



中华人民共和国国家标准

GB/T 19973.1—2023/ISO 11731-1:2018

代替 GB/T 19973.1—2015

医疗保健产品灭菌 微生物学方法 第 1 部分：产品上微生物总数的确定

Sterilization of health care products—Microbiological methods—
Part 1: Determination of a population of microorganisms on products

(ISO 11737-1:2018, IDT)

2023-03-17 发布

2024-10-01 实施

国家市场监督管理总局
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 总体要求	4
5 产品选择	4
6 生物负载的测定和微生物鉴定的方法	5
7 生物负载测定方法的确认	6
8 生物负载的常规测定和数据解释	6
9 生物负载测定方法的维护	7
附录 A (资料性) 产品上微生物总数的确定指南	8
附录 B (资料性) 生物负载确定方法的指南	22
附录 C (资料性) 生物负载回收率的确认	30
附录 D (资料性) 典型职责分配	37
参考文献	39

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第 1 部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件是 GB/T 19973《医疗保健产品灭菌 微生物学方法》的第 1 部分。GB/T 19973 已经发布了以下部分：

- 第 1 部分：产品上微生物总数的确定；
- 第 2 部分：用于灭菌过程的定义、确认和维护的无菌试验。

本文件代替 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》，与 GB/T 19973.1—2015 相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 增加了术语“生物负载峰值”及其定义（见 3.6）；
- 增加了产品和/或生产过程的变更对生物负载测定方法的关注（见 9.1）。

本文件等同采用 ISO 11737-1:2018《医疗保健产品灭菌 微生物学方法 第 1 部分：产品上微生物总数的确定》。

本文件做了下列最小限度的编辑性改动：

- 纳入了 ISO 11737-1:2018/Amd.1:2021 的修正内容，所涉及的条款的外侧页边空白位置用垂直双线(||)进行了标示；
- 在药典示例中增加了《中华人民共和国药典》（见 A.4.3）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国消毒技术与设备标准化技术委员会(SAC/TC 200)归口。

本文件起草单位：苏州诺洁医疗技术有限公司、杭州唯强医疗科技有限公司、广东省医疗器械质量监督检验所、强生(苏州)医疗器材有限公司、泰尔茂医疗产品(杭州)有限公司、浙江泰林生物技术股份有限公司。

本文件主要起草人：徐海英、周志龙、钟静、刘雪美、翁辉、赵振波、陈健梅、梁泽鑫、周杰、张兆勇、夏晓久、高凯斐。

本文件所代替文件的历次版本发布情况为：

- 2005 年首次发布为 GB/T 19973.1—2005, 2015 年第一次修订；
- 本次为第二次修订。

引 言

无菌医疗保健产品是指不含存活微生物的产品。规定灭菌过程的确认和常规控制要求的国际标准要求,当需要提供无菌医疗保健产品时,在其灭菌前宜将各种非预期的微生物污染降至最低。这些产品是非无菌的。灭菌的目的是灭活微生物,从而将非无菌产品转化为无菌产品。

利用物理方法和/或化学试剂对纯培养微生物灭活的动力学通常可以通过存活的微生物数量与灭菌剂处理程度之间的指数关系进行描述。这意味着无论采用何种程度的灭菌处理,微生物总能不可避免地以有限的概率存活下来。对于特定的处理条件,微生物的存活概率取决于微生物的数量、耐受性以及处理过程中微生物生存的环境。因此,无法保证经过灭菌处理的产品中的任何一个产品是无菌的,但可以根据产品上微生物的存活概率来定义该产品的无菌性。GB/T 19973《医疗保健产品灭菌 微生物学方法》由两个部分构成。

- 第1部分:产品上微生物总数的确定。目的在于确立适用的方法测试灭菌前产品上微生物总数。
- 第2部分:用于灭菌过程的定义、确认和维护的无菌试验。目的在于确立产品灭菌过程的定义、确认和维护中的无菌试验。

ISO 9001 给出了设计和开发、生产、安装和服务的质量管理体系一般要求;ISO 13485 给出了医疗器械生产的质量管理体系的特殊要求。根据质量管理体系标准,对于制造过程中的某些特殊过程,无法通过后续的产品检验和测试验证其有效性,灭菌就是这样一个过程的例子。因此,灭菌过程需经过确认,定期监测灭菌过程的性能并对设备进行维护。

已有相关法规标准规定了医疗保健产品灭菌的过程确认和常规控制的要求[例如 ISO 14937、ISO 11135、ISO 11137(所有部分)、ISO 17665(所有部分)和 ISO 14160]。但也宜认识到,暴露于一个合理确认和精确控制的灭菌过程并不是保证产品无菌以符合其预期用途的唯一要素。此外,为了灭菌过程的有效确认和常规控制,了解灭菌过程中存在的微生物数量、特点和性质对灭菌过程的挑战是很重要的。

术语“生物负载”用于描述存在于产品和/或无菌屏障系统上或其中的存活微生物总数。生物负载可应用于以下多种情况:

- 灭菌过程确认和再鉴定;
- 生产过程控制常规监测;
- 原材料、部件或包装监测;
- 清洁过程有效性评估;
- 整体环境监测计划。

生物负载是来自多个污染源的微生物总和,这些污染源包括原材料、部件生产、组装过程、生产环境、组装/生产辅助手段(例如压缩气体、水、润滑剂)、清洁过程和成品包装。为了控制产品的生物负载,宜注意这些污染源的微生物状态。

准确计数产品生物负载是不太可能的,实际上是使用一种已定义的方法来确定生物负载。由于医疗保健产品的设计和材料种类繁多,所以通过单一方法确定所有情况下产品生物负载是不切实际的。也无法通过单一技术收集所有情况下的微生物用以计数。此外,医疗保健产品上或产品中可能存在的微生物类型将会影响微生物计数培养条件的选择。

本文件规定了确定生物负载需满足的要求。此外,附录中的指南提供了满足要求的解释和方法。也可以使用指南以外能够有效符合本文件要求的方法。

医疗保健产品灭菌 微生物学方法

第 1 部分：产品上微生物总数的确定

1 范围

本文件规定了医疗保健产品、部件、原材料或包装(表面或内部)存活微生物计数和微生物鉴定,并提供了指南。

注 1: 微生物鉴定的特性和程度取决于生物负载数据的预期用途。

注 2: 第 1~9 章的指南见附录 A。

本文件所规定的要求不适用于病毒、朊病毒或原生动物的计数或鉴定,包括海绵状脑病的病原体的采集和检测,例如瘙痒病、牛海绵状脑病和克雅氏病。

注 3: ISO 22442-3、ICH Q5A(R1)和 ISO 13022 给出了灭活病毒和朊病毒的适用指南。

本文件不适用于医疗保健产品生产环境的微生物监测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中,注日期的引用文件,仅该日期对应的版本适用于本文件;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 13485 医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求(Medical devices—Quality management systems—Requirements for regulatory purposes)

注: YY/T 0287—2017 医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求(ISO 13485:2016, IDT)

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

ISO 和 IEC 维护的用于标准化的术语数据库,地址如下:

——IEC 电子百科: <http://www.electropedia.org/>;

——ISO 在线浏览平台: <http://www.iso.org/obp>。

3.1

批 batch

在确定制造周期中生产的,预期或假设具有相同特征和质量的一定产品的数量。

[来源:ISO 11139:2018,3.21]

3.2

生物负载 bioburden

产品和(或)无菌屏障系统表面或内部存活微生物的总数。

[来源:ISO 11139:2018,3.23]

3.3

生物负载校正因子 bioburden correction factor

用以存活微生物计数时补偿无法完全从产品和/或微生物培养中采集的数值。

[来源:ISO 11139:2018,3.24]

3.4

生物负载估计值 bioburden estimate

通过将生物负载校正因子应用于生物负载计数而确定的值。

[来源:ISO 11139:2018,3.25]

3.5

生物负载方法适用性 bioburden method suitability

评估测试方法以证明其允许微生物生长的能力。

[来源:ISO 11139:2018,3.168,有修改]

3.6

生物负载峰值 bioburden spike

显著高于同组中其他生物负载值的个别生物负载值。

[来源:ISO 11139:2018,3.26]

3.7

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一起实施。

[来源:ISO 9000:2015,3.12.3,有修改]

3.8

纠正措施 corrective action

为消除已发现的不合格或其他不期望情况的原因所采取的措施。

注1:一个不合格可以有若干个原因。

注2:采取纠正措施是为了防止再发生,而采取预防措施是为了防止发生。

注3:纠正和纠正措施是有区别的。

[来源:ISO 9000:2015,3.12.2,有修改]

3.9

培养条件 culture condition

促进微生物复苏、生长和(或)繁殖所采用的生长培养基和培养方法的组合。

注:培养方法可包括温度、时间和其他任何特定的条件。

[来源:ISO 11139:2018,3.71]

3.10

建立 establish

通过理论评估确定,并经试验证实。

[来源:ISO 11139:2018,3.107]

3.11

兼性微生物 facultative microorganism

能够进行有氧和无氧代谢的微生物。

[来源:ISO 11139:2018,3.114]

3.12

医疗保健产品 health care product

医疗器械(包括体外诊断医疗器械)或医药产品(包括生物制药产品)。

[来源:ISO 11139:2018,3.132]

3.13

微生物鉴定 microbial characterization

对微生物进行归类的过程。

注：归类可基于选择性培养基的使用、菌落或细胞形态、染色特性或其他特征。

[来源：ISO 11139:2018,3.170]

3.14

专性厌氧菌 obligate anaerobe

在没有分子氧的情况下生存和生长的微生物。

[来源：ISO 11139:2018,3.186]

3.15

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，而采取纠正措施是为了防止再发生。

[来源：ISO 9000:2018,3.12.1]

3.16

产品 product

过程的结果。

注：对于灭菌标准来说，产品为可触及的，可以是原料、半成品、部件和医疗保健产品。

[来源：ISO 11139:2018,3.219]

3.17

回收率 recovery efficiency

衡量某一特定技术从产品上转移、采集和/或培养微生物的能力。

[来源：ISO 11139:2018,3.228]

3.18

再鉴定 requalification

为证实某一规定过程持续合格而重新进行的部分确认活动。

[来源：ISO 11139:2018,3.235]

3.19

样品份额 sample item portion;SIP

用于测试医疗保健产品的规定部分。

[来源：ISO 11139:2018,3.244]

3.20

规定 specify

在批准的文件中详细阐明。

[来源：ISO 11139:2018,3.263]

3.21

无菌的 sterile

无存活微生物的。

[来源：ISO 11139:2018,3.275]

3.22

无菌屏障系统 sterile barrier system

为了产品在使用时保持无菌,防止微生物进入的最低限度的包装。

[来源:ISO 11139:2018,3.276]

