

【论著】

低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力检测方法的研究

孙文魁, 杨 彬, 苏冠民, 孟 蔚, 刘晓康, 崔树玉
(山东省疾病预防控制中心, 山东济南 250014)

摘要 **目的** 建立低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力的检测方法。**方法** 采用存活曲线法, 对某低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物的抗力进行检测和验证。**结果** 在 60 °C 恒温水浴条件下, 用浓度为 1.0 mol/L 甲醛溶液进行作用, 测得该生物指示物(嗜热脂肪地芽孢杆菌, ATCC 7953)芽孢的 *D* 值为 10.49 min、*ST* 值为 43.03 min 和 *KT* 值为 105.97 min。**结论** 该生物指示物的 *ST* 值和 *KT* 值经验证合格, 其抗力符合相关标准的要求, 本研究建立的测定方法具有可行性。

关键词 低温蒸汽甲醛灭菌; 生物指示物; 抗力; 测定

中图分类号: R187.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-7658(2019)08-0581-03

DOI: 10.11726/j.issn.1001-7658.2019.08.007

Study on the resistance test method of biological indicators for low-temperature steam formaldehyde sterilization

SUN Wen-kui, YANG Bin, SU Guan-min, MENG Wei, LIU Xiao-kang, CUI Shu-yu
(Shandong Provincial Center for Disease Control and Prevention, Jinan Shandong 250014, China)

Abstract Objective To study the resistance test method of biological indicators for low-temperature steam formaldehyde sterilization. **Methods** The survival curve method was used to detect and verify the resistance of biological indicator for low-temperature steam formaldehyde sterilization. **Results** Under the condition of 60°C and 1.0 mol/L of formaldehyde solution, the *D* value of the spore of biological indicator (*Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953) was 10.49 min, *ST* value was 43.03 min, and *KT* value was 105.97 min. **Conclusion** The *ST* value and *KT* value of the biological indicator have been verified and the resistance is in compliance with the relevant standards. The determination method established in this study is feasible.

Key words low-temperature steam formaldehyde sterilization; biological indicator; resistance; determination

低温蒸汽甲醛灭菌、汽化过氧化氢灭菌和环氧乙烷灭菌是目前国内外都公认的有效低温灭菌技术^[1]。在上述低温灭菌效果监测用生物指示物和化学指示物产品方面, 除环氧乙烷灭菌监测用指示物比较成熟之外, 其他两项低温灭菌监测用化学指示物和生物指示物产品尚有待完善。生物指示物监测是评价各项灭菌效果的金标准, 也是低温蒸汽甲醛灭菌效果评价的金标准, 其关键评价指标是生物指示物的抗力。目前, 国内外尚无用于低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物的抗力检测仪, 国内关于低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力的检测也未见报道, 相

关标准推荐用恒温水浴法评价生物指示物抗力。本文旨在验证低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力检测方法的可行性, 为科学评价低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物产品提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

生物指示物为国内某企业提供同一批次自含式低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物, 指示菌为嗜热脂肪地芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*, ATCC 7953) 芽孢, 产品说明书标示 *D*₆₀ 值为 11.3 min, 经活菌计数试验得到的平均回收菌量为 1.26×10^6 cfu/片。

主要试剂和培养基: 甲醛溶液为分析纯, 配成 1.0 mol/L 溶液供试验用, 用孔径 0.45 μm 滤膜过

〔作者简介〕 孙文魁(1986-), 男, 山东淄博人, 硕士, 主管医师, 从事消毒与感染控制工作。

〔通讯作者〕 崔树玉, Email: sdcdecui@sina.com

滤除菌;浓度为 20 g/L 亚硫酸钠溶液,用 0.45 μm 滤膜过滤除菌;培养基为胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB),均为德国进口产品。

试验用仪器包括 N1-13S 型恒温振荡水槽,60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴测定生物指示物抗力用;DK-S26 型恒温水浴锅,90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴用;KMF240 型恒温恒湿培养箱,细菌培养用。

