影响汽化过氧化氢灭菌生物指示剂抗力的因素研究

叶项宇，邢倩倩，周　婷，辛秋华，王云光
（浙江泰林生命科学有限公司，浙江杭州 311401）

摘要：嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus*，ATCC 12980），通常作为生物指示物监测过氧化氢的灭菌效果。文章探究了在汽化过氧化氢灭菌条件下，载体光洁度、芽孢纯度对生物指示剂抗力的影响。结果表明，生物指示剂的芽孢纯度与抗力呈负相关；生物指示剂的载体光洁度低时会提高抗力。因此，用户在接收汽化过氧化氢灭菌生物指示剂时，除进行常规的芽孢数量复核外，还需关注生物指示剂的载体质量及芽孢纯度。

关键词：生物指示剂；灭菌；过氧化氢；芽孢纯度；载体光洁度
中图分类号：R187　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1572-06
引用：叶项宇 , 邢倩倩 , 周　婷 , 等. 影响汽化过氧化氢灭菌生物指示剂抗力的因素研究 [J]. 中国医药工业杂志 , 2024, 55(11): 1572-1577. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.015

Research on Factors Affecting the Resistance of Biological Indicators for Vaporized Hydrogen Peroxide Sterilization

YE Xiangyu, XING Qianqian, ZHOU Ting, XIN Qiuhua, WANG Yunguang
(*Zhejiang Tailin Life Science Co., Ltd., Hangzhou 311401*)

ABSTRACT: *Geobacillus stearothermophilus* (ATCC 12980) is commonly used to detect the sterilization effect of vaporized hydrogen peroxide. The study mainly discussed the effects of carriers and spore purity on the resistance of biological indicators (BIs) under vaporized hydrogen peroxide sterilization. The results showed that spore purity was negatively correlated with BIs resistance, poor carrier smoothness could also increase the resistance of BIs. Therefore, when accepting the BIs which used to monitor the vaporized hydrogen peroxide sterilization, besides the viable spore count, users should pay more attention to the carrier and the purity of the spores.

Key Words: biological indicator; sterilization; hydrogen peroxide; spore purity; carrier smoothness

过氧化氢灭菌作为一种新兴的灭菌方式，因杀菌效率高、易于降解等特点，被广泛应用于制药企业、医院、食品等行业，并逐渐取代传统灭菌方式如臭氧、甲醛灭菌等。近年来，汽雾化过氧化氢消毒设备已成为高级别生物安全实验室的关键灭菌设备，并在疫情防控、医院感染控制等多个领域中发挥着重要作用[1]。

根据原理不同，过氧化氢灭菌方式主要分为 3 类：汽化过氧化氢（vaporized hydrogen peroxide，vHP）灭菌、雾化过氧化氢灭菌和过氧化氢低温等离子体灭菌。vHP 灭菌的过程分为 3 个阶段，首先通过“闪蒸”将液态过氧化氢转化为 vHP，直至测试区域中过氧化氢的饱和度不再增加，维持这一状态并持续杀灭微生物，最后引入新鲜空气，催化过氧化氢蒸汽分解为氧气和水。该方式使用的液体过氧化氢浓度为 30％～ 59％，灭菌时间为 1.5 ～ 8 h，主要应用场景为无菌隔离器及医疗器械的灭菌。美国 FDA 于 2024 年 1 月 8 日更新指南[2]，将 vHP 重新归类，从既定的 B 类灭菌工艺更新为既定的 A 类灭菌工艺，以促使医疗器械行业更广泛地采用 vHP 作为灭菌方法。这意味着该灭菌方法在医疗器械灭

收稿日期：2024-01-20
作者简介：叶项宇（1998—），男，硕士，从事药品微生物检测研究。E-mail：791315878@qq.com

菌领域的应用进一步扩大。雾化过氧化氢灭菌则利用旋转气流将液态过氧化氢喷出，形成 8 ～ 10 μm 的气溶胶扩散到试验区域，实现对微生物的杀灭。该方式使用的液体过氧化氢浓度为 5%～ 7%，灭菌时间一般为 2 ～ 3 h，主要应用场景为高级别生物安全实验室的终末消毒，以及医疗机构内感染的预防与控制。上述 2 种灭菌方式均可实现 10^6 的微生物杀灭 [3]。过氧化氢低温等离子体灭菌首先将过氧化氢液体汽化，注入真空灭菌仓后使用射频或电能以生成过氧化氢等离子体，达到灭活细菌和病毒的目的。过氧化氢等离子体最后会分解成水和氧气。过氧化氢低温等离子体灭菌使用液体过氧化氢浓度为 50%～ 60%，灭菌时间较短，为 30 ～ 120 min[4]，应用场景为过氧化氢低温等离子体灭菌器，主要对不耐热的精密医疗器械如人工瓣膜、心脏起搏器等进行快速灭菌 [5]。

