



中华人民共和国国家标准

GB/T 19973.1—2015/ISO 11737-1:2006
代替 GB/T 19973.1—2005

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

**Sterilization of medical devices—Microbiological methods—
Part 1: Determination of a population of microorganisms on products**

(ISO 11737-1:2006, IDT)

2015-12-10 发布

2016-09-01 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

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 质量管理体系要素	3
5 产品选择	4
6 生物负载的测定方法和微生物鉴定方法	4
7 生物负载测定方法的确认	5
8 生物负载的常规测定和数据分析	6
9 生物负载测定方法的维持	6
附录 A (资料性附录) 产品上微生物总数的测定指南	7
附录 B (资料性附录) 生物负载的测定方法指南	17
附录 C (资料性附录) 生物负载方法的确认	24
参考文献	27

前 言

GB/T 19973《医疗器械的灭菌 微生物学方法》拟分为以下两个部分：

——第1部分：产品上微生物总数的测定；

——第2部分：验证灭菌过程的无菌试验。

本部分为 GB/T 19973 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/T 19973.1—2005《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估计》，与 GB/T 19973.1—2005 相比，主要技术内容变化如下：

——增加了部分术语和定义；

——增加了质量体系 YY/T 0287 的要求；

——修改并增加了生物负载的测定方法和微生物鉴定方法、确认和数据分析；

——在附录中修改并增加了生物负载的测定方法指南和确认。

本部分使用翻译法等同采用 ISO 11737-1:2006《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》。

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 19022—2003 测量管理体系 测量过程和测量设备的要求(ISO 10012:2003, IDT)

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：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、广东省疾病预防控制中心、杭州泰林生物技术设备有限公司、北京市射线应用研究中心。

本部分主要起草人：雷秀峰、钟昱文、叶大林、胡金慧、肖洁玲、刘博、赵振波。

本部分所代替标准的历次版本发布情况为：

——GB/T 19973.1—2005。

引 言

无菌产品是指不含有活的微生物的产品。当提供无菌产品时,应将微生物污染都减少到最低限度。然而,即使是依照产品质量系统的要求,在标准制造状态下生产的产品,也会有少量的微生物污染。这样的产品是有菌的产品。只有灭菌才能消除微生物污染并将有菌产品变为无菌产品。

利用物理方法或化学制剂来灭活医疗器械上纯培养的微生物的灭菌动力学,常常可以通过存活微生物的数量与杀菌剂处理程度之间的指数关系加以说明,这就意味着不管处理的程度如何,微生物总会以有限的概率存活下来。对于一个施加的处理来说,微生物存活的概率是由微生物的数量、抗力以及在处理期间微生物存在的环境所决定的。由此可见,经过灭菌处理的一组产品中的任何一个产品的无菌状态是无法保证的,但是可以根据微生物在一个产品上存活的概率确定这一组产品的无菌状态。

关于产品设计与开发、生产、安装和服务的质量管理体系的一般要求包含在 GB/T 19001 (GB/T 19001—2008, ISO 9001:2008, IDT) 中,而关于医疗器械生产的质量管理体系的特别要求则包含在 YY/T 0287 (YY/T 0287—2003, ISO 13485:2003, IDT) 中。根据质量管理体系的标准,对于某些制造过程,其过程的有效性不能够完全通过后期的产品检验与测试来验证。灭菌是这种过程的一个例子。因此,对灭菌过程进行确认,定期监测灭菌过程,同时对设备进行维护是很必要的。

关于医疗器械灭菌过程的确认与常规控制已经制定了这方面的标准[例如, GB 18279 (GB 18279—2000, ISO 11135:1994, IDT)、GB 18280 (GB 18280—2000, ISO 11137:1995, IDT) 系列和 ISO 17665]。然而,也应认识到,正确地确认和准确地控制灭菌过程并不是确保产品无菌以满足其预期用途的唯一因素,了解过程中存在的微生物风险,包括微生物的数量、特点和性质等,对于灭菌过程的有效确认和常规控制也很重要。

生物负载是指产品和/或无菌屏障系统上或其中的存活微生物的总数。生物负载用于许多情况:

- 灭菌过程的确认与再确认;
- 制造过程控制的常规监测;
- 原材料、部件或者包装的监测;
- 清洗过程效率的评估;
- 总体的环境监测方案。

生物负载是指由多种微生物污染源所产生的微生物的总和,这些微生物污染源包括原材料、部件的制造、组装过程、制造环境;组装/制造辅助手段(例如:压缩气体、水、润滑剂)、清洁过程和成品的包装。为了控制生物负载,应注意这些可能污染的微生物的状态。

不可能准确地列举和鉴定生物负载,实际上,是利用一种已定义的方法来确定生物负载。由于医疗器械的设计和制造材料相当广泛,所以只用一种确定的生物负载的方法去定义所有情况是不可行的。也不可能只确定一种技术去清除所有的微生物。此外,对微生物条件的选择也很可能受到医疗器械上或其中微生物类型的影响。

GB/T 19973 的本部分规定了生物负载测定应满足的要求,即本部分的标准化要求,是应遵守的要求。资料性附录中的准则不是标准化的要求,而且不是作为检查表为稽核人员提供的。该准则提供了对被视为满足这些要求的合适手段的解释和方法。可以使用该准则中所给定的方法以外的方法,只要这些方法能够达到满足本部分要求的效果即可。

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

1 范围

GB/T 19973 的本部分规定了医疗器械、部件、原材料、包装上(或内)的存活微生物总数的计数和鉴定的要求,并提供了指南。

注 1: 微生物定性和范围依据微生物负载数据的预期用途。

本部分没有规定对病毒性污染或原虫性污染计数和鉴定的要求。

注 2: 本部分中所规定的要求不用于海绵状脑病(诸如瘙痒病、牛海绵状脑病和克-雅病)病原体的采集与检测。

本部分没有规定对生产医疗器械的环境中微生物监测的要求。

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。

GB/T 27025—2008 检测和校准实验室能力的通用要求(ISO/IEC 17025:2005, 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)

ISO 10012 测量管理体系 测量过程和测量设备的要求(Measurement management systems—Requirements for measurement processes and measuring equipment)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

生物负载 bioburden

一件产品和/或包装上或其中存活的微生物总数。

[ISO/TS 11139:2006, 定义 2.2]

3.2

纠正 correction

为消除已发现的不合格所采取的措施。

注: 纠正可连同纠正措施(3.4)一起实施。

[GB/T 19000—2008, 定义 3.6.6]

3.3

修正系数 correction factor

用于补偿无法从产品和/或微生物培养中完全采集的数值。

3.4

纠正措施 corrective action

为消除已发现的不合格或其他意外情况而采取的措施。

注 1: 一个不合格项可以有若干个原因。

注 2: 采取纠正措施是为了防止再发生,而采取预防措施(3.9)是为了防止发生。

注 3: 纠正(3.2)和纠正措施是有区别的。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.8]

3.5

培养条件 culture conditions

促进微生物复苏、生长和/或繁殖所采用的培养基和培养方式。

注: 培养方法可包括温度、时间和其他规定用于培养的条件。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.10]

3.6

建立 establish

通过理论评价确定,并经试验工作证实。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.17]

3.7

医疗器械 medical device

制造商的预期用途是为下列一个或多个特定目的用于人类的,不论单独使用或组合使用的仪器、设备、器具、机器、用具、植入物、体外试剂或校准物、软件、材料或者其他相似或相关物品。这些目的是:

- 疾病的诊断、预防、监护、治疗或者缓解;
- 损伤的诊断、监护、治疗、缓解或者补偿;
- 解剖或生理过程的研究、替代、调节或者支持;
- 支持或维持生命;
- 妊娠控制;
- 医疗器械的消毒;
- 通过对取自人体的样本进行体外检查的方式来提供医疗信息。

其作用于人体体表或体内的主要设计作用不是用药理学、免疫学或代谢的手段获得,但可能有这些手段参与并起一定辅助作用。

注: 本定义由全球协调工作组制定(GHTF 2002)。

[YY/T 0287—2003]

3.8

微生物鉴定 microbial characterization

微生物分类的过程。

注: 可按采用的选择性培养基、菌落或细胞形态、染色特性或其他特征分类。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.25]

3.9

预防措施 preventive action

为消除潜在不合格或其他潜在不期望情况的原因所采取的措施。

注 1: 一个潜在不合格可以有若干个原因。

注 2: 采取预防措施是为了防止发生,而采取纠正措施(3.4)是为了防止再发生。

[GB/T 19000—2008,定义 3.6.4]

3.10

产品 product

过程的结果。

注: 在本灭菌标准中,产品是有形的并且可以是原材料、中间体、部件和医疗保健产品。

[GB/T 19000—2008,定义 3.4.2]

3.11

公认的菌种保存库 recognized culture collection

根据“国际公认微生物菌种保存专利与法规”布达佩斯(Budapest)公约建立的国际菌种保存机构。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.38]

3.12

回收率 recovery efficiency

用某一特定技术从产品上采集和/或培养微生物能力的测量。

3.13

样品份额 sample item portion;SIP

被测试的医疗器械规定部分。

3.14

规定 specify

在批准的文件中详细约定的内容。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.42]

3.15

确认 validation

为建立某可持续生产出符合预定技术规格的产品工艺,获得、记录和整理结果的文件化过程。

注:在生物负载测定过程中,“过程”是试验方法,“产品”是试验结果。对生物负载测定技术的确认包括一系列调查,来评估检测方法的有效性和重现性。

[ISO/TS 11139:2006,定义 2.55]