1.2 试验方法

参照 GB 18281.1-2015/ISO 11138-1:2006《医疗保健产品灭菌生物指示物第 1 部分:通则》^[2]和 GB 18281.5-2015/ISO 11138-5:2006《医疗保健产品灭菌生物指示物第 5 部分:低温蒸汽甲醛灭菌用生物指示物》^[3],并略作修改。

1.2.1 D 值测定 采用微生物存活曲线法。①随机抽取 20 个生物指示物,在无菌条件下取出其菌片,平均分为 5 个时间组,每组 4 个菌片放入一个无菌试管中,置 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。5 个时间组的设置要求为:组间间隔时间相等;一组未经甲醛溶液处理,即暴露时间为 0 min;一组暴露后存活菌量降低到初始菌量的 0.01% (1.26×10^2 cfu/菌片)或以下,且需在检测限(50 cfu)以上;其余 3 组的暴露时间介于前两组之间。②分别加入 10 ml 预热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 1.0 mol/L 甲醛溶液,开始计时。③达到相应暴露时间后立即将试管中的甲醛溶液倒掉,并加入 10 ml 亚硫酸钠溶液中和至少 10 min。④将试管中的亚硫酸钠溶液倒掉,加入 10 ml 灭菌纯水,静置 10 min。⑤将试管置 90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 60 min。⑥对处理后的菌片进行含菌量测定,计算各组菌片的平均存活菌量。⑦用所得的菌片平均存活菌量的常用对数值对时间(min)作图,用最小二乘法进行回归分析,确定最佳线性曲线。计算所得直线斜率的负倒数,即等于以时间(min)表示的指定暴露条件下的 D 值。具体计算公式参照 GB 18281.1-2015/ISO 11138-1:2006^[2]附录 C。

1.2.2 存活-杀灭反应特性验证 ①存活时间(ST)和杀灭时间(KT)采用初始存活菌量(N_0)和 D 值,根据以下公式计算: ST 值 $\geq (\lg N_0 - 2) \times D$ 值, KT 值 $\leq (\lg N_0 + 4) \times D$ 值。②随机抽取 100 个生物指示物,在无菌条件下取出其菌片,每个菌片放入一个无菌试管中,置 60 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 20 min。③分别加入 10 ml 预热至 60 $^{\circ}\text{C}$ 的 1.0 mol/L 甲醛溶液,开始计时。其中,50 个菌片的暴露时间为 ST ,另外 50 个菌片的暴露时间为 KT 。④达到相应暴露时间后立即将试管中的甲醛溶液倒掉,并加入 10 ml 亚硫酸钠溶液中和至少 10 min。⑤将试管中的亚硫酸钠溶液尽可能倒干,加入 10 ml TSB 培养基,置 56 $^{\circ}\text{C}$ 温箱

培养 7 d,观察有无细菌生长。⑥试验同时设置阳性对照组和阴性对照组。

1.2.3 评价标准 依据 GB 18281.5-2015/ISO 11138-5:2006^[3]规定,在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 mol/L 甲醛溶液暴露条件下,测定的 D 值应 ≥ 6 min;暴露时间为 ST 时,50 个测试样本应全部有菌生长;暴露时间为 KT 时,50 个测试样本应全部无菌生长。此外,GB 18281.1-2015/ISO 11138-1:2006^[2]还要求所测 D 值与标示 D 值相差应在 $\pm 20\%$ 范围内。

2 结果

2.1 D 值测定结果

根据生存曲线法适用条件,最终确定的 5 个暴露时间为 0 min、11 min、22 min、33 min 和 44 min。在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 mol/L 甲醛溶液暴露条件下,根据各组菌片平均存活菌量计算的回归曲线线性方程为 $y = -0.0953x + 6.6423$,存活曲线的线性相关系数 r^2 为 0.92,计算得到的 D 值为 10.49 min,与标示 D 值相差 -7.17%,符合 GB 18281.1-2015/ISO 11138-1:2006^[2]的要求,详见表 1 和图 1。