vHP 灭菌技术的优势是广谱杀菌性、无环境毒性，尤其适用于热敏性材料，但劣势也非常明显，即作用方式为表面灭菌，穿透性差。因此，在 vHP 灭菌验证中对生物指示剂的性能要求更高。然而，由于国内尚无关于 vHP 灭菌生物指示剂的抗力评价标准及设备，导致生物指示剂产品的质量参差不齐 [6]，在无菌隔离器的灭菌验证过程中，生物指示剂培养呈阳性的情况屡见不鲜。并且，目前研究多集中于过氧化氢的灭菌工艺及设备开发 [7]，对 vHP 灭菌生物指示剂的性能研究较少。影响生物指示剂抗力的因素多种多样，如培养基配方、培养条件、纯化方式等 [8—11]。文章探究了在 vHP 灭菌条件下，生物指示剂载体的光洁度、芽孢纯化方式对其抗力的影响，为提高 vHP 灭菌工艺技术水平提供数据支持。

1 仪器与试药

Star-SED 型台式扫描电镜（荷兰 Phenom Scientific 公司）；ME204/02 型精密天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）；1246 型生物安全柜（比利时 BioX 公司）；DHG-9240A 型电热鼓风干燥箱（上海一恒科学仪器有限公司）；BIER-VH100 型过氧化氢灭菌抗力仪（浙江泰林生物技术股份有限公司）；GHP-9270 型隔水式恒温培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）。不锈钢载体 A 为自制载体；不锈钢载体 B 源自某国内过氧化氢灭菌生物指示剂生产商；不锈钢载体 C 源自某国外过氧化氢灭菌生物指示剂生产商；Tyvek® 透析材料购自美国 DuPont 公司。

胰酪大豆胨液体（tryptic soy broth，TSB）培养基和胰酪大豆胨琼脂（tryptic soy agar，TSA）培养基均购自北京三药科技有限公司；溶菌酶（上海麦克林生化科技有限公司）。

嗜热脂肪地芽孢杆菌（*Geobacillus stearothermophilus,* ATCC 12980）购自美国典型培养物保藏中心（American Type Culture Collection，ATCC）。

2 方法与结果

2.1 菌悬液制备

将甘油管中保存的嗜热脂肪地芽孢杆菌转接至 TSB 培养基中，于 55 ℃培养 24 h 后，取菌液 1 mL，接种至 TSA 培养基 200 mL 中，再于 55 ℃培养 5 d 后，加入无菌纯化水 5 mL，使用涂布棒将菌苔刮下，收集菌液至无菌锥形瓶中备用。

2.2 芽孢的纯化与计数

无菌水洗涤菌悬液：用适量无菌纯化水洗涤“**2.1**”项下的菌悬液，离心（5 438×*g*）5 min；沉淀用无菌水重悬沉淀，重复 3 次，于 2 ～ 8 ℃保存备用。

酶处理菌悬液：将收集到的“2.1”项下的菌悬液，按体积比 1 ∶ 1 添加 100 μg/mL 溶菌酶溶液，于 37 ℃孵育 1 h 后，离心（5 438×*g*）5 min；沉淀用无菌水重悬，重复 3 次，于 2 ～ 8 ℃保存备用 [6]。

取上述处理后的菌悬液 1 mL 于试管中，加无菌纯化水 9 mL，于水浴（95 ～ 100 ℃）热激活处理 15 min，迅速转移至冰水混合物中，将试管冷却至室温。于生物安全柜中进行 10 倍梯度稀释，涂布于 TSA 平板上，于 55 ℃培养 48 h 后计数。

2.3 生物指示剂制备

将待使用的不锈钢载体清洗、烘干后，于电热恒温干燥箱中 180 ℃干热灭菌 3 h。将灭菌后的载体平铺至生物安全柜中，取计数完成的菌悬液，涡旋混匀，按 1×10^6 cfu 的加菌量均匀地加到每个载体上，待菌液风干后，装入 Tyvek® 透析材料中，封口备用。

