

灭菌大法汇总

灭菌法系指用适当的物理或化学手段将物品中活的微生物杀灭或除去的方法。本法适用于无菌、灭菌制剂、原料、辅料及医疗器械等生产过程中物品的灭菌。

无菌物品是指物品中不含任何活的微生物。然而，对于任何一批灭菌产品来说，绝对无菌是既无法保证也无法被用试验来证实的，因为不可能对每一最小包装的产品进行无菌试验。事实上，物理或化学灭菌方法手段灭菌试验表明：微生物的杀灭曲线遵循对数规则，，因此，所以，批已灭菌物品的无菌性标准一般在概率意义上定义为污染单位低到可接受的程度，一般用以物品灭菌后微生物存活概率-无菌保证值水平 SAL (Sterility Assurance Level)表示。最终灭菌产品产品微生物存活概率的无菌保证值一般不得高于 10^{-6} ，即灭菌后微生物存活概率不得大于百万分之一。无菌保证值与灭菌物品中存在的微生物数量及特性密切相关，因此在产品生产的各个环节均应采取各种有效的手段(包括过滤除菌等措施)来降低待灭菌产品的微生物污染并控制在规定的限度内。已灭菌产品达到的无菌保证水平可通过验证确定。

灭菌产品的无菌保证并不能依赖于最终产品的无菌检验，而是取决于生产过程中采用合格的灭菌工艺、严格的 GMP 管理和良好的全面质量保证体系。灭菌工艺的制定确定应综合考虑其被灭菌物品的性质、灭菌方法的有效性、和经济性及、灭菌后产品物品的完整性和稳定性等因素。

灭菌程序的验证是无菌保证的重要内容必要条件。对灭菌产品(包括最终容器及包装)而言，；灭菌方法在实际应用前必须对其灭菌程序经进行验证后，方可交付正式使用。验证内容包括：

- (1)撰写确定验证方案及制定评估标准。
- (2)确认灭菌设备技术资料齐全、安装正确,并能处于正常运行（安装确认）。
- (3)确认关键控制设备和仪表能在规定的参数范围内正常工作运行（运行确认）。
- (4)采用灭菌物品或模拟物品进行重复试验，提供各参数范围，确认灭菌效果符合规定（性能确认）。
- (5)汇总并完善各种文件和记录，撰写记录完整的验证报告。

日常生产中，应对灭菌过程程序的运行情况进行监控，确认灭菌过程中各关键参数（如温度、压力、时间、湿度、灭菌气体浓度及吸收的辐照吸收剂量等）均在验证确定的范围内。；已采用的灭菌程序中关键的设备和工艺应定期进行再验证。当灭菌程序发生较大变化发生变更时，（包括灭菌柜中灭菌物品放置装载

方式和数量发生的改变)时, 应进行重新再验证。

产品在这种概率意义上的无菌保证并不能依赖于最终产品的无菌检验, 而是取决于生产过程中采用合格的灭菌工艺、严格的 GMP 管理和良好的全面质量保证体系。这意味着批生产过程的监控将比批无菌试验结果更能反映产品的无菌保证水平。产品的无菌保证与灭菌前产品被污染的程度及污染菌的特性相关。因此, 应严格监控被灭菌品灭菌前的微生物污染水平及污染菌的耐受性, 并在生产的各个环节采取各种措施降低污染, 确保微生物污染控制在规定的限度内。

否则, 应采取必要手段降低污染及消除抗性菌株, 甚至进行灭菌工艺的重新验证。灭菌后, 应防止已灭菌物品被再次污染。任何情况下, 都应要求容器及其密封系统确保产品在有效期内符合无菌要求。

灭菌方法

常用的灭菌方法有蒸汽湿热灭菌法、干热灭菌法、气体灭菌法、辐射灭菌法和过滤除菌法。可根据被灭菌物品的特性采用一种或多种方法的组合灭菌。只要产品允许, 一般应尽可能选用终端最终灭菌法(即产品分装至包装容器后再灭菌)灭菌。若产品不适合采用终端最终灭菌法, 可选用过滤除菌法或无菌生产工艺达到无菌保证要求, 只要可能, 应对非最终灭菌的产品作补充性灭菌处理(如流通蒸汽灭菌)。