4 质量管理体系要素**4.1 文件**

4.1.1 应规定生物负载测定过程。

4.1.2 应由指定人员(见 4.2.1)评审和批准本部分要求的文件和记录。根据 YY/T 0287—2003 或 GB/T 27025—2008,文件和记录应受控。

4.1.3 应保存原始观察的记录、计算、导出数据和最终报告记录。记录应包括取样、制备和检测人员身份的识别。

4.1.4 应对计算和数据转化进行适当的校核。

4.2 管理职责

4.2.1 应对本部分所述执行和实施过程的职责和权限进行规定。根据 YY/T 0287—2003 或 GB/T 27025—2008,应对能胜任的人员落实职责。

4.2.2 若由组织独立的质量保证体系来保证本部分要求得到满足,应对组织内各部分的职责和权限作出规定。

4.2.3 所有设备所需的标准操作方法和测量方法,都应是可操作的。

4.3 产品实现

4.3.1 应规定采购过程。过程应符合 YY/T 0287—2003 或 GB/T 27025—2008 规定。

4.3.2 应在符合 YY/T 0287—2003、GB/T 27025—2008 或 ISO 10012 的文件化体系中,设定满足本部分要求的所有设备,包括用于试验目的的仪表的校准规定。

4.3.3 应规定包括特定质量检测在内的生物负载测定所用材料的制备和灭菌方法。

4.4 测量、分析和改进——不合格品控制

应规定不合格结果的调查过程以及纠正、纠正措施和预防措施过程。过程应符合 YY/T 0287—2003 或 GB/T 27025—2008 要求。

5 产品选择

5.1 总则

5.1.1 选择和处理用于生物负载测定的产品的过程，应能确保所选产品对包括包装材料和过程的常规生产具有代表性。

5.1.2 若为生物负载测定的目的对产品进行分类，应记录每一分类内包含这一产品的理由（见 4.1.2）。理由应包含所选产品在整个分类里具有代表性的标准。

5.1.3 由于生物负载测定易受时间推移的影响而改变，应考虑生物负载测定的取样时限。

5.2 样品份额(SIP)

如果已验证生物负载在本产品上或本产品内是均匀分布的，则 SIP 可以是该产品的任何部分。否则，样品应包含能代表所制产品的每种相应材质而随机选取的产品部位。若已知生物负载分布，可以从认为对灭菌工艺最有严峻挑战的产品部分选择 SIP。可在长度、质量、体积或表面积基础上计算 SIP（实例见表 1）。

表 1 SIP 计算实例

选 SIP 依据	产品
表面积	植入物(不可吸收)
质量	粉末 手术服 植入物(可吸收)
长度	管路(直径一致)
体积	杯量流体

注：若适用，在灭菌过程的确认和常规控制要求的标准中规定适当的 SIP 适宜性准则。

6 生物负载的测定方法和微生物鉴定方法

6.1 生物负载的测定

6.1.1 适当方法的选择

应选择生物负载测定的适当方法。方法应包括下列对应的技术：

- a) 微生物的采集(若需要)；
- b) 微生物的培养；
- c) 微生物计数。

应规定精确度，并应适于该数据的应用目的。

6.1.2 微生物的采集

6.1.2.1 对一特定产品,采集存活微生物是方法的一部分,应考虑其采集效率并记录讨论结果(见4.1.3)。至少要考虑下列内容:

- a) 采集微生物的技术能力;
- b) 微生物的可能种类和它们在产品上的位置;
- c) 采集技术对微生物活性的影响;
- d) 检测时产品的物理或化学特性。

6.1.2.2 对采集存活微生物不是方法的一部分的特定产品,应考虑其微生物计数效率并记录讨论结果(见4.1.3)。至少要考虑下列内容:

- a) 微生物的可能种类和它们在产品上的位置;
- b) 待测产品的物理或化学特性;
- c) 由于原位培养,细胞聚集形成单一种群。

6.1.2.3 若产品的理化性质表明其能释放出某些能影响已发现微生物的数量或种类的物质,应使用中和或减少这种物质作用的方法,或者至少应有能将该种释放物质的影响降至最小的方法。该方法的有效性应经过验证。

注:附录B描述了用于评价灭菌或抑菌物质释放的技术。

6.1.3 微生物培养

应在对可能出现的微生物的种类加以考虑之后选择培养条件。应记录考虑的结果和所得结论的原理(见4.1.2)。

6.1.4 微生物计数

应在对可能出现的微生物的种类加以考虑之后选择计数技术。应记录考虑的结果和所得结论的原理(见4.1.2)。

6.2 生物负载的微生物鉴定

6.2.1 应选择生物负载微生物鉴定的适当技术。

注:当使用生物负载这一数据时(例如建立灭菌过程),需要对微生物进行鉴定以确定产品微生物群落是否发生变化,因这些变化有可能影响到最终生物负载量的确定。

6.2.2 通过下列一个或多个特性完成微生物鉴定:

- a) 染色特性;
- b) 细胞形态;
- c) 菌落形态;
- d) 选择性培养的使用;
- e) 生化特性;
- f) 有足够的数据库提供基因序列数据。

7 生物负载测定方法的确认

7.1 应对生物负载测定方法进行确认并形成文件。

7.2 确认应包括下列内容:

- a) 若测定方法中包括采集产品上微生物,则对该技术适宜性进行评价;

- b) 确定回收率,以便得到修正系数;
- c) 对包括培养条件和微生物计数技术在内的微生物计数适宜性的评价;
- d) 微生物鉴定技术适合性的评价。

8 生物负载的常规测定和数据分析

- 8.1 应使用规定了样品大小和取样频率标准化的取样计划进行生物负载的常规测定。
- 8.2 对某一产品或产品类(见 5.1.2)应用规定的方法对其进行生物负载测定。
- 8.3 进行生物负载微生物鉴定在一定程度上应由生物负载测定数据的使用目的决定。若进行微生物鉴定时发现分离菌不是规定的微生物群落的一部分,宜考虑评定这些分离菌的特性。
- 8.4 若生物负载数据用于确定灭菌过程的处理程度,则应满足灭菌过程设定、验证和常规控制特定标准中规定的关于生物负载数据使用的切实可行的要求。
- 8.5 应规定医疗器械上或医疗器械内的生物负载的可接受限量。规定应基于先前产生的数据。若超过该限量,应采取措施(见 4.4)。
- 8.6 应运用经过一段时间得到的生物负载测定数据来确定趋势。应评审可接受限量并在必要时进行修改。
- 8.7 确定样品大小、取样频率和/或可接受限值的统计学方法的应用应符合 YY/T 0287—2003。

9 生物负载测定方法的维持

9.1 产品和/或生产过程的改变

应评审产品和/或生产工艺的变更,以确定其是否有可能改变生物负载。应记录评审结果(见 4.1.2)。如果生物负载有改变,应进行专门的生物负载测定以评价任一变化的程度和特性。

9.2 生物负载测定方法的改变

应对生物负载测定常规方法的任何变化进行评价。该评价应包括:

- a) 评价测定结果的变化影响;
- b) 建立紧随该变化的方法的回收率。

注:对变化的评价能显示出先前进行的确认和回收率仍有效。

9.3 生物负载测定方法的再确认

应根据过程文件定期对原始确认数据(见 7.2)及随后的任何再确认数据进行评审。应确定进行再确认的范围。应记录评审和所有进行的再确认结果(见 4.1.3)。

附 录 A
(资料性附录)
产品上微生物总数的测定指南

注：为便于参考，本附录内容编号与本部分的规范部分使用的编号相对应。

A.1 范围

本附录包括了执行本部分规定要求的指南。本附录并不是面面俱到的，只是突出宜注意的重要方面。

也可使用非本附录中未提出的方法，但宜证明这些方法能达到本部分所规定的要求。

本附录不是评价是否符合本部分要求的检查清单。

A.2 规范性引用文件

规范性引用文件中包含的文件要求，只有当被引用在 GB/T 19973 的规范性引用部分时，这些要求才是本部分的要求，并且该项引用可以是整个标准或者是特定的条款。

A.3 定义

无准则要求。

A.4 质量管理体系要素

注：本部分并不要求有一个完整的质量管理体系，但是当用于灭菌医疗器械的确认和检测时，控制生物负载测定最少需要的质量管理体系要素在本附录中的适当地方被列出作为规范性参考（参见第 4 章）。要关注控制医疗器械生产或再处理所有阶段的质量管理体系标准（见 YY/T 0287—2003）。按照有关医疗器械的国家和/或区域性规定，可能要求完全执行一个全面的质量管理体系，以及第三方组织对该体系的评定。

A.4.1 文件

YY/T 0287—2003 中对文件的要求涉及文件（包括规范和过程文件）的形成和控制以及记录。

实验室可以使用计算机来直接或间接地收集、处理和/或储存数据。所有的硬件和软件建议进行控制。

计算机系统的硬件和软件宜经过确认，建议对这些方面的任何改变形成文件以及需经过适当批准。

若是通过电子数据处理技术进行计算，使用之前建议对所用软件（例如电子表格计算）进行确认并保存确认记录。

对软件，宜有文件描述：

- 计算机系统上的应用软件；
- 运用软件；
- 所用数据包。

所有软件在投入运行之前都建议接受测试。

若计算机软件是机构内部开发的，宜开发适当的过程，确保：

- 保存包括源代码在内的开发文件；
- 保存合格测试记录；
- 程序修改文件化说明；
- 设备更改的文件化说明及使用前的正式测试。

这些控制也宜适用于商业软件包的任何修改或定制。

宜有检测或防止未经授权对软件程序进行更改的程序。

进行组织、制表和/或提供数据用于统计或其他数学计算过程的软件程序,或者对电子存储数据进行其他方面使用或分析的软件程序,宜具有原始数据录入的恢复功能。计算机数据归档可能需要特定程序,并宜将该程序形成文件。

