

应用生物指示剂验证 蒸汽灭菌器的灭菌效果

为验证蒸汽灭菌器的灭菌效果——我们设计了对照实验：实验组生物指示剂和待灭菌物品在 121℃ 下灭菌 15 min，对照组生物指示剂没有进行灭菌处理。然后，将实验组生物指示剂和对照组生物指示剂放在 60℃ 培养箱中分别培养 48 h 后，发现实验组安瓿的内容物呈紫红色且澄清；对照组安瓿的内容物呈橘黄色且浑浊。这证明蒸汽灭菌器的灭菌过程有效，可杀灭孢子菌。

文 / 陈世鹏 董炎超

《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》中将验证定义为：证明任何操作规程（或方法）、生产工艺或系统能够达到预期结果的一系列活动^[1]。并提到企业的厂房、设施、设备和检验仪器应当经过确认，应当采用经过验证的生产工艺、操作规程和检验方法进行生产、操作和检验，并保持持续的验证状态^[1]。

《中华人民共和国药典（2020 年版 四部）》中将生物指示剂定义为：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品^[2]。并提到湿热灭菌 121℃ 的生物指示剂通常选择嗜热脂肪地芽孢杆菌，且芽孢数范围在 $1.0 \times 10^5 \sim 5.0 \times 10^6$ ，D 值为 1.5 ~ 3 min，存活时间在 4.5 ~ 14 min，杀灭时间在

13.5 ~ 32.0 min。

《中华人民共和国药典（2020 年版 四部）》中将湿热灭菌法定义为：将物品置于灭菌设备内利用饱和蒸汽、蒸汽 - 空气混合物、蒸汽 - 空气 - 水混合物、过热水等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法^[3]。

1 实验目的

为了验证微生物检验过程中所用物品经灭菌后能否达到无菌状态，本实验以公司化验室的蒸汽灭菌器能否杀灭孢子菌为判断依据进行实验。首先，将生物指示剂和待灭菌物品一同置于蒸汽灭菌器中，在 121℃ 下灭菌 15 min。然后，把生物指示剂放在 60℃ 培养箱中培养 48 h。最后，如果安瓿的内容物呈紫红色且澄清，则证明公司蒸汽灭菌器的灭菌过程有效，可杀灭孢子菌；如果安瓿的内容物呈橘黄色且浑浊，则证明公司蒸汽灭菌器的灭菌过

程失效，不能杀灭孢子菌。灭菌过程失效会导致因检验物品引入微生物，造成假阳性的风险。

2 实验原理

生物指示剂与要经过高压灭菌的待灭菌物品一起放入高压灭菌器中^[4]，在 $121 \pm 0.5^\circ\text{C}$ (245 kPa) 的压缩蒸汽中加热 15 min 后，孢子完全被杀死。高压灭菌后，通过安瓿的培养检查灭菌过程是否成功：嗜热脂肪土杆菌没有生长表明灭菌充分，反之则表明灭菌不充分。

3 实验过程

3.1 实验材料

3.1.1 设备

本次实验所用到的设备为 YXQ-LS-100G 立式压力蒸汽灭菌器和 BSP-150 生化培养箱。

3.1.2 物料

本次实验所用到的物料为生物指示剂 Sterikon® plus

PROCESS-Tip

* 更多信息请登录：
pharm.vogel.com.cn
* 反馈编码：210751

本文作者陈世鹏就职于普邦明胶（黑龙江）有限公司，董炎超就职于河南官渡生物工程有限公司。

表 1 生物指示剂验证结果统计

验证次数	序号	实验组（灭菌前）	实验组（培养后）	对照组（灭菌前）	对照组（培养后）
1	1	紫红色、澄清	紫红色、澄清	紫红色、澄清	橘黄色、浑浊
	2	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	3	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	4	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	5	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	6	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
2	1	紫红色、澄清	紫红色、澄清	紫红色、澄清	橘黄色、浑浊
	2	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	3	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	4	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	5	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	6	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
3	1	紫红色、澄清	紫红色、澄清	紫红色、澄清	橘黄色、浑浊
	2	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	3	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	4	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	5	紫红色、澄清	紫红色、澄清		
	6	紫红色、澄清	紫红色、澄清		

