



中华人民共和国国家标准

GB 18281.1—2015/ISO 11138-1:2006
代替 GB 18281.1—2000

医疗保健产品灭菌 生物指示物 第 1 部分：通则

Sterilization of health care products—Biological indicators—
Part 1: General requirements

(ISO 11138-1:2006, IDT)

2015-12-10 发布

2017-01-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局
中国国家标准化管理委员会 发布

前 言

GB 18281 的本部分的全部技术内容为强制性。

GB 18281《医疗保健产品灭菌 生物指示物》分为以下五个部分：

- 第 1 部分：通则；
- 第 2 部分：环氧乙烷灭菌用生物指示物；
- 第 3 部分：湿热灭菌用生物指示物；
- 第 4 部分：干热灭菌用生物指示物；
- 第 5 部分：低温蒸汽甲醛灭菌用生物指示物。

本部分是 GB 18281 的第 1 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本部分代替 GB 18281.1—2000《医疗保健产品灭菌 生物指示物 第 1 部分：通则》，与 GB 18281.1—2000 相比，主要技术变化如下：

- 增加了自含式生物指示物的具体信息；
- 增加了对标签的综合要求的图表；
- 增加了生物指示物的使用关于具体的最低生物量和/或抗力标准的范围等其他方面的要求，这些范围在产品标签上有详细说明；
- 在附录 D 中规定可以用 HSKP、LHSKP 或 SMCP 方法计算 D 值。

本部分使用翻译法等同采用 ISO 11138-1:2006《医疗保健产品灭菌 生物指示物 第 1 部分：通则》。

与本部分中规范性引用的国际文件有一致性对应关系的我国文件如下：

- GB/T 7408—2005 数据元和交换格式 信息交换 日期和时间表示法 (ISO 8601:2000, IDT)；
- GB 18278.1—2015 医疗保健产品灭菌 湿热 第 1 部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求 (ISO 17665-1:2006, IDT)；
- GB 18279.1—2015 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第 1 部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制的要求 (ISO 11135-1:2007, IDT)；
- GB/T 18279.2—2015 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第 2 部分：GB 18279.1 应用指南 (ISO 11135-2:2008, IDT)；
- GB 18280.1—2015 医疗保健产品灭菌 辐射 第 1 部分：医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求 (ISO 11137-1:2006, IDT)；
- GB 18280.2—2015 医疗保健产品灭菌 辐射 第 2 部分：建立灭菌剂量 (ISO 11137-2:2006, IDT)；
- GB/T 18280.3—2015 医疗保健产品灭菌 辐射 第 3 部分：剂量测量指南 (ISO 11137-3:2006, IDT)；
- GB/T 19633.1—2015 最终灭菌医疗器械的包装 第 1 部分：材料、无菌屏障系统和包装系统要求 (ISO 11607-1:2006, IDT)；
- GB/T 19633.2—2015 最终灭菌医疗器械的包装 第 2 部分：成形、密封和装配过程的确认要求 (ISO 11607-2:2006, IDT)；
- GB/T 19973.1—2015 医疗器械的灭菌 微生物学方法 第 1 部分：产品上微生物总数的测定 (ISO 11737-1:2006, IDT)；

GB 18281.1—2015/ISO 11138-1:2006

——GB/T 24628—2009 医疗保健产品灭菌 生物与化学指示物 测试设备(ISO 18472:2006, IDT);

——YY/T 0287—2003 医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求(ISO 13485:2003, IDT);

——YY/T 0466.1—2009 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 第1部分:通用要求(ISO 15223:2008, IDT)。

本部分做了下列编辑性修改:

——按照 GB/T 1.1 的要求进行了一些编辑上的修改;

——删除了国际标准的前言。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发行机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由全国消毒技术与设备标准化技术委员会(SAC/TC 200)归口。

本部分起草单位:山东新华医疗器械股份有限公司、3M 中国有限公司、国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人:王久儒、黄秀莲、黄靖雄、赵健存。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为:

——GB 18281.1—2000。

引 言

本部分规定了用于灭菌周期监测的生物指示物(包括染菌载体和菌悬液)在生产、标签、检测方法和性能等方面的通用要求。GB 18281 的其他部分规定了对用于不同灭菌过程的生物指示物的具体要求。

附录 F 中介绍了生物指示物的详细图解和组成部分,其中包含 GB 18281 中的两类生物指示物,这表明染菌载体可不用包装,也可以用灭菌物质可穿透的初级包装,暴露于灭菌因子中。

抗力特性取决于试验微生物的种类、数量、准备方式和初级包装的效果。关于生物指示物的选择、使用以及结果的指南参考 ISO 14161。

对于任何一个(包括 GB 18281 的其他部分所描述的)灭菌过程,生物指示物的抗力也取决于测试时的微生物环境。理论上,这可能导致生物指示物的准备过程中产生很多不确定因素。此外,灭菌过程中可能会出现各种情况,这就要保证产品在各种条件下能充分暴露。因此,当暴露在特定灭菌过程各种条件下时,规范生产的生物指示物的抗力性能表现为 D 值和相关的 z 值。这些值在 GB 18281 的其他部分中都有所规定。

专业制造商、使用者和权威管理部门都参与了 GB 18281 的第 1 部分~第 5 部分的起草,其代表了当今科技的发展水平。

在 GB 18281 的其他部分中所未涉及的具体灭菌过程的生物指示物也要遵循 GB 18281 的通用要求,包括抗力性能的测试。这类指示物不能准确定义,可能用于新的灭菌过程,也可用单独的微生物负载来代表。如果这些生物指示物含有世界卫生组织风险评估小组一组以外的微生物,应满足合适的保藏方法和安全等级。

GB 18281 规定了确认要求和灭菌过程的控制。

医疗保健产品灭菌 生物指示物

第 1 部分:通则

1 范围

1.1 适用

1.1.1 GB 18281 的本部分规定了拟用于确认和监测灭菌周期的生物指示物(包括染菌载体、试验菌悬液)及其他组成部分在生产、标识、检测方法和性能方面的通用要求。

1.1.2 本部分的基本要求适用于 GB 18281 的其他各部分。对于用于特殊灭菌过程中的生物指示物的要求在 GB 18281 的其他部分都有所规定。本部分适用于没有特殊要求的生物指示物。

1.2 不适用

本部分不适用于依靠物理方式去除微生物的检测体系,例如过滤过程或利用清洗消毒器或流通蒸汽等物理和/或机械方法去除微生物的过程。然而,本部分应包含相应的微生物测试系统的内容。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

ISO 8601 数据元和交换格式 信息交换 日期和时间表示法(Data elements and interchange formats—Information interchange—Representation of dates and times)

ISO 11135-1 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第 1 部分:医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制的要求(Sterilization of health care products—Ethylene oxide—Part 1:Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices)

ISO 11135-2 医疗保健产品灭菌 环氧乙烷 第 2 部分:ISO 11135-1 应用指南(Sterilization of health care products—Ethylene oxide—Part 2:Guidance on the application of ISO 11135-1)

ISO 11137-1 医疗保健产品灭菌 辐射 第 1 部分:医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求(Sterilization of health care products—Radiation—Part 1:Requirements for development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices)

ISO 11137-2 医疗保健产品灭菌 辐射 第 2 部分:建立灭菌剂量(Sterilization of health care products—Radiation—Part 2:Establishing the sterilization dose)

ISO 11137-3 医疗保健产品灭菌 辐射 第 3 部分:剂量测量指南(Sterilization of health care products—Radiation—Part 3:Guidance on dosimetric aspects)

ISO 11607-1 最终灭菌医疗器械的包装 第 1 部分:材料、无菌屏障系统和包装系统要求(Packaging for terminally sterilized medical devices—Part 1:Requirements for materials, sterile barrier systems and packaging systems)

ISO 11607-2 最终灭菌医疗器械的包装 第 2 部分:成形、密封和装配过程的确认(Packaging for terminally sterilized medical devices—Part 2:Validation requirements for forming, sealing and assembly processes)

ISO 11737-1 医疗器材的灭菌 微生物学方法 第1部分:产品上微生物总数的估计 (Sterilization of medical devices—Microbiological methods—Part 1; Determination of a population of microorganisms on products)

ISO 13485 医疗器材 质量管理体系 用于法规的要求 (Medical devices—Quality management systems—Requirements for regulatory purposes)

ISO 15223 医疗器材 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号 (Medical devices—Symbols to be used with medical device labels, labelling and information to be supplied)

ISO 17665-1 医疗保健产品灭菌 湿热 第1部分:医疗器械灭菌过程的开发、确认和常规控制要求 (Sterilization of health care products—Moist heat—Part 1; Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices)

ISO 18472 医疗保健产品灭菌 生物与化学指示物 测试设备 (Sterilization of health care products—Biological and chemical indicators—Test equipment)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物指示物 biological indicator

对规定的灭菌过程有特定的抗力,含有活微生物的测试系统。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.3]

