



中华人民共和国国家标准

GB/T 19973.1—2005/ISO 11737-1:1995

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

Sterilization of medical devices—Microbiological methods—
Part 1: Estimation of population of microorganisms on products

(ISO 11737-1:1995, IDT)

2005-11-04 发布

2006-04-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	I
引言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	2
5 产品单元的选择	3
6 技术的选择	3
7 技术选择	3
8 技术的使用	4
附录 A (资料性附录) 产品上微生物总量的估计指南	5
附录 B (资料性附录) 微生物学技术确认方法指南	14
附录 C (资料性附录) 参考文献	17

前 言

GB/T 19973《医疗器械的灭菌 微生物学方法》分为以下几个部分：

——第 1 部分：产品上微生物总数的估计；

——第 2 部分：确认灭菌程序的无菌试验。

另外部分将在以后公布。

本部分等同采用 ISO 11737-1:1995《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》。

由于 GB/T 19001—1994 和 GB/T 19002—1994 两份标准已经由 GB/T 19001—2000 代替，所以本部分做了相应改动。

本部分的附录 A、附录 B 是资料性附录。

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归口。

本部分主要起草单位：上海环境微生物控制工程研究所、上海市消毒品协会、济南医疗器械检测中心、广东省医疗器械质量监督检验所。

本部分主要起草人：徐荷、薛广波、田青、杨晓玲、吴平、李华、张扬。

引 言

无菌产品是指产品上没有活的微生物。当需要提供无菌产品时,要求卫生产品上哪怕偶然的微生物污染都必须减少到最低限度。虽然如此,依照卫生产品质量系统要求,在标准制造状态下生产的产品可能仍有微生物污染,尽管数量很少。这样的产品是有菌的,灭菌的目的就是清除微生物污染并将有菌产品转换为无菌产品。

用物理或化学制剂来灭活卫生产品上纯培养的微生物常常可得到接近于一个指数效应的关系,这就意味着微生物总是不可避免的以有限的概率存活下来,不管处理的程度如何,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、抵抗力以及在处理期间微生物存在的环境所决定的。

出于设计和发展质量系统的需要,保健产品的制造、安装和维修被记载于 GB/T 19001—2000(idt ISO 9001:2000)中。假如结果不能被随后的产品检验和试验充分证明,GB/T 19000—2000(idt ISO 9000:2000)系列则提供了某些用于制造的程序,因为程序的效能不能被产品的检验和试验所证明,灭菌就成为了一个特殊的程序。由于这个原因,在使用以前不得不对消毒程序进行验证,即包括常规控制的每一步程序和合适的设备状态。

在 GB 18278—2000(idt ISO 11134:1994)、GB 18279—2000(idt ISO 11135:1994)和 GB 18280—2000(idt ISO 11137:1995)中,详列了卫生产品消毒程序的验证和常规控制步骤。然而,必须注意到一点暴露于合适的验证和精确控制的灭菌程序,不是保证产品无菌的唯一的因素,而对于灭菌程序的有效验证和常规控制来说,留意微生物的挑战,包括存在程序中的数量术语、微生物的特性和性质,也是很重要的。

灭菌前微生物的污染是来自大量污染源的污染物的总和;因此,也应注意以下因素:刚进入的半成品和/或成分的微生物状况,它们的储存、生产、装配和包装的环境的控制。

“生物负载”一词通常用来描述存在于材料和产品上活微生物数。要确定精确的生物负载是不可能的,因此,实际上是用规定的技术进行活菌计数。借助于应用正确的因素对于材料或产品上生物负载进行估计相应的活菌数即是须完成的验证实验。

对生物负载的了解来自于对微生物污染水平的调查。生物负载估计在许多不同的情况下进行:它们是:

- a) 确认和再确认一个灭菌程序,生物负载的估计将直接关系到暴露于灭菌程序的程度;
- b) 确认和再确认一个灭菌程序,暴露于灭菌程序的程度将不直接关系到生物负载,但对生物负载应有所了解;
- c) 无菌产品制造程序的常规控制,其灭菌验证见上述 a);
- d) 无菌产品制造程序的常规控制,其灭菌验证见上述 b);
生物负载估计也可用于卫生产品制造过程中的质量系统;
- e) 综合的环境管理程序;
- f) 微生物清除程序效力的估计;
- g) 监控有菌产品供应的程序,规定了微生物的洁净度;
- h) 监控半成品,成品或包装。

一般来说,医疗器械生物负载的估计由下面 3 个不同的阶段所组成:

- 从医疗器械上洗脱微生物;
- 将这些微生物转入培养状态;
- 用随机的特性对微生物计数。

利用生物负载回收研究中计算出的校正数,计算灭菌前菌数的估计值。

由于设计和构成保健产品的材料的多样性,所以没有必要规定在所有情况下单独用一种技术来洗脱微生物。此外,选择的条件可能受污染类型的影响。

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

1 范围

1.1 GB/T 19973 的本部分说明了应用于估计医疗器械、半成品或包装上活的微生物总数的一般标准。这种估计包括两个方面：菌数的计算和定性。

注1：在常规应用之前，验证估计产品上微生物总数的技术。

注2：GB/T 19973 的本部分的附录提供了选择技术和方法的指导，这种方法可用于验证所选择的技术。

1.2 本部分不适用于计算和鉴定病毒性污染。

本部分不适用于对生产医疗器械的环境中微生物的监控。

注3：提请注意，质量体系的国家标准 GB/T 19001—2000(idt ISO 9001:2000)控制包括灭菌程序在内的生产过程的各个阶段。在生产中具有一个完整的质量体系不是本部分的要求，但要求具有这个体系的某些要素，并且在本标准条文中适当的地方有规范的引用。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过 GB/T 19973 的本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单（不包括勘误的内容）或修订版均不适用于本部分，然而，鼓励根据本部分达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本部分。

GB/T 19001—2000 质量管理体系 要求(idt ISO 9001:2000)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于 GB/T 19973 的本部分。

3.1

生物负载 bioburden

一件产品和/或包装上存活的微生物总数。

3.2

生物负载估计值 bioburden estimate

通过对活菌计数或灭菌前活菌计数加上一个回收效率补偿系数，得出的组成生物负载的微生物数值。

3.3

定性 characterization

将微生物分入到大类中的一般过程。

注4：按菌落或细胞形态、污染特性或其他特征进行分类。

3.4

修正系数 correction faction

用于对活菌计数或灭菌前活菌计数进行修正的数值，以补偿产品上无法完全洗脱的微生物，以便计算出生物负载估计值。

3.5

培养条件 culture conditions

包括培养时间、温度和培养基在内的一组条件,用于促进微生物的生长和繁殖。

3.6

医疗器械 medical device

由生产者设计成为下列目的应用于人的(不论是单独使用还是组合使用)任何仪器、设备、装置、材料或其他物品。包括使用所需软件,这些目的是:

- 疾病的诊断、预防、监护、治疗或缓解;
- 伤残的诊断、监护、治疗缓解或代偿;
- 解剖或生理过程的研究、替代或修复;
- 控制妊娠。

其他虽然不是通过药理学、免疫学或代谢手段作用于人体,但可在这些方法的应用中起辅助作用的器械。

3.7

灭菌前计数 presterilization count

灭菌前获得的存活菌数。

3.8

产品 product

原材料、半成品、部件和成品医疗器械的总称。

3.9

回收率 recovery efficiency

对某一特定的技术从产品上获取微生物的能力的测定值。

3.10

重新确认 revalidation

用于对已确认的程序进行再次确认的一系列文件化程序。

3.11

样品份额(SIP) sample item portion

从某一保健产品单元上取出的用于试验的部分。

3.12

确认 validation

用于获取、记录和解释某一过程生产出的产品符合预定规范的文件化程序。

注5:在生物负载估计中,“过程”是试验方法,“产品”是试验结果。对生物估计技术的确认包括一系列调查,来测定试验方法的有效性和重现性。

3.13

活菌计数 viable count

在规定的培养条件下,根据生长的离散菌落,估算出的微生物数。

注6:离散菌落不一定必须来自单一存活微生物。一个菌落不一定就是由一个存活微生物所形成的。

4 总则

4.1 文件

4.1.1 应保存所用的试验技术,以及相应仪器的使用和操作的文件化程序和规程,这些文件化程序和规程应按照 GB/T 19001 规定经批准和受控。

4.1.2 GB/T 19973 本部分所要求的文件化程序和规程应有效执行。

4.1.3 计算和数据转化应进行适当的校核。

注7：如果是用电子数据处理技术进行计算，使用之前所用软件应经确认并保存确认记录。

4.1.4 应按照 GB/T 19001 的规定，保存原始观察的记录、导出数据和最终报告。记录应包括取样、制备和试验人员的识别。

4.2 人员

4.2.1 根据 GB/T 19001 的规定，生物负载估算应由专业人员进行。

4.2.2 按照文件化程序进行试验，技术人员的有关资格、培训和资历的记录应予以保存。

4.3 设备

4.3.1 应具备规定试验的校核和测量所需设备的所有项目。

4.3.2 应按照文件化程序对所有需要按计划维护的设备进行维护，应保存设备维护记录。

4.3.3 应为所有具有测量与控制功能的设备的校准建立有效的体系并形成文件和维持。这一校准体系应符合 GB/T 19001 的要求。

4.4 培养基和材料

应建立生物负载估算(包括适宜的质量试验)所用的材料制备和灭菌方法，并形成文件。

注8：适宜的质量试验应包括各批培养基的生长促进试验。

5 产品单元的选择

5.1 产品单元的选择

应建立选择和获取试验产品单元的程序，以保证这些产品单元对常规生产具有代表性。

5.2 样品份额(SIP)

如果所用的样品份额(SIP)小于一个完整的产品单元，则应选择代表产品单元的具有微生物的部分。如果已验证微生物在产品单元上是均匀分布的，应从产品单元上任一单一部位选择样品份额。在缺少这些验证的情况下，应从产品单元上随机选择几个部分作为样品份额。

注9：规定灭菌过程的确认和常规控制要求的标准应提供样品份额的适宜性指标。

6 技术的选择

6.1 对经识别的产品，应考虑并记录影响获取产品上存活微生物的效率的因素(如果获取是作为技术的一部分)。这些因素包括：

- a) 获取微生物污染的能力；
- b) 污染微生物的可能种类和它们在产品上的位置；
- c) 获取方法对污染微生物活性的影响；
- d) 待测产品的物理或化学特性。

6.2 如果待测产品(见 6.1 中的 d))的理化性质表明可能释放出某些能影响被测微生物数量和类型的物质，应使用中和或减少这种物质作用的方法。如果做不到这一点，应使用将这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10：附录 B 描述了用于评价释放灭活微生物或抑制微生物的物质方法。

6.3 在对可能出现的微生物的类型加以考虑之后，应选择培养条件。应将考虑的结果和所得结论的原理形成文件。

6.4 所选技术应按第 7 章进行确认。

7 技术选择

7.1 对生物负载估计进行确认的每一程序都应形成文件。

7.2 确认程序应包括下列步骤：

- 7.2.1 对从产品上取下微生物所用技术的适当性的评价,如果取下微生物是该技术的一部分。
- 7.2.2 对计算所取下微生物数量所用技术(包括微生物计数技术和培养条件)的适当性的评价。
- 7.2.3 确立所用方法的回收效率,以便计算出修正系数。

注11:附录B所述的方法可用于生物负载评估技术的确认。

- 7.3 应对常规方法中的任何改变进行评价。该评价应包括:

- 7.3.1 对改变的评价;
- 7.3.2 确立改进后的方法的回收效率。

注12:对改变的评价可能会显示出以前进行的确认和回收效率仍有效。

- 7.4 应对确认数据和随后进行的再确认数据进行定期评审,并应确定再确认的程度,并形成文件。确认和再确认的评审程序应形成文件,并保存再确认的记录。

再确认报告应由原确认报告的出具、评审和批准的职责部门/组织签字。

8 技术的使用

- 8.1 灭菌前计数应按照形成文件的抽样方案,根据确定的取样频率和样品大小来进行抽样。
- 8.2 进行灭菌前计数时,如果分离出不常见的污染物,则应对其进行定性。此类污染物对生产过程,包括灭菌过程的有效性的影响应予以考虑,并形成文件。
- 8.3 应在以往数据的基础上,确立灭菌前计数或生物负载估计值的可接受限量,并形成文件。如果超过这些限量,则应按 GB/T 19001 进行修正。如果必要所确立的极限应在规定的时间间隔内和修改后进行正规的评审。
- 8.4 如果用统计学方法确定样品的大小、取样频率和/或可接受限量,应符合 GB/T 19001 的要求。
- 8.5 当灭菌前计数用于确定灭菌过程的处理程度时(除非标准中规定了对某灭菌过程的确认要求),则:

- a) 在测定处理程度之前,应在确认过程中(见 7.2)根据回收效率测出的修正系数应用到灭菌前计数来计算生物负载估算值。
- b) 在测定处理程度时应考虑产品上的微生物的抗性。

注13:在运用微生物数据确立辐照灭菌的灭菌剂量时[见 GB 18280—2000(idt ISO 11137:1995)附录B和 ISO 13409:2000],可用灭菌前计数来选择验证和灭菌剂量。