YY/T 0287—2003 的 4.2.3 和 4.2.4,或 GB/T 27025—2008 的 4.3 和 4.13 中规定了对文件和记录的控制要求。

GB/T 27025—2008 的 4.13.2 和 5.4 中规定了对技术资料的要求。

也可参见 GB/T 19000.3。

A.4.2 管理职责

YY/T 0287—2003 中对管理职责的要求涉及管理承诺、以顾客为关注焦点、质量方针、策划、职责权限与沟通、管理评审。

为保证生物负载测定中得出的数据是可靠的并且可重现,在受控条件下进行生物负载的测定是十分重要的。因此,不论测定所用的试验设备是在医疗器械制造商所在地还是在离生产厂较远的地方,都宜根据文件化的质量体系对这些设备进行管理和运行。

生物负载测定包括几个独立组织,每一组织负责测定方法或过程的某些部分。本部分内容要求各组织承担规定的相应职责,并将职责限定形成文件。质量管理体系中将已认可组织职责与权限的规定形成文件。要求承担规定部分职责的组织将这些职责分配给通过培训与资格认证的适任人员。

若生物负载测定是在医疗器械制造商直接管理之下的实验室中进行,实验室则在制造商质量管理体系下运行。若使用外部实验室,该实验室宜通过专用国家标准(如 GB/T 27025—2008)正式认可。

任何实验室宜对提供质量服务作出保证,并作为质量方针将承诺形成文件。宜正式建立实验室组织的职责与权限的界限并形成文件。宜指定专人负责实验室质量管理体系的建立,并有权确保质量管理体系的实施。

实验室的运行宜经过定期内部审核。实验室宜将审核结果形成文件并提交实验室管理层评审。见 GB/T 27025—2008 的 4.14。

YY/T 0287—2003 的 5.5 中规定了对职责权限的要求,YY/T 0287—2003 的 6.2 中则规定了对人力资源的要求。

对资源提供的要求在 YY/T 0287—2003 中进行了规定,对设备的要求在 GB/T 27025—2008 的 5.5 中进行了规定。

A.4.3 产品实现

YY/T 0287—2003 中对产品实现方面的要求涉及由顾客需求确定的产品生命周期、设计和开发、采购、生产控制,以及对监测和测量装置的校准。

宜有识别每台实验室设备维护要求的系统。

宜清楚标识不需校准的设备。

检测过程中与产品、洗脱液、培养基等接触的任何器械或其部件宜是无菌的。所有用于采集产品上微生物的微生物培养基和洗脱液,宜保证用无菌的方法进行制备。

质量测试宜包括促生长试验。通常,在每批培养基上使用低菌量[在 10 CFU(菌落形成单位)~

100 CFU 之间]的选定微生物进行促生长试验。药典专论中有对促生长试验的描述。也可采用其他公认的对培养基质量控制的定量及半定量分析方法。

YY/T 0287—2003 的 7.4 规定了对采购的要求。特别是 7.4.3 对采购产品的验证适用于所有从组织外部接收的产品和服务。

YY/T 0287—2003 的 7.6 规定了对监视和测量装置的校准要求。对设备和测量溯源性的要求则在 GB/T 27025—2008 的 5.5 和 5.6 进行了规定。

A.4.4 测量、分析和改进——不合格品控制

YY/T 0287—2003 中对测量、分析和改进方面的要求涉及过程监测、不合格品控制、数据分析和改进(包括纠正和预防措施)。

需要对所有超过规定和预示不利趋势的生物负载结果进行调查。调查的初始阶段宜包含估定结果是正确的还是错误的。下列情况可能导致错误,遇有类似情况,宜加以指出:

- 样品不当(例如非代表性、非均质的废料);
- 取样材料不当(例如拭子、容器、包装);
- 不适宜的运输、搬运及仓储条件;
- 试验器材不当(例如储罐、移液管、过滤器);
- 错误的处理或测试方法;
- 培养基或稀释剂不当;
- 实验室环境不适宜;
- 培养环境不适宜;
- 计算或抄写错误。

如果结果是起因于一个错误,那么宜通过使用取自同一批产品的样品重新做测定来验证超出规定限值的生物负载结果。若产品证实有微生物生长或是不能再提供同一批产品,可以使用新的一批。

若确定初始结论是正确的结果,那么在调查的第二阶段宜考虑下列几点:

- a) 与灭菌过程有效性相关的结果的意义。
- b) 增加样品量和/或取样频次的需要。
- c) 制造过程的评定结果,在该类评定中,宜提到下列内容:
 - 1) 原材料/部件(供应商、变更);
 - 2) 清洁液/润滑液/制备液;
 - 3) 运输/保存容器;
 - 4) 工作台表面;
 - 5) 人员穿着/个人卫生/个人习惯;
 - 6) 搬运/组装;
 - 7) 环境条件和监测结果(包括季节因素,假如有);
 - 8) 包装材料及包装过程;
 - 9) 贮存条件。
- d) 回收微生物的微生物鉴定,包括:
 - 1) 潜在来源;
 - 2) 与之前分离菌的比较。

基于上述调查结果,可能需要特定的纠正措施。若需进行纠正,需要证明其有效性。

YY/T 0287—2003 的 8.5.2 以及 GB/T 27025—2008 的 4.11 规定了纠正措施过程。

A.5 产品选择

A.5.1 总则

A.5.1.1 宜对产品样品和处理技术进行选择,进行该技术时要避免因疏忽而引起的污染以及使样品中微生物的数量和类型产生明显改变。取样技术宜保持一致以便允许在一段时间内生物负载可以进行比较。

选择用于生物负载测定的产品样品方面,有两种可能:

- a) 随机取样品;
- b) 抽取不适用于销售的可被废弃或除去的产品。

样品选择取决于众多因素,但先决条件是所选样品宜能具有此类产品的代表性生物负载。若决定利用不合格品,则宜选择那些已经过生产过程的各个基本阶段(包括可能存在的清洁和包装过程)的产品。按上述 a)抽取的产品是更为理想的样品。

为生物负载测定取样时,产品宜装在其通常包装内。

A.5.1.2 为生物负载测定对产品进行分类时,宜考虑以下方面:

- a) 微生物的数量;
- b) 微生物的类型;
- c) 产品的尺寸;
- d) 部件的数量;
- e) 产品的复杂性;
- f) 生产过程中使用的自动化程度;
- g) 生产环境。

由分类中选出的用于生物负载测定的产品宜有 2 种取样方式:1)随机选取;或者 2)根据计划进度选取。

A.5.1.3 若生物负载产生的数据用于建立灭菌过程,则产品样品选择到生物负载测定之间经过的时间宜能反映出产品生产最后一个步骤的完成与产品灭菌之间的时间段。

A.5.2 样品份额(SIP)

生物负载测定应尽量使用整个产品,但由于实验室玻璃器皿很难容纳整个产品,所以宜选用尽可能大的产品部分,并且通过所用的产品部分宜可以测定出整个产品的生物负载。因此在测试如手术服或外引流成套器械等大型产品时仔细选取产品的测定部分是必需的。