3.2

载体 carrier

可涂覆试验微生物的支持材料。

3.3

菌落形成单位 colony forming unit

CFU

由单个或多个细胞生长构成的肉眼可见的活的微生物群落。

3.4

菌种保藏编号 culture collection number

由科学界公认的菌种保藏机构提供的试验微生物的唯一编号。

3.5

培养条件 culture conditions

促进微生物复苏、生长和(或)繁殖所采用的生长培养基和接种方式的组合。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.10]

注:接种方式包括接种温度、接种时间和其他特定接种条件。

3.6

D 值 D value

D_{10} 值 D_{10} value

在规定的条件下,灭活试验微生物总数的 90%所需的时间或剂量。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.11]

3.7

F_{BIO} 值 F_{BIO} value

反映了生物指示物的抗力,其根据 D 值与微生物的对数减少量的乘积计算得到。

3.8

灭活 inactivation

微生物生长和(或)繁殖能力的丧失。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.21]

3.9

灭活曲线 inactivation curve

在设定的条件下,试验微生物的灭活与对灭菌介质暴露增强的关系曲线图。

3.10

染菌载体 inoculated carrier

已染上规定数量试验微生物的载体。

注:见附录 F。

3.11

标定的微生物总数 nominal population

制造商标定的活的微生物数量。

注:一般以 lg 的函数来表达(如,10⁶)。

3.12

包装系统 package system

无菌屏障系统和保护性包装的组合。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.28]

3.13

初级包装 primary package

包装系统的一部分,用于维持产品的完整性。

注:保护染菌载体免受损坏和污染,而不阻碍灭菌因子穿透的系统。

3.14

过程挑战装置 process challenge device; PCD

对某一灭菌过程构成特定抗力的装置,用于评价该灭菌过程的性能。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.33]

3.15

抗力仪 resistometer

为测量灭菌过程中产生的物理和/或化学参数相关组合而设计的测量设备。

3.16

次级包装 secondary package

装有已包装的生物指示物,供运输和贮存的包装系统。

3.17

自含式生物指示物 self-contained biological indicator

初级包装中含有试验微生物恢复生长所需培养基的生物指示物。

3.18

存活-杀灭区间 survival-kill window

在规定的条件下灭菌处理时,生物指示物从全部存活微生物(存活时间)过渡到全部杀灭微生物(杀灭时间)的暴露程度。

3.19

菌悬液 suspension

包含活的试验微生物的液体。

注:装在密封好的安瓿内的菌悬液可以作为一种生物指示物使用,菌悬液也可以是染菌载体或者生物指示物的中间体。

3.20

活菌量 viable count

实际可回收的菌落形成单位或其他合适单位的数量。

注：见附录 A。

3.21

z 值 z value

使 *D* 值变化一个数量级所需温度的数值。

注：见 ISO 11138-3 和 ISO 11138-4。

4 生产通用要求

4.1 生产控制

4.1.1 质量体系

制造商应按照本部分建立、记录和持续运行一套完整的质量体系(例如 ISO 13485、GMPS 或国家其他要求)用以覆盖所有的操作要求。特别是制造商要在生产的各个阶段采取有效措施来降低对生物指示物产生的不良影响。

4.1.2 可追溯性

4.1.2.1 制造的组成成分的可追溯内容应保存。

4.1.2.2 制造的组成成分应包括掺入或直接接触试验菌悬液、染菌载体或其初级包装的所有材料和组成成分。

4.1.3 最终产品要求

最终产品应符合本部分的要求：

- a) 生产(第 5 章)；
- b) 标签(4.3)；
- c) 抗力特性(6.4)；
- d) 储存和运输(4.4)。

注：生物指示物的使用方法参见 ISO 14161。

4.1.4 人员

本部分规定的步骤和方法应由经过专业培训和经验丰富的实验室人员来实施(见 4.1.1)。

4.2 试验微生物

4.2.1 菌株

4.2.1.1 试验微生物应为被确定的菌株,来源于公认的菌种保藏机构,并能通过正确的检测方法进行确认。

4.2.1.2 试验微生物应为符合以下条件的菌株：

- a) 试验微生物需用合适的方法来处理,不需要特殊保藏方法,不需要特殊的操作条件,不需要特殊的运输和邮递要求(例如世界卫生组织风险评估小组一组要求)；
- b) 在规定的保质期内运输和储存,可以有效保持其菌株的抗力。

注：一般来说,生物指示物使用的试验微生物来自细菌芽孢。

4.2.1.3 除细菌芽孢外,试验微生物也可以是被证明对灭菌过程有合适抗力的微生物。

4.2.2 菌悬液的初始接种物

4.2.2.1 每批试验微生物悬液的最初接种物应符合以下要求:

- a) 可追溯到公认的菌种保藏机构的标准菌株;
- b) 验证其种类和纯度。

4.2.2.2 指定保存试验微生物菌种的方法应当能保证培养物不受污染,且引起其固有的性质发生变化的不利影响减少到最小。

4.2.2.3 制造商应记录和验证每株试验菌的详细确认检验。

4.2.3 试验微生物数量

4.2.3.1 对试验微生物悬液的活菌计数按照附录 A 的规定进行。

4.2.3.2 用户需要试验微生物生长指数情况时,应将有效试验微生物数表达为占显微镜检测所得细菌总数的百分比。

4.3 制造商提供的信息(标签)

4.3.1 每批菌悬液、染菌载体和生物指示物的标签上应有以下说明:

- 可追溯生产过程的唯一性编号;
- 试验微生物的名称;
- 适合菌悬液、染菌载体和生物指示物的灭菌工艺;
- 按照 ISO 8601 规定的方式标明失效期,例如,××××年××月××日;
- 制造商的名称、商标、地址或其他识别方法;

在适当的地方使用国际公认的符号(见 4.1.3 和 ISO 15223)。

4.3.2 每批产品的外包装应该包括表 1 中给出的信息。

4.3.3 标签使用的符号可参照 ISO 15223 的规定。

表 1 制造商提供的信息

信息要求	菌悬液	染菌载体	生物指示物
提供试验微生物的菌种名称或缩写和该菌种的编号	必需	必需	必需
菌悬液的标称容积(mL)	必需	—	—
产品适用过程、抗力以及影响抗力的操作过程和载体 ^a	必需	必需	必需
详细的储藏条件	必需	必需	必需
处置方法	必需	必需	必需
使用指南,尤其是有关灭菌处理后用于恢复试验活菌的培养基和培养条件的数据	必需	必需	必需
每毫升试验微生物的数量(菌悬液)或每单位菌含量(染菌载体或生物指示物)	必需	必需	必需
次级包装中产品的数量	—	必需	必需
参考本部分	必需	必需	必需
^a 根据要求对制造商提供的抗力以及数量进行检测的方法。			

4.4 储存和运输

4.4.1 应遵照试验微生物悬液的存储和运输条件,确保试验微生物悬液符合本部分和 GB 18281 的其他部分的要求。

4.4.2 对染菌载体的包装方式应不影响其标明的数量和每个染菌载体的性能。

4.4.3 应遵照染菌载体的存储和运输条件,确保染菌载体符合本部分和 GB 18281 的其他部分的要求。

4.4.4 单独包装的生物指示物应放入次级包装中才能进行运输和储存。用于运输和储存的包装应确保生物指示物符合本部分和 GB 18281 的其他部分的要求。

5 生产具体要求

5.1 菌悬液

5.1.1 合适的培养基和培养条件应能保证稳定地生产出符合本部分和 GB 18281 的其他部分性能要求的试验菌悬液。

5.1.2 菌悬液培养基应不影响试验微生物的稳定性,同时要与染菌载体和生物指示物制造工艺和材料相兼容。

5.1.3 收集及随后的处理方法应保证载体染菌时使用的菌悬液不含有对染菌载体或生物指示物的效能可能产生不良影响的培养基残留物。

5.2 载体、初级和次级包装

5.2.1 载体、内层和次级包装的材料应不得含有任何对生物指示物的性能产生不良影响的污染物(物理的、化学的或微生物的)。

5.2.2 载体、内层和次级包装以及特殊的储藏条件的标识应符合本部分要求,保证生物指示物在有效期内性能良好。制造商应向购买者提供每种载体尺寸的最大值和最小值。

5.2.3 在灭菌过程中或灭菌后,载体和初级包装应不得残留或释放任何物质到培养基,否则会抑制少量存活菌在培养条件下的生长。应按附录 B 进行试验,检查是否符合这一要求。

5.2.4 载体、初级和次级包装使用前应耐受预期的运输和处理,保证无破损。

5.2.5 用于载体和初级包装的原材料应能经受暴露于灭菌过程,以保证染菌载体和生物指示物性能在预期用途下稳定。应通过观察灭菌过程中载体和初级包装暴露于极限变化范围及其物理和化学变化的程度来检验是否符合标准。