一、蒸汽湿热灭菌法

本法系指将物品置于灭菌柜内利用高压饱和蒸汽或流通蒸汽灭菌、过热水喷淋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。流通蒸汽不能完全杀灭细菌孢子, 一般可作为不耐热无菌产品的辅助灭菌手段。高压蒸汽灭菌该法灭菌能力强, 为热力学灭菌中最有效、应用最广泛的灭菌灭菌方法。药品、容器、培养基、无菌衣、胶塞以及其他其它遇高温和潮湿不发生变化或损坏的物品, 均可用本法灭菌。流通蒸汽不能完全杀灭细菌孢子, 一般可作为不耐热无菌产品的辅助灭菌手段。1. 蒸汽灭菌的有关参数

(1) D 值

D 值即微生物的耐热参数, 系指一定温度下, 杀灭 90%微生物所需的时间, 以分表示。D 值越大, 表明该微生物的耐热性越强。不同的微生物在不同环境条件下具有不同的 D 值。

灭菌方法验证时, 微生物的耐热参数一般使用 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 。

(2) Z 值

Z 值即灭菌温度系数, 系指使某一种微生物的 D 值下降一个对数单位, 灭菌

温度应升高的值(°C)，通常取 10°C。它被用于定量的描述孢子对灭菌温度变化的敏感程度，Z 值越大孢子对温度的敏感性越弱。

(3) FT 值

FT 值系指给定的 Z 值下，灭菌程序所赋予待灭菌品在温度 T 下的灭菌时间，以分表示。

$$\lg P = \lg N_0 - FT/DT$$

式中 P 为灭菌产品中微生物存活的概率。

N_0 为产品灭菌前微生物的数量。

灭菌温度高时，FT 值就小，灭菌温度较低时，所需 FT 值就大。

(4) 灭菌率 L

L 值系指在某温度下灭菌 1 分钟所相应的标准灭菌时间(分)，即 F_0 和 FT 的比值 ($L = F_0/FT = D_{121^\circ\text{C}}/DT$)。不同 Z 值、不同温度下的 L 值是不同的，灭菌率均可查得。

(5) F_0 值

F_0 值即标准灭菌时间，系指灭菌过程赋予待灭菌物品在 121°C 下的等效灭菌时间，即 $T=121^\circ\text{C}$ 、 $Z=10^\circ\text{C}$ 时的 FT 值。121°C 为标准状态， F_0 值即为标准灭菌时间，以分表示。一个灭菌程序的总的标准灭菌时间 F_0 ，应包括加热及冷却过程。它可以用灭菌率对时间求积分的方法计算而得。

$$F_0 = \int t^2 L \cdot dt$$

式中 dt 为测定的间隔时间，相邻两次的间隔时间通常取 1 分钟。

100°C 以下，L 值可以忽略。 F_0 是作为灭菌过程中监控物品达到无菌保证的重要手段。现代灭菌器上设置有 F_0 值自动显示系统。

上述参数及其关系为蒸汽灭菌程序的设计、验证及日常灭菌效果的监控提供了理论依据。

灭菌条件及验证的基本要求

高压蒸汽湿热灭菌条件一般通常采用 $121^\circ\text{C} \times 20\text{min}$ 或 $116^\circ\text{C} \times 40\text{min}$ 的程序，也可采用其它温度和时间参数。总之，必须保证物品灭菌后的 $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ 。总之，必须验证所采用的灭菌条件能达到无菌保证要求。在实际应用中，对热稳定的产品或物品，可采用过度杀灭法，其 SAL 应 $\leq 10^{-12}$ 。对热极为敏感的产品，可的允许标准灭菌时间 F_0 可低于 8min，但对 F_0 低于 8 的灭菌程序要求应在生产全过程中，对产品中污染的微生物严加监控，并采取各种措施防止耐热菌污染及降低微生物污染水平，以确保被灭菌产品达到无菌保证要求。灭菌物品的表面必须洁净，不得污染有机物质。必要时，外表应用适宜的包皮宽松的包裹，特别是烧瓶、试管等容器的塞子要防止脱落。灭菌柜内的物品装载方式应保证灭