表 1 各组菌片平均存活菌数

暴露时间(min)	平均存活菌数(cfu/片)
0	1 260 000
11	738 000
22	134 000
33	4 750
44	90

注:计算出 D 值为 10.49(min), $r^2 = 0.92$ 。

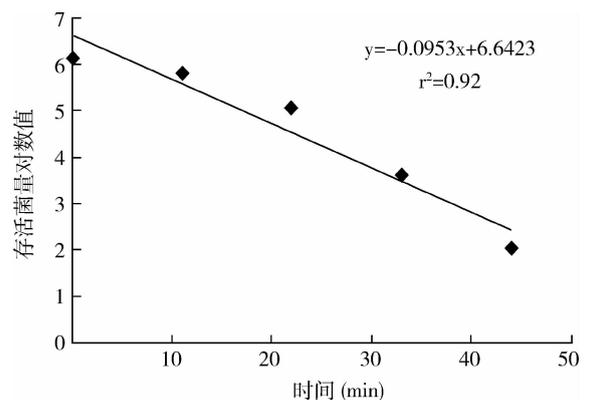


图 1 生物指示物存活曲线

2.2 存活-杀灭反应特性验证

根据所测 D 值计算,该批次生物指示物在 60 $^{\circ}\text{C}$ 、1.0 mol/L 甲醛溶液暴露条件下的 ST 为 43.03 min, KT 为 105.97 min,其存活-杀灭反应特性验证结果(表 2)符合 GB 18281.5-2015/ISO 11138-5:2006^[3]的要求。

表 2 存活 - 杀灭反应特性验证结果

暴露时间(min)	检测片数	有菌生长片数
43.03	50	50
105.97	50	0

注:阳性对照组有菌生长,阴性对照组无菌生长。

3 讨论

临床上某些医疗器械(如内镜)无法耐受高温,促使了低温消毒技术的发展。低温蒸汽甲醛灭菌技术是上世纪发展起来的新型灭菌技术,尽管甲醛具有潜在致癌毒性,但是低温蒸汽甲醛灭菌器的有效性和安全性早在 20 世纪 80 年代就已得到验证^[4,5],并逐渐在欧洲得到推广应用。在处理不同的灭菌对象时,低温蒸汽甲醛灭菌效果等于甚至优于过氧化氢等离子体灭菌和环氧乙烷灭菌^[6,7]。目前,国内已有厂商在推广低温蒸汽甲醛灭菌设备,且国产化设备也已通过灭菌性能和安全性能测试^[8]。因设备在灭菌过程中受到诸多因素的影响以及相关标准、规范的要求,灭菌效果需要定期用生物指示物进行监测。因此,如何科学有效地评价低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物显得尤为迫切。

合格的生物指示物应当具有合格的抗力,生物指示物的抗力特性包括 D 值和存活 - 杀灭反应特性。国内已有关于过氧化氢灭菌和环氧乙烷灭菌生物指示物抗力测定的研究^[9,10],而关于低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力测定的研究尚未见报道。低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力测定的难点在于目前世上尚无低温蒸汽甲醛灭菌抗力检测仪,无法完全模拟低温蒸汽甲醛灭菌环境。因此,建立一个有效、可行的低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力测定方法非常必要。

根据 GB 18281.1 - 2015/ISO 11138 - 1:2006^[2]附录 C 存活曲线方法测量 D 值的要求,至少有一次暴露的活菌数降低到初始菌量的 0.01%,而该方法可行的最低限约为 50 cfu,因此确定最长的暴露时间是试验的关键点。暴露时间过短,达不到菌量降低的要求;暴露时间过长,可能无法获得存活菌量的准确计数结果。在实际操作中,可根据产品说明书上标注的 D 值,预估最长的暴露时间,然后通过多次预试验加以确认。本次试验确定的最长暴露时间为 44 min,存活菌量为 90 cfu/菌片,符合标准要求。存活曲线的 r^2 为 0.92,说明曲线拟合度好,所得 D 值可信度高,且与说明书标示值相差 -7.17%,在 $\pm 20\%$ 范围内,符合 GB 18281.1 - 2015/ISO 11138 - 1:2006^[2]的要求。