3.23

确认 validation

通过客观证据证明满足特定预期用途或应用的过程。

注 1: 确认所需的客观证据是由测试或其他形式的检测(例如执行不同的计算法则或文件审查)所决定的结果。

注 2: “已确认”一词用于指定相应的状态。

注 3: 确认所使用的条件可以是真实的或是模拟的。

[来源:ISO 9000:2015,3.8.13,有修改]

4 总体要求

4.1 灭菌过程的开发、确认和常规控制是医疗保健产品实现过程的一个关键因素。为确保本文件中规定的要求实施一致性,需要建立、实施和维护必要的流程。与灭菌过程的开发、确认与常规控制相关的特别重要的过程包括但不限于:

- 包括记录的文件控制过程;
- 管理职责分配过程;
- 充足的资源提供过程,包括合格的人力资源和基础设施;
- 外部提供的产品控制过程;
- 整个过程中产品的识别和追溯过程;和
- 不合格品控制过程。

注: 出于监管目的,ISO 13485 从质量管理体系方面涵盖了医疗器械生命周期的所有阶段。提供医疗保健产品相关的国家和/或地区法规可能要求实施完整的质量管理体系,并由公认的合格评定机构对其进行评估。

4.2 应制定包括测试用仪器在内的所有设备的校准流程,以满足本文件的要求。

5 产品选择

5.1 通则

5.1.1 用于生物负载测定产品的选择和处理的程序,应确保所选产品能够代表日常生产,包括包装材料 and 工艺过程。

5.1.2 若基于生物负载测定的目的将产品归类为一个产品族,应记录产品归类到产品族的理由。该理由应包括确保从产品族中选择用于生物负载测定的产品能代表整个产品族的准则。

5.1.3 由于生物负载可能随时间而改变,应考虑生产到生物负载测定的时间间隔。

5.2 样品份额(SIP)

5.2.1 整个产品(SIP=1.0)或部分产品(SIP<1.0)均可用于生物负载测定。

5.2.2 若 SIP<1.0,样品份额应充分,能够代表整个产品的生物负载。样品份额的确定应基于产品生物负载是否均匀分布,见 5.2.3~5.2.5。

5.2.3 当生物负载分布已知时,以下内容适用:

- a) 若生物负载均匀地分布在产品上和/或产品中,则可以从产品的任意部分选择 SIP;

b) 若产品生物负载分布不均匀,样品份额应包括以下任意一项:

- 1) 所选产品部分成比例地代表制成产品的每种材料;或
- 2) 产品中含有对灭菌过程最具微生物挑战(数量和/或类型)的部分。

当选择包含最具微生物挑战的产品部分时,应建立所测试的样品份额的生物负载与整个产品生物负载的关系。

5.2.4 若生物负载分布未知,则样品份额应由所选产品的部分组成,这些部分按比例代表成品的每种材料。样品份额所选产品的组成部分应按比例代表成品的每种材料。

5.2.5 样品份额可以根据产品特征计算,例如长度、质量、体积或表面积(见表 A.1)。

注:一些对灭菌过程确认和常规控制要求的标准,如 ISO 11137(所有部分),规定了样品份额充分性的准则。

6 生物负载的测定和微生物鉴定的方法

6.1 生物负载的测定

6.1.1 方法选择

根据生物负载数据的使用目的选择合适的方法。测定方法应包括以下内容:

- a) 抑菌物质的中和(若需要);
- b) 微生物的采集(若适用);
- c) 微生物的培养;
- d) 微生物的计数。

6.1.2 抑菌物质的中和

若产品的物理或化学特性使其释放出对产品生物负载测试产生不利影响的抑菌物质,则应建立中和、去除抑菌物质的方法;若不能完全去除抑菌物质,也应使其对生物负载测试的影响最小化。同时应证明该方法的有效性。

注:附录 B 描述了用于评价杀菌或抑菌物质释放的技术。

6.1.3 微生物的采集

6.1.3.1 对一特定产品,采集存活微生物是方法的一部分,应考虑其采集方法的有效性并形成记录。至少应考虑下列内容:

- a) 该方法采集微生物的能力;
- b) 微生物可能的种类及其在产品上的位置;
- c) 采集方法对微生物活性的影响;
- d) 检测时产品的物理或化学特性。

6.1.3.2 对一特定产品,采集存活微生物不是方法的一部分(例如产品的直接培养),应考虑其计数方法的有效性并形成记录。至少应考虑下列内容:

- a) 微生物可能的种类及其在产品上的位置;
- b) 检测时产品的物理或化学特性。

6.1.4 微生物的培养

培养条件应在考虑可能存在的微生物类型和待测产品的物理或化学性质之后进行选择。应对考虑的结果和所做决定的理由形成记录。

6.1.5 微生物的计数

应在考虑产品可能存在的微生物类型后选择其计数方法。应对考虑的结果和所做决定的理由形成记录。

6.2 生物负载的微生物鉴定

6.2.1 应选择适当的微生物鉴定方法。

注：微生物鉴定对于发现产品生物负载的变化是有必要的，该变化可能会影响生物负载数据使用的某些方面（例如灭菌过程的建立）。此外，微生物鉴定有助于识别污染源。

6.2.2 通过以下一种或多种方法进行微生物鉴定：

- a) 菌落形态；
- b) 细胞形态；
- c) 鉴别染色；
- d) 使用选择性和/或差异条件培养；
- e) 生化特性；
- f) 基因型分析，例如基因模型、指纹技术或序列分析技术；
- g) 蛋白质组学方法，例如质谱。

7 生物负载测定方法的确认

7.1 通则

测定生物负载方法应经过确认并形成文件。

注：典型的微生物学方法确认和使用的信息详见 A.7.1。

7.2 确认

确认应包括以下内容：

- a) 评估测试方法的适用性，以证明测试过程对微生物无生长抑菌作用；

注1：若使用接种产品进行测试，生物负载回收率测试数据能作为测试方法不抑制微生物生长的证明。

- b) 若生物负载测试方法中包含微生物采集技术，充分评估该技术的回收率；

注2：生物负载回收率确认信息见附录 C。

- c) 评估培养条件和微生物计数技术的充分性；
- d) 评估微生物鉴定技术的适用性。

8 生物负载的常规测定和数据解释

8.1 通则

应按照规定了取样量及取样频率的文件化取样计划进行生物负载的常规测定。

8.2 检测限和平板计数

产品或产品族应按指定方法进行生物负载的测定（见 5.1.2）。选择测定方法时应考虑影响结果的相关因素，例如检测限和平板计数。

8.3 微生物鉴定

进行生物负载的微生物鉴定的程度取决于生物负载测定数据的使用目的(见 6.2)。

8.4 用于灭菌过程的生物负载数据

若生物负载数据用于确定灭菌过程的处理程度(即基于生物负载的方法),则应满足灭菌过程开发、确认和常规控制标准中规定的所有适用于使用生物负载数据的要求。

8.5 生物负载峰值

若生物负载数据显示某一测试结果(生物负载峰值)明显大于其他测试值,则应根据生物负载数据的使用目的评估峰值数据的影响。

8.6 生物负载水平

应规定产品或产品组的生物负载的可接受水平。若超过可接受水平,则应采取措施。必要时应审查和修订可接受水平。

8.7 数据分析

应通过在一段时间内获得的生物负载数据来确定趋势。

8.8 统计学方法

若使用统计学方法来定义样本量、取样频率和/或可接受水平时,所使用的统计学方法应用应符合 ISO 13485。

9 生物负载测定方法的维护

9.1 产品和/或生产过程的变更

应根据产品生物负载数据的使用目的,审核产品和/或生产过程发生的变更,以确定相关变更是否可能改变产品生物负载水平,并记录审查结果。若生物负载水平发生变化,则应进行具体的产品生物负载测定,以评估变更对生物负载的影响程度和性质。

9.2 生物负载测定方法的变更

应评估常规生物负载测定方法变更。该评估应包括变更对测定结果的影响,并记录评估结果。

注:对变更的评估可以表明先前的确认和生物负载回收率仍然适用。

9.3 生物负载测定方法的再确认

在规定的间隔内,应对原始确认数据(见 7.2)及后续的再确认数据按照形成文件的程序进行审核,并对审核结果和再确认过程形成记录。

附录 A

(资料性)

产品上微生物总数的确定指南

注：为便于参考，本附录中的章条号(除 A.4 外)与本文件正文中使用的章条号相对应。

A.1 范围

本附录为实施本文件中规定的要求提供了指南。附录中所提供的指南未涵盖所有细节，仅强调宜注意的重点。

可以使用本附录之外的方法，但宜证明这些替代方法能满足本文件规定的要求。

本附录不作为评估是否符合本文件要求的核对清单。

A.2 规范性引用文件

未提供指南。

A.3 术语和定义

未提供指南。

A.4 质量管理体系要素

注：本文件不要求有完整的质量管理体系，但当控制生物负载测定用于灭菌医疗保健产品的确认和监测时，可满足质量管理体系基本要素(见第 4 章)。可关注控制医疗保健产品生产或再加工的所有阶段的质量管理体系标准(见 ISO 13485)。

A.4.1 文件

ISO 13485 对文件的要求涉及文件(包括规范和过程文件)和记录的形成和控制。

计算机可以在实验室中用于数据的直接和间接收集、处理和/或存储。用于此类应用的硬件和软件都宜受到控制。

宜识别使用中的计算机系统硬件和软件，软件和硬件的任何变化都宜记录，并得到适当的批准。

若通过电子数据处理技术进行计算，使用前宜进行确认(如电子计算表格)，并保留确认记录。

软件相关文件宜包含以下信息：

- a) 计算机系统上的应用软件；
- b) 操作软件；
- c) 所用数据包。

所有软件在运行之前都宜经过确认。

若计算机软件是内部开发的，宜制定适当程序，以确保：

- 保存包括源代码在内的开发文件；
- 保存接收测试记录；
- 记录程序的修改；
- 记录设备的变更，正式测试后投入使用。

这些控制也适用于商业软件包的修改或定制。

宜具备发现或阻止未经授权更改软件的程序。

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,或者对电子储存数据进行其他方面使用或分析的软件程序,宜具有恢复原始数据的功能。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。

ISO 13485、ISO 15189 或 ISO/IEC 17025 规定了文件和记录控制的要求。

ISO/IEC 17025 规定了技术记录的要求。

计算机软件质量管理体系的应用指南也可参见 ISO/IEC 90003。

A.4.2 管理职责

ISO 13485 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。

生物负载测定中获得的数据宜是可靠的。在受控的条件下实施生物负载测定是十分重要的,因此用于测定的实验设施,无论是在医疗保健产品制造商生产现场还是在远程位置的地点,都宜根据形成文件的质量体系对这些设施进行管理和操作。

生物负载测定包含多个独立组织,每一个组织负责测定方法或程序的特定要素(责任指南见附录 D)。本附录要求各组织承担规定的相应职责,并将职责形成文件。在各组织的质量管理体系中将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胜任的人员。

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,宜根据公认的现行最佳实验室规范(例如 ISO 15189、ISO/IEC 17025)实施所有测试,若适用,数据宜由有能力的、知情的专业人士进行评估。