- 8.6 如果生物负载估算值已用于测定灭菌过程的处理程度,则:
 - 8.6.1 如果超过可接受的限量,应考虑对无菌保证水平的影响;并且
 - 8.6.2 对不常见的污染物的定性应包括这些污染物对灭菌过程的抗性估计。应考虑对灭菌过程具有高抗性的产品污染物对无菌保证的影响。

所有这些考虑都应形成文件,并包括在确定的纠正措施中。纠正措施应按 GB/T 19001 进行。

- 8.7 产品和/或工艺改变时,应对其进行评审,以确定这些改变是否引起生物负载的改变(见 8.3)。评审结果应形成文件。如果生物负载有改变,应进行专门的生物负载估计以评价改变造成的影响。

附录 A
(资料性附录)

产品上微生物总量的估计指南

A.1 引言

本附录包括了执行 GB/T 19973 本部分规定的要求的指南,目的在于能够使读者更好地理解这些要求。本指南并不是面面俱到的,只是突出了应注意的重要方面。

也可使用非本附录给出的方法,但宜先论证这些方法的有效性是否达到 GB/T 19973 本部分所规定的要求的有效性。

本附录并不是评价是否符合 GB/T 19973 本部分要求的检查清单。

A.2 总则

为了使生物负载估计中得出的数据可靠并具有重现性,在受控条件下进行生物负载估计是十分重要的。生物负载估计所用到的试验设施(不论是在医疗器械的生产地点还是离生产厂较远的地方)都应是按文件化的质量体系进行管理及运行。

如果进行生物负载估计的实验室是在医疗器械生产厂的直接管理之下,实验室操作应符合生产厂的质量体系。如果使用外部实验室,建议该实验室是符合 GB/T 15481—2000 要求的实验室。

任何实验室应承诺提供质量服务,并将这些承诺作为一项质量方针而形成文件。建议明确实验室的权限和责任,并形成文件。应指定一人负责实验室质量体系的建立,并有权确保质量体系的实施。

实验室的运行应经过定期内部考核。建议将考核结果形成文件并经实验室管理评审。

有关质量管理的其他信息见 GB/T 19004(idt ISO 9004:2000)。GB/T 15481 概述了实验室质量体系的要求。医疗器械生产企业质量体系的专用要求见 YY/T 0287—2003(idt ISO 13485:2003)和 YY/T 0288—1996(idt ISO 13488:1996)。

A.3 设备和材料

A.3.1 电子数据处理设备

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。所用的硬件和软件应进行控制。

计算机系统的硬件和软件应经过鉴别,建议对这些方面的任何改变要形成文件,并且须经过批准。

对软件,建议有文件描述:

- 计算机系统的应用软件;
- 运行软件;
- 所用的数据包。

在使用之前,所有的软件应经测试合格[见 GB/T 19000.3(idt ISO 9000-3:1997)]。

如果是购买商业软件包,这些软件包应是在符合 GB/T 19000.3(idt ISO 9000-3:1997)质量体系的情况下生产的。

如果计算机软件是内部生产的,应有适当的程序保证:

- 保存开发文件,包括源代码;
- 保存合格测试记录;
- 程序修改的文件化说明;
- 设备更改的文件化说明以及使用前的正式测试。

这些控制也适用于对商业软件包的修改或定制。

建议有测试或防止软件程序未经授权更改的程序。

数据的组织,制表,统计或进行其他数学运算的软件程序或者对电子存储数据进行使用或分析的软件程序应具有原数据条目的恢复功能。可能需要计算机数据存档的特殊程序,建议将这些程序形成文件。

A.3.2 实验室设备

每台实验室设备应有一个标明其维护要求的标识系统。

清楚地标明不需要校准的设备。

试验过程中任何与产品、洗脱液、培养基等接触的器材或其组件应是无菌的。

A.3.3 微生物培养基

所有用于获取产品上微生物的微生物培养基和洗脱液,应保证用无菌的方法制备。

应确定微生物培养基促进微生物生长的能力。通常是通过对每批培养基用低含量的选定微生物(10 cfu ~100cfu)的接种进行一项促生长试验。促生长试验一般在药典中有描述,药典中可能还包括具体微生物的促生长方法。

A.4 技术选择

A.4.1 总则

微生物污染估计技术的各关键步骤如下:

样品选择→试验项目的收集→送入实验室→处理(如果需要)→移入培养基→培养→计数和定性(如适用)→数据解释

负责进行估计的人员应运用原材料、部件、生产环境、生产过程和产品的特性方面的知识为每一步选择适当的方法。

如引言中所述,GB/T 19973 本部分生物负载估计可用于不同情况下。建议负责人员在决定取样率、培养基范围和培养条件以及方法开发和确认水平时要根据情况而定。将这些考虑的事项以及作决定时的理论基础形成文件会有助于对随后的程序进行评审。

如果生物负载值直接用于确立与灭菌条件的接触程度,在进行生物负载估计中还要考虑到包装材料。

理想的情况是对每一产品都在统一的基础之上进行生物负载估计。但由于产品品种多,批量经常很小,往往总是做不到这一点。在这种情况下,产品可以根据类型、生产环境和过程的相似性和原材料加以分组。应将产品分组的原理形成文件,并保证数据能代表这组中的所有产品。

A.4.2 生物负载估计的要素

A.4.2.1 总则

取样和处理样品时应避免因疏忽而引起的污染和对样品中微生物数量和性质有较大改变。取样系统应具有一致性,以便在一段时间内具有可比性。

通常,通过在洗脱液中浸泡、漂洗或溶解,微生物从被测项目或有代表性的部分转移至培养基中。然后让洗脱液通过一个滤膜(该滤膜能直接贴在培养基上)。对大型的不可分的项目,可以用表面取样方法进行测试(见 A.4.2.4.8, A.4.2.4.9 和 A.4.2.4.10)。

洗脱液中加入表面活性剂以及对液体中的产品进行物理处理,可提高产品表面上的微生物回收。常用的洗脱液见 A.4.2.5。

A.4.2.2 样品选择

A.4.2.2.1 为进行灭菌前计数,取样无非有两种可能性:

- a) 灭菌前随机抽取样品;
- b) 抽取不适于销售的产品,如废料或不合格品。

此类样品的选择取决于众多因素,但是先决条件是所选样品能尽可能地代表灭菌前的产品。如果是用不合格品,则宜选择那些已经过各个关键的生产过程阶段(包括清洗和包装过程)的产品。按以上a)抽取的产品是更为理想的样品。

为不同的目的,如确认清洗过程或评价生产过程,可运用不同的策略来选择生物负载估计样品。

A.4.2.2.2 生物负载估计宜尽可能使用整个产品,但这可能做不到,因为现有的实验室玻璃器皿不可能容纳整个产品。在这种情况下,选用的产品部分应尽可能大,并且在估计完成后,通过对所用的产品部分的生物负载估计应能估计出整个产品的生物负载。因此在测试大型产品(如手术衣或外用引流成套器械)时必须认真选取产品的试验部分。