在存活 - 杀灭反应特性验证试验中,当暴露时间为 ST 值时,50 个测试样本均有菌生长;暴露时间为 KT 值时,50 个测试样本均无菌生长,符合 GB 18281.5 - 2015/ISO 11138 - 5:2006^[3]的要求。该

验证试验的目的是进一步验证通过统计学方法计算的 D 值的准确性,同时确保生物指示物的抗力和初始存活菌量(ST 值和 KT 值与 D 值和 N_0 相关)具有一定的均一性、稳定性。

在 D 值测定和存活 - 杀灭反应特性验证试验初始阶段,装有菌片的无菌试管在 60 °C 水浴 20 min 是为了利用反应温度烘干在操作过程中菌片可能吸收的水分,以确保加入的甲醛溶液能够按照设计浓度作用于菌片。此外,在加入甲醛溶液时,应使甲醛溶液贴试管壁缓慢流下,直至甲醛溶液完全浸没菌片后再快速加入剩余甲醛溶液,此过程中试管一直处于 60 °C 水浴中。该操作是为了避免快速加入甲醛溶液时,菌片表面可能会产生一层气泡膜,阻止菌片与甲醛溶液接触,进而影响试验结果。

综上所述,该产品所测抗力结果符合 GB 18281.5 - 2015/ISO 11138 - 5:2006^[3]的要求;本方法测定低温蒸汽甲醛灭菌生物指示物抗力具有可行性,现阶段可用于该类产品的检测评价。但是同等浓度下,液相状态甲醛的穿透力肯定要低于蒸汽状态,本方法所测 D 值可能要高于真实值,有待低温蒸汽甲醛灭菌抗力检测仪问世后通过试验验证。

参考文献

- [1] 李涛,班海群,沈瑾,等. 消毒学与医院感染管理的相互促进[J]. 中华医院感染学杂志,2017,27(14):3139-3146.
- [2] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18281.1 - 2015/ISO 11138 - 1 - 2006 医疗保健产品灭菌 生物指示物第 1 部分:通则[S]. 2016.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB 18281.5 - 2015/ISO 11138 - 5 - 2006 医疗保健产品灭菌 生物指示物第 5 部分:低温蒸汽甲醛灭菌用生物指示物[S]. 2016.
- [4] Gibson GL. Processing heat-sensitive instruments and materials by low-temperature steam and formaldehyde[J]. J Hosp Infect, 1980,1(2):95-101.
- [5] Robertshaw RG. Low temperature steam and formaldehyde sterilization[J]. J Hosp Infect, 1983,4(3):305-314.
- [6] Pinto FM, Araújo VG, Souza RQ, et al. Evaluation of microbial growth on single-use vitrectomy probes reprocessed in healthcare practice[J]. Rev Esc Enferm USP, 2012,46(3):597-603.
- [7] Batista Neto S, Graziano KU, Padoveze MC, et al. The sterilization efficacy of reprocessed single use diathermy pencils[J]. Rev Lat Am Enfermagem, 2010,18(1):81-86.
- [8] 徐燕,曹永章,周连,等. 国产某品牌低温蒸汽甲醛灭菌柜灭菌相关性能的研究[J]. 中国消毒学杂志,2016,33(1):1-4.
- [9] 苏裕心,李海帅,王长德,等. 过氧化氢灭菌生物指示剂抗力测定方法的研究[J]. 中国消毒学杂志,2018,35(11):805-808.
- [10] 徐燕,陈越英,吴晓松,等. 环氧乙烷灭菌生物指示物抗力实验研究[J]. 中国消毒学杂志,2013,30(5):402-404.