任何实验室宜对提供的质量服务做出承诺,该承诺宜作为质量方针形成文件。宜正式建立实验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,并有权限确保质量管理体系的实施。

实验室的运行宜定期接受内部审核。实验室宜将审核结果形成文件并由实验室管理层评审(示例见 ISO 15189、ISO/IEC 17025)。

ISO 13485 规定了职责、权限以及人力资源的要求。

ISO 13485 规定了资源提供的要求。

ISO 15189 和 ISO/IEC 17025 规定了设备的要求。

A.4.3 产品的实现

ISO 13485 中对产品实现方面的要求与产品的生命周期相关,其中包括顾客需求的确定、设计和开发、采购、生产控制,以及对监视和测量设备的校准。

宜有识别实验室每台设备维护要求的体系。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培养基和洗脱液的制备方式宜确保其无菌性。

培养基质量控制测试宜包括促生长试验。通常,每批培养使用低接种量[不超过 100 CFU]的选定微生物进行促生长试验。药典[例如《中华人民共和国药典》、《美国药典》(US Pharmacopoeia, USP)、《欧洲药典》(European Pharmacopoeia, EP)]描述了促生长试验,其中详细描述了适用的微生物。也可以采用其他公认的定量或半定量的培养基质量控制的分析方法。

ISO 13485 规定了对采购的要求。特别是 ISO 13485 对采购产品的验证要求适用于所有从组织外部接收的产品和服务。

ISO 13485 规定了对监视和测量设备的校准要求。

ISO/IEC 17025 规定了设备和测量可追溯性的要求。

A.4.4 测量、分析和改进

A.4.4.1 生物负载试验结果通常不符合数学分布模型。因此,除了评估实验室的整体能力外,测量不确定度、精度和偏差可能是不必要的。对于生物负载试验方法,已通过生物负载回收率的确定考虑了不确定度测量、精密度和偏差。

A.4.4.2 ISO 13485 中的测量、分析和改进部分的要求与过程监控、不合格品控制、数据分析和改进(包括纠正和预防措施)相关。

所有超过规定水平和/或表明不利趋势的生物负载结果宜进行调查,调查的初始阶段宜评估结果正确与否。下列情况可能导致错误,宜加以指出:

- 不当的样品(例如不具代表性的、非均质的、不合格的物料);
- 不当的取样材料(例如拭子、容器、包装);
- 不适当的运输、处理及储存条件;
- 不当的试验器材(例如储存容器、移液器、过滤器);
- 错误的处理或测试方法;
- 不当的培养基或稀释剂;
- 不当的实验室环境;
- 不当的培养环境;
- 计算或誊写错误;
- 试验方法的偏差(例如稀释错误、过滤的错误、无菌技术错误)。

若结果归因于取样或试验错误,若可能,宜使用同一批产品的新样品再次测定,以验证超过规定水平的生物负载结果。若产品支持微生物生长会导致无效数据,或同批产品不可获得,宜使用新的批次。

若原始结果经确认是真实结果,那么在第二阶段的调查宜至少考虑以下几点。

- a) 结果与数据使用目的的关系(例如灭菌过程的有效性)。
- b) 需要增加样品量和/或取样频率。
- c) 生产过程的评估,包括以下内容:
 - 1) 原材料/部件(如供应商、变更);
 - 2) 清洁剂/润滑剂/制造用液;
 - 3) 运输/存储容器;
 - 4) 工作台表面;
 - 5) 人员穿着/个人卫生/个人行为;
 - 6) 搬运/组装;
 - 7) 环境条件和监测结果(包括季节因素,如有);
 - 8) 包装材料及包装过程;
 - 9) 储存条件。
- d) 回收到的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,可能需要采取特定的纠正措施。若采取纠正措施,需证明其有效性。

ISO 13485、ISO 15189 以及 ISO/IEC 17025 规定了纠正措施程序。

A.5 产品选择

A.5.1 通则

A.5.1.1 选择和处理样品的程序宜形成文件,进行操作时要避免引入意外的污染,并防止样品中微生物数量和类型发生明显改变。取样方法宜保持一致并宜允许对生物负载基于事件和基于时间进行比较。

选择用于生物负载测定的产品样品时,有下列可能:

- a) 选择实际产品(随机或规定的频率);
- b) 按照常规生产过程生产专门用于生物负载测试的产品;
- c) 选择不宜销售的产品,如废弃或不合格的产品。

样品选择取决于众多因素,但第一个先决条件是所选产品的生物负载宜能代表实际产品的生物负载。若决定使用不合格品,该产品宜经历生产的所有基本阶段,包括可能的清洁和包装过程。

为生物负载测定取样时,产品宜装在常规包装内。通常情况下,移除产品包装系统后,对产品本身进行生物负载测定,而不必测定包装系统的生物负载。根据无菌标签声明,内包装组件,如托盘或插件可能需要根据以下因素进行测试:

- 预期无菌;
- 包装是产品不可分割的一部分时;或
- 用于特定的评估。

A.5.1.2 在建立生物负载测试产品族时,宜考虑生物负载数据的使用(如原材料的控制、来料的接收、工艺步骤的评估、灭菌过程的鉴定)。宜考虑以下因素:

- a) 原材料的特性和来源;
- b) 部件的特性和来源;
- c) 生产过程的复杂性,如处理程度、工艺步骤数量;
- d) 使用的生产过程类型;
- e) 生产和/或装配环境;
- f) 产品设计及尺寸;
- g) 生产设备;
- h) 生产地点。

此外,微生物的数量和种类也会影响产品族的生物负载测试方法的选择。对于每个产品族,宜选用主产品或代表性产品用于生物负载的常规测定。主产品宜基于形成文件的原理进行选择。

若产品族内的产品认为是等同的,则可选择一个有代表性的产品用于生物负载的测定。可以常规监测所选择的产品或者轮流选取产品族中的其他产品。若对所选产品进行常规监测,产品族的其他产品的持续等同性宜定期监测或提供合理的理由。

A.5.1.3 若生物负载测定的数据用于建立或维持灭菌过程,则产品的抽样到生物负载测定之间的时间间隔宜能代表产品生产的最后一个步骤完成与灭菌之间的时间间隔。

A.5.2 样品份额(SIP)

A.5.2.1 在可行的情况下,生物负载的测定宜使用整个产品,若实验室容器很难容纳整个产品,在这种情况下使用样品份额。宜考虑整个产品生物负载的分布。若生物负载在产品上的分布是不均匀的,宜识别产品污染最严重的部位。该部位宜包括在选中的样品份额内。

A.5.2.2 宜尽可能将大部分产品用于样品份额。样品份额宜具有代表性,以确定整个产品的生物负

载。当测试大件产品(例如手术服或体外引流包)时,需仔细选择产品的样品份额。

A.5.2.3 宜考虑生产方面对产品上微生物分布的影响。

A.5.2.4 样品份额可以从对灭菌过程最具挑战的产品中选择,选择样品份额的示例如带有连接件或阀门等导管类的组件。

A.5.2.5 表 A.1 提供了选择不同样品份额计算基础的产品示例。

在准备或组合样品份额时,在取样操作时宜小心。若从产品上分离一部分,宜在受控的洁净环境条件下进行(例如在层流台内),以避免增加污染。

表 A.1 样品份额计算举例

产品份额依据	产品
表面积	植入物(不可吸收)
质量	粉末、衣物、植入物(可吸收)
长度	导管(直径一致)
体积	容器中的液体

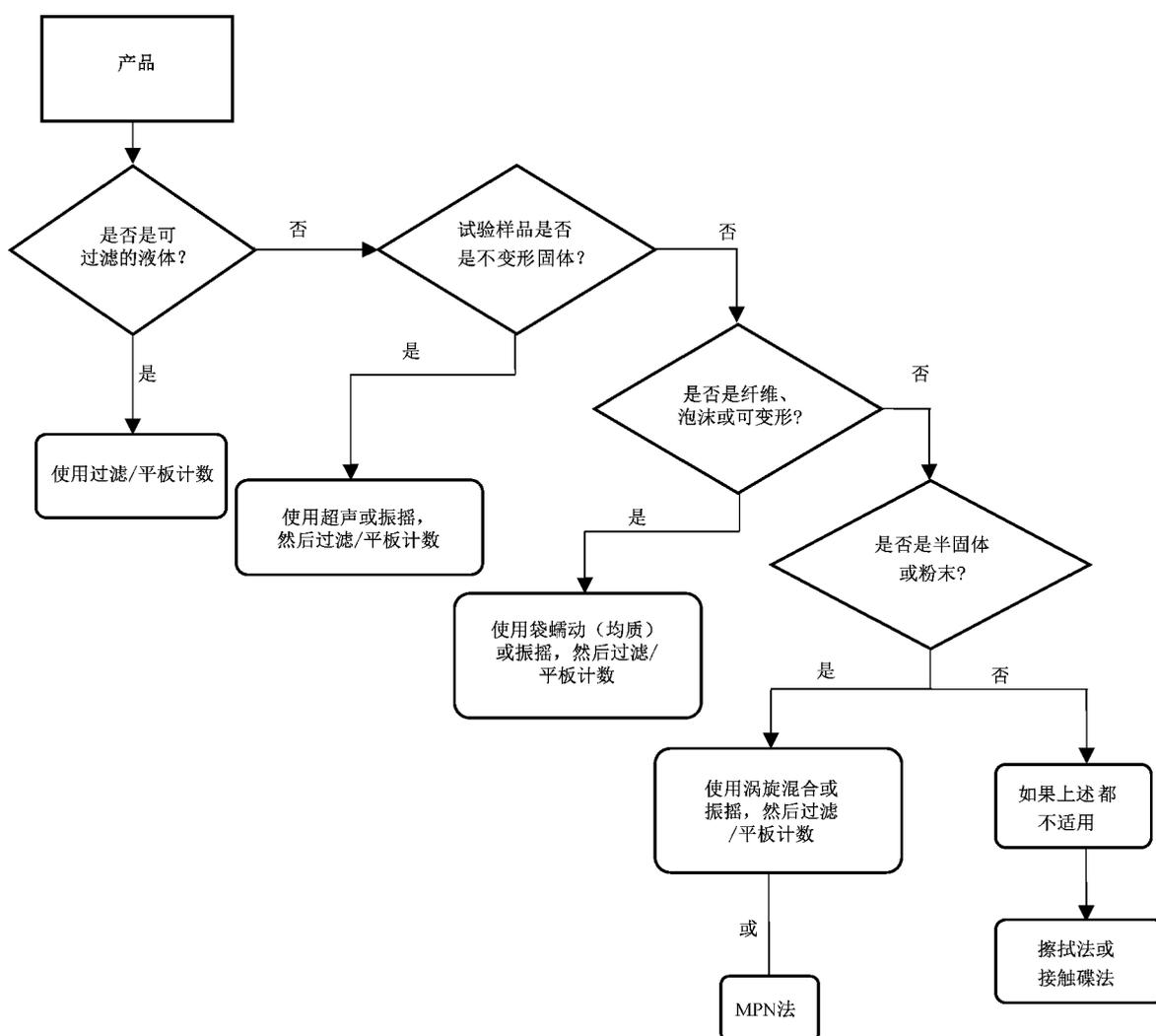
A.6 生物负载测定及其微生物鉴定的方法

A.6.1 生物负载测定

A.6.1.1 适当方法的选择

图 A.1 的决策树通用于生物负载测定方法的初步选择,基于培养和非培养的方法均适用。

采用培养方法测定生物负载含量高的产品时,确保适宜的稀释以获得可计数的结果,避免诸如菌落成片或数量过多而无法计数(TNTC)平板的问题。



注 1: 此决策树不排除使用替代方法、快速微生物负载测定方法(例如自体荧光法、流式细胞术、直接荧光法、过滤技术和固相细胞计数法)。

注 2: 此决策树不包含所有可以测试的产品类型和所有可以使用的测试类型。

图 A.1 生物负载测定方法选择决策树

对于生物负载很低的产品,即使采用合适的已确认回收率的生物负载测试方法,也可能无法从单个产品单元中回收可检测的生物负载。当检测到零菌落时,宜谨慎估计平均生物负载,以避免低估实际的产品生物负载。生物负载测试方法的预期检测限宜反映生物负载数据的预期用途,必要时,生物负载试验方法的设计宜尽可能合理可行地降低检测限。