A.4.2.2.3 在为生物负载估计抽取样品时,要注意产品应装在其标准包装之中。

当从产品上取下用于生物负载试验的部分时,操作要小心。如果必须将试验部分从产品上分离下来,建议在洁净条件下进行(例如在层流柜中),这样可以避免增加污染。

A.4.2.3 取样频率

生物负载估计频率的确立基于多种不同的因素,包括:

- a) 以前进行的生物负载估计数据;
- b) 生物负载估计值的使用;
- c) 所用的加工过程;
- d) 批量大小;
- e) 产品的生产频率;
- f) 所用的材料;
- g) 生物负载值的变异。

取样频率可以按时间(如每月一次)也可以按生产量(如每隔多少批一次)。但是为了确立基线水平,在新产品投产时,通常要进行高频率的生物负载估计,这种频率随着对生物负载的了解而递减。

生物负载估计频率以能检测出例如因季节变化、生产过程改变或材料改变而引起的生物负载的改变为宜。

A.4.2.4 处理

A.4.2.4.1 总则

微生物在表面附着的程度受表面特性、微生物自身和存在的其他材料(如润滑剂)的影响。污染源也会影响到附着程度。为获取微生物,所进行的处理包括漂洗(同时施以物理力)或直接表面取样。表面活性剂可以用于提高回收,但应认识到,较高浓度的表面活性剂可能会抑制微生物(另见A.4.2.5)。

在相当一部分材料中,有些微生物可能以生物膜的形式出现,在生物膜的结构中,微生物在牢固附着于材料表面上的被囊状包围。生物膜状微生物可能会表现更强的抗灭菌性。尽管在医疗器械的生产中生物膜的形成不常见,但在有些情况下,例如材料源自动物则会形成生物膜。在这种情况下,就应考虑生物膜形成的可能性,而且也不应认为A.4.2.4.2和A.4.2.4.10中列出的处理方法能完全将微生物从生物膜中释放出来。在对获取技术进行确认时,如果在重复回收(见A.5.2.1.1)过程中重复记录到较高的微生物数,则表明有生物膜出现。

在生物负载估计中所用的任何处理都应具有重现性,并应避免会明显影响微生物活性的条件,如过分空化、剪切力、温度升高或渗透震动。

有些处理方法要比其他一些方法易于控制。在选择方法和设计适宜的变量组合时,建议考虑方法中的变量和控制这些变量的途径。例如,对一给定的方法,可以通过延长时间或调整机械搅动的特性来增加微生物的回收。

有些处理方法可能会分解待测产品(例如碎解、袋蠕动和涡旋)。分解的材料会给微生物计数造成困难,这时则需要进行其他处理,如将分解的材料从洗提液中分离出来。应注意保证所得到的计数具有代表性。

应尽快将试验项目移至试验室。如果必须要推迟转送,试验项目的保存条件应避免微生物的丢失或改变。应规定贮存的最长时间。干燥可能是微生物数量减少的重要原因,所以在选择贮存条件和贮存时间时应加以考虑。

A.4.2.4.2 袋蠕动

将试验项目和一已知体积的洗脱液封装于一无菌胃型袋中。开动往复式搅拌机,使洗脱液穿过并环绕试验项目。

该方法尤其适用于软质、纤维状和/或吸收性材料,但不适用于能将袋子刺破的材料,如带针的器械或较大的试验项目。

应规定处理的时间长度。

该方法因为使用了相对大量的洗脱液,所以可能会生成微生物浓度较低的悬浮液。可使用膜过滤(见 A.4.2.6.2)或平板浇注(pour plating)(见 A.4.2.6.3)技术为微生物计数。

A.4.2.4.3 超声洗脱

将试验项目浸于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浴中进行处理或将超声探测器浸入容器内的洗脱液中进行处理。

应规定超声处理的常规频率和处理时间。而且还应规定试验项目放在超声浴中的位置。应注意限制同时进行处理的试验项目数量,以便阻断超声处理源。

该方法尤其适用于不透明液体的固体试验项目和形状复杂的产品。该方法对某些医疗器械可能会有破坏作用,特别是带有电子部件的器械,如植入式脉冲发生器。

超声处理能和超声处理时间不应太强和太长,以免破坏微生物并导致其死亡,或者使洗提液过热。

A.4.2.4.4 搅动(带或不带玻璃珠)

将试验项目浸于装有已知体积洗脱液的适宜器皿中,并用机械搅拌器(往复式、环绕式或手腕作用式)进行搅动。也可使用手工搅动,但其效力会因操作人员而异。可以加入一定大小的玻璃珠来增加表面磨损以提高回收效率。玻璃珠的大小以及搅动频率和时间不应导致过热和/或对微生物造成破坏。

应注意,加入玻璃珠会增加微生物可附着的表面积。

应规定搅动的时间和频率。

A.4.2.4.5 涡旋式混合

将试验项目浸于装有已知体积洗脱液的密封容器中。将容器靠压在旋转混合器的旋转垫上以形成涡旋。

对所用的容器,混合时间和设定的混合器的速度应加以规定。涡旋的形成将取决于手动施加的压力,这样就会产生差异。该方法操作简单快捷,但仅适用于具有规则表面的小项目。

A.4.2.4.6 冲洗

让洗脱液通过试验项目的内腔。可以靠重力或泵来使液体流动。另外还可将洗脱液充入产品中,夹住并抖动。

应规定器械与洗提液的接触时间、冲洗速度和液体体积。

A.4.2.4.7 搅切(碎解)

将试验项目浸于装有已知体积洗提液的适宜容器中。在规定的时间内进行搅切,搅切时间取决于试验项目和搅切器,但不宜过热,以便会引起洗脱液过热和对微生物造成破坏。该方法能将试验项目分割成足够小,以便用适当的方法对微生物计数。

A.4.2.4.8 擦拭

含有可吸收取样材料的棉拭子通常被固定于杆或把手上。样品材料可以是也可以不是可溶性的。

通常的使用方法是先用缓冲液或液体培养基湿润棉拭,用棉拭擦拭界定好的取样表面。在有些情况下,可以先湿润样品表面,然后用干棉拭擦拭,这样可以提高回收效率。随后将棉拭放入缓冲液或液体培养基中,并搅动以从棉拭上取下微生物。另外,有时也可用可溶性棉拭,使棉拭溶解于缓冲液或液