菌蒸汽彻底穿透物品，且不影响蒸汽穿透速度和灭菌后的干燥程度。灭菌柜中的空气应排空并被饱和蒸汽完全替代，以保证表压与灭菌柜内压力的一致。

采用湿热灭菌时[d1]，被灭菌物品应有适当的包装和装载方式，保证灭菌的有效性和均一性。

蒸汽灭菌法湿热灭菌工艺验证时，应进行热分布试验、热穿透试验和生物指示剂验证试验。以确定灭菌柜空载及不同装载时腔室里中的热分布状况及可能存在的冷点；在空载条件下，确认 121℃ 时腔室的各点的温度差值应 $\leq \pm 1^\circ\text{C}$ ；使用插入实际物品或模拟物品内的温度探头，确认灭菌柜在不同装载时，最冷点物品的标准灭菌时间 (F0) 达到设定的标准；用生物指示剂进一步确认在不同装载时冷点处的灭菌物品达到无菌保证水平。本法常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*)。

二、干热灭菌法

本法系指物品于干热灭菌柜、隧道灭菌器等设备中、利用干热空气达到杀灭微生物或消除热原物质的方法，在干热灭菌柜、连续性干热灭菌系统或烘箱等设备中进行灭菌。可用适用于耐高温但不宜用蒸汽湿热灭菌法灭菌的物品的灭菌，也是最为有效的除热原方法之一，如玻璃器具、金属制容器、纤维制品、固体试药、液状石蜡等均可采用本法灭菌。

干热灭菌条件一般为 160~170℃ × 120min 以上、170~180℃ × 60min 以上或 250℃ × 45min 以上，也可采用其它温度和时间参数。总之，应保证灭菌后的产品其 SAL $\leq 10^{-6}$ 。干热过度杀菌杀灭后产品的 SAL 应 $\leq 10^{-12}$ ，此时物品一般无需进行灭菌前污染微生物的测定。干热灭菌 250℃ 45min 的干热灭菌也可除去无菌产品包装容器及有关生产灌装用具中的热原物质。

采用干热灭菌时，被灭菌物品应有适当的包装和装载方式，保证灭菌的有效性和均一性。

用本法灭菌的物品表面必须洁净，不得污染有机物质，必要时外面应用适宜的包皮宽松包裹。配有塞子的烧瓶、试管等容器口应有金属箔或纱布等包皮包裹，并用适宜的方式捆扎，防止脱落。干热灭菌箱内物品排列不可过密，保证热能均匀穿透全部物品。

干热灭菌法验证与蒸汽湿热灭菌法相同，应进行热分布试验、热穿透试验、生物指示剂验证试验或细菌内毒素灭活验证试验。以确认灭菌柜中的温度分布应符合设定的标准、确定最冷点位置、确认最冷点标准灭菌时间 (FH) 能保证达到设定标准并达到 SAL 要求。常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*)。细菌内毒素灭活验证试验是证明除热原过程有效性的试验。

一般将不小于 1000 单位的细菌内毒素加入待去热原的物品中，证明该去热原工艺能使内毒素至少下降 3 个对数单位。细菌内毒素灭活验证试验所用的细菌内毒素一般为大肠杆菌内毒素 (*Escherichia coli* endotoxin)。验证时，一般采用最大装载方式。

三、辐射灭菌法

本法系指将灭菌产品置于适宜放射源辐射的 γ 射线或适宜的电子加速器发生的电子束中进行电离辐射而达到杀灭微生物的方法。本法最常用的为 ^{60}Co - γ 射线辐射灭菌。医疗器械、容器、生产辅助用品、不受辐射破坏的原料药及成品等均可用本法灭菌。

采用辐射灭菌法灭菌的无菌产品其 SAL 应 $\leq 10^{-6}$ 。 γ 射线辐射灭菌所控的参数主要是辐射剂量（指灭菌物品的吸收剂量）。该剂量的制定应根据考虑产品灭菌物品的适应性和及产品可能污染的微生物最大数量及最强抗辐射力，所使用的剂量事先应验证其有效性及安全性。常用的辐射灭菌吸收剂量为 25kGy。对最终产品、原料药、某些医疗器材应尽可能采用低辐射剂量灭菌。灭菌前，应对待被灭菌物品微生物污染的数量和抗辐射强度进行测定，以评价灭菌过程赋予该灭菌物品的无菌保证水平。

灭菌时，应采用适当的化学或物理方法对灭菌物品吸收的辐射剂量进行监控，以充分证实灭菌物品吸收的剂量是在规定的限度内。如采用与灭菌物品一起被辐射的放射性剂量计，剂量计要置于规定的部位。在初安装时计量剂量计应用标准源进行校正，并定期进行再校正。