为优化低生物负载产品的生物负载测定方法,必要时可考虑使用替代方法,示例见 a)~e)。

a) 合并样本法:将多个样本单元合并进行检测,需确定该方法的生物负载回收率,将合并样本回收的总菌落数除以合并的样本单元数量以估测每个单元的菌落数。单元合并可以估测低含量的每单元的菌落数,然而,它不能提供合并样本中各单元的生物负载分布和差异性的信息。每个样本单元菌落数量一致的情况下可以进行合并。

需重视合并法可能会降低发现生产过程中意外变化的能力,这取决于合并的方法。

b) 最可能数(MPN)法,见 B.3.3。

c) 微生物群的组合和消除测试法:对很多种类型的微生物而言,不需要将提取物分成不同的部分

进行单独测试,例如需氧菌、厌氧菌、孢子和真菌。若测试评估显示没有厌氧菌,后续可免除该项测试。此外,若在需氧菌计数中检测到需氧孢子,并且真菌计数不高,则可以将需氧菌、细菌孢子和真菌合并测试,例如,将全部的提取液过滤到一张滤膜上,放置在合适的通用培养基上,然后于两个不同的温度下进行培养(例如 30 °C~35 °C,20 °C~25 °C)。其他的例子包括使用培养温度(30±2)°C或者在其他温度范围内培养用于检测的特定微生物种群。采用这种方式消除稀释因子(假设消除是合理的),可以尽可能避免低估平均生物负载。

- d) 半检测限法:当生物负载结果中出现“小于检测限”时,该法有助于计算生物负载平均值。当较小百分比的结果为每板 0 CFU 时,该方法提供了较低的生物负载结果(见参考文献[27])。
- e) 以泊松分布值替代“小于检测限”值的方法:这里提供了一种评估平均生物负载值的方法。在整个生产过程中,生物负载通常不会以一种能够使用泊松分布进行统计学分析的方式分布在产品上。宜根据信息的预期用途仔细考虑对生物负载应用泊松分布的影响。(更多信息见参考文献[23]和[27]。)

选择生物负载测定方法宜考虑产品上或产品内可能出现生物膜。与液体接触时产品上或产品中会形成生物膜,除非采取适当的生物负载控制措施。含有组织的医疗保健产品有可能形成生物膜。

A.6.1.2 抑菌物质的中和

见附录 B。

A.6.1.3 微生物的采集

见附录 B。

A.6.1.4 微生物的培养

原料的性质、生产方法和产品生产条件是影响产品生物负载的因素,在选择培养基和现有条件时宜予以考虑。除非可能存在苛养菌,否则通用的、非选择性的培养基和培养条件是合适的。结合制造商提供的信息,实验室关于使用标准生物负载培养条件的建议作为考量和依据是充分的。

选择培养基和培养条件时,至少宜考虑下列几点:

- a) 没有一种培养基和培养条件的组合能支持所有微生物的生长;条件的选择宜尽量降低由于在不同培养基上计数相同微生物而高估平均生物负载的可能性;
- b) 确认活动比常规检测可能需要使用更多种培养基和更广泛的培养条件;
- c) 可能的微生物污染源和可能会遇到的微生物类型,宜注意某些污染源可能随季节变化,合成材料制成的医疗保健产品不太可能受到专性厌氧菌的污染。由组织或其他天然材料制成的医疗保健产品有受到专性厌氧菌污染的风险。

培养基和培养条件示例见表 A.2。

宜注意所有非选择性厌氧培养方法都能支持兼性厌氧微生物的生长。

表 A.2 培养基和培养条件示例^a

微生物类型	固体培养基	液体培养基	培养条件 ^b
兼性菌、非苛养菌、需氧菌 ^d	大豆酪蛋白消化琼脂(胰酪大豆胨琼脂) 营养琼脂 血琼脂 葡萄糖胰蛋白胨琼脂(平板计数琼脂)	大豆酪蛋白消化肉汤 (胰酪大豆胨液体培养基) 营养肉汤	30℃~35℃培养 3 d~7 d
酵母菌和霉菌	沙氏葡萄糖琼脂 麦芽提取琼脂 孟加拉红琼脂 氯霉素琼脂 大豆酪蛋白消化琼脂 (胰酪大豆胨琼脂) 马铃薯葡萄糖琼脂 葡萄糖胰蛋白胨琼脂(平板计数琼脂)	沙氏葡萄糖肉汤 麦芽提取肉汤 大豆酪蛋白消化肉汤(胰酪大豆胨液体培养基)	20℃~25℃培养 5 d~7 d
厌氧细菌	强化梭菌琼脂 ^c Schaefer 琼脂 ^c 血琼脂 ^c 兼性厌氧菌琼脂 ^c 大豆酪蛋白消化琼脂(胰酪大豆胨琼脂) ^c 哥伦比亚琼脂 ^c Wilkens-Chalgren 琼脂 ^c	罗伯逊肉汤 硫乙醇酸盐流体培养基	30℃~35℃培养 3 d~7 d
^a 本表未详尽列举所有示例。 ^b 所列培养条件为示例的微生物类型常用的条件。 ^c 在厌氧条件下培养。若培养基经过预还原,可以提高其性能。 ^d 一些用于兼性菌、非苛养菌、需氧菌的培养基也能支持酵母菌和霉菌的生长。			

A.6.1.5 微生物计数

方法的考量和理由足够充分时,实验室可以具体指定计数方法。见 B.6。

A.6.2 生物负载的微生物鉴定

A.6.2.1 必需的微生物鉴定程度取决于产品的特性、检出的菌落的多样性,以及数据的使用(例如灭菌鉴定)。

A.6.2.2 可以使用多种方法来鉴定构成医疗保健产品上或产品内的生物负载的微生物。用于生物负载的典型微生物鉴定方式包括菌落形态、细胞形态、染色特性、选择性培养和微生物鉴定。关于这些方法的详细信息如下。

a) 菌落计数时菌落形态易于记录。描述菌落形态在某种程度上是主观的,包括颜色、形状、大小、

纹理、边缘、凸起和其他物理方式可观察到的菌落特征。仅此信息无助于趋势分析(参见 A.8)。它通常可用于区分细菌和霉菌,并初步确定平板上的菌落是否可能是同一种微生物。为了识别污染源,需要更具体的方法进行进一步鉴定。

- b) 细胞形态学和染色技术,如湿涂片法和革兰染色法,常被用于鉴定微生物。这些方法的优点是仅需要极少的设备和时间即可获得微生物一般特征的有价值信息。通过物理描述和湿涂片法对真菌(即霉菌和酵母菌)进行鉴定足以对大多数分离株进行鉴定。
- c) 选择性培养和鉴别培养基可用于抑制特定微生物的生长、筛选特定微生物或帮助区分某些微生物与其他微生物(例如在特定培养基上菌落的颜色),这有助于微生物鉴定。
- d) 微生物鉴定可采用表型或基因型方法,或两种方法结合进行。传统的表型试验如菌落和细胞形态、革兰染色和芽孢染色反应、需氧或厌氧生长能力以及简单的生化反应(如过氧化氢酶、氧化酶、吡啶),通常提供菌所在群或属的一些指征。更复杂的生化和血清学测试,或基因型或蛋白质组学方法可以将细菌识别到属、种或菌株水平。酵母和霉菌也可以用类似的方法。形态学和生理特性的结合可用于确定属,结合生化同化可区分到种。

表 A.3 提供了生物负载常用鉴定方法。

表 A.3 生物负载常用鉴定方法

方法	举例	专属性
菌落形态	形态、凸起、边缘、大小、颜色	低
细胞形态	形状(杆菌、球菌、酵母) 大小,聚集(簇,链) 结构(真菌结构)	低到中
染色特性	鉴别染色(革兰染色、芽孢染色、抗酸染色) 真菌染色	低到中
选择性培养和鉴别培养基	热激活、培养参数、选择性培养基	中到高
属/种鉴定	基因和生化鉴定技术和系统	高

A.7 生物负载测定方法的确认

A.7.1 通则

一般而言,经典微生物学方法在确认生物负载测定方法时给使用者带来了挑战。通常不必确认经典的微生物学方法或国家和国际标准及药典中描述的方法。这些方法只需要在其独特的使用条件下验证其准确性和可靠性。这些措施通常足以确认生物负载测定的有效性。

在生物负载检测方法的确认中有两个方面需要考虑。第一个是中和测试系统抑菌因子以允许微生物繁殖的能力(生物负载方法的适用性),第二个是从产品中采集和培养微生物的能力(生物负载的回收率)。

当测定生物负载的方法包括从产品中采集微生物时,最值得关注的是采集过程的效率。采集和培养过程的确认称为生物负载回收率(详见附录 C)。

A.7.2 确认

A.7.2.1 生物负载方法适用性

生物负载方法适用性试验用于证明产品不会阻止微生物生长或检出。产品可能含有在生物负载测试条件下对微生物有抑菌作用的物质。

宜使用稀释或适当的灭活/中和的方法检测含有抑菌物质的产品。

宜在试验初期调查产品洗脱物的抑菌作用,以评估产品是否含有在生物负载测试条件下能够抑制微生物生长的物质。若器械包含已知或已证明为惰性的材料,则可接受书面的理由。

以下情况宜考虑生物负载方法的适用性:

- a) 当有新产品或变更的产品时;及
- b) 当测试条件有变化时(例如培养条件、提取介质)。

对于杀菌或抑菌物质适用性已给定的方法(例如采用经确认的膜冲洗程序进行的膜过滤),应用于产品时可能不需要进行特定的生物负载方法适用性试验。

A.7.2.2 生物负载回收率

通常有两种传统方法可用于确认从医疗保健产品上采集的微生物的回收率(见 C.1.4)。这些方法包括:

- 重复回收法:重复处理样品,然后定量评估回收程度;或
- 产品接种法:接种已知数量的微生物至产品上,然后定量评估回收程度。

第一种方法的优势是利用自然产生的微生物,但通常需要中高水平的初始生物负载。在此情况下,根据产品和/或结构首选第一种方法。第二种方法为试验建立了一个模型系统,但由此产生了该模型与产品自然状态微生物回收如何比对的问题。见表 C.1。

更多非传统产品(例如含有粉末、液体、抑菌剂、多种组分的复合物或复杂产品)可能需要组合方法来评估生物负载回收率。见附录 C。

对于过滤的液体产品,或使用 MPN 法时,不需要确定生物负载回收率和计算生物负载校正因子。但仍宜评估测试方法对计数的适用性。

A.7.2.3 计数和培养条件

关于计数的进一步指南见 B.6。

生物负载测定中选定的培养条件(即培养基和培养条件)不一定能够检测出所有的潜在微生物。因此,在实践中很可能会低估生物负载。尽管如此,还是要选择适宜的培养条件。

评估培养条件的一种方法包括基于对包括生产工艺、环境、材料和预期存在的微生物的了解来选择培养条件。若特定产品特征表明需要进行额外评估,则将典型培养条件下计数的微生物与替代培养条件下检出的微生物进行比较。若该方法表明在典型培养条件下检测到的生物负载比例较低,则宜重新考虑替代培养条件以优化测定。对于含抑菌剂可能影响微生物生长的医疗保健产品尤其要关注。

在选择用于微生物鉴定的方法时,考虑以下因素:

- 灭菌鉴定模式对制造产品的风险;
- 以前可用的数据;
- 生成数据的目的;
- 生产工艺(例如涉及水、手动、自动)和产品的性质。

A.8 生物负载的常规测定和数据分析

A.8.1 通则

为了证明已实施并维持了对微生物质量的有效控制,宜制定产品和/或组件的监测计划。

对生物负载水平的常规监测通常使用 3 个~10 个样本量。

若生物负载数据用于满足另一国际标准[例如 ISO 11137(所有部分)]的要求,该标准已预先规定了样本量和试验频率,其将取代此处推荐的样本量。

样本量的合理选择主要取决于两个因素。

a) 检测到的生物负载的变化。

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。为了早期发现平均生物负载水平的微小变化,可能需要一个大的样本量。

b) 单个样品间存活微生物数量估计值的差异。

这种差异程度将决定检测一个给定变化所需的样本量。这种估算中个体间差异小比个体间差异大所需的样本量少。

较大的样本量可以提高检测显著变化的置信度。

宜认识到,对生物负载数据的使用方式会影响在检测给定幅度的变化时要求的置信度。宜合理选择待检测的变化幅度以及实现该检测的可能性。

宜考虑各种因素合理选择监测频率,包括:

- 历史数据的可用性;
- 生成数据的目的;
- 生产过程的特性;
- 产品的生产频率;
- 及时检测生物负载变化的重要性;
- 季节和环境的变化。

可根据时间(例如每月、每季度)或生产量(例如间隔批次),按照一定频率进行取样。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检测出例如因季节变化、生产变更或材料变更引起的生物负载的变化。

A.8.2 检测限和平板计数

A.8.2.1 检测限

在确定生物负载值时,宜考虑生物负载测试方法的检测限(LOD)。对于微生物学报告,当对部分浸提液进行生物负载测试且回收到 0 个菌落时,结果通常报告为小于“X”,其中“1/X”代表测试部分的比例分数。例如若产品在 400 mL 液体中浸提,并过滤 $\frac{1}{4}$ 浸提液,则将零菌落结果报告为少于 4 个菌落形成单位(即 <4 CFU)。因此该示例的 LOD 为 4。在微生物报告中, <4 CFU 的结果意味着整个浸提液可能含有 0 CFU、1 CFU、2 CFU 或 3 CFU,但微生物报告规则要求报告为 <4 CFU。

单个生物负载结果以整数报告,因为该数字代表菌落形成单位。使用生物负载数据的平均值或采用其他数学计算生物负载值通常报告保留一位小数。

检测限可以通过以下方法改进:

- a) 对测试方法的更改(例如过滤更大比例的浸提液);

- b) 合并多个样品；
- c) 使用另一种测试方法，例如 MPN 法。

A.8.2.2 平板计数

在其他行业应用的已发布的标准微生物学方法中，建议选择处于可接受范围的平板（例如 <200 CFU、25 CFU~250 CFU 或 30 CFU~300 CFU）。这适用于进行多次稀释的情况，因此可从中进行选择。然而生物负载测试并不总是如此，因为：

- 许多产品具有较低生物负载，其平板计数低于例如 30 CFU；和
- 当计数较低时，并不总是需要多次稀释。

对于这些情况，记录和使用小于如 30 CFU 的计数平板是合适的。

平板计数可以通过三种不同方式确定：

- a) CFU 的直接计数；
- b) 估计计数；
- c) 超出可计数或估计范围的计数。

直接计数是使用任何便于准确计数的方法（例如计数器、标记平板等）直接数出所有菌落记录在表格中。

一个平板的一部分上的菌落可计数，并通过倍增方式代表平板的剩余部分时，可进行估算计数。

当存在扩散菌落时，估计计数是获得计数结果的一种方式。当扩散菌落（由于大小或不透明度）不遮蔽其他菌落时，通常应用该技术。

若可根据可识别菌落的存在得到近似的菌落数值，则可对超出可计数或估计范围的计数进行半定量。但是，若无法做到这一点，则结果宜记为“太多无法计数”（TNTC）。从一组样本的平均值中省略 TNTC 结果是一种可接受的做法。宜调查 TNTC 结果。

当使用重复平板计数、稀释因子或等分试样时，宜相应地调整平板计数以获得单个产品的计数。

A.8.3 微生物鉴定

若在微生物鉴定中回收的微生物类型不是正常生物负载的一部分，则宜考虑评估这些分离株存在的相关性。

A.8.4 生物负载数据的处理程度

无指南。

A.8.5 生物负载峰值

在生物负载的一组数据中的一个值显著大于（通常称为生物负载峰值）该组中的其他值。这种生物负载峰值可能出现在以下两种情况之一：

- a) 该值不是生物负载分布的正常且一致的部分；
- b) 该值是生物负载分布的正常且一致的部分。

通过对生产操作、微生物测试和样本处理的调查，可以确定生物负载峰值不是生物负载分布的正常和一致部分。参考本条以确定如何处理这种情况。

通过回顾历史数据，可以确定生物负载峰值是生物负载分布的正常且一致的部分。历史数据可以证明在预期范围内出现周期性较大的数值成为生物负载的一致部分。若这些数据包含产品上通常发现的微生物，这使其成为生物负载的正常部分。在确定灭菌处理的程度时，宜包括这些峰值。例如，由于

原材料不一致或生产工艺涉及过度处理,可能导致生物负载峰值的出现。

在表 A.4 给出的示例中,10 个批次中有 3 个批次(批次 2、5、6)包含的个别值明显大于批次平均值(在此示例中,是批平均值的 5 倍或更多)。已确定这些高值是生物负载的正常且一致的部分。因此在建立以确定用于灭菌过程处理程度的总平均生物负载时,可能需要考虑那些含有高值批次的高值和/或批平均值。

表 A.4 含有生物负载峰值的生物负载数据示例

批次号	测试结果 CFU/器械										平均值 CFU/器械
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	4	20	12	12	4	32	28	4	4	8	12.8
2	12	32	20	458	88	120	40	44	36	60	91.0
3	36	44	52	88	36	48	344	96	180	128	105.2
4	30	4	8	4	12	24	24	20	28	4	15.8
5	36	52	48	36	920	4	36	72	4	36	124.4
6	36	32	12	36	36	36	386	72	88	36	77.0
7	40	20	52	44	36	4	36	44	52	308	63.6
8	24	20	12	16	4	24	36	80	24	8	24.8
9	8	40	20	48	12	8	4	20	28	44	23.2
10	40	104	8	16	28	24	44	8	4	8	28.4
											56.6

A.8.6 生物负载水平

当超过规定的水平时,宜采取预定的措施。若纠正措施导致影响生物负载的工艺发生变化,则宜获取新数据并为产品建立新的生物负载水平。

生物负载水平的规定通常基于产品的历史数据和数据的使用目的。在收集历史数据之前,若希望建立临时水平,则可以在评估给定产品的前三批或更多批次之后设定。在为新产品线设置临时水平时,也可以使用来自类似产品、生产过程和/或生产环境的历史数据。对于某些产品源,可以预见生物负载的显著季节性变化。季节性湿度和/或温度水平/变化也可以改变生物负载中微生物的类型和数量。根据连续的测试结果,一段时间后宜重新评估生物负载数据以验证原始水平是否合适。

历史生物负载数据用于建立生物负载水平,通常定义为警戒限和行动限。建立这些水平宜考虑基于信息使用的意图而采用的方法。例如,生物负载水平可用于评估原材料供应商、鉴定或证明灭菌过程的持续有效性或评估在生产过程中环境控制的有效性。

宜考虑随着生物负载水平的建立,确立生物负载超限时宜采取的措施。这些措施宜基于对生物负载中存活微生物构成的认知,以及对测定不同方式附着在产品上(内)的生物负载的测试的了解。预见这些微生物数据并不精确。更常见的是,生物负载的微生物学数据中存在很大的范围。生物负载的微生物学数据也不符合或不需要符合任何统计分布。

使用标准差是确定生物负载警戒限和行动限的一种常用方法。在这种情况下,用标准差计算用于

了解数据的离散度,生物负载数据是否符合特定的统计分布并不重要。

宜调查被识别为异常高或异常低,或非典型趋势的数据。在设定生物负载监测水平时,在计算时可忽略已确定原因的非典型数据(例如实验室错误、在生产过程中偶发的高值)。当生物负载数据分析用于与质量相关的决策时,个别测试结果例如“无生长”或“太多无法计数”(TNTC),都宜包含在此分析中。

A.8.7 数据分析

将随着时间变化收集的数据用图形表示,有助于区分实际趋势和采样变化性。即使生物负载值仍在预设水平内,图形也可以表明微生物数量发生了显著变化。

在对生物负载测定获得的数据进行统计计算之前,特别是在记录了许多观察结果的情况下,有必要以适当的方式处理这些数据,以便展现出它们的重要特性。这可以通过将测量值分组形成频率表和图表来定性地完成。完成后,可检查数据的趋势。