Bioindicator。

3.2 方法与结果

3.2.1 方法

3.2.1.1 流程

本次实验的思路为通过对生物指示剂进行灭菌和培养，得到实验结果并进行数据分析，从而得出实验结论。

3.2.1.2 过程

步骤 1：将 6 支生物指示剂用标签依次标为 1、2、3、4、5 和 6，作为实验组；额外多准备 1 支生物指示剂作为对照组，一起拍照。

步骤 2：将实验组 6 支生物指示剂按照 2 支一小组，放在烧杯中。打开灭菌器，将烧杯按照上、中、下三层和待灭菌物品放在灭菌器中，拍照，关闭灭菌器。

步骤 3：设置灭菌器的灭菌温度为 121℃，灭菌时间为 15 min，打开灭菌器电源进行灭菌。

步骤 4：待灭菌结束，将灭菌后的实验组和对照组生物指示剂拍照。

步骤 5：将灭菌后的生物指

示剂及时放置在培养箱，然后调节培养温度为 60℃，并培养 48 h。随后取出培养后的生物指示剂，观察安瓿的内容物，并与生物指示剂照片作比较。

重复步骤 1 至步骤 5，连续验证 3 次。

3.2.2 合格标准

如果经灭菌和培养后，安瓿的内容物呈紫红色且澄清，则证明公司化验室的蒸汽灭菌器的灭菌过程有效，可杀灭孢子菌；

如果经灭菌和培养后，安瓿的内容物呈橘黄色且浑浊，则证明公司化验室的蒸汽灭菌器的灭菌过程失效，不能杀灭孢子菌。

3.2.3 结果

连续验证 3 次后，实验组安瓿的内容物都呈紫红色且澄清。实验结果见表 1。

3.3 结论

根据表 1 可得知，公司化验室的蒸汽灭菌器在 121℃ 保持

15 min 灭菌的条件下，能够杀灭孢子菌。化验室在日常微生物检验过程中，用 121℃ 条件下灭菌 15 min 的方式能彻底杀灭包括孢子菌在内的所有微生物，而不会因为杀菌不彻底，因微生物检验用物品引入微生物，造成假阳性的风险。公司化验室的蒸汽灭菌器可满足日常检验时的灭菌使用要求。

3.4 注意事项

3.4.1 生物指示剂的运输和储藏

生物指示剂在运输过程中，需保持其处于恒定的温度。生物指示剂送达公司后，应立即置于冰箱冷藏柜进行冷藏；试验室取出生物指示剂后，应尽快开始灭菌。当生物指示剂储存于冰箱中时（恒定温度为 2～8℃），应保证其在包装上打印的有效期之前保持稳定。室温条件下生物指示剂的储存周期为 1～2 周，储存温度超



无论您面临何种工况，
我们承诺为您提供完善的阀门应用及解决方案！

英国FLYGER弗莱戈阀门作为世界领先的阀门制造商，始终秉承“阀门应用专家，有价值的服务”的价值服务理念；关注并深刻理解和客户需求，针对性定制生物制药行业阀门应用及解决方案；为用户提供高品质阀门产品和专业的流体控制解决方案。不断以卓越的产品和服务成就FLYGER和客户的共同价值生态。

球阀 蝶阀 调节阀 隔膜阀 止回阀 截止阀 闸阀
刀闸阀 陶瓷阀 衬氟阀 执行机构 特殊定制阀门



销售总部
地址：上海市七莘路1839号
财富108广场北楼20层
电话：+86-21-60712361
传真：+86-21-60712363
邮箱：flygersh@flyger.cn



官方网站

成都工厂
地址：成都市经济技术开发区
(龙泉驿) 南二路309号
电话：+86-28-88428198
传真：+86-28-85151711
邮箱：flyger@flyger.cn