体培养基中。则用过滤、平板计数或其他方法分析所得到的悬液。

拭擦是从不规则形状产品或相对难以接近的区域取样的有效方法,该方法对取样面积必须大时也有效。

但该方法因擦拭方式的不同而更易出错。而且,通过擦拭不太可能将样品上所有的微生物都收集到。有些微生物可能会被棉拭本身吸附,从而不会被测到。

棉拭中不应有微生物杀灭剂或微生物抑制剂。

A. 4. 2. 4. 9 琼脂覆盖

当生物负载低和在产品构型适宜时,在产品表面涂上熔化的琼脂培养基(最高温度在 45℃),培养至生成可见菌落。

表面上天然集聚的细胞群、菌落在琼脂介面散布、琼脂干燥、可能存在的厌氧菌等都是潜在的不利因素。

A. 4. 2. 4. 10 接触板

接触板或玻璃片可用于将凝固的培养基放在样品表面上,使存活微生物能附着在培养基表面,然后再培养接触板或玻璃片,至形成可以计数的菌落。

该系统的优点在于易于使用,结果与凝固的培养基的接触表面直接相关。

由于该方法的效率普遍较低,所以只有在其他方法都不适用的情况下使用。接触板和玻璃片一般只适用于平的或至少是规则的表面。

A. 4. 2. 5 洗脱液、稀释液和转送培养基

在生物负载估计过程中,洗脱液可用于从产品上取下微生物;传送培养基可用于将取下的微生物移去计数;稀释液可用于获得含有可计数微生物的悬液。

洗脱液和稀释液的特性对所用方法的效率有显著影响。在选择稀释液或洗提液时,应注意它们成分(如组成、浓度、渗透性和 pH)。这些成分不应使微生物增殖或失活。

当用液体从固体表面取下微生物时,可考虑使用表面活性剂。

常用的洗脱液和稀释液见表 A. 1。

表 A. 1 洗脱液的稀释液示例

溶 液	水中的浓度	应 用
林格氏溶液	1/4 强度	通用
蛋白胨水溶液	0.1%~1.0%	通用
缓冲的蛋白胨水溶液	0.067 mol/L 磷酸 0.43% 氢氧化钠 0.1% 蛋白胨	通用
磷酸盐缓冲盐水溶液	0.02 mol/L 磷酸 0.9% 氢氧化钠	通用
氯化钠溶液	0.25%~0.9%	通用
Calgon 林格氏溶液	1/4 强度	溶解乳酸钙棉拭
硫代硫酸盐林格氏溶液	1/4 强度	中和残留氯
水		稀释含水样品;计数前制备可溶材料的等渗压溶液

注:本表并不是全都包括的。表面活性剂,如聚山梨醇酯(Tween® 80)可以加入洗提液和稀释液中。根据具体的应用,通常使用的浓度在 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。

A. 4. 2. 6 移至培养基

A. 4. 2. 6. 1 总则

经过处理后,通常在洗脱液中会生成微生物悬液,可用 A. 4. 2. 6. 2 和 A. 4. 2. 6. 7 描述的方法检查其中的存活微生物数。

在移入培养基之前,还可能必须进行额外的处理,以便将聚集的微生物分解开来,以降低变异。在有些情况下,从试验项目中取下微生物的方法也会分解这种聚集,但是有些情况下则可能必须另外进行处理。

如果洗脱液中有杀灭微生物或抑制微生物的物质,这可以通过稀释将其浓度降至无效,或通过过滤或化学中和法来去除。因为,杀灭微生物或抑制微生物的物质可能会影响计数方法的选择。

在选用菌落计数方法时,对培养中生成的菌落的上限应加以考虑。该限度可以不同,但应使每一存活微生物都能形成一可见的菌落,且不会受其周围菌落的影响。此外,纤维可能会妨碍离散菌落的形成,使计数产生困难。

A. 4. 2. 6. 2 膜过滤法

通常,经膜过滤后,将滤器放到适宜的生长媒介上进行培养形成可见菌落是一种评价污染的有效方法。滤膜的孔径大小应适宜,能滤除通过它的洗提液中的微生物。通常孔径为 0.45 μm 的滤膜能促进菌落的形成。进行培养时,滤膜可以放在琼脂表面或放在浸泡了营养媒介的吸水纱布垫上。滤膜表面上形成的菌落可以计数,也可从滤器上分离出来进行定性。

膜过滤尤其适用于微生物浓度较低的悬液。

从洗提液中取出微生物时,当怀疑液体基质(substrate)中含有杀灭或抑制微生物时,膜过滤特别适用,先将洗提液中的微生物过滤出来,并可在培养前对滤膜上的微生物进行冲洗。但是有些类型的膜滤器可以吸收或释放抑制微生物生长的物质,所以只使用那些适于给微生物计数的滤膜是很重要的。滤膜和洗提液应相容。

通常需要一真空或正压(有些情况下)源。应注意避免负压过大,这会引起滤膜变形或损坏。

注 14: 对含有纤维产品残留物的洗脱液进行膜过滤可能会有些困难,因膜滤可能会被堵塞。

A. 4. 2. 6. 3 平板倾注

运用平板倾注技术,将一定量的悬浮液在不超过 45 $^{\circ}\text{C}$ 下与熔化的琼脂混合,随后浇到平板中,放至凝固。对平板进行培养至菌落形成并计数。

倾注板技术并不能将微生物从洗提液中分离出来。如果存在杀灭微生物或抑制微生物的物质,可用 A. 4. 2. 6. 1 适用。

A. 4. 2. 6. 4 平板涂沫

平板涂沫技术是用涂抹器将一定量的悬液涂在固体培养基表面上。

涂在培养基表面上的悬液被吸收,这样就形成了离散的菌落;所需的吸收决定了一只平板所能处理的(可容纳的)悬液体积。

如果存在杀灭微生物或抑制微生物的物质,应考虑采用 A. 4. 2. 6. 1。

A. 4. 2. 6. 5 连续稀释的最大可能数(MPN)法

如果具有足够多的洗脱液,可将其一系列的稀释液接种于营养培养基中,使接种的培养基部分在随后的培养中不产生可见生长。用表现出生长的稀释度,用统计学方法来估计微生物的原始数量。目前利用统计学假设已经设计出了 MPN 表格,可查表直接估计出微生物的最可能数目(MPN)。

MPN 法易于操作,但是可以使用的培养条件范围则很有限,而且因该方法是基于统计学,所以它更适于一般性评价而不是精确测定。

如果存在杀灭微生物或抑制微生物的物质,可用 A. 4. 2. 6. 1。

A. 4. 2. 6. 6 螺旋涂沫法

运用自动装置,将一定量微生物悬液涂于固体培养基的表面上。悬液涂沫是以递减的速率从培养

板的中心沿螺旋线轨迹向周边运动。

培养后,用专用的计数格栅和计数技术(对全板或部分板计数),通过换算来估计原悬液中的微生物数目。

如果存在杀灭微生物或抑制微生物的物质,可按 A.4.2.6.1。

已表明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技术得出的结果具有良好的 consistency。由于器械的设计及使用毛细管和小容量(悬液),螺旋板主要用于培养同质的和无聚集的材料。