注:相关的灭菌条件见 GB 18281 的其他相关部分。

5.2.6 生物指示物的制造商应研究灭菌条件,并对生物指示物灭菌条件的适用性进行测试。

5.3 染菌载体

5.3.1 制造染菌载体的材料应能经受暴露于灭菌过程中不会变形、熔化、腐蚀或其他损坏,从而影响染菌载体的使用。

5.3.2 除非制造商已经证明多个菌种的使用不会严重影响在特殊灭菌过程中试验微生物的性能,否则只能采用同一株试验微生物,制备一批染菌载体。

5.3.3 接种前,需要依据 ISO 17665-1、ISO 11135、ISO 11137 的相关灭菌方法,对载体进行灭菌。如果灭菌不可行,接种前应依据 ISO 11737-1 建立可接受的生物负载量限度要求(见附录 B)。

5.3.4 载体的接种应保持一致的微生物数量。

5.4 生物指示物

5.4.1 应把单个载体分别装入初级包装内作为生物指示物。

5.4.2 预期适用的初级包装应被确认(见附录 B)。

5.4.3 包装应符合国际标准或国家标准(见 ISO 11607-1 和 ISO 11607-2)。

5.5 自含式生物指示物

自含式生物指示物的性能应经过验证,其中包括经过灭菌过程后试验微生物在培养基中的恢复能力。

6 抗力测定

6.1 抗力的通用要求

6.1.1 每批次/批量生物指示物的抗力应经过试验,以证明符合本部分及 GB 18281 的其他部分的性能要求。

6.1.2 灭菌过程中生物指示物的抗力性能在 GB 18281 的其他部分中没有规定时,应该按照已经描述灭菌过程的试验条款确定。

6.1.3 某些灭菌过程中使用不符合 GB 18281 要求的生物指示物的最小菌量和抗力,需确定和明示,并被公认。能够提供以下信息的生物指示物是可以被接受的:

- a) 符合 GB 18281 所有其他要求(包括菌量和抗力的检测方法);
- b) 产品信息中,包括对活菌数和抗力的详细说明;
- c) 当菌量和/或抗力(若适用)低于 GB 18281 的相关部分的规定值时,产品标签要有明确警示。

6.1.4 抗力试验应包括活菌计数和抗力特性的测定(见 6.3 和 6.4)。

6.1.5 生物指示物的抗力可用 F_{BIO} 值表示。

6.2 试验微生物

应规定试验微生物。

6.3 试验微生物的数量

应确定活菌数量(见附录 A)。

在有效期内,制造商或第三方机构利用制造商给出的方法检测出活菌的数量,应介于制造商标定值的 50%~300%之间。

6.4 抗力特性

6.4.1 抗力特性的确定应使用至少以下两种方法的组合:

- a) 通过建立存活曲线测定 D 值(见附录 C);
- b) 通过部分阴性分析法测定 D 值(见附录 D);
- c) 验证存活-杀灭反应特性(见附录 E)。

6.4.2 由这些方法获得的数值应在 GB 18281 的其他部分规定的范围之内。在生物指示物标签上至少标有两个上述数据。

6.4.3 在有效期内,利用制造商给出的检测方法,检测标定的 D 值,范围应在±20%之内。

理想状态下,存活菌曲线在整个灭活区间呈线性关系。实际上有些误差,但是线性应保持在可接受

范围之内。通过计数法建立的存活菌的抗力曲线大于 5×10^1 ，而通过部分阴性分析法基于存活试验微生物统计分析建立的曲线则低于 5×10^1 。通过两种方法获得的 D 值有良好的相关性，与线形存活曲线无严重偏差。

GB 18281 的其他部分可增加其他的要求[例如用于湿热灭菌(ISO 11138-3)或者干热灭菌(ISO 11138-4)的生物指示物的 z 值]。

本部分和 GB 18281 的其他部分规定的抗力特性规定了测试条件的细节。

6.4.4 用所得的全部存活菌数的常用对数值的一半对时间作图，所得的曲线的线性相关系数应不小于 0.8。

6.5 试验条件

抗力特性的测定应在指定的试验条件下进行，见表 2。

表 2 试验所需要的最少样本

GB 18281.1 的测试方法	检测样品的最少量	最少暴露次数	检测样品的最小总量
测试活菌的初始数量 ^a	4	—	4
附录 C 存活曲线方法	4	5	20
附录 D 部分阴性分析法	20	5 ^b	100 ^b
附录 E 存活-杀灭区间	50	2	100
最小总数应取决于方法组合的选择			124 或 204
注：对于特殊灭菌过程的一般性检测方法在 GB 18281 的其余部分有所解释。			
^a 未经过灭菌的染菌载体和生物指示物的活菌数。			
^b 随后的 t_0 (见表 D.1) 在暴露条件下额外的检测不用于计算，但却是作为评判结果有效与否的条件。			

7 培养条件

7.1 培养箱

7.1.1 培养箱应能设置、监测与确认具体的培养条件。

7.1.2 除了对常规的温度进行监测以外，培养箱温度分布也要被验证。

7.2 生长培养基

7.2.1 生长培养基应当被规定和证明，可以支持不少于 100 个试验微生物接种体的生长。

7.2.2 标签上应包括暴露于灭菌过程后培养条件的信息。

7.2.3 生长培养基应当被确认以确保它可以去除任何可能影响测试菌活性的灭菌因子残留。

7.3 培养

7.3.1 应确认培养温度和时间。

7.3.2 制造商应提供培养指南(见表 1)。对于一个公认的灭菌过程例如湿热灭菌和环氧乙烷灭菌，利用合适性能测试菌，分别为嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草芽孢杆菌，其培养时间通常为 7 d。对于一个新的灭菌方法，7 d 的培养时间是不充裕的，基于验证，至少 14 d 才能用来作为一个参考培养周期。

附录 A
(规范性附录)
试验活菌数测定

A.1 概述

A.1.1 通过菌落形成单位检测方法统计染菌载体或已包装的生物指示物上的试验活菌。这种方法常用于预期回收菌量在 5×10^1 CFU 以上的情况。

A.1.2 应按照 A.2~A.4 规定的方法检查相关产品恢复的试验菌。这种方法适用于处理和未处理的样品,同时也可以用于初始活菌数(未处理的样品)的检测以及利用存活曲线(处理过的样品)检测 D 值。

A.1.3 可以使用已证明的与平板计数法等效的其他方法。

A.2 试验样品的最小检测数量

每批量/批次或每次暴露至少使用 4 个测试样品。

A.3 样品的准备和培养方法

A.3.1 应把检测样品放入一定体积的培养液中。通过已确认的程序(例如用玻璃珠振荡、研磨和/或用混匀器和/或混合器混匀、漩涡振荡、超声波或其他合适的方法)将试验微生物从试验样品上洗脱下来(见 ISO 11737-1)。

A.3.2 若需要,应通过稀释的方法,用合适的无菌稀释液调整微生物在菌悬液中的浓度。在任何情况下,利用上述方法,使菌落形成单位的数量控制在特定范围之内。

将培养物与融化的固体琼脂培养基混合或涂布在有固体培养基的平板上,菌落数控制在 30 CFU~300 CFU 之间最为精确。

A.3.3 应利用合适的检测方法统计活菌数。

方法包括膜过滤法、半固体培养基涂布法,以及固体培养基混合法(见 ISO 11737-1)。

A.3.4 生物指示物制造商应确认或提供合适的试验微生物恢复培养基,和/或准备培养基的全部资料和说明。

A.4 培养和计数

A.4.1 平板样本或滤膜应在制造商规定的温度和时间下培养。

通常,嗜热菌的培养温度在 $55\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,时间不少于 48 h;常温菌的培养温度在 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下,时间不少于 48 h。

注:在较高的培养温度下,培养基的干燥性会显著影响生长。

A.4.2 经过适当的时间培养后,应对平板或滤膜上的菌落数进行计数,再计算出每个合适单位上恢复试验微生物的平均数。

附 录 B
(规范性附录)

用经过灭菌处理的载体和初级包装材料测定细菌的生长抑制

B.1 概述

本方法通过确定载体和初级包装材料对灭菌后试验微生物生长可能的抑制效果来测定其在确定灭菌过程中的适用性。这些材料物理性能的适用性应经过测定。检测方法在 GB 18281 的其他部分已给出。抗力仪的相关要求见 ISO 18472。

B.2 材料

B.2.1 试验菌悬液与染菌载体使用的细菌同株,而且制备方法相同。悬液内细菌总数应可知,可经活菌计数确定,分成含有少于 100 CFU 活菌的试样。

B.2.2 培养箱应能设定特定培养条件的温度,并能监测确认。

B.2.3 培养基应符合培养条件规定。

B.2.4 检测样品应为根据 B.3 要求准备的未染菌载体和初级包装材料。

B.3 方法

B.3.1 准备 9 管培养基,均放置在培养条件规定的培养温度下,装入与通常菌悬液、染菌载体和生物指示物相同体积的生长培养基。

B.3.2 取具有代表性的 12 个未染菌载体,分成 6 组,每组 2 个。应用制造生物指示物的材料进行包装。

B.3.3 取 B.3.2 中的 3 组样品,每组包含 2 个载体,并将其暴露在灭菌过程中。

B.3.4 按照本部分以及 GB 18281 的其他相关部分要求的数值确定抗力检测仪的操作条件。

B.3.5 灭菌终止时,除去载体的包装,在无菌条件下未经中间处理直接转移到培养基中,在 3 管预温至培养温度的培养基中分别加入一组 2 个载体(见 B.3.1)。记录完成转移的时间。

