐热性越强。D 值不受原始细菌总数的影响, 但会受到热处理温度、菌种、细菌或芽孢菌悬液的性质影响。

D 值和孢子计数是评估生物指示剂的 2 个主要指标^[2], 针对其测定方法, 进行了广泛的研究考察和文献报道^[3]。

中国药典对于生物指示剂的规定以及应用指导信息严重不足, 仅在灭菌法[中国药典 2010 年版附录 XVII(二部)]下进行了部分原则性规定。由于我国在生物指示剂方面缺乏基础性研究, 国内各大菌种保藏中心均没有对灭菌抗性进行过清楚研究的生物指示剂标准菌株, 目前市面上销售的生物指示剂产品均采用 ATCC 菌株。而且, 我国药品质量监管机构不具备生物指示剂抗性检查的技术能力, 灭菌工艺评价中生物指示剂的抗性参数只能依据市售商品的标称值, 必然影响到灭菌工艺验证的科学性。

因此急需从生物指示剂菌株抗性检测及标准化应用等进行研究, 建立药品质量控制用生物指示剂抗性检查法和生物指示剂指导原则, 以满足药品质量控制的迫切需求。

基金项目: 2014 年国家药典委员会标准提高研究项目; 浙江省药品接触材料质量控制研究重点实验室(2014E10006)

作者简介: 曹炜, 男, 药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: 13240715@qq.com *通信作者: 李珏, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0571)86459427 E-mail: lj811005@163.com

本研究以环氧乙烷灭菌生物指示剂为例,测定来源于不同厂家产品的D值,并对D值测定结果的影响因素进行探讨,为该类产品的质量评价提供基础性数据参考。

1 材料

1.1 样本收集

经过市场调研,确定选择3个厂家共5个品种的样本:1号样本(EZTest 自含式生物指示剂,厂家A,批号:G-188);2号样本(MesaStrip 芽孢条生物指示剂,厂家A,批号:BATR-418);3号样本(自含式环氧乙烷灭菌生物指示剂,厂家B,批号:140918);4号样本(芽孢条环氧乙烷灭菌生物指示剂,厂家B,批号:140918);5号样本(芽孢条环氧乙烷灭菌生物指示剂,厂家C,批号:141008)。

1.2 仪器设备

环氧乙烷生物指示剂抗性仪(杭州电达消毒设备厂);MS3 涡旋振荡器(德国IKA);IF450 恒温培养箱(德国Mettler);MLS-3780 高压蒸汽灭菌器(日本Sanyo)。

1.3 试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基(广东环凯,批号:3103691);胰酪胨大豆肉汤培养基(北京奥博星,批号:20140329);吐温-80(国药)。

2 方法与结果

对收集到的所有样本首先采用部分阴性法测定D值,然后用存活灭杀时间进行验证,两者一致说明部分阴性法测定D值结果有效。若无法验证,则采用残存曲线法重新测定D值后再用存活灭杀时间进行验证。

2.1 抗性仪工作原理

实验用灭菌效果评价装置为环氧乙烷生物指示剂抗性仪,结构见图1。抗性仪的暴露舱(A舱)和B舱为圆柱体,外壁整体覆有加热膜。

抗性仪的工作原理:首先用加热膜对A舱和B舱进行加温,使舱内温度到达54℃,同时加湿系统(E)作用于A舱,使舱内湿度到达60%,通过真空系统(D)对A舱和B舱进行预真空之后,切断A舱和B舱的连接。然后用环氧乙烷供气系统(C)使得B舱内环氧乙烷气体浓度到达600 mg·L⁻¹。连通A舱,A舱在短时间内就可达到需要的环氧乙烷浓度。暴露结束后,通过真空系统(D)对尾气进行排除与清洗。

本实验的暴露条件:温度为54℃,湿度为60%,环氧乙烷浓度为600 mg·L⁻¹。

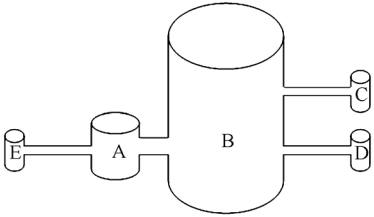


图1 环氧乙烷生物指示剂抗性仪结构示意图

A-暴露舱;B-环氧乙烷气体浓度调节舱;C-环氧乙烷供气系统;D-真空系统;E-加湿系统。

Fig. 1 The structure of ethylene oxide biological indicator evaluator resistometer vessel

A-exposure cabin; B-ethylene oxide gas concentration adjustment cabin; C-ethylene oxide gas supply system; D-vacuum system; E-humidification system.