2.4 SEM 观察

2.4.1 试验方法

选取 A、B、C 3 种不锈钢片作为载体，使用

SEM 观察各载体加菌前、加菌后的情况。

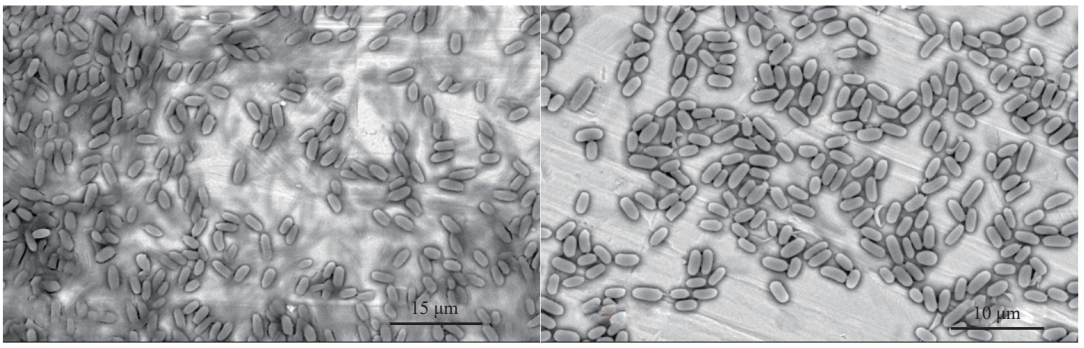
SEM 参数：放大倍数 5 000 倍；加速电压 10 kV；工作距离 7.972 mm。

2.4.2　不同纯化方法的芽孢 SEM 观察

取“**2.2**”项下的 2 种纯化芽孢悬液，按“**2.3**”项下方法分别加至自制载体 A 上制备为生物指示剂，于 SEM 下进行观察，结果如图 1 所示。结果表明，2 种纯化方法所得悬液的芽孢纯度有明显差异。使用无菌水洗涤的纯化方法效果较差，悬液的芽孢纯度较差，可见大量营养体附着在芽孢表面（图 1A）。这种情况可导致美国注射剂协会（Parenteral Drug Association，PDA）第 51 号技术报告中提到的“流氓生物指示剂（rogue biological indicator）”的出现[12]，一方面严重阻碍过氧化氢对细菌的杀灭进程，显著提升生物指示剂的抗力；另一方面，死亡的营养体细胞分解产生的胞壁肽等物质可诱导芽孢萌发，易导致生物指示剂在保存过程中失效，缩短其有效期[13]。而使用溶菌酶纯化获得的悬液芽孢率较高，无营养体，芽孢无堆叠且分散程度较好（图 1B），符合 ChP 2020 年版四部《9207 灭菌用生物指示剂指导原则》中生物指示剂芽孢含量高于 90%的要求。

2.4.3　不同生物指示剂载体的 SEM 观察电镜观察

不同生物指示剂载体的 SEM 观察结果如图 2 所示。A、B 载体的光洁度尚可，整体较平整，无明显凹陷、划痕，是较理想的过氧化氢灭菌生物指示剂的载体材料。载体 C 的光洁度较差，表面不平整，有较多凹陷，不适宜作为过氧化氢灭菌生物指示剂的载体。在载体染菌过程中，部分芽孢会嵌入到这些凹陷中，过氧化氢无法与这些芽孢直接接触，即使提高过氧化氢浓度或延长灭菌时间，依然无法将芽孢完全杀灭。因此，该类载体会严重影响生物指示剂的质量，其验证结果的可信度较低。