当 ^{60}Co - γ 辐射用于中药非灭菌制剂灭菌以控制其微生物污染水平时，一般最高辐射吸收剂量为：散剂及含原粉胶囊剂 3 kGy、丸剂 5 kGy、半成品粉末 6 kGy。辐射灭菌后的物品，应进行微生物检测，同时应测定中药灭菌辐射前后的主要药效成分是否变化，以确定该方法的安全性和有效性。

^{60}Co - γ 射线辐射灭菌法验证时，除进行生物指示剂验证试验外，还应确认空载和装载时灭菌腔内的辐射剂量的分布图、灭菌物品的吸收剂量及最大和最小吸收剂量的分布、灭菌物品的均一性、灭菌腔内物品的装载方式等。常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus pumilus*)。

四、气体灭菌法

本法系指用化学消毒剂形成的气体杀灭微生物的方法。在充有灭菌气体的高压腔室内进行。常用的化学消毒剂有环氧乙烷、气态过氧化氢、甲醛、臭氧 (O₃) 等，本法适用于在气体中稳定的物品灭菌。采用气体灭菌法时，应注意灭菌气体

的可燃可爆性、致畸性和残留毒性。

本法中最常用的气体是环氧乙烷，一般与 80%~90% 的惰性气体混合使用。该法可用于医疗器械，塑料制品等不能采用高温灭菌的物品灭菌。含氯的物品及能吸附环氧乙烷的物品则不宜使用。另外，使用气态过氧化氢和臭氧(O₃)灭菌，因其无危害性残留物，不会对操作人员和环境造成危害，适合于空间和物品表面的灭菌。

采用环氧乙烷灭菌时，灭菌柜内的温度、湿度、灭菌气体浓度、灭菌时间是影响灭菌效果的重要因数。可采用下列灭菌条件：

温度 (54 ±10) °C

相对湿度 (60±10) %

灭菌压力 8×10⁵Pa

灭菌时间 90min

灭菌条件应予验证。灭菌时，先将灭菌腔室先抽成真空，然后通入蒸汽使腔室内达到设定的温湿度平衡的额定值，再通入经过滤和预热的环氧乙烷气体。灭菌过程中，应严密监控腔室的温度、湿度、压力、环氧乙烷浓度及灭菌时间。必要时使用生物指示剂监控灭菌效果。本法灭菌程序的控制具有一定难度，整个灭菌过程应在技术熟练人员的监督下进行。灭菌后，应采取新鲜空气置换，使残留环氧乙烷和其他易挥发性残渣消散。并对后通入环氧乙烷残留物和反应产物进行监控，以证明其不超过规定浓度，避免产生毒性。

环氧乙烷灭菌法验证时，应进行如下试验：泄露泄漏试验，以确认灭菌腔室的密闭性；生物指示剂的验证试验，指示剂一般采用枯草芽孢杆菌孢子(Spores of *Bacillus subtilis*)；灭菌后换气次数的验证试验，确认环氧乙烷及相应的反应产物含量在限定的范围内。验证设计时，还应考虑物品包装材料和灭菌腔室中物品的排列方式对灭菌气体的扩散和渗透的影响。

五、过滤除菌法

本法系利用细菌不能通过致密具孔滤材的原理以除去空气气体或液体中的微生物的方法。在开放式或封闭式过滤系统中进行。本法广泛用于制药行业，特别是常用于对热不稳定的药品溶液或原料的除菌。

除菌过滤器采用孔径分布均匀的微孔滤膜作过滤材料，微孔滤膜分亲水性和疏水性两种。滤膜材质依过滤物品的性质及过滤目的而定。药品生产中采用的除菌滤膜孔径一般不超过 0.22μ m。过滤器不得对被滤过成分有吸附作用，也不能释放物质，不得有纤维脱落，禁用含石棉的过滤器。滤器和滤膜在使用前应进行洁净处理，并用高压蒸汽进行灭菌或作在线灭菌。更换品种和批次应先清洗