B.3.6 将包含载体样本的生长培养基在规定的温度下培养 $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$ 以便载体上的抑制物解除吸附。将此培养基取出培养箱,每管接种不多于 100 个活菌的试验微生物悬液,再把此接种细菌的培养基放回培养箱。在正常使用条件下,按确定的恢复生物指示物的时间进行培养。

B.3.7 将未经暴露过程,包含 2 个载体的剩余 3 组转移到 3 管培养基中作为对照,培养 $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$,再每管接种不少于 100 个试验微生物,在确定时间内按照 B.3.6 相同的方法培养。

B.3.8 如果发现有菌载体的使用会影响检测结果,应进行微生物的鉴定。

B.3.9 生长培养基对照,将 3 管无载体生长培养基培养 $2\text{ h} \pm 10\text{ min}$,再每管接种不少于 100 个试验微生物,在确定时间内按照 B.3.6 相同的方法培养。

B.3.10 在确定的培养周期结束时,从培养箱中取出全部 9 管培养基,再按制造商确定的常规条件使用方法进行活菌检查。

B.3.11 以试验微生物“有菌生长”或“无菌生长”报告结果。

B.4 结果分析

B.4.1 如果在阳性对照中出现一个或多个“无菌生长”，则本次试验无效。

注：阳性对照无菌生长可能是由于接种试验菌总数失控或恢复条件不合适（如生长培养基、培养时间、培养温度等）。

B.4.2 如在载体对照中出现一个或多个“无菌生长”，则表明载体不适合生产染菌载体或者生物指示物。

注：在载体对照中“无菌生长”而在生长培养基中有生长，则表明载体材料对试验微生物的生长有抑制。

B.4.3 若被灭菌过的载体在三次试验中出现一个或者多个“无菌生长”，则表明载体材料不适合生产染菌载体或者生物指示物。

注：无菌生长可能是由于处理过程中载体材料上吸附高浓度的灭菌剂或发生降解引起的。

B.5 初级包装材料生长抑制性的确定

B.5.1 初级包装材料应按照类似载体的方法进行试验（用初级包装材料作为检测样品，按照本部分给出的步骤检测）。

B.5.2 试验中被测试的初级包装材料与培养基接触的部分，应是正常染菌载体面积的两倍。对自含式生物指示物，则等于正常接触恢复培养基面积。检测样品应该浸没在生长培养基中。

附 录 C
(规范性附录)
存活曲线方法测量 D 值

C.1 概述

本方法是通过直接计数菌落数(CFU)检测存活试验微生物的数量。利用活菌计数法检测存活被测微生物的数量。这个方法也称为直接计数法,见附录 A。

注:这种方法可行的最低限约为 5×10^1 CFU。

C.2 材料

C.2.1 测试样品如芽孢悬液、染菌载体或已包装的生物指示物,应包含在材料当中。

注:检测方法在 GB 18281 的其他部分给出。抗力仪的其他规定由 ISO 18472 给出。

C.2.2 培养箱应能设定特定培养条件的温度,并能监测确认。

C.2.3 符合培养条件的生长培养基应包含在材料当中。

C.3 步骤

C.3.1 测试样本应暴露于规定的暴露条件。暴露范围应规定,见表 2。

C.3.2 应至少有 5 次暴露,而且应包括以下几方面:

a) 有一次暴露中样本未经灭菌因子处理(例如 0 暴露时间);

注:灭菌因子可不存在或由惰性气体或介质替代。

b) 至少有一次暴露使活菌数降低到最初接种量的 0.01%(减少 4lg);

c) 至少有三次暴露介于 a) 和 b) 情况之间。

C.3.3 每次测定中每次暴露所用的试验样本应不少于 4 个,每次暴露应采用相同数量的试验样本。

C.3.4 如果灭菌因子在试验样本上或内部有残留,要尽快去除以免影响测试结果。如果需要去除程序,应被验证。

C.3.5 每次暴露 2 h 内,应对测试样本进行处理,让试验微生物从载体上脱落。在常用条件下恢复,采用制造商规定的培养条件和方法进行活菌计数(见附录 A)。

C.3.6 应用合适的无菌稀释液调整菌悬液浓度。将培养物与融化的固体琼脂培养基混合或涂布在有固体培养基的平板上,菌落数在 30 CFU~300 CFU 之间视为有效。

C.3.7 用所得的全部存活菌数的常用对数值,对时间(min)或剂量作图,用最小二乘法进行回归分析,确定最佳线性曲线。回归分析时不应包括原先细菌数 0.5lg 范围内的存活数据点。计算所得直线斜率的负倒数,即等于以时间(min)或剂量表示的指定暴露条件下的 D 值。

a) 利用以下公式确定最佳线性拟合曲线的斜率:

$$m = \frac{nG - AB}{nC - A^2}$$

式中:

m ——最佳线性拟合曲线的斜率;

n ——数据点的个数;

- G — $\sum(t \lg y)$;
- A — $\sum t$;
- B — $\sum \lg y$;
- C — $\sum t^2$ 。

计算所需要的数据在表 C.1 给出。

表 C.1 回归分析需要的样本数据

回收菌量*(y)	暴露间隔(t) min	lgy	t ²	t lgy	(lgy) ²
y ₁	t ₁ =0.0	lgy ₁	t ₁ ² =0	t ₁ lgy ₁ =0	(lgy ₁) ²
y ₂	t ₂	lgy ₂	t ₂ ²	t ₂ lgy ₂	(lgy ₂) ²
y ₃	t ₃	lgy ₃	t ₃ ²	t ₃ lgy ₃	(lgy ₃) ²
y ₄	t ₄	lgy ₄	t ₄ ²	t ₄ lgy ₄	(lgy ₄) ²
y ₅	t ₅	lgy ₅	t ₅ ²	t ₅ lgy ₅	(lgy ₅) ²
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \lg y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} t_i^2$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i \lg y_i)$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\lg y_i)^2$
分配变量	A	B	C	G	E

^a 按照 C.3.7, 回归分析时不应包括 0.5lgy₁ 范围内的数据点。

b) 最佳线性曲线斜率的示例见表 C.2 和以下计算过程:

$$\begin{aligned}
 m &= \frac{nG - AB}{nC - A^2} \\
 &= \frac{5 \times 66.641\ 4 - 20 \times 21.930\ 0}{5 \times 120 - 20^2} \\
 &= \frac{333.207\ 0 - 438.600\ 0}{600 - 400} \\
 &= \frac{-105.393\ 0}{200} \\
 &= -0.527\ 0
 \end{aligned}$$

表 C.2 斜率的计算示例

回收菌量*(y)	暴露间隔(t) min	lgy	t ²	t lgy	(lgy) ²
y ₁ =2.5×10	t ₁ =0.0	lgy ₁ =6.397 9	t ₁ ² =0	t ₁ lgy ₁ =0	(lgy ₁) ² =40.933 1
y ₂ =3.4×10 ⁵	t ₂ =2.0	lgy ₂ =5.531 5	t ₂ ² =4	t ₂ lgy ₂ =11.063 0	(lgy ₂) ² =30.597 5
y ₃ =3.1×10 ⁴	t ₃ =4.0	lgy ₃ =4.491 4	t ₃ ² =16	t ₃ lgy ₃ =17.965 6	(lgy ₃) ² =20.172 7
y ₄ =1.7×10 ³	t ₄ =6.0	lgy ₄ =3.230 4	t ₄ ² =36	t ₄ lgy ₄ =19.382 4	(lgy ₄) ² =10.435 5
y ₅ =1.9×10 ²	t ₅ =8.0	lgy ₅ =2.278 8	t ₅ ² =64	t ₅ lgy ₅ =18.230 4	(lgy ₅) ² =5.192 9
	$A = \sum_{i=1}^{i=5} t_i$	$B = \sum_{i=1}^{i=5} \lg y_i$	$C = \sum_{i=1}^{i=5} t_i^2$	$G = \sum_{i=1}^{i=5} (t_i \lg y_i)$	$E = \sum_{i=1}^{i=5} (\lg y_i)^2$
分配变量	A=20	B=21.930 0	C=120	G=66.641 4	E=107.331 7

^a 按照 C.3.7, 回归分析时不应包括 0.5lgy₁ 范围内的数据点。

c) D 值相当于所得的斜率的负倒数,用下面公式计算:

$$D = -\left(\frac{1}{m}\right)$$

利用上面计算出来的斜率,结果 D 值为:

$$D = -\left(\frac{1}{-0.5270}\right) = 1.8975 \text{ min (精确到小数点后一位, } D = 1.9 \text{ min)}$$

C.3.8 所得线性存活菌曲线的线性相关系数应不小于 0.8。

a) 存活菌曲线的线性相关系数用以下公式计算:

$$r^2 = \frac{[g - A(B/n)]^2}{(C - A^2/n)(E - B^2/n)}$$

其中 C.3.7a) 给出了所有变量的定义, $E = \sum (\lg y)^2$ 。

b) 存活曲线的线性相关系数的计算示例:

利用表 C.2 的数:

$$\begin{aligned} r^2 &= \frac{[66.6414 - 20 \times (21.9300/5)]^2}{(120 - 20^2/5)(107.3317 - 21.9300^2/5)} \\ &= \frac{(66.6414 - 87.7200)^2}{(120 - 80)(107.3317 - 96.1850)} \\ &= \frac{(-21.0786)^2}{40 \times 11.1467} \\ &= \frac{444.3074}{445.8680} \\ &= 0.9965 \end{aligned}$$

附 录 D
(规范性附录)
部分阴性分析法测定 D 值

D.1 总则

D.1.1 本方法是通过直接观察液体培养基的生长情况确定的可回收微生物的数量,来间接确定存活试验微生物的数量。部分阴性分析法是一种部分测试样没有表现出生长情况(部分阴性范围),并且这种计算是建立于获得的数据的结果之上的方法。“全部杀灭分析法”也是一种部分阴性分析法,它是所有的测试样本没有表现出生长,并且计算建立于获得符合该要求的结果之上。这种方法适用于当测量的单位面积上的可回收试验微生物的数量少于 5×100 CFU 的情况。

D.1.2 Holcomb-spearman-karbe 法(见 D.3.1)与有限 Holcomb-spearman-karbe 法(见 D.3.2)要求覆盖整个部分阴性区域的连续暴露过程。

注:尤其在存活-杀灭区间一致的情况下,也可使用其他方法。一种类似方法如通过 Stumbo-Murphy-Cochran 方法得到的方法。

D.1.3 试样应暴露在除时间外的满足所有过程变量要求确定的暴露条件下,并保持在规定区间内(稳定状态)。如果认为过程变量范围小,可以接受,则时间用“*t*”表示。如果认为过程变量控制范围大,不属于恒定量,则应采用积分法计算等效时间“*U*”。这两个术语均可在文献中查到。

每次暴露过程中的暴露试样数量 *n*、相邻两次暴露过程之间的间隔时间 *d* 均会影响试验可靠性。

D.2 材料

D.2.1 测试样本应能代表芽孢悬液、染菌载体或者包装的生物指示物。

D.2.2 使用相关的抗力仪。

注:检测方法在 GB 18281 的相关部分给出。抗力仪的要求在抗力仪的标准中给出(ISO 18472)。

D.2.3 培养箱应能够提供特定的培养条件中规定的温度,并且能监测和验证。

D.2.4 生长培养基应能满足培养条件的规定。

D.3 方法**D.3.1 Holcomb-spearman-karbe 法(HSKP)****D.3.1.1 简介**

D.3.1.1.1 应将试样分级暴露在除时间外,符合所有过程变量规定的确定暴露条件下,并保持稳定状态。试验样本总数量不应少于 100 CFU。每次暴露过程中最少使用 20 个重复。

D.3.1.1.2 至少应使用 5 个暴露条件,至少包括 1 组所有试样出现有菌生长的试样、2 组部分试样出现有菌生长的试样、2 组经过连续暴露后没有观察到出现有菌生长的试样。

D.3.1.1.3 当灭菌因子在样品里面或上面有残留时,残留应该尽快被去除,以免影响测试结果。如果样本需要去除过程,此过程应经过验证。

D.3.1.1.4 试样经过暴露后应按照制造商指定的方法培养。

D.3.1.1.5 每个染菌载体在无菌条件下转移至装有适当的液体培养基的试管中去。每个试管内的液体

培养基应该一致。如果液体培养基已经由制造商提供在生物指示物里,应按照制造商规定的方法进行。生物指示物制造商应确定或者能提供制备一份生物指示物所需的合适回收培养基和/或完整的数据(见 4.3)。

D.3.1.1.6 应按照制造商指定的方法为试样接种。经过制造商建议的培养期后,或经确认的培养时间,应检查培养基(见 7.3)。根据试验微生物的特点,液体培养基的浑浊度、培养基表面的生长情况或试管底部沉淀物将表明试验微生物的生长情况。如果生长培养基属于生物指示物的一部分,如自含式生物指示物,则应按照制造商提供的使用说明判断试验微生物是否出现生长情况。

D.3.1.1.7 通过观察 pH 值颜色变化,从而显示自含式生物指示物中试验微生物的生长情况。

D.3.1.1.8 结果应记录为在每次亚致死暴露过程中带有非回收试验微生物的染菌载体与染菌载体的总数之比。

D.3.1.2 利用 HSKP 计算

D.3.1.2.1 此计算方法是建立在 5 组暴露试验条件的最小数基础之上,至少应包含以下条件:

- 其中 1 组样品是全部试验菌生长;
- 其中 2 组样品有部分样品生长;
- 其中 2 组样品是全部不生长菌(见表 D.1)。

注: HSKP 类似于有限 HSKP 法(见 D.3.2)。不同之处在于, HSKP 利用通用公式,该公式不受限于在每个暴露条件或在暴露的过程中恒定的时间间隔的相同数量重复。

D.3.1.2.2 *D* 值的平均值用以下公式计算:

$$D = \frac{U_{\text{HSK}}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

式中:

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{k-1} U_i$$

N_0 ——每个生物指示物的活菌平均数,用活菌计数法计算(见附录 A),计算时需要的数据见表 D.1。

表 D.1 HSKP 计算时所需要的样品数据

暴露在灭菌因子下的时间 t	暴露样品数量 n	无菌生长的样品数量 r
$t_1 (U_1)$	n_1	$r_1 (r=0)^a$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5 (U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6 (U_k)$	n_6	$R_6 (r=n_6)$
t_7	n_7	$r_7 (r=n_7)$

注: t_1 为所有测试样均出现生长情况的暴露组中,暴露在灭菌因子下的最长暴露时间; $t_2 - t_5$ 是部分阴性区域的增加时间; t_6 和 t_7 是所有试样均没出现生长情况的连续暴露时间。

^a 如果未出现阴性单元,即,未出现阴性试样($r=0$),且所有单元在暴露时间 t_1 前出现生长情况;同时,在暴露时间 t_6 之后的过程中全部为阴性试样($r=n_7$),即未出现生长情况,则测试有效。

D.3.1.2.3 对于暴露在灭菌因子下的暴露时间 $t_1 - t_6$, 因子 χ 和 γ 按如下公式计算:

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{(i+1)}}{2}$$

$$\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1} - \frac{r_i}{n_i}$$

式中：

r_i ——在暴露时间 t_i 时出现未生长试样的数量；

n_i ——在暴露时间 t_i 下暴露的数量。

在 t_i 时间下，所有试样表现出生长，所以 $\gamma_i = \frac{r_i + 1}{n_i + 1}$ 。

从以上 χ_i 和 γ_i 的计算值中，在每一次暴露时间 t_i 的 U_i 值可以被计算如下：

$$U_i = \chi_i \gamma_i$$

D.3.1.2.4 任何试样的平均无菌时间 U_{HSK} ，可以通过对每一次暴露时间 $t_1 - t_6$ 的 U_i 值的求和来计算：

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{i=6} U_i$$

D.3.1.2.5 当暴露时间间隔 d 是一个常量，在每一个暴露时间下，测试样品数量 n 也是一样的，平均无菌时间的 U_{HSK} 可以用以下公式计算：

$$U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{i=6} r_i$$

D.3.1.2.6 D 的平均值 \bar{D} ，可用下面的公式中计算：

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

注：lg(Euler 常量) = lg(0.577 2) = -0.250 7。

式中：

N_0 ——每个试样的初始活菌数量(见附录 A)。

D.3.1.2.7 按照以下公式计算 \bar{D} ($p=0.05$) 的 95% 置信区间 D_{calc} ：

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

D.3.1.2.8 方差 V 用以下公式计算：

$$V = a \left(\frac{2.3026}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2$$

D.3.1.2.9 用于计算方差的“ a ”可以用以下公式计算：

$$a = 0.25 \sum_{i=2}^{i=6} (t_{i+1} - t_{i-1})^2 \left[r_i \frac{(n_i - r_i)}{n_i^2 (n_i - 1)} \right]$$

D.3.1.3 HSKP 计算方法举例

表 D.2 可变的时间间隔和可变的样本数量的数据示例

灭菌剂暴露时间 t min	暴露试样数量 n	表现未生长试样的数量 r_i
$t_1 = 10$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0$
$t_2 = 18$	$n_2 = 19$	$r_2 = 4$
$t_3 = 28$	$n_3 = 21$	$r_3 = 8$
$t_4 = 40$	$n_4 = 20$	$r_4 = 12$

表 D.2 (续)

灭菌剂暴露时间 t min	暴露试样数量 n	表现未生长试样的数量 r_i
$t_5 = 50$	$n_5 = 20$	$r_5 = 16$
$t_6 = 60$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20$
$t_7 = 70$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20$