有许多可应用于生物负载的趋势分析技术。这些趋势分析技术包括但不限于生物负载平均值或生物负载估计的趋势,休哈特控制图(ISO 7870-2)、基于范围的控制(BOR)或者累积和图(ISO 7870-4)。这些不同的技术均可用于确定与通常的结果随机分布的可能偏移,并突出显示偏差。

在某些情况下,可以适当地利用其中一种以上的技术来确定是否根据现有数据集采取措施或是否需要额外的数据。

A.8.8 统计学方法

依照 ISO 13485 的要求,宜策划和执行适当的测量和分析方法,包括选择合适的统计学方法。对各种产品的生物负载测定中获得的数据进行的检查说明了这些数据的可变性。各组产品组内的测定结果不同,因此,数据分析通常使用平均值。显然,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类型也会变化。

从生物负载测定中获得的数据的频率分布,一个常见特征是分布是偏离的,并且能够显示明显的拖尾。对于低值或者中间值数据,最常见的值为零,在这种情况下,生物负载通常很低,即使有效地实施了控制措施,偶尔也可能出现高值。

A.9 生物负载测定方法的维护

A.9.1 产品和/或生产过程的变更

宜审核产品和/或生产工艺的变更以确定对生物负载测定方法有效性的任何潜在影响。宜记录审核结果。在某些情况下,有必要变更和/或重新确认生物负载测定方法。

A.9.2 生物负载测定方法的变更

无指南。

A.9.3 负载测定方法的再确认

无指南。

附 录 B
(资料性)
生物负载确定方法的指南

B.1 概述

B.1.1 生物负载测定能在多种情况下应用。实施此类测定的负责人员宜考虑方法开发和确认的程度。此外,宜考虑进行测定的特殊情况,例如确定取样率、所用方法、培养基特性、相关的培养条件。

B.1.2 生物负载测定过程的关键步骤顺序如图 B.1 所示,实施此类测定的负责人员应用原材料、部件、生产环境、生产过程以及产品特性的知识为各步骤选择适当的技术。为选择合适的开发和确认方法,最初可能需要结合多种方法以确定最适合常规使用的方法。

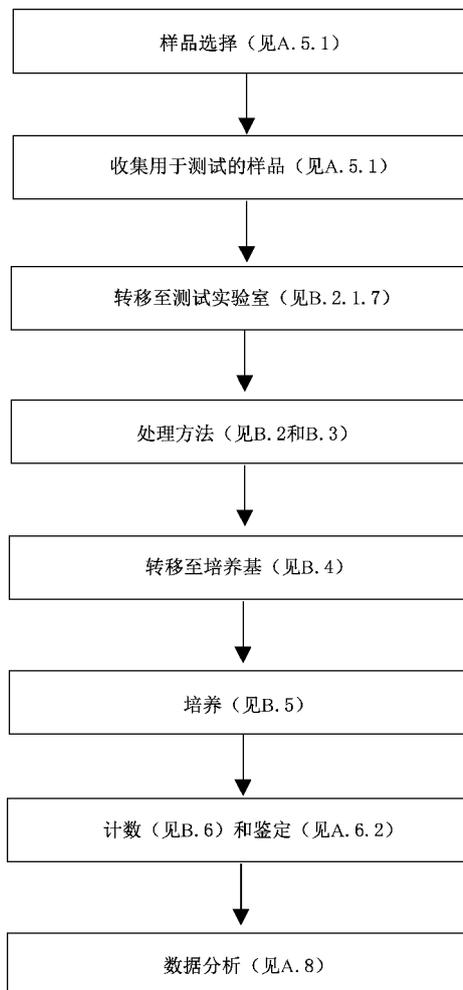


图 B.1 生物负载测定过程关键步骤的顺序

B.2 使用洗脱液采集微生物的方法

B.2.1 总则

B.2.1.1 本附录中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和减少差异性。

B.2.1.2 微生物对表面的附着程度因表面的特性、微生物自身和存在的其他材料(例如润滑剂)而异。污染物的来源也会影响附着程度。为采集微生物,所使用的处理方法包括施以某种形式物理力冲洗或直接表面取样。表面活性剂可用于提高回收率,但公认的是高浓度的表面活性剂可能会抑制微生物的生长。

B.2.1.3 对于与非无菌液体接触的材料,除非采取了适当的生物负载控制措施,否则微生物可能会以生物膜的形式出现。生物膜是一种微生物被包裹在一个牢固附着于表面的基质中的结构。生物膜中的微生物可对灭菌过程表现出增强的抗性。生物膜可在包含机体组织的医疗保健产品或已使用的器械上快速形成并可发展到较大的范围。这种情况下,宜考虑生物膜形成的可能性,不宜认为 B.2.2 中所述的处理方法能将微生物完全地从生物膜中释放出来。在采集技术的确认过程中,若重复的回收过程中反复记录到较高微生物数量,则表明可能有生物膜存在。高水平的内毒素也表明生物膜可能存在。

B.2.1.4 在生物负载测定中所用的任何处理宜有重现性,并宜避免可能影响微生物活性的条件,例如过度气蚀、剪切力、温度上升或渗透冲击。

B.2.1.5 有些处理比其他方法更易于控制。当选择处理方法和设计合适的处理条件时,宜考虑变量及其控制方式。例如对于一个给定的处理可延长或改变机械搅拌的性质以增加对微生物的采集。

B.2.1.6 某些处理方法(例如碎裂、均质器处理和涡旋)可以分解在测产品,分解材料的存在会增加微生物计数的难度。额外的处理可能是必要的,例如从洗脱液中分离分解的材料。宜注意确保获得的计数具有代表性。主要基于微生物的相对疏水性,某些类型的微生物会比其他类型的微生物更容易聚集/再聚集。

B.2.1.7 宜尽力将试验样品尽快地转移至实验室。若延迟转移不可避免,宜选择物品的储存条件,以尽量减少微生物数量的变化。宜规定最长储存时间。干燥可能是微生物数量显著减少的原因,在选择储存条件和储存时间时宜加以考虑。

B.2.2 采集技术

B.2.2.1 均质器处理

B.2.2.1.1 将试验样品和已知体积的洗脱液装在一个无菌均质袋中。拍击板往复作用于袋子表面,迫使洗脱液通过和围绕试验样品。

B.2.2.1.2 宜规定处理时间。

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

B.2.2.1.4 若使用了大量的洗脱液,本方法可能会生成含有低浓度微生物的悬浮液。若可行,宜对洗脱液进行过滤。

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。将容器连同内容物一起在超声波清洗器中进行处理,或将超声探头浸入容器内洗脱液中。超声波也能使微生物失去活性,尤其是更大能量传输时,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。宜依照 B.9 评估超声法。

B.2.2.2.2 宜确定超声处理的额定频率和处理时间。此外,宜确定试验样品在超声波清洗器中的放置位置。宜考虑限制同时进行处理的试验样品数量,因为一些超声波能量在穿过遮挡物时会被减弱。

B.2.2.2.3 该方法尤其适用于不可渗透的固体试验样品以及形状复杂的产品。该方法对某些医疗保健产品可能造成破坏,尤其是对那些带有电子元件的医疗保健产品,例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导致微生物破坏和死亡,或导致洗脱液过热。

B.2.2.3 振摇(机械或人工方式)

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(例如往复式、轨道或机械腕动作)振摇规定时间/循环次数,以辅助微生物的采集。也可用人工振摇,但其效果会因人而异。

B.2.2.3.2 宜规定振摇时间和频率。

B.2.2.3.3 可加入规定大小的玻璃珠以增加表面摩擦,由此提高生物负载回收率。加入的玻璃珠的大小以及振摇时间和频率不宜导致过热和/或对微生物造成可能的破坏。

注:添加玻璃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,密闭容器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。涡旋的变化会使微生物采集产生差异。

B.2.2.4.2 宜规定所用容器、混合时间以及混合器的设定速度。

B.2.2.4.3 该方法操作简单快捷,但主要适用于在小容器内的小型试验样品。宜评估操作涡旋混合器的不同人员间的采集差异。

B.2.2.5 冲洗

B.2.2.5.1 让洗脱液通过试验样品的内腔。可以靠重力或泵促使液体流动。另外也可让洗脱液充满产品,夹住并摇晃。

B.2.2.5.2 宜确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 器械结构及内腔尺寸会限制从内表面完全采集微生物所必需的冲洗力。

B.2.2.6 混合(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混合或破碎试验样品。

B.2.2.6.2 规定的时间取决于试验样品和混合器,但是时间不宜过长,以免洗脱液过热可能对微生物造成破坏。

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,以便于通过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 拭子包含的吸附性材料通常被固定于一定形状的杆或把手上。取样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拭子,并用拭子擦拭预先界定的试验样品的表面。在有些情况下,可通过先湿润表面,然后用干拭子擦拭的方法提高生物负载回收率。将拭子转移至稀释液中并搅动,以采集拭子上的微生物。另外,若使用可溶性拭子,拭子会溶解到稀释液中。

B.2.2.7.3 擦拭法是一种对不规则形状产品或相对难以进入区域取样的有效方法。该方法也可用于大

面积区域的取样。

B.2.2.7.4 该技术因拭子操作方式的差异,特别容易出错。而且,不可能通过擦拭将表面上的全部微生物都采集起来。有些采集到的微生物会被拭子本身吸附。因上述原因,使用该方法的回收率通常较低。

B.2.2.7.5 拭子中不宜有杀菌剂或抑菌剂存在。

B.2.3 洗脱液、稀释液和转移介质

B.2.3.1 在生物负载测定过程中,洗脱液可用于从产品上采集微生物,转移介质可用于转移采集到的微生物以进行计数,稀释液用于制备含有可计数微生物的悬液。

B.2.3.2 洗脱液和稀释液的特性对所用方法的总体效率有明显影响。选择稀释液或洗脱液时,宜考虑其组分(例如成分、浓度、渗透压和 pH)。理想情况下,这些组分不宜使微生物增殖或失活;但是不能确定此理想情况适用于所有潜在污染物。

B.2.3.3 当用液体从固体表面采集微生物时,可考虑结合使用温和的表面活性剂。见表 B.1。

B.2.3.4 常用的洗脱液和稀释液见表 B.1。

表 B.1 洗脱液和稀释液示例

溶液	水溶液浓度	应用
氯化钠蛋白胨缓冲液	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
蛋白胨水溶液	0.1%~1.0%	通用
磷酸盐缓冲液	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
氯化钠溶液	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	稀释水样; 计数前制备可溶材料的等渗溶液
注:本表并未包括全部。表面活性剂,例如聚山梨酯 80,可添加到洗脱液和稀释液中。根据具体的应用,通用浓度在 0.1%~1.0%之间。可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 不使用洗脱液采集微生物的方法

B.3.1 接触板

B.3.1.1 在此方法中,可将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,然后再培养接触平板或接触片,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、菌落在琼脂表面蔓延、琼脂失水、可能存在的厌氧位置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 琼脂覆盖包括用熔化的琼脂培养基覆盖产品表面并使其凝固,然后培养以产生可见的菌落。该方法不经常使用,但在生物负载较低且产品结构合适时适用。