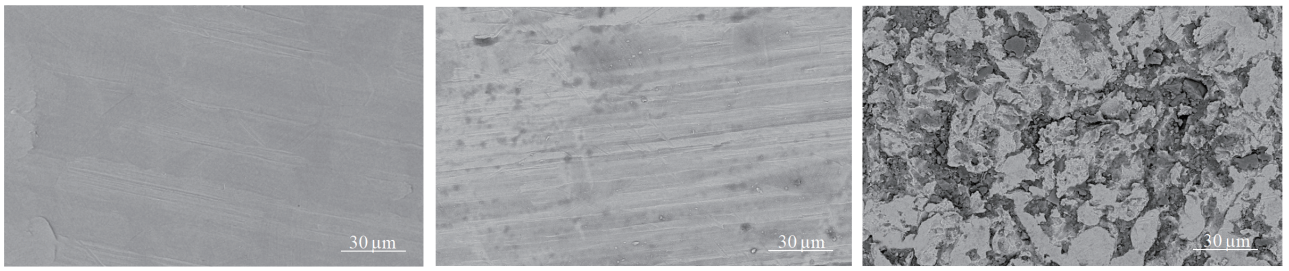


A　　B

A—无菌水洗涤（×10 000）；B—溶菌酶处理（×14 000）。

图 1　不同纯化方法所得芽孢的 SEM 照片

Fig.1　SEM Images of Spore Purified by Different Methods



A　　B　　C

A—自制载体 A；B—某国内生物指示剂生产商 B；C—某国外生物指示剂生产商 C。

图 2　不同生物指示剂载体 SEM 照片（×5 000）

Fig.2　SEM Images of Different Biological Indicator Carriers（×5 000）

2.5 抗力测试

2.5.1 抗力测试方法

将制备好的各生物指示剂置过氧化氢灭菌抗力仪中，设置过氧化氢浓度为 6×10^{-4}。参照 2020 年版 ChP 四部《9208 生物指示剂耐受性检查法指导原则》中的阴性分数法进行 *D* 值测试。灭菌结束后，迅速取出生物指示剂，转移至生物安全柜中，将灭菌后的生物指示剂接种至 TSB 培养基中，于 55 ℃恒温培养 7 d，观察并记录测试结果。抗力测试重复 3 次。

2.5.2 不同芽孢纯化方法的生物指示剂抗力测试

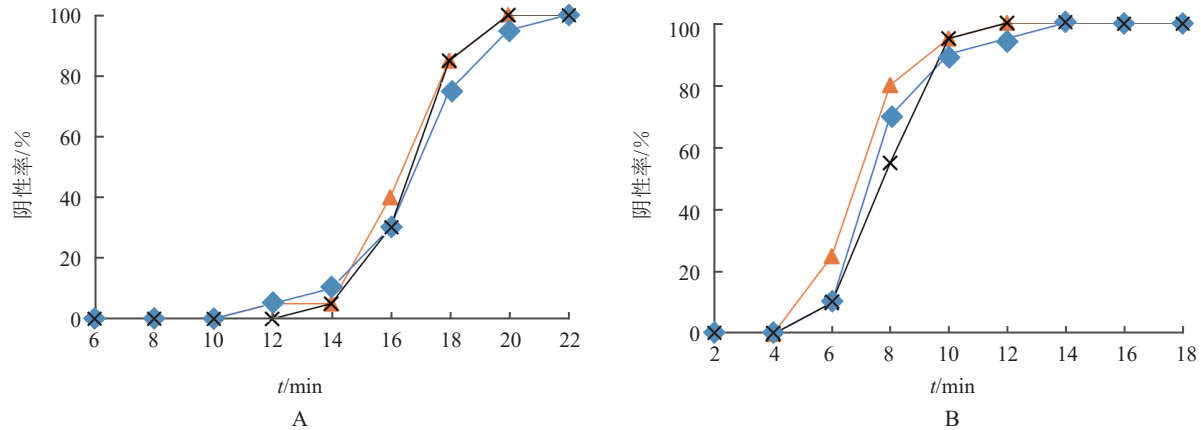
采用“**2.4.2**”中的 2 种生物指示剂，按“**2.5.1**”项下方法进行抗力测试，结果如图 3 所示。结果表明，不同芽孢纯化方法的生物指示剂 *D* 值存在明显差异。采用无菌水洗涤的菌悬液制作的 3 批生物指示剂，全部样品为阴性结果的灭菌时间为 22 min，*D* 值为 (2.65±0.03) min；而用溶菌酶处理的菌悬液制作的 3 批生物指示剂全部样品为阴性结果的灭菌时间为 14 min，D 值为 (1.20±0.07) min。生物指示剂的 *D* 值与芽孢纯度呈负相关，即芽孢纯度越高，*D* 值越低、越容易被杀灭。试验结果表明，细菌营养体的存在会显著提高生物指示剂的抗力。用户在进行生物指示剂芽孢数量复核过程中，按照相关标准的要求需进行“热激活”处理，可使载体上的细菌营养体失活。即使生物指示剂计数结果一致，无法表示生物指示剂的芽孢纯度相同，也可以通过孔雀石绿染色法或 SEM 方法，判断生物指示剂的芽孢率是否符合要求。