2.2 部分阴性法

每次暴露采用20个样本,每次暴露的时间与先前的暴露时间不同,但差距相等。每次暴露后2h内,芽孢条式指示剂采用无菌操作将每一个染菌载体转移至含10 mL胰酪胨大豆肉汤培养基的试管内,于36℃培养7d;自含式指示剂用自带的夹子夹破内部玻璃管,于36℃培养7d,记录未长菌的样本数,按GB 18281.1-2000/ISO 11138-1:2006中LSKP方法公式计算D值^[4]。由部分阴性法分析计算出的D值,可用于计算存活和灭杀时间。部分阴性法测定D值分析见表1。

表1 部分阴性法测定D值分析

Tab. 1 Analysis of D value tested by LSKP method min						
实验样本	实测D值	±20%标示量D值	D _{low}	-10% D值	D _{up}	+10% D值
1号	2.8	1.8~2.6	2.64	2.52	2.90	3.08
2号	2.4	1.6~2.4	2.30	2.16	2.50	2.64
3号	3.3	2.9~4.3	3.17	2.97	3.38	3.63
4号	2.8	2.9~4.3	2.66	2.52	2.92	3.08
5号	3.8	2.6~3.8	3.64	3.42	3.92	4.18

2.3 存活灭杀时间验证部分阴性法测定的D值结果

实验分2组,每组包含50个相应的原始单独包装的生物指示剂,使每个样本都能均匀暴露于灭菌条件中。将其中一组按要求的存活时间暴露,移出后立即转移入另一组按要求的杀灭时间暴露,需保证2组暴露条件平行。每次暴露后2h内,芽孢条式指示剂采用无菌操作,将每一个染菌载体转移至含10 mL培养基的试管内,于36℃培养7d;自含式指示剂用自带的夹子夹破内部玻璃管于36℃培养7d。存活灭杀时间验证部分阴性法测定结果见表2。

表 2 存活灭杀时间验证部分阴性法测定结果

Tab. 2 The validation of LSKP method by survival and killing time

实验 样本	存活时 间/min	灭杀时 间/min	存活时间后 阳性样本数	灭杀时间后 阳性样本数	能否验 证 D 值
1 号	12.1	28.8	50	0	是
2 号	10.5	24.9	50	17	否
3 号	14.2	34.0	50	0	是
4 号	12.0	28.8	50	0	是
5 号	17.9	39.9	5	0	否

2.4 残存曲线法

每次暴露采用 5 个样本, 每次暴露的时间与先前的暴露时间不同, 但差距相等。每次暴露后 2 h 内, 无菌操作将每一个染菌载体转移至含 0.1%吐温 80 的灭菌纯化水的匀浆仪里, $9\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 搅拌 5 min, 记录培养 48 h 后的平均活孢子数, 按 GB 18281.1-2000/ISO 11138-1:2006 中存活曲线方法公式计算 D 值^[2]。用该方法计算出的 D 值, 可计算出存活和灭杀时间。2 号和 5 号样本残存曲线法的 D 值测定结果见表 3。

表 3 残存曲线法测定 2 号和 5 号样本 D 值结果

Tab. 3 The D value results of sample 2 and 5 tested by survival-curve method

样本	暴露时间/ min	残存菌量 平均值/cfu	残存菌量 (lg 值)	D 值
2 号	0	1.8×10^6	6.26	3.0 min (相关系数 $R^2=0.92$)
	2.5	8.7×10^5	5.94	
	5	2.0×10^5	5.30	
	7.5	3.1×10^4	4.49	
	10	7.1×10^2	2.85	
5 号	0	4.3×10^6	6.63	3.1 min (相关系数 $R^2=1.00$)
	2.5	1.1×10^6	6.04	
	5	1.1×10^5	5.04	
	7.5	1.9×10^4	4.28	
	10	3.4×10^3	3.53	