滤器，再更换滤膜。

过滤过程中无菌保证与过滤液体液体的初始生物负载负荷及过滤器的对数下降值 LRV (Log Reduction Value) 有关。LRV 是表示系指在规定条件下，待被过滤液体过滤前的微生物数量与过滤后的微生物数量比的常用对数值。

$$\text{即： } LRV = \lg N_0 - \lg N$$

式中 N_0 为产品除菌前的微生物数量。

N 为产品除菌后的微生物数量。

LRV 用于表示过滤器的过滤除菌效率，对孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的过滤器而言，要求每 $25\text{px}2$ 有效过滤面积的 LRV 应不小于 7。因此过滤除菌时，应将待被过滤产品总的污染量应控制在规定的范围限度内。为保证过滤除菌效果，可使用两个过滤器串连过滤，或在灌装前用过滤器进行再次过滤。

在过滤除菌中，一般无法对全过程中过滤器的关键参数（滤膜孔径的大小及分布，滤膜的完整性及 LRV）进行监控。因此，在每一次过滤除菌前后均应作滤器的完整性试验，即气泡点试验或压力维持试验或气体扩散流量试验。测定滤器是否符合已验证过的完整性控制标准，确认滤膜在除菌过滤过程中的有效性和完整性。完整性试验可使用完整性试验仪测定。除菌过滤器的使用时间不应超过一个工作日，否则应进行验证。

过滤系统的验证包括过滤系统对过滤液体的适应性、过滤材料对溶液的污染程度、过滤器的规格、过滤器的灭菌方法、过滤系统的完整性试验、生物指示剂试验、过滤液体的微生物含量控制及过滤时间、过滤器的使用寿命等。上述试验大部分可由滤器的生产厂商来进行。微生物挑战性试验常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*)。

通过过滤除菌法达到无菌的产品应严密监控其生产环境的洁净度，建议在无茵环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其它物品应采用适当的方法进行灭菌，并防止再污染。

六、无菌生产工艺

无菌生产工艺系指必须在无菌控制条件下生产无菌制剂（如粉针剂）的方法，无菌分装及无菌冻干是最常见的无菌生产工艺。后者在工艺过程中须采用过滤除菌法。

无菌生产工艺应严密监控其生产环境的洁净度，并应在无菌控制的环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其它物品应采用适当的方法进行灭菌，并防止被再次污染。

无菌生产工艺过程的无菌保证应通过培养基无菌灌装模拟试验验证，试验结

果的阳性率不得超过 0.1%(置信度取 95%)。值不得低于 3。因此在生产过程中,应严密监控生产环境的无菌空气质量、操作人员的素质、各物品的无菌性。

无菌生产工艺应定期进行验证,包括对环境空气过滤系统有效性验证及培养基模拟分灌装试验。

生物指示剂

生物指示剂系一类特殊的活微生物制成的特殊制剂品。可用于确定确认灭菌设备的性能、灭菌物品的灭菌程序的建立和有效性的验证、灭菌程序的再验证、供评估产品灭菌是否达到无菌保证要求的依据、无菌空气过滤系统的评估生产过程灭菌效果的监控等。用于灭菌验证中的生物指示剂一般是细菌的孢子。

选择制备生物指示剂用微生物的基本要求

不同的灭菌方法使用不同的生物指示剂,制备生物指示剂所选用的微生物必须具备以下特性:

- (1) 菌种的耐受性应大于需灭菌产品中所有可能被污染微生物的耐受性。
- (2) 菌种应无致病性。
- (3) 菌株应稳定。存活期长,易于保存。
- (4) 易于培养。若使用休眠孢子,生物指示剂中休眠孢子含量要在 90%以上。

1. 生物指示剂的制备

生物指示剂的制备应按一定的程序进行,制备前,应需先确定所用微生物的特性,如 D 值(微生物的耐热参数,系指一定温度下,将微生物杀灭 90%所需的时间,以分表示)值等。

菌株应用适宜的培养基(如产孢子的培养基)进行培养。培养物应制成悬浮液,其中孢子的数量应占优势,孢子应悬浮于无营养的液体中保存。

生物指示剂中包含一定数量的一种或多种孢子,可制成多种形式,通常是将一定数量的孢子附着在无生命的载体上,如滤纸条、玻片、不锈钢、塑料制品等;孢子悬浮液也可密封于安瓿中;有的生物指示剂还配有培养基系统。生物指示剂应选用合适的材料包装进行包装以防止微生物的污染和孢子损耗,,并确定设定有效期。载体和内层包装材料在保护生物指示剂不被污染和损耗的同时,还应保证灭菌剂穿透必须保证灭菌因子易穿透包装内的微生物部位并能与生物指示剂充分接触、不得有任何污染物、在灭菌过程中不被破坏,否则将影响生物指示剂有效性、稳定性及使用。同时载体和包装应设计应原则是便于贮存、运输、取样、转移接种,并能避免这些过程微生物的污染和孢子的损耗。