在准备或收集样品部分时,对产品的操作要小心。若需将试验样品从产品上分离出来,宜在受控环境中、洁净条件下进行(例如在层流柜中),这样可避免附加污染。

A.6 生物负载的微生物鉴定和测定方法

A.6.1 生物负载的测定

A.6.1.1 适当方法的选择

若需要,如同 DNA 测序,分子分型方法可以用于补充培养方法。图 A.1 是生物负载测定方法的选择初期的通用判定树。

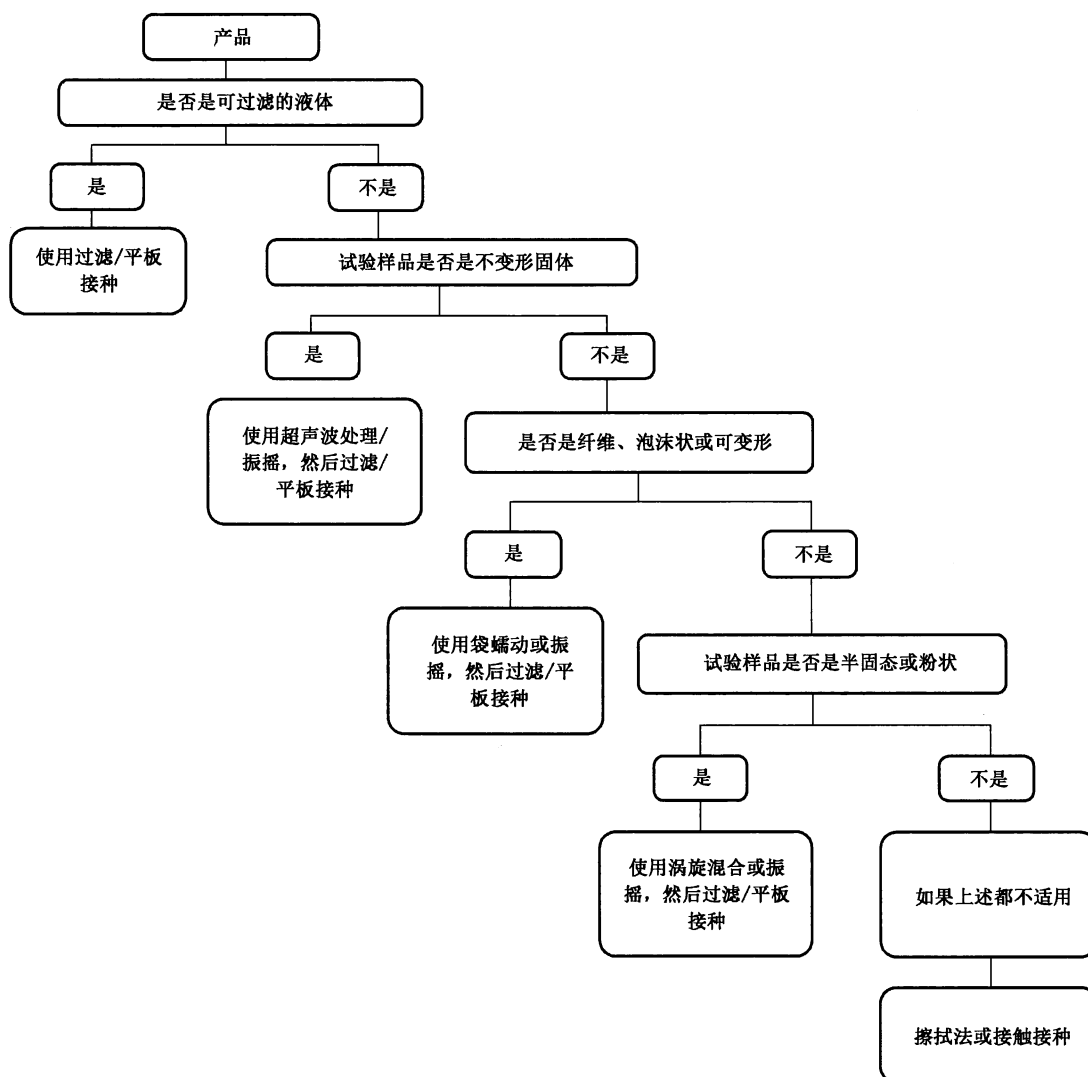


图 A.1 生物负载方法判定树

A.6.1.2 微生物的采集

见附录 B。

A.6.1.3 微生物培养

当选择培养基和培养条件时,需要考虑原材料特性、制造方法以及进行生产的条件等因素。除非会出现苛求菌,需选择适合的非选择性培养基和培养条件。

选择培养基和培养条件时,至少宜考虑到下列几点:

- 一个培养基和培养条件的组合不能使所有微生物生长;
- 验证试验比常规检测需使用更多种培养基和更广泛的培养条件;
- 直接接种在选择性培养基上,可能会因生理应激或对微生物造成了损害而导致不生长;
- 切记某些污染源可能季节性变化,如可能会遇到的微生物污染源和微生物类型。

表 A.1 中罗列了培养基和培养条件的示例。

表 A.1 培养基和培养条件示例^a

微生物的类型	固体培养基	液体培养基	培养条件 ^b
非选择性需氧菌	大豆酪蛋白消化琼脂 (胰蛋白胨大豆琼脂) 营养琼脂 血琼脂 葡萄糖胰蛋白胨琼脂	大豆消化酪素肉汤 (胰蛋白胨大豆肉汤) 营养肉汤	30 ℃~35 ℃培养 3 天~7 天
酵母菌和霉菌	沙保罗葡萄糖琼脂 麦芽提取琼脂 孟加拉红琼脂 氯霉素琼脂 大豆消化酪素琼脂 (胰蛋白胨大豆琼脂) 马铃薯葡萄糖琼脂	沙保罗葡萄糖肉汤 麦芽提取物肉汤 大豆消化酪素肉汤 (胰蛋白胨大豆肉汤)	20 ℃~25 ℃培养 5 天~7 天
厌氧细菌	强化梭菌琼脂 ^c Schaedler 琼脂 ^c 预还原血琼脂 ^c 兼性厌氧菌琼脂 ^c Wilkens-Chalgren 琼脂 ^c	罗伯逊肉汤 液体硫乙醇酸盐肉汤	30 ℃~35 ℃培养 3 天~7 天
^a 本表资料并不详尽。 ^b 所列培养条件表明了所列微生物类型常用的条件。 ^c 在厌氧条件下培养。			

宜注意所有非选择性厌氧培养法也可能使兼性厌氧微生物生长。

A.6.1.4 微生物计数

见 B.6。

A.6.2 生物负载的微生物鉴定

产品生物负载所需微生物鉴定的程度要基于数据所用目的。

可用一系列方法对包含有医疗器械上或医疗器械内的生物负载的微生物进行微生物鉴定。形态学、革兰染色和芽孢染色反应及简单的生物化学反应(如:过氧化氢酶、氧化酶、吡啶)等传统试验的分离菌鉴定通常提供微生物属于哪个科或属的指征,更加复杂的生物化学、血清学及分子检测可确定分离菌的属或种水平。

表 A.2 提供了常用的分类方法资料。

表 A.2 常用生物负载分类方法

方法	举例	特异性
染色特性	革兰染色、芽孢染色	低至中
细胞形态学	杆状菌、球菌	低至中
菌落形态学	形态、颜色、组织结构	低至中
选择性培养	芽孢热休克、选择性真菌琼脂	中至高
分离菌鉴别	属和种	高

A.7 生物负载测定方法的确认

A.7.1 在通常情况下,在生物负载测定方法确认过程中,标准的传统微生物方法对使用者提出了要求。通常没必要对传统的微生物方法进行确认,而是建立适用的方法,以及证明人员的工作能力。若适用,适当的阳性及阴性参考控制微生物或化学制品也包含在内。

通常,鼓励实验室使用例如药典、ISO、AOAC、ASTM 等公布的国家标准和国际标准中所描述的方法。标准或参考测试中规定的认可参考方法已经经过了实验室间比对,因此,使用认可方法的实验室只需在这些方法使用的独特条件下验证其准确性和可靠性。

确认过程中所有用于控制的测试微生物菌株都宜从公认的菌种保藏库中得到。

A.7.2 主要有两种对从医疗器械上采集检测微生物有效性验证的方法。这些方法是:

- 样品产品的重复处理;
- 对回收程度量化评估后,对已知微生物污染水平的产品进行培养。

第一种方法优势在于利用自然形成污染的微生物,但它经常需要一个相对较高的初始生物负载。第二种方法为试验建立一个模型系统,此系统使用的问题是它能否与实际自然状态相符,但该方法可以用于自然污染水平较低的产品。

生物负载测定中选用的培养条件(也就是培养基和培养条件)不一定能够检测出所有的潜在微生物。因此,实际上生物负载估计偏低是不可避免的。尽管如此,还是要选择适宜的培养条件。

评价培养条件的方法之一包括在对生产工艺、环境和材料了解的基础上选择培养条件,然后对在这些培养条件下计数得到的微生物与其他培养基和培养条件组合条件下检测出的微生物进行比较。若该方法表明只对小比例生物负载进行了计数,宜重新考虑推荐的培养条件以达到测定最优化。尽管如此,该方法能用于生物负载水平低的产品。

关于计数的进一步指南,参见 B.6。

生物负载测定只是对产品上生物负载的一个估计。对特定技术而言,提高回收率时,能增加生物负载测定的准确度。由于存在多种能用于采集微生物的技术,通过某一特定技术才能得到的回收比率是决定要使用的技术的一个因素。若发现回收率低于 50%,宜考虑技术改进或使用替代技术。应注意存在回收率不可能高于 50%的情况。

当选择用于环境和工业微生物的微生物鉴定技术时,实验室人员宜注意:

- 已改进的主要用于临床设置的试验和工具套装的适宜性;
- 实验室对生物化学试验中微生物表现出极低的新陈代谢活动结果的解释能力(如非发酵革兰阴性细菌)。

A.8 生物负载的常规测定和数据分析

A.8.1 为证明对微生物特征已进行和保持了有效控制,宜制定监测产品和(或部件)过程。

对生物负载水平的常规监测通常使用 3 个~10 个样品量。

样品量的合理选择主要依靠两个方面:

a) 检测到的生物负载的变化;

注:这取决于生物负载水平变化(增加或减少)的结果以及如何应用生物负载信息。为对平均生物负载水平的小变化进行早期检测,可能需要一个大的样品量。

b) 个别样品上可存活微生物估计数量的变化。

注:这种差异程度将决定检测一个给定变化所需的样品量。在这些估算量中,小变量所需的用于检测变化的样品量比大变量所需的样品量要小。

表 A.3(仅作为一个实例)说明了样品量和生物负载变异性如何影响检测生物负载量值的给定变化的能力。很显然,检测明显变化时,大样品量能提高信任度。

表 A.3 采用休哈特控制图检测生物负载水平的 10 倍变化(改变样本量和样本内变异性) 获得生物负载数据的概率

样品 数量	样品内变异							
	标准偏差							
	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
3	0.997 23	0.908 26	0.678 71	0.454 92	0.299 57	0.201 88	0.141 08	0.102 41
4	0.999 88	0.977 25	0.841 34	0.630 56	0.443 20	0.308 54	0.218 35	0.158 66
5	1.000 00	0.995 20	0.929 51	0.766 32	0.577 06	0.418 82	0.303 11	0.222 45
6	1.000 00	0.999 11	0.971 22	0.860 48	0.691 21	0.524 66	0.390 37	0.290 98
7	1.000 00	0.999 85	0.989 03	0.920 67	0.782 20	0.620 65	0.475 97	0.361 58
8	1.000 00	0.999 98	0.996 06	0.956 74	0.850 97	0.703 86	0.556 74	0.431 89
9	1.000 00	1.000 00	0.998 65	0.977 25	0.900 73	0.773 37	0.630 56	0.500 00
10	1.000 00	1.000 00	0.999 56	0.988 41	0.935 43	0.829 67	0.696 25	0.564 46
11					0.958 90	0.874 06	0.753 37	0.624 24
12					0.974 34	0.908 26	0.802 06	0.678 71
13					0.984 25	0.934 09	0.842 83	0.727 59
14					0.990 49	0.953 24	0.876 44	0.770 85
15					0.994 34	0.967 21	0.903 77	0.808 66