A.4.2.6.7 固体项目的 MPN 法

MPN 法也适用于小的、离散的项目。这要求在每一项目上的生物负载要很低,并且生物负载的分布,应使直接放入培养基中的所有项目部分不会在培养中产生生长。结果可按 A.4.2.6.5 进行评价。对有些产品,可以将一个以上的项目放入一等量的培养基中。

如果存在杀灭微生物或抑制微生物的物质,可用 A.4.2.6.1。

A.4.2.7 检测微生物的其他方法

估计生物负载时还可使用菌落计数以外的其他方法。这包括新陈代谢物测定和荧光法。这些方法被称为“间接法”,为了建立起与以往确定的存活微生物数量的关系,它们必须对照菌落计数校准。这些技术的一个主要限制就是需要相对较高的微生物数悬浮在样品洗脱液中。一般来说,检测的数据量下限要超过 100 个菌落形成单位(cfu)。

A.4.3 培养基和培养条件的选择

在选择培养基和培养条件时,应对下列方面进行考虑。

- 一个培养基与培养条件的组合不能促进所有微生物的生长,但是有些组合会得出比其他一些组合更具代表性的结果;
- 确认时可能需要使用比常规检测更多的培养基和培养条件;
- 在所选的培养基上直接涂抹可能会使微生物受到物理压力或损坏,而不能生长;
- 培养条件的选择应基于对待试产品的了解,如可能遇到的微生物污染源和微生物的特性。

媒介和培养条件示例列于表 A.2。

酵母菌和霉菌可以在较低的温度下培养(引用表 A.2)。通常对培养基的需氧菌需再培养 3 d~7 d,但该技术需要认真的评价。

应注意所有非选择性厌氧培养法也会使兼性寄生厌氧微生物的生长。

A.5 生物负载技术的确认

A.5.1 总则

通过对生物负载估计方法确认应能深入了解产品上的微生物群落。为了使将来的微生物估计可靠,GB/T 19973 本部分要求对所使用的全部技术进行确认并测定回收效率。

A.5.2 获取微生物技术的确认

A.5.2.1 方法

目前有两个对医疗器械上微生物回收效率进行确认的方法,这些方法是:

- 样品产品的重复处理;
- 对已知微生物污染水平的产品进行培养。

第一种方法的优势在于利用自然形成污染的微生物,但需要一相对较高的初始生物负载。第二种方法为试验建立了一个模型系统,使用时会引起的问题是该系统是否与自然状态相符。但是该方法可用于自然污染水平较低的产品。

A.5.2.1.1 重复性回收方法

本方法的原理是生物负载估计法应重复进行,直至回收的微生物累积数量无明显增加。每重复一

次后,从产品上或产品部分上将洗脱液全部回收并计数。比较连续回收得到的结果。但是应注意的是,本方法不是很精确。从产品上回收的微生物数与产品上实际的微生物数间的精确关系是永远无法验证的。

表 A.2 培养基和培养条件示例

微生物类型	固体培养基	液体培养基	培养条件 ¹⁾
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 血液琼脂 葡萄糖胰蛋白胨琼脂	(大豆酪蛋白消化肉汤) 胰蛋白胨大豆肉汤 营养肉汤	30℃~35℃下 2 d~5 d
酵母菌和霉菌	萨布罗右旋糖酐脂 麦芽浸提琼脂 四碘四氧荧光素 氟霉素琼脂 (大豆酪蛋白消化琼脂) 胰蛋白胨大豆琼脂	萨布罗右旋糖肉汤 麦芽浸提肉汤 (大豆酪蛋白消化肉汤) 胰蛋白胨大豆肉汤	20℃~25℃下 5 d~7 d
厌氧菌	加强梭状芽胞杆菌琼脂 ²⁾ Schaeidler 琼脂 ²⁾ 预先减少的血液琼脂 ²⁾ 难养的厌氧菌琼脂 ²⁾ Wilken-Chalgren 琼脂 ²⁾	罗伯逊肉汤 液体硫糖原酸肉汤	30℃~35℃下 3 d~5 d
注:本表资料并不详尽。			
1) 所列的培养条件是所列微生物类型常用的。			
2) 在厌氧条件下培养。			

A.5.2.1.2 产品接种方法

通过向产品接种一定数量的选定的微生物,形成人工生物负载,用来确立回收率。微生物可以是细菌繁殖体或芽孢。最常用的方法是使用需氧菌芽孢。在实际当中使用细菌繁殖体有些困难,因干燥常会失去活性。

确认研究中选用的微生物应能反应出自然形成的生物负载。所选微生物可包括代表性的:

- 霉菌;
- 繁殖型微生物(革兰阳性和/或革兰阴性);
- 形成芽孢的革兰氏阳性菌。

使用具有代表性的厌氧芽孢形成菌,在实际当中可能会有困难。

接种时应验证活性数。接种体干燥后,如果对特定的产品适用,就应使用从产品上获取微生物的方法。回收数量与原接种数量之比即为产品的回收率。

微生物接种有很多局限性,如结壳、悬浮液粘连,成块以及接种体水平各异。在对产品进行接种时应考虑到这些局限性。

对可吸水性材料制成的产品进行接种,应将其浸于所选微生物的悬浮液中。这样可使微生物均匀地分布在产品上。

A. 5. 2. 2 洗脱液

洗脱液不应促进也不应抑制从产品上获取的微生物的生长。为了确立洗脱液的作用,应将已知数量的少量的微生物接种至产品上,然后在洗脱液中放至一段时间,这段时间应能代表最坏情况的处理时间。随后利用生物负载估计法来验证洗脱液可能产生的抑制或促进作用。

A. 5. 2. 3 物理力

可使用物理力从产品上获取微生物(见 A. 4. 2. 4)。应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上(约 100 cfu),测出物理力对微生物计数的影响。但是还应将洗脱液对从产品上获取的存活微生物的影响考虑在内(见 A. 5. 2. 2)。

A. 5. 3 计数方法的确认

A. 5. 3. 1 计数方法的确认应考虑:

- a) 涉及的微生物;
- b) 估计污染微生物的数量,这需要考虑是否需要浓缩或稀释洗脱液;
- c) 利用新陈代谢活动来估计数量的可能性。

A. 5. 3. 2 生物负载估计的有效性主要取决于:

- a) 所选培养基促进微生物生长的能力(确保组成生物负载的微生物的回收);
- b) 所选的温度、培养时间所选培养基促进生长的能力。

A. 6 技术应用

A. 6. 1 总则

当用生物负载估计值确立灭菌过程的处理强度时,估计值精确是十分重要的。而且在生产过程的常规控制中,用一个准确的微生物估计方法在灭菌前监测微生物负载是否变化到了会影响灭菌过程的有效性的水平,也是十分重要的。