D.3.1.3.1 χ_i 和 γ_i 的计算(每次暴露):

$$\chi_i = \frac{t_i + t_{i+1}}{2}$$

$$\chi_1 = \frac{t_1 + t_{1+1}}{2}$$

$$\chi_1 = \frac{10 + 18}{2} = 14$$

$$\chi_2 = \frac{18 + 28}{2} = 23$$

$$\chi_3 = \frac{28 + 40}{2} = 34$$

$$\chi_4 = \frac{40 + 50}{2} = 45$$

$$\chi_5 = \frac{50 + 60}{2} = 55$$

$$\chi_6 = \frac{60 + 70}{2} = 65$$

$$\gamma_i = \frac{r_{i+1}}{n_{i+1}} - \frac{r_i}{n_i}$$

$$\gamma_1 = \frac{r_{1+1}}{n_{1+1}} - \frac{r_1}{n_1}$$

$$\gamma_1 = \frac{4}{19} - \frac{0}{20} = 0.21$$

$$\gamma_2 = \frac{8}{21} - \frac{4}{19} = 0.17$$

$$\gamma_3 = \frac{12}{20} - \frac{8}{21} = 0.22$$

$$\gamma_4 = \frac{16}{20} - \frac{12}{20} = 0.2$$

$$\gamma_5 = \frac{20}{20} - \frac{16}{20} = 0.2$$

$$\gamma_6 = \frac{20}{20} - \frac{20}{20} = 0$$

注: 为了 γ_i 和 γ_6 的计算, 两者的 $\gamma_6 = 0.2$, 这是因为在这个例子中表现出未生长的试样的数量以恒定比率增长。

D.3.1.3.2 计算每个暴露时间 t_i 的 U_i :

$$U_i = \chi_i \gamma_i$$

$$U_1 = \chi_1 \gamma_1 = 14 \times 0.21 = 2.94$$

$$U_2 = 23 \times 0.17 = 3.91$$

$$U_3 = 34 \times 0.22 = 7.48$$

$$U_4 = 45 \times 0.2 = 9.0$$

$$U_5 = 55 \times 0.2 = 11.0$$

$$U_6 = 65 \times 0 = 0$$

D.3.1.3.3 用以下公式计算平均无菌时间 U_{HSK} :

$$U_{\text{HSK}} = \sum_{i=1}^{i=6} \mu_i$$

$$U_{\text{HSK}} = \mu_1 + \mu_2 + \mu_3 + \mu_4 + \mu_5 + \mu_6$$

$$U_{\text{HSK}} = 2.94 + 3.91 + 7.48 + 9.0 + 11.0 + 0 = 34.33$$

D.3.1.3.4 用以下公式计算 D 的平均值 \bar{D} :

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

式中:

N_0 —— 初始菌量 1×10^5 。

$$\bar{D} = \frac{34.33}{5.000 + 0.2507} = 6.54。$$

D.3.1.3.5 按照以下公式计算 \bar{D} ($p=0.05$) 的 95% 置信区间 D_{calc} :

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

D.3.1.3.6 方差 V 用以下公式计算:

$$V = a \left(\frac{2.3026}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2$$

D.3.1.3.7 每一个时间 t_i 方差公式中的“ a ”和所有结果的求和可以用以下公式计算:

$$a = 0.25 \sum_{i=2}^{i=6} \left\{ (t_{i+1} - t_{i-1})^2 \left[r_i \frac{n_i - r_i}{n_i^2 (n_i - 1)} \right] \right\}$$

$$a = 0.25 \left\{ (t_{1+1} - t_{1-1})^2 \left[r_1 \frac{n_1 - r_1}{n_1^2 (n_1 - 1)} \right] + (t_{2+1} - t_{2-1})^2 \left[r_2 \frac{n_2 - r_2}{n_2^2 (n_2 - 1)} \right] + (t_{3+1} - t_{3-1})^2 \left[r_3 \frac{n_3 - r_3}{n_3^2 (n_3 - 1)} \right] \right\}$$

$$+ (t_{4+1} - t_{4-1})^2 \left[r_4 \frac{n_4 - r_4}{n_4^2 (n_4 - 1)} \right] + (t_{5+1} - t_{5-1})^2 \left[r_5 \frac{n_5 - r_5}{n_5^2 (n_5 - 1)} \right] + (t_{6+1} - t_{6-1})^2 \left[r_6 \frac{n_6 - r_6}{n_6^2 (n_6 - 1)} \right]$$

$$a = 0.25 \times \left[(28 - 10)^2 \times 4 \left(\frac{19 - 4}{361 \times 18} \right) + (40 - 18)^2 \times 8 \left(\frac{21 - 8}{441 \times 20} \right) \right]$$

$$+ (50 - 28)^2 \times 12 \left(\frac{20 - 12}{400 \times 19} \right) + (60 - 40)^2 \times 16 \left(\frac{20 - 16}{400 \times 19} \right)$$

$$+ (70 - 50)^2 \times 20 \left(\frac{20 - 20}{400 \times 19} \right)]$$

$$a = 0.25(2.9917 + 5.7070 + 6.1137 + 3.3684 + 0.0000)$$

$$a = 0.25 \times 18.1808 = 4.5452$$

D.3.1.3.8 “ a ”被计算出后,方差 V 用以下公式计算:

$$V = a \left(\frac{2.3026}{\ln N_0 + 0.5772} \right)^2$$

式中:

$N_0 = 1 \times 10^5$ 。

$$V = 4.5452 \left[\frac{2.3026}{\ln(1 \times 10^5) + 0.5772} \right]^2$$

$$\begin{aligned}
 &= 4.545\ 2 \times \left(\frac{2.302\ 6}{11.513 + 0.577\ 2} \right)^2 \\
 &= 4.545\ 2 \times (0.190\ 45)^2 \\
 &= 4.545\ 2 \times 0.036\ 27 \\
 &= 0.164\ 9
 \end{aligned}$$

D.3.1.3.9 按照以下公式计算 \bar{D} ($p=0.05$) 的 95% 置信区间 D_{calc} :

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2\sqrt{V}$$

D.3.1.3.10 置信下限:

$$\begin{aligned}
 D_{\text{calc}} &= \bar{D} - 2\sqrt{V} \\
 &= 6.54 - 2\sqrt{0.164\ 9} \\
 &= 6.54 - (2 \times 0.406\ 1) = 5.73
 \end{aligned}$$

D.3.1.3.11 置信上限:

$$\begin{aligned}
 D_{\text{calc}} &= \bar{D} + 2\sqrt{V} \\
 &= 6.54 + 2\sqrt{0.164\ 9} \\
 &= 6.54 + (2 \times 0.406\ 1) = 7.35
 \end{aligned}$$

D.3.2 LHSKP

D.3.2.1 用 LHSKP 计算

D.3.2.1.1 LHSKP 计算方法是建立在至少 5 组暴露试验条件下的基础之上,至少包含以下条件:

- 其中 1 组样品应是全部试验菌生长;
- 其中 2 组样品应有部分样品生长;
- 其中 2 组样品应是全部不生长菌(见表 D.3)。

表 D.3 相同时间间隔和相同样品数量的 LHSKP 计算所需的数据示例

灭菌因子下的暴露时间 t min	暴露试样数量 n	表现无菌生长的试样数量 r_i
$t_1 (U_1)$	n_1	$r_1 (r=0)$
t_2	n_2	r_2
t_3	n_3	r_3
t_4	n_4	r_4
$t_5 (U_{k-1})$	n_5	r_5
$t_6 (U_k)$	n_6	$r_6 (r=n)$
t_7	n_7	$r_7 (r=n)^a$

^a 如果未出现阴性单元,即,未出现阴性试样($r=0$),且所有单元在暴露时间 t_1 前出现生长情况;同时,在暴露时间 t_6 之后的过程中全部为阴性试样($r=n_7$),即未出现生长情况,则测试有效。

D.3.2.1.2 LHSK 方法类似于有限 HSKP 法(见 D.3.1)。不同之处在于,LHSK 利用公式计算,该公式要求在每个暴露条件下有相同数量重复和在暴露的过程中恒定的时间间隔。