注:表 A.3 是以下列为基础编制的:
 ——生物负载估计的对数变换;
 ——标准休哈特(Shewhart)控制图的使用;
 ——变换后数据符合正态分布;
 ——生物负载呈 10 倍增长;
 ——样品平均值取大于三西格马控制极限的一个值。

应意识到检测一给定的量变化时生物负载数据的使用方式会影响要求的置信水平。宜合理选择要检测的变化值以及为实现那种检测的可能性。

通过考虑各种因素对监测频率作出合理选择,这些方面包括:

- 历史数据的可用性;
- 数据生成目的;
- 制造过程特性;
- 产品生产频率;
- 及时检测生物负载变化的临界状态;
- 季节和环境变化。

可以定期(例如:每月)或者按生产量(如每隔多少批次)频率进行取样。但是为了建立基线水平,在新产品生产初期通常以一个较高的频率测定生物负载,并且随着对生物负载的了解,频率会随之递减。

生物负载的测定频率宜能对例如因季节变更、生产变化或材料改变引起的生物负载中的变化进行检测。

A.8.2 当选择生物负载的测定方法时,宜考虑产品上或产品内可能出现生物膜。混入生物组织的医疗器械会有生物膜出现的可能性。与液体接触可能会在产品上或产品内形成生物膜。

A.8.3 见 A.6.2。

A.8.4 无指南。

A.8.5 当相关数据超过指定的限值时,应采取预定的措施。若纠正措施导致影响生物负载的工艺变化,宜重新取数据并重新对产品建立范围。

基于产品的历史数据限定用于生物负载的范围。缺少该历史数据时,可根据对给定产品的头三批产品评估来设定临时范围。一段时间后宜基于连续的试验数据对验证初始范围是否适当进行重新评估。

对一给定产品,由生物负载测定得到的数据可能不会严格服从一个公认的数学分布。尤其是某些数据出现许多零计数(有少许高计数),并且描述该生物负载数据的直方图会呈现右偏分布。若一组给定数据服从数学分布,那么可以相应地设定数据上限。因此能够选择生物负载的概率上限(概率极限大约为 95%或 99%),并且若生产过程持续运行在用于获得历史数据的同一方式下,该上限不宜超过该限值。

在不适合数学分布的情况下,则有可能,将控制图示法的原理应用到由生物负载测定所获得的数据,并且据此设定极限值。控制图的绘制不严格取决于任何优先假定的分布。标绘在控制图上的数量值是平均和标准偏差(或者范围)。平均值的分布比个别数值的分布具有更对称的趋势。原始数据的变换可以进一步改进标准休哈特控制图的适用性。使经验分布适合这些数据组/数据集的经验表明,单个计数可能适合下列两种转换。

- a) 对于生物负载总平均数小于 10 CFU/单位的产品,改进对称性的转换见式(A.1):

$$Y = \sqrt{N} \lg(\sqrt{x/N} + \sqrt{x/N+1}) \quad \dots\dots\dots (A.1)$$

式中:

Y —— 变换后的值;

x —— 未变换的初值;

N —— 基于方差的换算系数,且等于(均值)²/(方差-均值)。

对于历史平均数超出历史(组内)变量的情况,忽略变换,因为常量 N 将是不确定的/未被定义的。

- b) 对于生物负载总平均数超过 10 CFU/单位的产品,分布可能再次趋向于不对称,且带有向右偏的长尾;实际上,这些数据可以通过一个对数正态分布达到最佳的近似。实际上,取单个计数的对数将会使这些数据接近一个正态分布。因为可以观察到零的生物负载计数,所以,在取对数前,应将一个 0.1 的正常数加到所有计数上。那么,所提议的变换成见式(A.2):

$$Y = \lg(x + 0.1) \quad \dots\dots\dots (A.2)$$

式中:

Y —— 变换后的值;

x —— 未变换的初值。

对于一个产品,在收集到足够数量的历史数据后,就可以建立平均生物负载的一个休哈特控制图的控制限(控制图绘制步骤参见 GB/T 4091 和 GB/Z 4887)。若对于一给定产品,不能得到足够数量的历史数据时,可以根据较少的数值建立条件性控制限。当可得到更多数据时可以修正该限值。在适当情况下,设定限值时宜考虑到季节性差异。在设定极限值时,凡是确定为类似离群数据,应被排除在外。

应调查被确定为异常大或者异常小的数据。如果这些数据被认为是非实验室误差或者是制造过程中发现的偶然高值,那么,可以认为该数据是离群数据,并且可以在设定生物负载检测限值时的计算中忽略该数据。当为了与质量相关的决策而对生物负载数据进行分析时,分析中宜包含个别试验结果,诸如“无菌生长”或者“无法计数”(TNTC)。

A.8.6 将一段时间所采集的数据用图形表示,则能够有助于区别实际趋势和采样变化性。图示法也可以显示:即使生物负载值在预定的极限范围内,但微生物总数仍然发生了重大变化。

在对由生物负载测定所获得的数据进行统计计算之前,特别是在许多观测值被记录的位置,有必要以适当的方式处理这些数据,以便能够展现出它们的重要特点。通过将测量值分组,形成频率表和频率图,从而就可以以定性的方式处理这些数据。一旦上述步骤完成,就能够检测数据的趋势。

有许多适用于生物负载的趋势方法。这些趋势方法可以包括但不限于休哈特控制图、基于范围的控制(BOR)或者累积和图(GB/Z 4887)。在这些不同的方法中,每一种方法均能够用于建立常见的结果随机分布的可能偏移,并且突出偏离技术指标的结果。

在某些情况下,适当的做法是:采用一种以上的方法来确定是否需要根据有效的数据集采取措施或者是否需要额外的数据。

A.8.7 依照 YY/T 0287—2003 中 8.1 的要求,应制定和执行适当的测量与分析方法,包括选择合适的统计方法。对于通过对广泛的产品进行生物负载测定所得到的数据,检查这些数据将会举例说明这些数据的变异性。组内所有项中由每一组得到的测定值都不同,因此,数据分析通常使用平均值。明显地,这些平均值可以取高值、中间值或者低值,而且平均值将随时间而变化。此外,组成生物负载的微生物的类型也会不同。

对于由生物负载测定所得到的数据,其常见的频率分布特点是:分布极不对称,并且常常显示极长的尾。对于低值或者中间值数据,最常见的值是零,这种情况下,即使实施了有效的控制措施,但是生物负载通常低,但有许多偶然高值。

这些偏态频率分布的极端不对称意味着基于对称分布建立的质量控制技术并不总是适当的。可能有必要为个别情况制定特殊的统计方法:

- a) 利用变换法对数据进行对称分布,并应用标准技术;或
- b) 开发一种特别适合不对称分布的新技术。

A.9 生物负载测定方法的维持

无指南。

附录 B
(资料性附录)
生物负载的测定方法指南

B.1 总则

B.1.1 生物负载测定能在多种情况下进行。负责进行该类测定的人员宜考虑到在确定了取样速率、培养基特性、培养条件以及研发和确认方法的适用范围的特殊情况下所做的测定。

B.1.2 生物负载测定过程的关键步骤顺序在图 B.1 中说明。负责进行测定的人员应利用原材料、部件、生产环境、生产过程以及产品特性等知识为不同的步骤选择适当的技术。

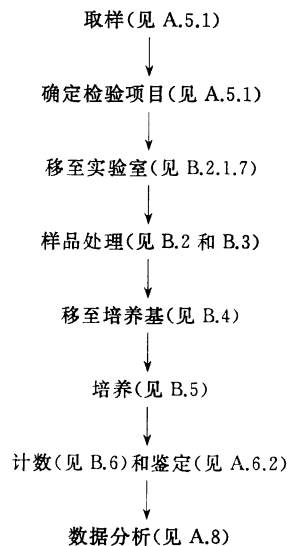


图 B.1 生物负载测定过程中关键步骤的顺序

B.2 采集微生物应用的方法**B.2.1 总则**

B.2.1.1 本附录中所描述的几种方法可以组合使用,以增加可发现的微生物的数量,同时减少变异性。

B.2.1.2 微生物对表面的附着度受表面的特性、微生物自身和存在的其他材料(例如:润滑剂)的影响。污染源也会影响到附着程度。为了采集微生物,所使用的处理方法包括漂洗(同时施以物理力)或直接的表面取样。表面活性剂可用于提高回收率,但应认识到,较高浓度的表面活性剂可能对微生物的生长有抑制作用。

B.2.1.3 对于与非无菌液体接触的材料,微生物会以生物膜的形式出现。在生物膜的结构中,微生物被牢固附着于材料表面上的被囊状包围。生物膜状微生物可以表现出更强的抗灭菌性。在进入机体组织的医疗器械上或者在所使用的器械上,生物膜能在几分钟内形成并扩展到相当大的范围。这种情况下,应考虑生物膜形成的可能性,且不宜认为 B.2.2 中所述的处理方法能将所有微生物从生物膜中释放出来。在对采集技术的确认过程中,若重复回收过程中重复记录到较高微生物数,则表明有生物膜出现。