2.5 存活灭杀时间验证残存曲线法

方法同“2.3”项, 采用存活灭杀时间验证残存曲线法的 D 值, 结果见表 4。

表 4 存活灭杀时间验证残存曲线法测定结果

Tab. 4 The validation of survival-curve method by survival and killing time

样本	存活时间/ min	灭杀时间/ min	存活时间后 阳性样本数	灭杀时间后 阳性样本数	能否验证 D 值
2 号	13.1	31.1	50	0	是
5 号	14.0	32.6	50	0	是

3 讨论

3.1 D 值测定结果分析

根据部分阴性法测得的 D 值采用存活灭杀时间进行验证, 由表 2 可知, 1 号、3 号和 4 号样本 D 值结果均可以被验证, 而 2 号和 5 号 2 个样本根据部分阴性法测得的 D 值计算出的灭杀时间

(24.9 min)和存活时间(17.9 min), 存活灭杀实验验证过程中发现前者灭杀实验中 50 个样本仍有 17 个未被灭杀, 推测部分阴性法测得的 D 值比真值要低; 后者存活实验中 50 个样本有 45 个被灭杀, 推测部分阴性法测得的 D 值比真值要高。由于 D 值测定影响因素较多, 因此用存活灭杀时间来验证通过部分阴性法或残存曲线法测得的 D 值来验证测定结果的准确性是有必要的。

3.2 2 种 D 值测定方法部分阴性法和残存曲线法的比较

①样本用量比较: D 值测定至少要有 5 次暴露, 部分阴性法每次暴露时取样 ≥ 20 片(支), 而残存曲线法每次暴露时取样 ≥ 4 片(支), 残存曲线法在实验样本用量方面明显少于部分阴性法。②操作方法比较: 每次暴露之后, 部分阴性法只需直接把菌片接种至培养基, 通过观察培养管颜色变化或者是否浑浊即可, 而残存曲线法则必须对每片样本进行活孢子总数测定, 因此部分阴性法在实验操作上比残存曲线法更加简便。③周期比较: 部分阴性法需要培养 7 d 观察结果, 而残存曲线法则只需 2 d, 相比部分阴性法可以更快地得到测定结果。

3.3 仪器性能对于 D 值测定的影响

影响环氧乙烷灭菌效果的主要因素为温度、湿度和环氧乙烷浓度, 而其中温度对于灭菌效果的影响非常显著。抗性仪的暴露舱为圆柱体, 外壁整体覆有加热膜, 因此在加热传导过程中, 舱体中心和外壁之间有温度差, 在一次暴露过程中, 由于暴露舱内样品台上的样品放置不同的位置, 使得每个样本所处的温度环境不完全一致, 可能会对测试结果有一定影响。这也可能是上述实验结果中采用部分阴性法有 2 次实验测得的 D 值未被存活灭杀时间所验证可能的原因之一。因此, 测定 D 值所需的硬件设备对于 D 值测定准确性是至关重要的。

REFERENCES

[1] 医疗保健产品灭菌生物指示剂选择/使用及检验结果判断指南[S]. GB/T 19972-2005/ISO 14161: 2000.
[2] XIAO H, GUO Z L, XIA M F, et al. Investigation of spore counting methods using self-contained pressure biological indicator for steam sterilization [J]. China Pharm(中国药师), 2015, 18(7): 1110-1112.
[3] FENG Z, XIAO H, YANG M C, et al. Evaluation of D value testing methods using self-contained biological indicator for pressure steam sterilization [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2017, 48(4): 568-573.
[4] 医疗保健产品灭菌生物指示物第 1 部分通则[S]. GB 18281.1-2000/ISO 11138-1: 2006.

收稿日期: 2017-06-30
(本文责编: 李艳芳)