2.5.3 不同载体的生物指示剂抗力测试

将“**2.2**”项下用溶菌酶纯化所得的芽孢，按“**2.3**”项下方法分别加至 3 种不锈钢片上，按“**2.5.1**”项下方法进行抗力测试，结果如图 4 所示。以不锈钢片 A、B 作为载体的生物指示剂的抗力表现出一致性，均在 12 min 以内完全杀灭。其中，不锈钢片 A 的生物指示剂 *D* 值为 (1.24±0.09) min，不锈钢片 B 的生物指示剂 *D* 值为 (1.24±0.05) min。不锈钢片 C 的生物指示剂在测试周期内 (22 min) 未出现全阴性结果，且测试数据无规律，随着灭菌时间的延迟，生物指示剂的阴性率未能呈现出“线性”的测试结果，故无法计算出该生物指示剂的 *D* 值。出现该结果的原因主要是不锈钢片 C 的表面光洁度差，在生物指示剂的制备过程中，部分芽孢在裂痕处聚集、堆叠，导致灭菌因子无法作用，进而表现出测试结果无规律。进一步采用 SEM 观察该生物指示剂，其芽孢分布情况如图 5 所示。由于载体上的裂痕较多且深浅不一，载体上的大小沟壑中均能发现芽孢的身影，有些芽孢几乎嵌入到载体裂痕最底部，故该生物指示剂的抗力测试结果无规律。

3 讨论

《药品 GMP 指南》要求用户在接收成品生物

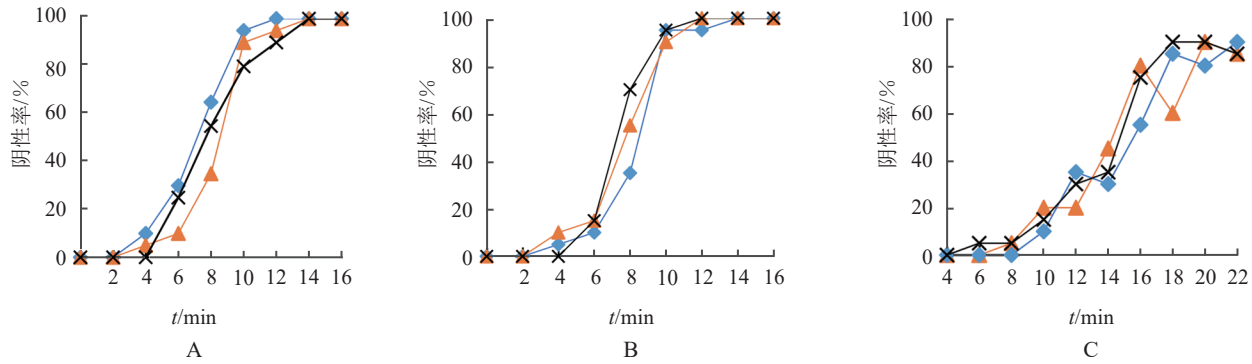


A—无菌水洗涤；B—溶菌酶处理。

▲—批次 1；◆—批次 2；×—批次 3。

图 3 不同纯化方法的芽孢抗力测试结果

Fig.3 Resistance Test Results of Different Spore Purification Methods



A—不锈钢载体 A；B—不锈钢载体；C—不锈钢载体 C。

▲—批次 1；◆—批次 2；×—批次 3。

图 4　不同载体的生物指示剂抗力测试结果

Fig.4　Resistance Test Results of Different Biological Indicator Carriers

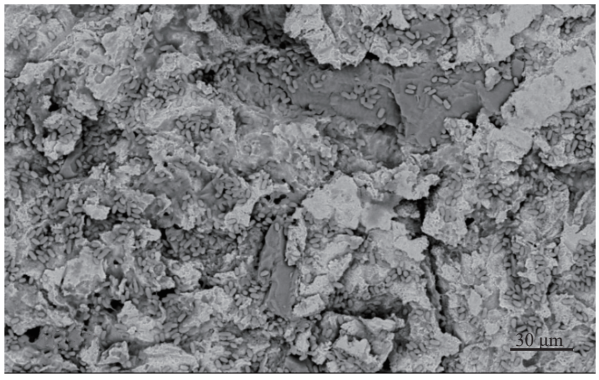


图 5　载体 C 上芽孢分布的 SEM 照片（×5 000）

Fig.5　SEM Image of Spores Distribution on the Carrier C (×5 000)