微信公众号

阀门应用专家 有价值的服务

过 30℃时会影响产品的稳定性。

3.4.2 蒸汽灭菌器的确认

开展蒸汽灭菌器灭菌效果的验证之前，应对蒸汽灭菌器实施运行确认和性能确认。运行确认是为了保证蒸汽灭菌器的运行符合设计标准；性能确认是为了保证蒸汽灭菌器在正常操作方法和工艺条件下能够持续符合标准。

3.4.3 生物指示剂的灭菌

容量不超过 250 L 的蒸汽灭菌器应至少使用 2 支安瓿进行检查，而容量超过 250 L 的高压灭菌器应至少使用 6 支安瓿进行检查。（这里需要注意的是：在放入蒸汽灭菌器之前，需用力摇动每支安瓿，以分散孢子。）

为了避免意外破损造成污染，建议将安瓿放在玻璃烧杯中，并将其放在高压灭菌器的底部或中部（通常被认为是其中最不利灭菌的位置）。灭菌后，取出安瓿，并在 $60 \pm 2^\circ\text{C}$ 下培养 48 h。（这里需要注意的是：应避免在超过 125°C 的灭菌温度下使用安瓿，以防止损坏生物指示剂。）

3.4.4 生物指示剂的培养

首先需要对培养生物指示剂的培养箱实施运行确认和性能确认。运行确认是为了证明培养箱的运行符合设计标准；性能确认是为了证明培养箱在正常操作方法和工艺条件下能够持续符合标准。将灭菌后的生物指示剂及时放置在培养箱中，然后调节培养温度为 60°C ，并培养 48 h。

3.4.5 蒸汽灭菌器灭菌效果的验证频率

蒸汽灭菌器的灭菌效果验证至少一年开展 1 次。

3.4.6 蒸汽灭菌器灭菌验证的文件要求

关于蒸汽灭菌器的灭菌效果验证，首先制定验证方案，并经审核、批准，同时验证方案应当明确职责。其次，验证应当按照预先确定和批准

的方案实施，并记录。验证工作完成后，应写出报告，并经审核、批准。验证的结果和结论（包括评价和建议）应记录并存档。最后，应当根据验证的结果确认工艺规程和操作规程。

4 实验总结

根据《药品生产质量管理规范（2010 年修订）》、《中华人民共和国药典（2020 年版 四部）》、《YXQ-LS-100G 立式压力蒸汽灭菌器使用说明书》、《BSP-150 生化培养箱（液晶显示）使用说明书》和《Sterikon® plus Bioindicator 使用说明书》制定了本次“蒸汽灭菌器灭菌效果验证方案”，经审核、批准后按照方案进行验证。根据验证结果编写了“蒸汽灭菌器灭菌效果验证报告”，并经审核与批准。蒸汽灭菌器验证结论为：实验组生物指示剂经 121°C 灭菌 15 min， 60°C 培养 48 h 后，在安瓿的内容物呈紫红色且澄清；而对照组生物指示剂经 60°C 培养 48 h 后，在安瓿的内容物呈橘黄色且浑浊。这证明公司化验室的蒸汽灭菌器在 121°C 、灭菌 15 min 的设置下，能够杀灭孢子菌。化验室在日常微生物检验过程中，用在 121°C 条件下灭菌 15 min 的方式，能彻底杀灭包括孢子菌在内的所有微生物，而不会因为杀菌不彻底，因微生物检验用物品引入微生物，造成假阳性的风险。公司化验室的蒸汽灭菌器可满足日常检验时的灭菌使用要求。

【参考文献】

- [1] 国家药品监督管理局. 药品生产质量管理规范（2010 年修订），第三百一十二条和第一百三十九条。
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（2020 年版 四部）：204-205。
- [3] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典（2020 年版 四部）：512-513。
- [4] 尚海滨. 压力蒸汽灭菌法在中药制剂生产中的应用 [J]. 机电信息，2013（26）：33-38。