B.2.1.4 在生物负载测定中所用的任何处理都宜有重现性,并宜避免可能影响微生物活性的条件,诸如过分空化、剪切力、温度上升或渗透振动。

B.2.1.5 有些处理比其他方法更易于控制。当选择一种处理方法并且设计合适的处理条件时,应考虑控制处理方法的变量和方式。例如,对于一个给定的方法,可以延长时间或调整机械搅动的特性来提高微生物的回收。

B.2.1.6 某些处理方法可能会分解待测产品(如碎裂、袋蠕动和涡旋)。分解的材料会致使微生物计数困难。这时需要进行其他处理,如将分解的材料从洗脱液中分离出来。宜注意要保证得到的计数具有代表性。

B.2.1.7 宜尽快将试验样品移至实验室。如果一定要推迟转送,试验样品的保存条件宜避免微生物的丢失或改变。宜规定贮存最长时间。干燥能成为微生物数量明显减少的原因,所以在选择贮存条件和贮存时间时宜加以考虑。

B.2.2 采集技术

B.2.2.1 袋蠕动

B.2.2.1.1 将试验样品和一已知体积的洗脱液装在一个无菌均质袋中。开动往复式搅棒,使洗脱液贯穿试验样品内外。

B.2.2.1.2 宜规定处理时间。

B.2.2.1.3 该方法尤其适用于软质、纤维和/或吸附性材料,但可能不适用于能刺破袋的任何材质(如带针或含有坚硬部分的器械)。

B.2.2.1.4 若使用了较大量的洗脱液,可能会生成含有低浓度微生物的悬浮液。宜使用膜过滤法滤掉洗脱液。

B.2.2.2 超声波洗脱

B.2.2.2.1 将试验样品浸入装有已知体积洗脱液的适当容器中。将容器连同内装物一起在超声波清洗器中进行处理,或将超声波探头浸入到容器内洗脱液中进行处理。超声波也能使微生物失去活性,尤其是大能量传输时,使用超声波探头会比超声波清洗器更有可能使其失去活性。根据 B.9 要求宜验证超声法。

B.2.2.2.2 宜规定超声处理的常规频率和处理时间。而且,还宜规定试验样品在超声波清洗器中的安放位置。宜注意限制同时进行处理的试验样品数量,以便阻断超声处理源。

B.2.2.2.3 该方法尤其适用于不透液体的固体试验样品以及形状复杂的产品。该方法对某些医疗器械可能产生破坏作用,尤其是对带有电子部件的器械,如植入式脉冲发生器。

B.2.2.2.4 超声处理能量和超声处理持续时间不宜太强或太长,以免破坏微生物并导致死亡,或是使洗脱液过热。

B.2.2.3 振摇(机械或手工方式)

B.2.2.3.1 将试验样品浸入装有已知体积洗脱液的适当容器中,并用机械振动器(如往复式、轨道或机械腕摇床)进行振摇。也可用手工振摇,但其效力会因操作人员而异。

B.2.2.3.2 宜规定振摇时间和频率。

B.2.2.3.3 可以加入一定大小的玻璃微珠增加表面磨损,由此提高回收效率。加入的玻璃微珠的大小以及振摇时间和频率不宜导致过饱和/或对微生物造成可能的破坏。

注:增加玻璃微珠将增加微生物可附着的表面积。

B.2.2.4 涡旋混合

B.2.2.4.1 将试验样品浸入装有已知体积洗脱液的密闭容器内,该容器压在放置在涡旋混合器的旋转垫上以形成涡旋。涡旋的形成取决于手动施加的压力。涡旋中的变化会使微生物洗脱产生差异。

B.2.2.4.2 宜规定所用容器、混合时间以及设定的混合器的速度。

B.2.2.4.3 该方法操作简单快捷,但仅适用于小的试验样品。

B.2.2.5 冲洗

B.2.2.5.1 让洗脱液通过试验样品的内腔。可以靠重力或泵来使液体流动。另外也可将洗脱液充入产品中,夹住并抖动。

B.2.2.5.2 宜规定器械与洗脱液的接触时间、冲洗速度及液体体积。

B.2.2.5.3 器械结构及腔体尺寸会限制从内表面完全移除微生物所必需的冲力。

B.2.2.6 搅切(碎裂)

B.2.2.6.1 将试验样品浸入装有已知体积洗脱液的适当容器内。在规定的一段时间内搅切或振摇试验样品。

B.2.2.6.2 根据试验样品和搅切器来规定搅切时间,但不宜超过会导致洗脱液过热和对微生物造成破坏的时间。

B.2.2.6.3 该技术提供了将试验样品分成足够小的部分的方法,以便通过接种平板培养技术对微生物进行计数。

B.2.2.7 擦拭

B.2.2.7.1 含有吸附性材料的棉拭子通常被固定于杆或把手上。样品材料可以是可溶性的或不可溶性的。

B.2.2.7.2 通常使用的方法是用洗脱液湿润棉拭子,并用棉拭子擦拭界定好的试验样品的表面。在有些情况下,可以先润湿表面,然后用干棉拭子擦拭,这样可提高回收效率。然后将棉拭子转放至洗脱液中并搅动,使棉拭子上的微生物洗脱。另外,若使用的是可溶性棉拭子,拭子会溶解到稀释液中。

B.2.2.7.3 擦拭法是对不规则形状产品或难接近的区域取样的一个有效方法。该方法也可用于大面积区域的取样。

B.2.2.7.4 该方法会因擦拭方式的不同而更易出错。而且,通过擦拭不可能将表面上的全部微生物都收集起来。有些微生物会被棉拭子本身吸附,以至于不被检测到。

B.2.2.7.5 棉拭子中不宜含有灭菌剂或抑菌剂。

B.2.3 洗脱液、稀释液和转送培养基

B.2.3.1 在生物负载测定过程中,洗脱液用于从产品上取下微生物。用转送培养基可将洗脱下的微生物移去计数,用稀释剂则可获得含有可计数微生物的悬液。

B.2.3.2 洗脱液和稀释剂的特性对所用方法的总体效率有明显影响。选择稀释剂和洗脱液时,宜注意它的成分(如组分、浓度、渗透压和pH值)。这些成分不宜使微生物增殖或失活。

B.2.3.3 当用液体从固体表面洗脱微生物时,可考虑结合使用表面活性剂。

B.2.3.4 常用的洗脱液和稀释剂见表B.1。

表 B.1 洗脱液和稀释液示例

溶液	水中的浓度	应用
缓冲蛋白胨水	0.067 mol/L 磷酸盐； 0.43%氯化钠； 0.1%蛋白胨	通用
六偏磷酸钠林格氏溶液	1/4 强度	溶解海藻酸钙拭子
蛋白胨水	0.1%~1.0%	通用
磷酸盐缓冲溶液	0.02 mol/L 磷酸盐；0.9%氯化钠	通用
林格氏溶液	1/4 强度	通用
氯化钠	0.25%~0.9%	通用
硫代硫酸盐林格氏溶液	1/4 强度	中和余氯
水	不适用	稀释含水样品； 计数前制备可溶材料的等渗压溶液

注：此表并未包括全部。表面活性剂，如聚山梨醇酯(Tween)80 可以添加到洗脱液和稀释液中。根据具体的应用，通常浓度在 0.01%~0.1%之间。应使用适当浓度的表面活性剂，并加以特殊处理以防止泡沫形成。

B.3 不使用洗脱液进行微生物采集的方法

B.3.1 接触板

B.3.1.1 接触板或玻璃片可用凝固的培养基放在样品表面上，使存活的微生物能附着到该培养基的表面，然后再培养接触板或玻璃片，至形成可计数的菌落。

B.3.1.2 该方法优点在于使用方便。结果与凝固培养基的接触表面直接相关。

B.3.1.3 表面上自然集聚的细胞群、菌落在琼脂表面散布，琼脂干燥，可能存在厌氧菌等都是潜在的不利因素。

B.3.1.4 由于该方法的回收率通常较低，只有在其他方法不适用的情况下才宜使用。接触板和玻璃片通常只适用于平的或规则的表面。

B.3.2 琼脂覆盖

B.3.2.1 当生物负载低以及产品构造适合时，在产品的表面涂上熔化的琼脂培养基(45 ℃左右)并固化，培养至产生可见菌落。

B.3.2.2 表面上自然集聚的细胞群、菌落在琼脂表面散布，琼脂干燥，可能存在厌氧菌等都是潜在的不利因素。

B.3.3 最大可能数(MPN 法)

B.3.3.1 MPN 法是一种沿用已久并有充分文献根据，用于估算在产品内随机分布的存活微生物数量的方法。它主要用于食品和水产品等行业(与液体、粉末和半固体的产品或者原材料一起使用)。这种方法尤其适用于生物负载平均数低的产品。

B.3.3.2 这种方法包括(按体积或者重量)对产品进行重复取样，其中每次取样的样品中均含有相同数量的可存活微生物(因而要求分布的随机性)，然后将样品转到液体培养基并培养，单独记下有可存活微

生物存在的每个样品。当具有足量的洗脱液,可将其一系列的稀释液接种于营养培养基中,使部分接种的培养基在随后的培养中不产生可见生长。用表现出生长的稀释度,估算出样品中或产品取样的绝大部分中存在的存活微生物的数量;关于此估算值,95%的可信区间是相对宽的。该估算和其置信界限来自 MPN 表格(DeMan^[18]),此表是在一定的假设条件下编制的,即根据泊松分布原理,重复取样样品中存在的可存活微生物的数量是围绕一个平均数量分布的。