B.3.2.2 表面上自然集聚的细胞群、菌落在琼脂表面蔓延、琼脂失水、可能存在的厌氧位置等都是潜在的不利因素。并且有一些微生物在不适宜温度中不一定会保持活性状态,这会导致假阴性结果或影响正确的评价。

B.3.3 最可能数(MPN)法

B.3.3.1 MPN法是一种成熟的有充分文献依据的方法,用于估算在产品中随机分布的存活微生物的数量。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中并培养,记下有存活微生物存在的每个样品。通常使用ISO 11737-2提到的同一培养基和培养条件,持续培养7 d是适宜的。可将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。根据一组测试中阳性结果出现频率,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%的置信区间是相对宽的。该估算和其置信界限来自MPN表格^[29],此表是在一定的假设条件下编制的,即根据泊松分布原理,重复取样的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。FDA BAM附录2^[30]中包含了用于计算MPN 95%置信度的电子数据表。

B.3.3.3 MPN法应用的关键要求是微生物数量在整个在测产品上随机分布。因此,MPN法可用于液态医疗保健产品、黏性液体、粉末或单一产品如洗脱液的液体中生物负载的估算。

B.3.3.4 MPN法易于执行,并且该方法的统计基础使它更适用于一般评估,而不是精确测定。用于10个样品的单次稀释的MPN法在FDA BAM的表格5中可以看到^[30]。这种单次稀释法不包含额外的稀释量,不能提供更多关于产生阳性样品的微生物数量的信息。或者,公式(B.1)可以用于单个样本或多个样品份额(SIPs),以确定最有可能的数量。公式(B.1)是科克伦原始公式^[45]的简化版本。

$$\text{MPN}(\text{sd 或 SIP}) = \ln\left(\frac{n}{s}\right) \frac{1}{\text{SIP}} \dots\dots\dots(\text{B.1})$$

式中:

sd —— 单次稀释的;

ln —— 自然对数;

n —— 被检测的样品总数;

s —— 阴性样本数。

B.3.3.5 每个产品的MPN结果可以等同于每个产品的CFU结果,用于生物负载计数和计算。

B.3.3.6 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 转移至培养基

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。可用下述其中一种方法检查悬液中存活微生物并进行计数。

B.4.1.2 在转移至培养基之前,为了将微生物聚集体分散,可能需进行额外的处理,以防估计值过低。在某些情况下,从试验样品上采集微生物的方法也会分散这种聚集体。

B.4.1.3 杀菌或抑菌物质的存在可能会影响培养方法的选择。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 薄膜过滤法

B.4.2.1 洗脱液过滤后,将滤膜贴在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 $0.45\ \mu\text{m}$ 的过滤膜适于采集微生物。然而,若预期产品上或产品中存在的微生物需要使用较小的孔径滤膜,则宜考虑使用较小的孔径滤膜。

B.4.2.2 通常需要一真空源,某些时候需要压力源。宜小心操作避免背压过大而使过滤膜变形或损坏。

B.4.2.3 对含有微粒(如纤维产品的残余物)的洗脱液进行膜过滤是困难的,因为微粒会堵塞过滤器。

B.4.2.4 进行培养时,可将滤膜贴在琼脂表面或者浸泡了液体营养培养基的吸收垫上。对薄膜表面上形成的菌落进行计数,从滤膜上分离出来进行鉴定。

B.4.2.5 膜过滤法特别适用于微生物浓度较低的悬液。

B.4.2.6 当液体中可能含有杀菌或抑菌物质时,过滤法也是有效的,因为洗脱液中微生物可通过滤膜分离并可在冲洗后进行培养。某些种类的滤膜能吸附或释放抑制微生物生长的物质,因此只使用适用于进行微生物计数的滤膜是重要的。滤膜和洗脱液宜相容。

B.4.3 平板倾注

B.4.3.1 使用平板倾注技术,将一定量的悬浮液与约 $45\ ^\circ\text{C}$ 温度熔化的琼脂相混合,然后使混合物在平板中凝固。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,需考虑的注意事项见 B.8。

B.4.3.3 可倾注的洗脱液量是有限的,因此这种方法对于微生物浓度较低的悬液可能没有理想的灵敏度。

B.4.3.4 琼脂的温度宜尽可能低,以避免对微生物造成损害,因为即使是 $45\ ^\circ\text{C}$ 也会灭活一些环境微生物。因此,尽管在特定情况下可以使用羟甲基纤维素作为凝固剂,平板倾注可检测的微生物类型依然存在局限性。

B.4.4 平板涂布

B.4.4.1 平板涂布:通过使用涂布器将一定量悬液涂在培养基表面。

B.4.4.2 涂在培养基表面上的悬液宜被吸收,才能形成分散的菌落;吸收能力决定了一个平板表面所能处理的悬液体积。

B.4.4.3 若存在杀菌或抑菌物质,需考虑的注意事项见 B.8。

B.4.4.4 可涂布的洗脱液量是有限的,因此这种方法对于微生物浓度较低的悬液可能没有理想的灵敏度。

B.4.5 螺旋涂板

B.4.5.1 螺旋涂板使用自动装置,将一定量的悬液涂在固体培养基表面。悬液以螺旋轨迹从培养基中心以一定的递减率向外周涂抹。经过适当培养后对全部或部分平板运用专门的计数栅格和计数技术来统计原始悬液中存活微生物的数量。

B.4.5.2 用螺旋涂板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布法得出的结果具有良好的 consistency。由于器械的设计和毛细管及小容量(悬液)的使用,螺旋涂板主要用于完全分散的、无凝聚物且含有高浓度微生物的悬液的计数培养。

B.4.5.3 若存在杀菌或抑菌物质,需考虑的注意事项见 B.8。

B.5 培养(培养基和培养条件)

B.5.1 表 A.2 中列出了一些培养基和培养条件的示例。该清单并未包含所有示例。通过包含分子技术的方法确定产品上存在的生物负载种类,可能会选择或排除一些微生物培养基。

B.5.2 宜注意所有非选择性厌氧培养法会使兼性厌氧微生物生长。然而,这些微生物的范围会因培养基和培养条件的不同而有很大的差异。

B.6 计数(菌落计数)

B.6.1 在使用菌落计数的计数方法中,宜建立程序来处理各种情况,如:

- a) 观测小菌落(例如使用立体显微镜);
- b) 计数和报告不常见菌落(例如成片菌落);
- c) 计数和报告密集的平板[例如菌落被遮挡或太多无法计数(TNTC)的平板];
- d) 报告连续稀释后的计数结果。

B.6.2 在使用菌落计数的方法中,宜考虑平板上产生的菌落数。这个数量宜是每个存活微生物都能够成为一个可见的菌落来呈现,而不受其近邻的不利影响。

B.6.3 标准平板计数规范通常规定平板上菌落数量的下限。该限值基于可供选择的稀释倍数。多重稀释不一定适用于生物负载较低的医疗保健产品的生物负载测定。

B.6.4 平板计数时宜评估不同技术人员之间结果的差异。标准方法参见 9215 异养平板计数^[40]中举例说明了不同技术人员之间结果可接受的偏差。

B.6.5 纤维的存在可能会阻碍分散菌落的形成,从而使计数变得困难。

B.6.6 若存在易扩散的微生物,仔细地在试验平板表面上覆盖一层琼脂可以获得培养后更容易计数的试验结果。

B.6.7 对于自动计数方法,宜根据 ISO/IEC 17025 对系统进行确认。

B.6.8 若使用了多种试验条件(例如一个平板上计数需氧微生物,在另一个平板上计数真菌),且无菌落生长,检测限(LOD)是累加的。例如需氧微生物数 <2 CFU,真菌数 <2 CFU,那么总数为 <4 CFU。

B.7 检测微生物的其他技术

生物负载测定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(例如阻抗法或荧光法)。这些技术称为“间接法”,是因为在建立与存活微生物数量的关联之前,它们需对照菌落计数进行校准。替代技术宜有足够的敏感度来检测低水平微生物。一般来说,所检测到的微生物数量的下限超过 100 CFU。

注:有一些快速的微生物方法(例如生物体发光、酶催化、细胞计数)可以提供关于以生物负载形式表现的微生物种类和相关数量的详细信息,并能评估可能出现的变化。这些方法相较于直接培养也能更快地提供生物负载信息。

B.8 影响生物负载测定物质的释出筛查

B.8.1 筛查的目的是研究从产品释放到悬液中的物质可能对脆弱的微生物生存能力的影响,这也是用于评估技术是否符合 6.1.2 的方法示例之一。

B.8.2 选用的每一灭菌产品,都宜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 中的规定,而产品若是直接接种到培养基中,按照 B.8.4 中的规定进行会更合适。

B.8.3 洗脱液宜不抑制从产品上采集的微生物的生长。

B.8.4 若产品是直接接种到培养基中(例如在 MPN 计数中,参见 B.3.3),可以使用药典中描述的方法适用性试验。试验中,在相同条件下将少量微生物和产品一起使用常规生物负载测定的建议条件进行培养。使用的微生物数量通常宜为 50~100。对结果的评价参见 B.8.5,经过规定的时间后,观察培养基内是否可见生长。

若医疗保健产品中含有能缓慢释放到培养基中的抑菌物质,则宜在培养周期结束时用少量微生物对产品和培养基混合物进行挑战试验。

B.8.5 若接种的微生物数量和回收数量有很大不同,或在适用性试验中未观察到微生物生长,宜重新考虑生物负载测定方法,如有必要则引入稀释法、中和法或过滤法以减少、灭活或去除抑菌物质。

若需要评估洗脱液的影响,可以将已知数量的微生物接种到洗脱液和对照溶液中,建议处理时间接近生物负载测定时间。处理结束后对洗脱液中回收的微生物进行计数,并与从对照溶液中回收的微生物数量进行比较。

B.9 物理力的不利影响筛查

物理力用于采集产品上的微生物(见 B.2.2)。宜考虑这些力对生物负载测定的影响。若需要评估物理力的影响,在无(受测)设备的情况下将物理力作用于已知数量的少量微生物(不多于 100 CFU)。对这些微生物进行计数能得出物理力的影响。

附 录 C

(资料性)

生物负载回收率的确认

C.1 总则

C.1.1 确认前

开始确认前,宜验证和规定对于每个产品或部件或产品组的采集技术。说明产品、样本量和回收技术的选择理由并形成文件。

C.1.2 基于生物负载回收率的目的对产品分组

相似的产品或部件可以分类为一个产品组,然后选择一个有代表性的产品进行生物负载回收率确认。分类的标准包括在原材料、设计大小、生产工艺、生产环境、生产人员和生产场所等方面的相似性。生物负载回收率确认的结果可以应用于将来同组内的所有产品的试验。