当需用生物负载的一般性信息来确定已有灭菌过程是否适宜时,最终估计的准确性、精确性也尤为重要。

在最初确认中得出的生物负载估计值为评价变化提供了一个基准;这些估计值可用作检测变化(因疏忽引起的)的依据,或确定变化对生产过程改变或环境改变影响的依据。过程控制极限的设定和趋势分析可以是检测生物负载变化的灵敏方法。

A. 6. 2 过程监控的极限设置

过程监控中使用的生物负载估计极限值的选择是基于历史数据。应对数据进行分析,看是否符合公认的数学分布(例如正态分布、泊松分布、二项分布)。在有经验的统计学家的指导下,可以将这些数据转换(如取对数、开根或乘方)使之符合公认的数学分布。如果这种尝试成功,就可计算估计值的置信度。但是如果转换不符合则无法证明是否符合公认的数学分布。

如果不符合公认分布,那么设置极限最简单也最适宜的方法是检查历史记录,找出一个水平,所有计数的 95%处于该水平之下(或 90%或 99%)。GB/T 19973 本部分规定,应定期对所用极限进行定期评审(属要求的内容)。

A. 6. 3 过程监控的趋势分析

进行趋势分析的目的是找出过程改变已经发生的证据,即使估计值是在规定的极限内。该分析是通过检查偏离估计值正常随机分布的数据来进行的。

可以使用统计学过程控制的标准原理,例如累积分析方法。

计数逐渐向上漂移的过程特征,会被偶尔发生的偏移或已知的周期波动(季节影响)所掩盖。从而可能不被发现,若可行,检测平均波动会有助于发现这种漂移。

一般来说,微生物数据在一段时间内保持在良好的水平,然后会形成一明显的“高峰”,但通常持续时间很短。应对这些“高峰”出现的频率进行监控,观察频率是否改变,如果改变要进行研究。

附录 B

(资料性附录)

微生物学技术确认方法指南

B.1 引言

本附录描述了可用于对生物学估计技术进行确认的方法。也可以使用非本附录给出的方法。

在正确使用这些技术的过程中需要有经过培训的有资格的人员来做出判定,尤其是要考虑产品的构型和在生物负载中发现某些污染物的情况。

B.2 对从产品上获取微生物技术的确认

注 15: 本附录概述了 A.5.2 中简介的两种从产品上获取微生物的确认方法。B.2.1 描述了重复处理方法(见 A.5.2.1.1), B.2.2 描述了用接种产品的方法(见 A.5.2.1.2)的确认。

B.2.1 用重复处理进行确认

注 16: 本方法使用了对产品中自然形成的生物负载进行确认过程。有时它是指“完全回收”。

B.2.1.1 在开始对从产品上获取微生物的技术进行确认之前,应将被确认的技术确定下来并形成文件。

注 17: 应注意一旦开始确认,技术就不应再被更改,这一点非常重要。因此有必要先进行预试验来确定并优化将要进行确认的技术。

B.2.1.2 应对测定回收率的产品或部件进行选择。应确定针对每一产品技术(见 B.2.1.1),并用其估计产品上的微生物数。

确定出产品上微生物的估计值后,再将该技术应用于同一产品来确定是否还有微生物被洗下。该技术应用于同一产品的过程可重复进行一定的次数。

注 18: 准确的重复次数取决于若干因素,这包括产品的特性,构成生物负载的微生物和初始污染水平。预试验(见 B.2.1.1)可用于确定重复的次数。

B.2.1.3 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有存活微生物。这可以通过下列方法得到:

- a) 用熔化的回收培养基涂在产品表面上,等到培养基变硬,然后使产品作用于规定的培养条件下(见 A.4.2.4.9)对培养形成的菌落计数;或
- b) 将产品浸于液体回收培养基中,作用于规定的培养条件下,检查是否生长。在浸于液体培养基并培养之后,如果在产品的一小部分上出现活微生物,可以用 MPN 法的计数结果(见 A.4.2.6.7)。但是如果全部结果都表明有微生物生长,则 MPN 法不适用,那么就应重新考虑确认方法。

B.2.1.4 首次应用获取技术(B.2.1.2)后得出的菌落数可表示为全部菌落数百分率。

注 19: 可为每一产品计算菌落总数的百分率,并用于确定回收率。B.5.2.1.1 给出了一操作示例。

B.2.2 用接种产品进行确认

B.2.2.1 在开始对从产品上取下微生物的技术进行确认过程之前,应将被确认的技术确定下来并形成文件。

注 20: 应注意一旦确认开始,技术就不应再被更改,这一点非常重要。因此有必要先进行预试验来确定并优化将要进行确认的技术。

B.2.2.2 应制备给产品接种的微生物悬液,并测定出存活计数。

注 21: 用产品接种法进行确认时所用微生物的选择已在 A.5.2.1.2 中进行了讨论。作为接种用微生物应能抵抗干燥,这一点十分重要,因此经常使用需氧菌芽孢。黑色枯草杆菌芽孢因易于获得而常被使用。宜选用符

合 ISO 11138-2 的黑色枯草杆菌变种芽孢水悬液。

B.2.2.3 应制备该悬液的稀释液,并测定出存活计数。接种体的数量级应与产品上的自然污染相同。对具有较低生物负载的项目,悬液的适宜浓度是向产品上放 100 个存活微生物。

注 22: 有必要进行预备试验来确立适宜的稀释液(见 B.2.2.1)。

B.2.2.4 应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(见 B.2.2.3)进行接种并可以在层流条件下进行干燥(如果对产品适用)。

注 23: 如果项目是经环氧乙烷灭菌,则应经过充分通风来降低残留物的影响。应在预试验中对从产品中洗脱出的任何具有限制影响的物质进行研究(见 B.2.2.1 和 B.4)。

将悬液分布于产品上时,应包括最难取下自然污染的部位。

B.2.2.5 运用规定的技术(见 B.2.2)来确立从产品上取下的接种微生物的数量。

B.2.2.6 取下的微生物数表示为接种到产品上的微生物百分率。可为每一产品计算百分率(见 B.2.2.4),并用其确立回收率。第 B.5 章给出一操作示例。

注 24: 应注意,从直接接种生物负载确认中得出的结果,可能不能准确模拟实际的生物负载。

B.3 培养条件的评价

生物负载估计中所用的培养条件,即培养基和培养条件,不可能期望检测出所有潜在的污染菌。因此在实际操作当中,生物负载的估计偏低是不可避免的。但是,还是要选择适宜的培养条件。GB/T 19973 本部分 7.2 规定在对计数进行确认时要对培养条件进行评价。

评价培养条件的评价方法之一包括在对生产过程、环境和材料了解的基础上对培养条件进行合理的选择,然后比较在这些培养条件下计数得到的微生物数与其他培养基和培养条件组合条件下得出的微生物数。