MPN 方法应用的关键要求是微生物总数在整个(研究中的)产品上随机分布。因此,对于液体用的医疗器械、黏性液体、粉末,或在单一产品使用如洗脱液等液体估算生物负载的情况下,MPN 方法可以有生物负载测定值。但是,这种方法并不普遍适用于在固体医疗器械上的生物负载测定。典型的情况是,在这些器械上构成低平均值生物负载的若干微生物的分布通常是随机的,一个总数的微生物总是有高比例的不可检测的有机物和少量的带“峰值”的微生物(实质构成平均值生物负载)。在 MPN 的应用中,“峰值”将会被简单地记录为一个正值,因而,只以公式化的方式构成此平均值,而不是用数字表示。这可能导致对生物负载估计过低,而得出一个不符合要求的结果。

B.3.3.3 MPN 法易于操作,并且该方法是基于统计学,所以它更适用于一般性评估而不是精确测定。

B.3.3.4 若存在杀菌或抑菌物质,B.8 中关于这方面略述的考量会适用。

B.4 移至培养基

B.4.1 总则

B.4.1.1 经处理后,通常在洗脱液中会生成微生物悬液。可用下列描述的方法检查其中的存活微生物并进行计数。

B.4.1.2 在移入培养基之前,还应进行额外的处理,以便将聚集的微生物分解开来,以减少低估。在某些情况下,从试验样品上采集微生物的方法也会分解这种聚集。

B.4.1.3 灭菌或抑菌物质的存在可能会影响对培养方法的选择。若洗脱液中存在灭菌或抑菌物质,可通过稀释的方法将其降低到一个无效的浓度,或通过过滤的方法去除或用化学方法使其失活。

B.4.2 膜过滤法

B.4.2.1 洗脱液过滤后,将滤器放到适宜的培养基上进行培养,形成可见菌落,是对存活微生物计数的一种有效方法。通常,孔径不大于 0.45 μm 的过滤器适于采集微生物。

B.4.2.2 通常需要一个真空源,某些时候需要压力源。宜注意避免负压过大而使过滤膜变形或损坏。

B.4.2.3 对含有类似纤维状产品残留物等微粒的洗脱液进行膜过滤可能比较困难,因微粒会阻塞过滤器。

B.4.2.4 进行培养时,可将膜过滤器放置在琼脂表面或者放在浸泡了液状营养培养基的吸附纸上。可以对膜过滤器表面上形成的菌落进行计数,也可从滤膜上分离出来进行定性。

B.4.2.5 膜过滤法更适用于微生物浓度较低的悬液。

B.4.2.6 从洗脱液中采集微生物时,当怀疑液体培养基中含杀菌或抑菌物质,则宜用膜过滤法,先将洗脱液中的微生物过滤出来,并且能够在培养前对过滤膜上的微生物进行冲洗。但有些类型的过滤膜能吸收或释放抑制微生物生长的物质,所以只使用适于微生物计数的膜过滤器,且膜过滤器与洗脱液宜相容。

B.4.3 平板倾注

B.4.3.1 使用平板倾注技术,将一定量的悬浮液在约 45 $^{\circ}\text{C}$ 的温度与融化的琼脂相混合,然后倾注到平板放至凝固。对平板进行培养至菌落形成并进行计数。

B.4.3.2 平板倾注并不能将微生物从洗脱液中分离出来。若存在杀菌或抑菌物质,需考虑的事项如

B.8 中所示。

B.4.3.3 可平板倾注的洗脱液量受限制,因此,这种方法对低浓度微生物的悬浮液达不到所要求的灵敏度。

B.4.4 平板涂抹

B.4.4.1 平板涂抹技术是用涂抹器将一定量悬液涂在固体培养基表面。

B.4.4.2 涂在培养基表面上的悬液被吸收,才能形成离散的菌落;吸收决定了一只平板所能处理的悬液体积。

B.4.4.3 若存在灭菌或抑菌物质,B.8 中关于这方面描述的考量会适用。

B.4.4.4 平板涂抹的洗脱液量受限制,因此该方法对微生物浓度较低的悬液达不到要求的灵敏度。

B.4.5 螺旋涂板

B.4.5.1 螺旋涂板技术运用自动装置将一定量微生物悬液涂在固体培养基表面上。悬液涂抹是以递减的速度从培养板中心以螺旋线轨迹向周边运动。经过培养后,对全板或部分板,运用专用的计数栅和计数技术来统计原始悬液中的存活微生物数量。

B.4.5.2 用螺旋涂板技术所得出的结果具有重现性,它与传统的连续稀释法和表面涂抹法得出的结果具有良好的一致性。由于器械的设计及毛细管和小容量(悬液)的使用,螺旋板主要用于完全分散的、无凝聚体的且含有高浓度微生物的悬浮液的计数培养。

B.4.5.3 若存在灭菌或抑菌物质,B.8 中关于该方面略述的考量会适用。

B.5 培养(培养基和培养条件)

B.5.1 表 A.1 中列出了培养基和培养条件的示例。

B.5.2 宜注意所有非选择性厌氧培养法也会使兼性厌氧微生物生长。

B.6 计数

B.6.1 在使用计算菌落的计数技术中,应建立针对各种情况的过程,如:

- a) 检测小菌落(例如使用立体显微镜);
- b) 计算和报告异常聚集物(如涂抹器);
- c) 列举和报告密集的平板(例如太多而无法计数);
- d) 报告连续稀释后的计数。

B.6.2 在使用计算菌落的计数技术中,宜考虑到平板上产生的菌落数。菌落数宜是能将其自身表示而不受邻近菌落影响的一个可见菌落。

B.6.3 标准的平板计数惯例/准则通常指定一块平板上的菌落数量的下限。该限值不一定适用于微生物污染低的医疗器械的生物负载测定。

B.6.4 宜评估不同技术人员所得出结果之间的差异。技术人员之间结果的偏差可高达 10%。

B.6.5 纤维的存在可能会影响离散菌落的形成,致使计数困难。

B.6.6 对于自动计数方法,宜根据 GB/T 27025—2008 对系统进行确认。

B.7 检测微生物的其他技术

估计生物负载时还可使用菌落计算以外的其他技术。这包括测定新陈代谢物的活性(例如新陈代

谢物测定或落射表面荧光)。这些技术称为“间接法”,为了建立起与以往确定的存活微生物数量的关系,它们应对照菌落计数进行校准。替代技术宜对检测低水平微生物有足够的敏感度。一般来说,所检测到的微生物数量的下限超过 100 CFU。

B.8 监控影响生物负载测定的物质释出

B.8.1 监控的目的是为了研究从产品释放到悬液中的物质对脆弱的微生物生存能力的影响。这也是根据 6.1.2.3 评估一项技术的方法之一。

B.8.2 选用的每一灭菌产品,都宜能按照常规使用的微生物采集技术进行操作。若采集技术使用洗脱液,可按照 B.8.3 中规定的过程进行,反之,若产品是直接放入到培养基中,按照 B.8.4 中的规定进行会更合适。

B.8.3 洗脱液宜既不促进也不抑制由产品上采集的微生物的生长。为确立洗脱液的作用,宜接种已知少量微生物到产品上,然后在洗脱液中放置一段时间,这段时间应当与平常的生物负载确认时间相等。在试验的最后,计算被回收的微生物。药典详述了可以使用的微生物。对结果的评价参见 B.8.5。使用的微生物数量宜约为 100。

B.8.4 如果产品是直接放入回收的培养基中(例如在 MPN 估计时,参见 B.3.3),可以用药典中描述的抑菌试验。试验中,产品连同少量微生物一起放入到培养基中,并在常规生物负载测定时建议的条件下进行培养。使用的微生物数量宜约为 100。对结果的评价参见 B.8.5。经过规定的时间后,观察培养基是否有明显生长。

若医疗器械中含有了能缓慢释放到培养基中的抗(抑)菌物质,则在培养期间的最后阶段对混合了少量微生物的培养基进行挑战试验。

B.8.5 若接种微生物数量和回收数量有很大不同,或在抑菌试验中发现微生物不生长,宜重新考虑使用的微生物测定技术。如有必要则加入稀释法、中和法或过滤法去减少、阻止或去除抑制物质。

B.9 监测物理力的不利影响

物理力用于采集产品上的微生物(见 B.2.2)。宜评价这些力对生物负载估计值的影响。将物理力作用于已知数量的少量微生物(大约 100 CFU),测出物理力对微生物计数的影响。但还应将洗脱液对从产品上采集的存活微生物的影响考虑在内。

附 录 C
(资料性附录)
生物负载方法的确认

C.1 用重复回收进行确认

注：本方法使用了确认过程中产品上自然形成的生物负载。有时该方法是指“极限回收”。

C.1.1 在开始确认之前，宜确定从产品上采集微生物的技术，并形成文件。

C.1.2 宜对测定回收率的产品或部件进行选择。宜对被选择的每一产品采用该技术。该技术是确定生物负载常用的技术。

C.1.3 确定出产品的生物负载估计值后，再将该技术应用于同一产品来确定是否还有微生物可被采集。该技术应用于同一产品的过程可重复进行一定的次数。

准确的重复次数取决于若干因素，包括产品特性、构成生物负载的微生物和初始污染水平。预试验可用于确定重复的次数。

C.1.4 在某些产品上，进行重复处理后有必要确定产品上是否还存在存活微生物。这可以通过以下方法实现：

- a) 用熔化的回收培养基涂在产品表面上，让培养基变硬，然后使产品在规定的培养条件下进行培养形成菌落并计数。
- b) 将产品浸于液体回收培养基中，在规定的培养条件下，检查是否生长。浸于液体培养基并培养后，若产品中的一小部分出现存活的微生物，可通过 MPN 方法来计数结果。但是若全部结果都表明有微生物生长，则不能采用 MPN 法，宜重新考虑确认方法。