有些生物指示剂可直接将孢子接种至液体灭菌物或具有与其相似的物理和化学特性的替代品中。此时必须论证替代品对孢子的生长繁殖没有影响及孢子的耐受力没有降低。使用替代品时,应用数据证明二者的等效性。

2. 生物指示剂的应用

在灭菌程序的验证中，尽管可通过灭菌过程某些参数的监控来评估灭菌效果，但生物指示剂的被杀灭程度，则是评价一个灭菌程序有效性更好的最直观的指标。灭菌用的生物指示剂可来源于使用商品化市售的标准生物指示剂，或是也可使用由日常生产污染菌监控中分离的最耐受微生物制备的孢子并经实验室制备而得。在生物指示剂验证试验中，需确定孢子在实际灭菌条件下的耐受性，并测定孢子的纯度和数量。验证时，生物指示剂的微生物用量应比日常检出的微生物污染量大，耐受性强，以保证灭菌程序有更大的安全性。在终端最终灭菌法中，生物指示剂应放在灭菌柜中灭菌因子最不易到达的部位（最冷点）的不同部位。若正常生产中需要用生物指示剂进行灭菌效果监测时，应注意放置方式并避免指示剂直接接触到被灭菌物品。生物指示剂按设定的条件灭菌后取出，分别置培养基中培养，确定生物指示剂中的孢子是否被完全杀灭。

过度杀菌杀灭产品灭菌验证一般不考虑微生物污染水平，可采用商品化市售的生物指示剂。对灭菌手段耐受性差的产品，设计灭菌程序时，根据经验预计在该生产工艺中产品微生物污染的水平，选择生物指示剂的菌种和孢子数量。这类产品的无菌保证应通过监控每批灭菌前的微生物污染的数量和、耐受力性、和灭菌程序验证所用的生物指示剂数量和耐受力及其他相关的参数获得的数据进行评估。

3. 常用生物指示剂

(1) 蒸汽湿热灭菌法：蒸汽湿热灭菌法最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*, 如 NCTC 10 007、NCIMB 8157、ATCC 7953)。D 值为 1.5~3.0min，每片（或每瓶）活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个，在 121℃、19min 下应被完全杀灭。另外此外，还可使用生孢梭菌孢子 (Spores of *Clostridium sporogenes* 如 NCTC 8594、NCIMB 8053、ATCC 7955)，D 值为 0.4~0.8min。

(2) 干热灭菌法：干热灭菌法最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*, 如 NCIMB 8058、ATCC 9372)。D 值大于 1.5min，每片活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个。去热原验证时使用大肠杆菌内毒素 (*Escherichia coli* endotoxin)，加量不小于 1000 细菌内毒素单位。

(3) 辐射灭菌法：辐射灭菌法最常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus pumilus*, 如 NCTC 10 327、NCIMB 10 692、ATCC 27 142)。每片活孢子数 107~108，置于放射剂量 25kGy 条件下，D 值约 3kGy。但应注意灭菌产品中所负载的微生物可能比短小芽孢杆菌孢子显示更大强的抗辐射力。因此短小芽孢杆菌孢子可用于监控灭菌过程，但不能用于灭菌辐射剂量的建立。

(4) 气体灭菌法：环氧乙烷灭菌最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*, 如 NCTC 10 073、ATCC 9372)。气态过氧化氢灭菌最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*, 如 NCTC 10 007、NCIMB 8157、ATCC 7953)。每片活孢子数 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个。环氧乙烷灭菌中，枯草芽孢杆菌孢子 D 值大于 2.5min，在环氧乙烷浓度为 600mg/L，相对湿度为 60%，温度为 54℃ 下灭菌，60min 应被杀灭。

(5) 过滤除菌法：过滤除菌法最常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*, 如 ATCC19 146)，用于滤膜孔径为 0.22 μ m 的滤器；黏质沙雷菌 (*Serratia marcescens*) (ATCC 14 756)，用于滤膜孔径为 0.45 μ m 的滤器。