如果该方法表明计数得到的生物负载数量低,则应重新考虑培养条件以使所得计数最佳。

B.4 释出物对生物负载估计不利影响的检验

检验的目的是研究从产品向悬液中释出的物质对脆弱微生物的影响,这里列举了一个方法,可用其评价获取技术是否符合 GB/T 19973 本部分 6.2 规定;还宜考虑 A.4.2.6.1。

B.4.1 选用灭菌产品,每一产品都应经受常规微生物洗脱技术。如果洗脱技术中用到洗脱液,则可按 B.4.2 的步骤进行,如果产品直接放入培养基中,则可按 B.4.3 进行。

B.4.2 如果洗脱技术中用到洗脱液(见 A.4.2.5),将一定数量的易受破坏的微生物放入洗脱液中。所用的最适宜的微生物数为 100。细菌抑制试验通常在药典专论中有描述。

注 25: 可以使用药典专论中所述的微生物,也可使用荧光假单胞菌。制备的悬液需放置一段时间,至少为生物负载估计中所允许的最长时间。然后计算存活微生物的数。

B.4.3 如果产品直接放入回收培养基中(如在 MPN 估计时,见 A.4.2.6.7),可以使用药典专论中描述的细菌抑制试验。

在该试验中,产品直接放入培养基中,并培养一段时间。然后将少量的微生物(见 B.4.2)放入培养基中并继续培养。经过一段时间后,检查是否有可见微生物生长。

B.4.4 如果接种的微生物数与 B.4.2 回收的数量有很大差异,或在 B.4.3 中未观察到微生物的生长,则应对生物负载估计技术进行重新考虑。可能有必要加入中和或过滤步骤以去除抑制物质(见 A.4.2.6.1)。

B.5 修正系数计算举例

B.5.1 引言

给出了两个示例来说明校正系数的计算。所引用的值不指示在实际确认过程中得到的值。

B.5.2 取下技术的确认**B.5.2.1 重复处理**

B.5.2.1.1 本示例中,表 B.1 中示出了重复处理确认过程中一般的理想化的数据。这些数据表示了一个医疗器械的 5 个平行结果。

表 B.1 某一器械平行试验中通过重复处理测得的菌落数

处理	平行计数					平均菌落数
	1	2	3	4	5	
1	60	50	70	55	45	56
2	10	12	5	2	3	6.4
3	1	0	2	0	0	0.6
4	0	1	0	0	1	0.4
琼脂覆盖	10	5	7	4	2	5.6
全部菌落数	81	68	84	61	51	69

B.5.2.1.2 根据表 B.1 中的数据,取下率计算如下:

第一次处理: 60 50 70 55 45

总数: 81 68 84 61 51

回收率/(%): 74 74 83 90 88

平均回收率=81.8% 范围=74%~90%

注 26: 运用一种琼脂覆盖的理想情况也包括在了本计算中。某些医疗器械的特性可能会无法用琼脂覆盖〔见 B.2.1.3 a)〕。

B.5.2.1.3 使用平均取下率,计算回收率的修正系数:

$$\frac{100}{81.8} = 1.22$$

注 27: 在有些应用中,可以决定使用取下率范围中最低值,以反应出最坏情况。这一决定将会影响数据的使用。

B.5.2.2 产品接种

B.5.2.2.1 确认时,对预试验表明生物负载非常低的情况可选择产品接种法。

B.5.2.2.2 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。

B.5.2.2.3 制备悬液的稀释液,使 0.1 mL 中含有 100 个芽孢。向器械所选部分接种 0.1 mL 该稀释液,并在层流下进行干燥。

B.5.2.2.4 使经接种的产品在经受上述选定的洗脱技术,洗脱的平均芽孢数为 35,其范围是在 25~45 之间。

B.5.2.2.5 回收率的校正系数计算如下:

$$\frac{100}{35} = 2.9$$

B.5.3 生物负载估计值的计算

生物负载估计值可通过灭菌前计数乘以 GB/T 19973 本部分中第 B.2 章得出的校正系数求得。

附 录 C
(资料性附录)
参 考 文 献

- [1] GB/T 15481—1995 检测和校准实验室能力的通用要求。
- [2] GB/T 19000.3—1994 质量管理和质量保证 第3部分:GB/T 19001在软件开发、供应和维修中的使用指南。
- [3] GB/T 19002—1994 质量体系生产、安装和服务的质量保证模式。
- [4] GB/T 19004.2—1994 质量管理和质量体系要素 第1部分:指南。
- [5] GB 18278—2000 医疗保健产品灭菌 确认和常规控制要求 工业湿热灭菌。
- [6] GB 18279—2000 医疗器械 环氧乙烷灭菌 确认和常规控制。
- [7] GB 18280—2000 医疗保健产品灭菌 确认和常规控制要求 辐射灭菌。
- [8] GB 18281.2—2000 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。
- [9] ISO/TR 13409 医疗保健产品灭菌——小批量生产或不经常生产的产品批采用25 kGy辐射灭菌的证明。
- [10] YY/T 0287—2003 医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求。
- [11] YY/T 0288—1996 质量体系—医疗器械 GB/T 19002-ISO 9002应用的专用要求。
- [12] 英国医疗保健行业与联合王国 GAMMA 和电子辐射研究小组联合会,评估微生物污染、环境和生物负载监控的指南,1992。
- [13] BONALSKY J. R. 带微生物原材料试验的模型系统,4(2),1980,pp. 49-51.
- [14] DEMAN J. C. MPN 表格更正。Eur. J. Appl. Microbiol. 17,1983 pp. 301-305.
- [15] GOLDSMITH P. L. 和 WHITFIELD H. 质量控制方案累积表的平均运转周期,3,1961, pp. 11-20.
- [16] HALLS N. A. 皮下注射产品上微生物数量在灭菌前的大量出现现象,22(3-5) 1983, pp. 663-666.
- [17] JOHNSON R. A. 和 BRADSHAW M. CUSUM 试验性能中的序列相关效应,16,1974, pp. 103-112.
- [18] LUCAS J. M. 设计和使用 V-mask 控制方案 8(1),1976.
- [19] LUNDHOLM M. 空降细菌的量化确定和总活菌数量估算的方法比较,1982, pp. 179-183.
- [20] MAL O. SPC 和持续改进,1989.
- [21] PAGE E. S. 累积总数表,3,1961, pp. 1-9.
- [22] PULEO J. R., FAVERO M. S. 和 PETERSON J. J. 使用超声能量评估表面的微生物污染, 15(6),1967, pp. 1345-1351.
- [23] SHIRTZ J. T. 无菌试验 1987, pp. 35-37.
- [24] SOKOLSKI W. T. 和 CHIDESTEY C. G. 基于石油的活菌计数改进方法, 53, 1964 pp. 103-107.