C.1.5 首次应用采集技术后计数的菌落数可表示为全部菌落数百分率。

可计算每一产品检验部分的菌落数百分率，并用于确定回收效率。C.3 提供了一操作示例。

C.1.6 这种方法的理论基础是生物负载的确认方法宜重复进行，直到回收的微生物累计数量没有明显增加。每重复一次后，将产品上或产品部分上的洗脱液全部回收并计数。比较连续回收得到的累计结果。但是宜注意，本方法未必精确。产品上回收的微生物数量及实际存在的微生物数量之间的确切关系永远无法验证。

C.2 修正系数计算说明示例

C.2.1 本示例中，表 C.1 中列出了重复处理确认过程中的一组理想化数据。这些数据表示了一个医疗器械的 5 次平行结果。

表 C.1 某一医疗器械平行试验中重复处理测得的菌落数

处理	产品数				
	1	2	3	4	5
1	60	50	70	55	45
2	10	12	5	2	3
3	1	0	2	0	0

表 C.1 (续)

处理	产品数				
	1	2	3	4	5
4	0	1	0	0	1
琼脂覆盖	2	1	2	1	0
总的菌落计数	73	64	79	58	49

C.2.2 根据表 C.1 中的数据,取下率计算如下:

第一次处理:	60	50	70	55	45
回收总数:	73	64	79	58	49
第一次处理的回收率:	82%	78%	89%	95%	92%
第一次处理后的平均回收率=87.2%	范围为 78%~95%				

计算中已包括了琼脂覆盖得到的菌落数。某些医疗器械可能会无法应用琼脂覆盖。

C.2.3 运用首次处理后平均回收率,回收效率的修正系数见式(C.1):

$$\frac{100}{87.2} = 1.15 \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

有些应用中可使用平均回收率范围的最低值,以反映出最坏情况。这一决定将会影响数据的使用。

C.3 产品接种法

C.3.1 用接种产品进行确认

C.3.1.1 通过向产品接种一定数量选定的微生物,形成人工生物负载,用来建立回收率。微生物可以为细菌繁殖体,但最常用的方法是使用需氧菌芽孢。但实际上使用细菌繁殖体会有些困难,常因干燥失去活性。

C.3.1.2 宜制备给产品接种的微生物悬液,并测定其存活数。

用产品接种法进行确认所用的微生物选择:选用作为接种的微生物应能抵抗干燥,所以通常使用需氧菌芽孢。

C.3.1.3 宜制备该悬液的稀释液,并测定存活数。

应进行预试验来确定合适的稀释液。人工接种的微生物数量宜与产品上的自然污染相同。对具有较低生物负载的样品,悬液的适宜浓度是向产品上放少于 100 个存活微生物。

C.3.1.4 宜选择一定数量的用于测定回收率的无菌产品或部件。每一产品用一定量的微生物悬液进行接种,并可在层流条件下进行干燥(如对产品适合)。

若测试部分已经环氧乙烷灭菌,则宜充分通风以降低残留物的影响。宜使用预试验阶段中产品上洗脱出的任何抑制作用的物质进行研究。

悬液分布在产品上,宜包括最难取下自然污染物的部位。

微生物接种有很多局限性,如结壳、悬浮液粘连、凝集以及接种水平各异等。对产品进行接种时宜考虑到这些局限性。

对吸附性材料制成的产品进行接种时,可将其浸于所选微生物的悬液中。该方法能使微生物均匀分布在产品上。

C.3.1.5 采用规定的方法来确定从产品上采集的接种微生物数量。

C.3.1.6 采集的微生物数量用接种到产品上的微生物百分率来表示。可为每一产品计算百分率,并用

其建立回收率。

C.3.1.7 从直接接种生物负载回收率确认中得到的结果,不一定能准确模拟实际的生物负载回收率。

C.3.2 运用产品接种进行的修正系数计算说明示例

C.3.2.1 确认时,预试验表明生物负载非常低的情况选择使用产品接种法。

C.3.2.2 制备枯草杆菌黑色变种芽孢水悬液,并用最佳培养条件测定悬液中的存活微生物数。

C.3.2.3 制备悬液稀释液,每 0.1 mL 中含有 100 个芽孢。向器械所选部分接种 0.1 mL 该稀释悬液,并在层流状态下干燥。

C.3.2.4 使经接种的产品经受得住所选采集技术,采集的平均芽孢数是 35,其范围为 25~45 之间。

C.3.2.5 回收率的修正系数见式(C.2):

$$\frac{100}{35} = 2.9 \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

参 考 文 献

- [1] GB/T 4091—2001 常规控制图
- [2] GB/Z 4887—2006 累积和图 运用累积和技术进行质量控制和数据分析指南
- [3] GB 18280.1 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
- [4] GB 18280.2 医疗保健产品灭菌 辐射 第2部分:建立灭菌剂量
- [5] GB 18280.3 医疗保健产品灭菌 辐射 第3部分:剂量测量指南
- [6] GB 18281.2 医疗保健产品灭菌 生物指示物 第2部分:环氧乙烷灭菌用生物指示物
- [7] GB/T 19000—2008 质量管理体系 基础和术语
- [8] GB/T 19000.3—2008 软件工程 GB/T 19001—2000 应用于计算机软件的指南
- [9] GB/T 19974—2005 医疗保健产品灭菌 灭菌因子的特性及医疗器械灭菌工艺的设置、确认和常规控制的通用要求
- [10] ISO 17665-1 Sterilization of health care products—Moist heat—Part 1: Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
- [11] ISO/TS 11139:2006 Sterilization of health care products—Vocabulary
- [12] ISO 11737-2 Sterilization of medical devices—Microbiological methods—Part 2: Tests of sterility performed in the validation of a sterilization process
- [13] ISO 14160:1998, Sterilization of single-use medical devices incorporating materials of animal origin—Validation and routine control of sterilization by liquid chemical sterilants
- [14] ASTM D4855-97 Standard Practice for Comparing Test Methods
- [15] Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purposes of Patent and Procedure, Budapest 28th April, 1977, amended 26th September, 1980.
- [16] BONALSKY, J. R., A Model system for testing raw materials for microbial content., Pharm. Technol., 1980, vol. 4, No. 2, pp. 49-51.
- [17] COLLINS, C. H., LYNE, P. M. and GRANGE, J. M., Collins and Lyne's Microbiological Methods, 7th Edition, Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, 1995.
- [18] DEMAN, J. C., M. P. N. Tables Corrected. European J. Appl. Microbiol 1983; vol. 17; pp. 301-305.
- [19] HALLS, NA., et al., The Occurrence of Atypically High Presterilization Microbial Counts ("Spikes") on Hypodermic Products., Radiat. Phys. Chem., 1983, vol. 22, No. 3-5, pp. 663-666.
- [20] HITCHENS, A. D. and MISHRA-SZYMANSKI, A., AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation, Journal of AOAC International, vol. 82, No 2, 1999, pp. 402-415.
- [21] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods: Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95).
- [22] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods: Methodology (CPMP/ICH/281/95).
- [23] LUNDHOLM, M., Comparison of Methods of Quantitative Determinations of Airborne bacteria and evaluation of total viable counts. Appl. Environ. Microbiol. 1982; vol. 44, No. 1; pp. 179-183.
- [24] PDA BIOBURDEN RECOVERY VALIDATION TASK FORCE, Technical Report: Bioburden Recovery Validation, Journal of Parenteral Science & Technology, 1990, vol. 44, No. 6, pp.

324-331.

[25] PDA Technical Report No 33, Evaluation, Validation and Implementation of New Microbiological Testing Methods, PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology Supplement TR33, vol.54, No.3, May/June 2000.

[26] PULEO, J.R., FAVERO, M.S. and PETERSON, J.J., Use of ultrasonic energy in assessing microbial contamination on surfaces, Appl. Microbiol., 1967, vol.15, No.6, pp.1345-51.

[27] SOKOLSKI, W.T. and CHIDESTER, C.G., Improved Viable Counting Method for Petroleum-Based Ointments, J. Pharm. Sci., 1964 vol.53, pp.103-107.

[28] SHIRTZ, J. T., Sterility Testing, Pharmaceutical Engineering, November/December 1987, pp.35-37.

[29] USP 28/NF 23 2005, General Information, <1225> Validation of Compendial Methods, USP 28/NF 23, United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD, 2005.

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
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
GB/T 19973.1—2015/ISO 11737-1:2006

*

中 国 标 准 出 版 社 出 版 发 行
北 京 市 朝 阳 区 和 平 里 西 街 甲 2 号 (100029)
北 京 市 西 城 区 三 里 河 北 街 16 号 (100045)

网 址 www.spc.net.cn

总 编 室 : (010)68533533 发 行 中 心 : (010)51780238

读 者 服 务 部 : (010)68523946

中 国 标 准 出 版 社 秦 皇 岛 印 刷 厂 印 刷
各 地 新 华 书 店 经 销

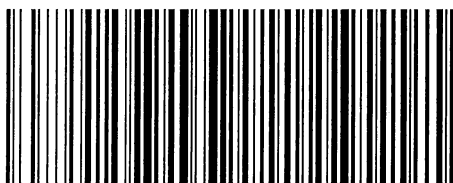
*

开 本 880×1230 1/16 印 张 2.25 字 数 58 千 字
2016 年 1 月 第 一 版 2016 年 1 月 第 一 次 印 刷

*

书 号 : 155066 · 1-51351 定 价 33.00 元

如 有 印 装 差 错 由 本 社 发 行 中 心 调 换
版 权 专 有 侵 权 必 究
举 报 电 话 : (010)68510107



GB/T 19973.1—2015