D.3.2.1.3 无菌生长平均时间 U_{HSK} 用以下公式计算:

$$U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

式中：

U_{HSK} —— 无菌生长的平均时间；

U_k —— 所有试样显示无菌生长的第一次暴露；

d —— 暴露条件之间的时间间隔或剂量差别(是一个恒量)；

n —— 每次暴露条件下样品的重复数量(每次暴露的相同样品数量,例如 20)；

N_0 —— 每个指示物的平均活菌数,用活菌计数法(见附录 A)；

$\sum_{i=1}^{k-1} r_i$ —— $U_2 \sim U_{k-1}$ 中包含的所有的阴性数的总和。

D.3.2.1.4 D 的平均值 \bar{D} 可以用以下公式计算：

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

注：当按照上述方法时,LHSK 方法可以计算变量 V 、标准偏差(SD)和 95%置信区间(置信上限和置信下限)。

D.3.2.1.5 变量 V 可用以下公式计算：

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i)$$

D.3.2.1.6 标准偏差(SD)用以下公式计算：

$$SD = \sqrt{V}$$

D.3.2.1.7 \bar{D} ($p=0.05$) 的 95%置信区间 D_{calc} 用以下公式计算：

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD$$

D.3.2.1.8 置信下限：

$$D = \frac{U_{\text{HSK}} - 2SD}{\lg N_0 + 0.2507}$$

D.3.2.1.9 置信上限：

$$D_{\text{calc}} = \frac{U_{\text{HSK}} + 2SD}{\lg N_0 + 0.2507}$$

D.3.2.2 LHSKP 的计算方法示例

D.3.2.2.1 D 值用以下公式计算：

$$\bar{D} = \frac{U_{\text{HSK}}}{\lg N_0 + 0.2507}$$

式中：

$N_0 = 1 \times 10^6$ 。

表 D.4 相同时间间隔和相同数量的样品的数据

暴露时间 t min	暴露菌片的数量 n	不长菌的测试样品数量 r_i
$t_1 = 20(U_1)$	$n_1 = 20$	$r_1 = 0$ ($r=0$)
$t_2 = 22$	$n_2 = 20$	$r_2 = 1$
$t_3 = 24$	$n_3 = 20$	$r_3 = 7$
$t_4 = 26$	$n_4 = 20$	$r_4 = 15$
$t_5 = 28(U_{k-1})$	$n_5 = 20$	$r_5 = 19$
$t_6 = 30(U_k)$	$n_6 = 20$	$r_6 = 20$ ($r=n$) ^a

表 D.4 (续)

暴露时间 t min	暴露菌片的数量 n	不长菌的测试样品数量 r_i
$t_7 = 32$	$n_7 = 20$	$r_7 = 20(r = n)^a$
^a 如果未出现阴性单元,即,未出现阴性试样($r=0$),且所有单元在暴露时间 U_1 前出现生长情况;同时,在暴露时间 U_k 之后的过程中全部为阴性试样($r=n$),即未出现生长情况,则测试有效。		

D.3.2.2.2 无菌保证的平均暴露时间 U_{HSK} 用以下公式计算:

$$U_{\text{HSK}} = U_k - \frac{d}{2} - \frac{d}{n} \sum_{i=1}^{k-1} r_i$$

式中:

$$U_k = 30;$$

$$d = 2;$$

$$n = 20;$$

$$N_0 = 1 \times 10^6;$$

$$U_{\text{HSK}} = 30 - \frac{2}{2} - \frac{2}{20} \times (0 + 0 + 1 + 7 + 15 + 19) = 24.8;$$

$$\bar{D} = \frac{24.8}{6.000 + 0.2507} = 3.97 \text{ min (保留小数后一位, } D = 4.0 \text{ min)}。$$

D.3.2.2.3 变量 V 用以下公式计算:

$$V = \frac{d^2}{n^2(n-1)} \times \sum_{i=1}^{k-1} r_i(n-r_i) = \frac{2^2}{20^2 \times (20-1)} \times (1 \times 19 + 7 \times 13 + 15 \times 5 + 1 \times 19) = 0.1074$$

D.3.2.2.4 标准误差 SD 用以下公式计算:

$$SD = \sqrt{V} = \sqrt{0.1074} = 0.3277$$

D.3.2.2.5 D 值($p=0.05$)的 95% 置信区间 D_{calc} 用以下公式计算:

$$D_{\text{calc}} = \bar{D} \pm 2SD$$

$$\text{置信下限值} = \frac{U_{\text{HSK}} - 2SD}{\lg N_0 + 0.2507} = \frac{24.8 - (2 \times 0.3277)}{6.000 + 0.2507} = \frac{24.144}{6.2507} = 3.86 \text{ min}$$

$$\text{置信上限值} = \frac{U_{\text{HSK}} + 2SD}{\lg N_0 + 0.2507} = \frac{24.8 + (2 \times 0.3277)}{6.000 + 0.2507} = \frac{25.445}{6.2507} = 4.07 \text{ min}$$

D.3.3 SMCP

D.3.3.1 简介

D.3.3.1.1 经过验证等同于 D.3.1 和 D.3.2 的分析方法也可以用于部分阴性数据的分析。

D.3.3.1.2 当反应特性可以预见时,SMCP 作为一种稀释培养计数法可以实际应用。

D.3.3.1.3 SMCP 的计算需要在部分阴性区域内的时间 t ,表现无菌生长的数量 r ,样品的重复数量 n ,在阴性区域内的一个暴露时间和每一个样品上的注释菌量 N_0 。

D.3.3.1.4 为了通过 SMCP 得到正确的数据, D 值应为在部分阴性区域内的至少三个可重复循环的平均值。

D.3.3.1.5 材料的应用与 D.2 相同。

D.3.3.1.6 为了得到 95% 的置信区间,每一个暴露条件下要不少于 50 个重复,同时为了建立相同于

D.3.1 和 D.3.2 的测试标准,需满足 $r/n < 0.9$ 。试样应在同一批/次的存活-杀灭区间内的确定的暴露条件下进行。

D.3.3.2 用 SMCP 计算

D.3.3.2.1 D 值用以下公式计算:

$$D = \frac{t}{\lg A - \lg B}$$

式中:

t ——暴露时间;

$\lg A$ ——每个样品中初始染菌量 N_0 的 \lg 值;

$\lg B$ ——暴露 t 时间之后的含菌量的 \lg 值。

D.3.3.2.2 以下公式可以重新定义部分阴性的数据库:

$$D = \frac{t}{\lg N_0 - \lg \left(\ln \frac{n}{r} \right)}$$

或

$$D = \frac{t}{\lg N_0 - \lg N_{\mu_i}}$$

式中:

$\lg B$ —— $\lg(\ln n/r)$ 或 $\lg[2.303 \lg(n/r)]$;

N_{μ_i} ——被检测样品的数量除以阴性样品的数量的商的自然对数;

N ——每一个暴露时间下的试样的数量;

r ——空白或者无菌生长的试样数量。

D.3.3.2.3 \bar{D} ($p=0.05$) 的 95% 置信区间 D_{calc} 用以下公式计算:

$$D_{\text{calc}} = \frac{t}{\lg N_0 - \lg \left(\ln \frac{1}{a} \right)}$$

式中:

$$a = \frac{r}{n} \pm 1.96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r/n}{n}}$$

D.3.3.2.4 上述公式只有在 $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n} \geq 0.9$ 下可用。

D.3.3.3 SMCP 的计算实例

表 D.5 仅用部分阴性区内一组数据计算 D 值

暴露时间 t min	暴露测试样品的数量 n	不长菌的测试样品数量 r ;
$t=24$	$n=100$	$r=37$

D.3.3.3.1 用下以下公式计算 D 值:

$$D = \frac{t}{\lg N_0 - \lg \left(\ln \frac{n}{r} \right)}$$

式中:

t ——暴露时间;

N_0 ——每个试样中初始活菌数= 1×10^6 ;

$\lg A$ ——每个样品中初始染菌量 N_0 的 \lg 值;

$\lg B$ ——暴露 t 时间之后的含菌量的 \lg 值,或 $\lg(\ln n/r)$ 或 $\lg[2.303 \lg(n/r)]$;

n ——每一个暴露时间下的试样的数量;

r ——空白或者无菌生长的试样数量。

$$\begin{aligned} D &= \frac{24}{6.000 - \lg(\ln 2.702\ 7)} \\ &= \frac{24}{6.000 - \lg(0.994\ 3)} \\ &= \frac{24}{6.000 - (-0.002\ 5)} \\ &= \frac{24}{6.002\ 5} \\ &= 4.00\ \text{min}(\text{保留小数后一位}, D = 4.0\ \text{min}) \end{aligned}$$

D.3.3.3.2 $\bar{D}(p=0.05)$ 的 95% 置信区间 D_{calc} 用以下公式计算。只有当 $n \times \frac{r}{n} \times \frac{n-r}{n} \geq 0.9$ 时,95% 置信区间才可以用以下公式计算:

$$D \text{ 值的置信下限} = \frac{t}{\lg N_0 - \lg(\ln 1/a)}$$

式中:

$$a = \frac{r}{n} + 1.96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6.000 - \lg(\ln 1/a)}$$