指示剂时，需要对生物指示剂的芽孢数量及微生物纯度进行确认[14]。在无菌隔离器、传递舱等常压环境下，因过氧化氢表面灭菌的特性，对生物指示剂载体的质量及芽孢纯度有更高的要求。目前国内外均未颁布关于这类生物指示剂的法规。因此，市场上过氧化氢灭菌生物指示剂产品的质量良莠不齐，导致大部分用户经常被“验证失败”困扰。ChP 2020 年版相关章节指出“生物指示剂的芽孢含量应高于 90%”，对于穿透性较好的灭菌方式如湿热灭菌、环氧乙烷灭菌，生物指示剂的芽孢含量对其抗力无明显影响，但对于穿透性较差的灭菌方式如 vHP 灭菌而言，生物指示剂的芽孢含量则至关重要。综合比较市场上 vHP 灭菌生物指示剂产品，只有极少数供应商可满足这一要求。为确保 vHP 灭菌验证结果的有效性，建议用户在接收成品生物指示剂时，除了对生物指示剂的芽孢数量进行复核外，还需进一步对载体质量、芽孢纯度进行确认，以确保验证结果的有效性。本研究结果表明，用于监测 vHP 灭菌效果的生物指示剂，其载体光洁度及芽孢纯度均可显著影响其抗力。这些结果可帮助用户在排查 vHP 灭菌过程生物监测结果异常的原因时，进一步排除由生物指示剂产品质量问题而引起的灭菌失效的原因。

参考文献：

[1]　蔡海洋．汽化过氧化氢灭菌对微生物的影响及其机理研究[D]．长沙：中南大学硕士学位论文，2022.

[2]　FDA．FDA facilitates broader adoption of vaporized hydrogen peroxide for medical device sterilization [EB/OL]．(2024-01-08)[2024-01-08]．https://www．fda．gov/news-events/press-announcements/fda-facilitates-broader-adoption-vaporized-hydrogen-peroxide-medical-device-sterilization.

[3]　王家新，吕东娟．汽化过氧化氢灭菌和过氧化氢干雾灭菌使用对比及分析 [J]．中文科技期刊数据库（引文版）医药卫生，2022,(7)：5.

[4]　BERGER D, GUNDERMANN G, SINHA A, *et al*. Review of aerosolized hydrogen peroxide, vaporized hydrogen peroxide, and hydrogen peroxide gas plasma in the decontamination of filtering facepiece respirators[J]．*Am J Infect Control*, 2021, **50**(2)：203-213.

[5]　钱小进，陈敬华．隔离器快速过氧化氢蒸汽灭菌程序开发及验证标准的建立 [J]．机电信息，2021,(14)：3.

[6] 李德全 , 陈昭斌 . 等离子体技术在消毒中的应用进展 [J]. 中国消毒学杂志 , 2023, **40**(4): 295-299.

[7] 陈苏婉 . 过氧化氢灭菌工艺及效果验证 [J]. 中国消毒学杂志 , 2022, **39**(5): 397-400.

[8] LI L, JIN J D, HU H J, *et al*. Optimization of sporulation and purification methods for sporicidal efficacy assessment on Bacillus spores [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2022, **49**(4): kuac014.

[9] NING Z S, DONG W, BIAN Z J, *et al*. Insight into effects of terbium on cell growth, sporulation and spore properties of *Bacillus subtilis* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2024, **40**(3): 79.

[10] WELLS-BENNIK M H J, JANSSEN P W M, KLAUS V, *et al*. Heat resistance of spores of 18 strains of *Geobacillus stearothermophilus* and impact of culturing conditions [J]. *Int J Food Microbiol*, 2019, **291**: 161-172.

[11] STIER P, MAUL S, KULOZIK U. Effect of sporulation conditions following solid-state cultivation on the resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores for use as bioindicators testing inactivation by H2O2 [J]. *LWT- Food Science and Technology*, 2021, **151**(5): 112078.

[12] PDA. Technical report No. 51 biological indicators for gas and vapor-phase decontamination processes: specification, manufacture, control and use [S]. Bethesda: PDA, 2010: 32.

[13] 邹 昊 , 田寒友 , 白 京 , 等 . 一种简单高效的芽胞纯化方法及其效果评价 [J]. 微生物学杂志 , 2021, **41**(2): 78-85.

[14] 国家市场监督管理总局 . 药品生产质量管理规范 (第二版): 质量控制实验室与物料系统 [S]. 北京 : 中国医药科技出版社 , 2023: 276.