式中:

$$\begin{aligned} a &= \frac{37}{100} + 1.96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}} \\ &= 0.37 + 1.96 \sqrt{0.37 \times \frac{0.63}{100}} \\ &= 0.37 + 1.96 \sqrt{0.37 \times 0.006\ 3} \\ &= 0.37 + 1.96 \sqrt{0.002\ 331} \\ &= 0.37 + 1.96 \times 0.048\ 28 \\ &= 0.465 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} D_{\text{calc}} &= \frac{24}{6.000 - \lg\left(\ln \frac{1}{0.465}\right)} \\ &= \frac{24}{6.000 - \lg(0.765\ 7)} \\ &= \frac{24}{6.000 - (-0.115\ 9)} \\ &= \frac{24}{6.000 + 0.115\ 9} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 &= \frac{24}{6.1159} \\
 &= 3.92
 \end{aligned}$$

$$D \text{ 值的置信上限值} = \frac{t}{\lg N_0 - \lg(\ln 1/a)}$$

式中：

$$a = \frac{r}{n} - 1.96 \sqrt{\frac{r}{n} \times \frac{1-r}{n}}$$

$$D_{\text{calc}} = \frac{24}{6.000 - \lg(\ln 1/a)}$$

式中：

$$\begin{aligned}
 a &= \frac{37}{100} - 1.96 \sqrt{\frac{37}{100} \times \frac{1-37/100}{100}} \\
 &= 0.37 - 1.96 \sqrt{0.37 \times \frac{0.63}{100}} \\
 &= 0.37 - 1.96 \sqrt{0.37 \times 0.0063} \\
 &= 0.37 - 1.96 \sqrt{0.002331} \\
 &= 0.37 - 1.96 \times 0.04828 \\
 &= 0.37 - 0.095 \\
 &= 0.275
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 D_{\text{calc}} &= \frac{24}{6.000 - \lg(\ln \frac{1}{0.275})} \\
 &= \frac{24}{6.000 - \lg(\ln 1.291)} \\
 &= \frac{24}{6.000 - 0.111} \\
 &= \frac{24}{5.889} \\
 &= 4.08
 \end{aligned}$$

附 录 E
(规范性附录)
存活-杀灭反应特性

E.1 概述

监测一次/批生物指示物的存活-杀灭反应特性,是为该次/批所有生物指示物性能一致提供保证的又一方法。

E.2 材料

E.2.1 试样应是芽孢悬液、染菌载体或包装好的生物指示物。

E.2.2 应使用相关的抗力仪。

注: GB 18281 的后续部分给出了相关检测方法。抗力仪的要求在抗力仪标准给出(见 ISO 18472)。

E.2.3 培养箱应能设定特定培养条件的温度,并能监测确认。

E.2.4 培养基应满足培养条件。

E.3 方法

E.3.1 应不少于 50 个相同的试样,证实存活时间和杀灭时间(见表 2)。通过存活曲线(见附录 C)或者部分阴性分析法(见附录 D)计算的 D 值应被用于存活-杀灭反应特性的规定。

E.3.2 样品暴露后应按照制造商给出的方法进行培养。

E.3.3 所标明的每个生物指示物中试验微生物存活的暴露时间表示存活特性。所标明的每个生物指示物中杀灭所有试验微生物的暴露时间表示杀灭特性。

E.3.4 存活-杀灭反应特性应用相关的抗力仪测定,使用相关的抗力仪过程参数。

注: GB 18281 的后续相关部分给出了特殊灭菌过程的相关条件。

E.3.5 存活时间和杀灭时间的相关数值用以下公式计算:

存活时间 $\geq (\lg N_0 - 2) \times D$ 值

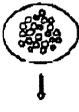
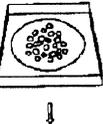
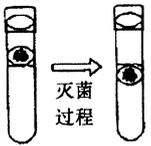
杀灭时间 $\leq (\lg N_0 + 4) \times D$ 值

E.3.6 每次暴露中使用的样品数,应根据所使用的生物指示剂物抗力仪的容积和操作特点确定。在测定存活和杀灭时间时,为了测试样品总数是否符合要求,可能需要进行几次暴露。

附录 F
(规范性附录)
生物指示物组成部分的关系

生物指示物组成部分的关系见表 F.1。

表 F.1 生物指示物组成部分的关系

图解	组成	术语
	微生物	试验微生物
	悬浮在液体中的微生物 ^a	试验微生物悬液 ^b
	接种在表面的微生物 ^c	染菌载体 ^b
	初级包装染菌载体	单独包装的生物指示物
	包含有处理过的染菌载体的生长培养基	处理好的染菌载体的生长性能测试
	准备使用的染菌载体和生长培养基结合的系统	自含式生物指示剂
<p>注：插图反映了常见的物理配置的图形演示。液体状的试验微生物悬液将悬浮的培养基作为载体介质，而非固体物质(见 3.2)。</p>		
<p>^a 根据微生物的目的是用来保存还是检测，采用的液体可能会发生变化。</p> <p>^b 如果用于监测灭菌过程，可以被定义为一种生物指示物。</p> <p>^c 在某些情况下，表面可以作为检测目的的产品。</p>		

参 考 文 献

- [1] ISO 31(all parts) Quantities and units
- [2] ISO 690:1987 Documentation—Bibliographic references—Content, form and structure
- [3] ISO 1000:1992 SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units
- [4] ISO 1000:1992/Amd 1:1998 SI units and recommendations for the use of their multiples and of certain other units—Amendment 1
- [5] ISO 10241:1992 International terminology standards—Preparation and layout
- [6] ISO/TS 11139 Sterilization of health care products—Vocabulary
- [7] ISO 14161:2000 Sterilization of health care products—Biological indicators—Guidance for the selection, use and interpretation of results
- [8] ISO 14937:2000 Sterilization of health care products—General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilizing process for medical devices
- [9] IEC 60027(all parts) Letter symbols to be used in electrical technology
- [10] ARMITAGE, P. and ALLEN, I., Methods of Estimating the LD 50 in Quantal Response Data, *J. of Hyg.* Vol. XLVIII, pp.298-322, 1950.
- [11] COCHRAN, W. G., Estimation of Bacterial Densities by Means of the “Most Probable Number”, *Biometrics*, Vol.6, No.1, pp.105-116, 1950.
- [12] GADDUM, J. H., Reports on biological standards, III, Methods of biological assay depending on a quantal response, *Spec. Rep. Ser. Med. Res. Council*, London, No.183, 1933.
- [13] HALVORSON, H. O. and ZIEGLER, N. R., Application of statistics to problems in bacteriology, *J. Bact.* 25, pp.101-121, 1933.
- [14] HOLCOMB, R. G. and PFLUG, I. J., The Spearman-Kärber method of analyzing quantal assay microbial destruction data, in: Pflug I. J., ed., *Selected Papers on the Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*, 5th edn., Minneapolis, Environmental Sterilization Laboratory, pp. 83-100, 1988.
- [15] JOHNSON, E. A. and BROWN, B., Wm., Jr., The Spearman Estimator for Serial Dilutions Assays, *Biometrics*, Vol.17, pp.79-88, 1961.
- [16] LEWIS, J. C., The Estimation of Decimal Reduction Times, *Appl. Micro.*, Vol.4, pp.211-221, 1956.
- [17] MOSLEY, G. A. and GILLIS, J. R., Operating Precision of Steam BIER vessels and the Interactive Effects of varying Z Valves on the Reproducibility of Listed D Values, *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, Vol.56, No.6, pp.318-331, 2002.
- [18] MOSLEY, G. A., Estimating the Effects of EtO BIER-Vessel Operating Precision on D Value Calculations, *M D & D I*, vol.24(4), pp.46-52, 2002.
- [19] Mosley, G. A., Gillis, J. and Whitbourne, J., Calculating Equivalent Time for Use in Determining the Lethality of EtO Sterilization Processes, *M D & D I*, vol.24(2), pp.54-63, 2002.
- [20] PFLUG, I. J., HOLCOMB, R. G. and GOMEZ, M. M., Thermal Destruction of Microorganisms, in *Disinfection, Sterilization and Preservation*, Block, Seymour S. (ed) Philadelphia, Lippincott, Williams & Wilkins, pp 79-129, 2001.

- [21] PFLUG, I.J., *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*, 11th Edition, Environmental Sterilization Services, Minneapolis, 2003.
- [22] PFLUG, I.J., *Microbiology and Engineering of Sterilization Processes*, St. Paul, University of Minnesota, 1992, ISBN 0-929340-01-9.
- [23] REED, L.J. and MUENCH, H. A., Simple Method of Estimating Fifty per cent Endpoints, *Amer.J. of Hyg.* Vol.27, No.3, pp.493-497, 1938.
- [24] SCHMIDT, C.F., Thermal resistance of microorganisms, in *Antiseptics, Disinfectants, Fungicides and Sterilization*. (G.F.Reddish, ed) 1st., pp.720-759, Lea and Febiger, Philadelphia.
- [25] SPEARMAN, C., 1908. The method of 'right and wrong cases' ('constant stimuli') without Gauss's formulae, *Brit.J.Psychol.*2, p.227.
- [26] STUMBO, C. R., MURPHY, J. R. and COCHRAN, J., Nature of Thermal Death Time Curves for P.A.3679 and *Clostridium Botulinum*, *Food Technology*, 4, pp.321-326, 1950.
- [27] World Health Organization, *Laboratory Biosafety Manual*, 2nd edn., WHO, Geneva, 1993 ISBN 92-4-154450-3.
- [28] United States Pharmacopoeia, official revision and Monographs for specific BIs; <55>, *Biological Indicators—Resistance Performance Tests: <1035> Biological Indicators for Sterilization*.
- [29] GRAHAM, G. S. and C. A., BORIS, *Chemical and Biological Indicators, Sterilization technology: A Practical Guide for Manufacturers and Users of Health care Products*, Eds. Morrissey, R.F. and Phillips, G.B, Van Nostrand Reinhold, NY, 1993, ISBN 0-442-23832-0.
- [30] FRITZE and PUKALL, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, pp.35-37, 2001.
-