C.1.3 样本量

C.1.3.1 宜对测定生物负载回收率的产品或部件数量进行选择。

C.1.3.2 常用的方法是使用3~10个产品进行回收确认试验。主要基于试验的目的(例如建立辐射灭菌剂量或过度灭菌周期)来确定样本量。当审核生物负载回收率结果时,对结果一致性进行审核,若结果不一致,宜使用不同的提取方法。或者更大的样本量可以更准确地测定生物负载回收率。

C.1.4 生物负载回收率方法选择指南

C.1.4.1 通过测定生物负载回收率来确定生物负载校正因子,并将其应用于生物负载数据估算,以补偿一部分不能被取样技术采集或不能在所用培养基中生长的微生物。通过生物负载校正因子的生物负载数据,能更准确地代表真实的生物负载值,这称为生物负载估计值。生物负载回收率试验也能用来比较生物负载测试方法。

C.1.4.2 在选择生物负载回收方法时(例如重复回收法对比产品接种法),主要考虑的因素是产品上自然存在的生物负载水平。通常,重复回收法适用于产品上微生物数量较多的情况,产品接种法适用于产品上微生物数量较少的情况。生物负载回收率结果和相应的生物负载校正因子可能因生物负载提取参数(例如重复回收的提取次数和类型,或产品接种法对比重复回收法)不同。因此,考虑回收率测定目的和微生物数据收集目的是很重要的。

C.1.4.3 表 C.1 总结了选择生物负载回收方法时宜考虑的典型的特征。

表 C.1 选择生物负载回收率方法时的一般考量

项目	回收方法	
	重复回收法	产品接种法
原理	对个体样品重复应用特定的技术	用规定水平的芽孢杆菌芽孢悬液接种产品。根据不同情况也可使用其他细菌

表 C.1 选择生物负载回收率方法时的一般考量 (续)

项目	回收方法	
	重复回收法	产品接种法
产品特性	具有中等至高生物负载量(例如:100 CFU~1 000 CFU)或高生物负载量(例如:>1 000 CFU)的产品。 通常包括以下类型的产品: ——有多种材料或表面的产品; ——具有黏合或编织基质的产品(例如织物、卷料、泡沫材料); ——多种部件组装在一起使用; ——含黏合剂/胶水的产品; ——含动物源性器械,尤其是从屠宰场获得的材料	低生物负载量(例如:<100 CFU)或极低生物负载量(例如:<10 CFU)的产品。 通常包括以下产品类型: ——易于溶解或分解的产品(例如可溶性材料); ——简易的塑料器械(例如不需过多处理的注塑成型); ——部件很少的产品; ——具有抗菌性能的产品; ——已清洁的产品
与实际生物负载的相关性	能代表自然生物负载的性能和类型	对自然生物负载性能和类型不具代表性。 芽孢相比其他细菌更易被采集,尤其是人工接种而不是自然形成的芽孢
结果一致性	因为自然生物负载的多样性,重复样品的结果较少一致性	重复样品的结果更具一致性
适应的测试时间	3 d~7 d(根据自然生物负载)	2 d~5 d(根据所用的微生物)
测试的复杂性	更花费人力	较少花费人力
方法的挑战性	自然生物负载的稳定性,生物负载不一致/多变	悬浮液在干燥、结垢、黏附或不黏附过程中结块

C.1.4.4 若在单独的容器中测试产品和/或使用不同的方法测试不同的部件,则具有不同类型部件(例如套件、粉末)的复杂产品可能需要不止一种生物负载回收率测定方法。这可能需要对使用不同方法测试的产品应用一个以上的生物负载校正因子。

C.1.4.5 若生物负载量低,并且若需要较大的测试样本量,则将多种产品作为混合样品一起进行测试。在这种情况下,无法获得单个产品的生物负载分布。若预期日常测试进行样品合并,则宜以相同方式进行生物负载回收率测定。例如若在常规测试中将5个产品合并在一起,则宜使用合并的5个产品实施生物负载回收率测定。

合并样品测试的生物负载回收率结果可能取决于合并的产品数量,若合并的产品数量变更,则生物负载回收率宜重新评估。

C.2 重复回收法

注:本方法的确认过程是使用在产品上自然形成的生物负载。本方法有时也称为“极限回收”。

C.2.1 使用重复回收法进行确认

C.2.1.1 该方法的理论基础是生物负载的确定的方法宜重复进行,直到回收的微生物数量显著减少。

每重复一次后,将产品或产品部分的洗脱液全部回收并进行计数。比较连续回收所累积的结果。需要指出的是本方法未必精确。不一定总能证明回收的微生物数量与产品上实际存在的微生物数量之间的确切关系。

所需要确切重复次数取决于多种因素,其中包括产品特性、构成生物负载的微生物和初始污染水平。可以使用预试验或类似产品的测试经验来确定需要的重复次数。

C.2.1.2 首次采集后的菌落数与所有重复测试中菌落总数的比值即为生物负载回收率。

C.2.1.3 使用需氧菌计数进行重复回收已被行业认可。通常构成医疗保健产品上的大部分微生物是需氧菌,因此其可有效代表其他类型微生物的回收特性。重复回收测试是基于微生物在产品上的附着方式来衡量回收方法的微生物采集效率,因此这些动力学特征通常适用于所有类型的微生物。

C.2.2 生物负载校正因子计算举例说明

C.2.2.1 本示例中,表 C.2 列出了重复处理确认过程中的一组数据,该示例中的数据涉及 10 个重复的医疗保健产品,并且在重复回收测试中进行了 5 次处理。

C.2.2.2 从表 C.2 中的数据可计算出采集率,如表 C.3 所示。

表 C.2 重复回收数据示例

产品	处理/浸提 CFU					5 次处理 总采集数 CFU	首次处理 采集率 %
	1	2	3	4	5		
1	450	200	20	10	<5	685	65.7
2	200	120	200	130	20	670	29.9
3	90	130	80	20	10	330	27.3
4	1 200	550	40	90	60	1 940	61.9
5	450	330	20	20	10	830	54.2
6	200	285	190	< 5	20	700	28.6
7	930	650	650	40	70	2 340	39.7
8	1 350	220	280	60	30	1 940	69.6
9	120	40	50	< 5	5	220	54.5
10	480	150	240	60	20	950	50.5
首次处理平均回收率			48.2%		校正因子(CF)=2.07≈2.1		
最差情况回收率			27.3%		校正因子(CF)=3.66≈3.7		
注:第 1~5 列中的计数已使用稀释因子进行调整,也可以使用未调整的计数来计算回收率,在该情况下计数为零是可以接受的。							

表 C.3 重复回收数据示例

产品	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
首次处理的回收量	450	200	90	1 200	450	200	930	1 350	120	480
总回收量	685	670	330	1 940	830	700	2 340	1 940	220	950
首次处理的回收率	65.7%	29.9%	27.3%	61.9%	54.2%	28.6%	39.7%	69.6%	54.5%	50.5%
首次处理的平均回收率	48.2%				校正因子(CF)=2.07≈2.1					
最差情况回收率	27.3%				校正因子(CF)=3.66≈3.7					

C.2.2.3 根据经首次处理后的平均回收率,并经过适当修约,可得到生物负载回收率的生物负载校正因子,如公式(C.1)所示:

$$\frac{100}{48.2} = 2.07 = 2.1 \quad \dots\dots\dots (C.1)$$

在某些情况下,可以使用最低回收百分比值以反映最差情况。该过程可根据生物负载估计值的用途而定。表 C.2 提供的数据中最差情况生物负载校正因子(包括修约)如公式(C.2)所示:

$$\frac{100}{27.3} = 3.66 = 3.7 \quad \dots\dots\dots (C.2)$$

C.3 产品接种法

C.3.1 使用产品接种法进行确认

C.3.1.1 通过在产品上接种已知数量的选定微生物形成人工生物负载以确定生物负载回收率。该微生物可以是细菌繁殖体,但最普遍的方法是使用需氧细菌芽孢。在操作上使用细菌繁殖体会有难度,因为干燥过程会使其失去活性。

微生物接种存在很多限制因素,例如悬液的结垢、黏着或非黏着状态,以及接种物水平上的聚集和变化,产品接种时宜考虑此类限制。

C.3.1.2 宜制备待接种产品的微生物悬液并测定其存活菌数量。

C.3.1.3 可能需要进行预试验以确定适当的稀释度。通常可将已知水平的活性微生物接种在产品上,使平板计数结果在可计数范围内。

C.3.1.4 宜选择多个产品或产品部分用于测定生物负载回收率。宜根据具体情况考虑是否需要使用无菌产品。每个产品接种一定体积的微生物悬液,若产品适合宜在层流条件下干燥。接种时测定接种物的存活微生物数。

悬液在产品上的分布宜确保覆盖自然形成的污染物最难采集的部分。接种时还宜考虑产品的各种材料类型。

对吸附性材料制成的产品进行接种时,可将其浸于所选定的微生物悬液中,这种方法能使微生物均匀分布在产品上。

C.3.1.5 使用确定的生物负载测定方法评估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。可为每一个产品计算百分率,并用其建立回收率。

C.3.2 产品接种法计算生物负载校正因子说明示例

C.3.2.1 在本示例中,表 C.4 列出了产品接种回收确认过程中的一组数据。这些数据涉及 3 个重复的产品部分。

C.3.2.2 由于预试验表明产品生物负载水平非常低,所以选择产品接种法进行确认。

C.3.2.3 制备萎缩芽孢杆菌(原名枯草芽孢杆菌黑色变种)的水悬液,并测定悬液的活菌数。

C.3.2.4 制备悬液稀释液,使每 0.1 mL 体积中平均含有 100 个芽孢。每个器械接种 0.1 mL 稀释悬液,并在层流中干燥。

C.3.2.5 使用选定方法采集接种产品,芽孢平均采集数量约为 76,其范围可在 68~83 之间。

表 C.4 接种回收确认的样品数据

平均接种量 CFU	样品	回收接种量 CFU	回收率 %
100	1	76	76.0
	2	83	83.0
	3	68	68.0
平均值			75.7

C.3.2.6 生物负载回收率的生物负载校正因子(包括修约)如公式(C.3)所示:

$$\frac{100}{75.7} = 1.32 = 1.3 \quad \dots\dots\dots (C.3)$$

在某些情况下,可决定使用采集百分比范围内的最低值反映最差情况。该决定受数据用途影响。对于上述数据,最差情况下的生物负载校正因子(包括适当修约)如公式(C.4)所示:

$$\frac{100}{68} = 1.47 = 1.5 \quad \dots\dots\dots (C.4)$$

C.3.3 两种生物负载回收率方法比较说明示例

C.3.3.1 在本示例中,表 C.5 列出了两组回收确认数据。该企业根据风险为生物负载回收率确定了内部接受标准。本示例数据涉及 5 件产品,都使用同种方法测试(首次试验),其中平均回收率低于规定标准。因此,在现有方法中增加了一个附加步骤,以确定生物负载回收率是否得到了提高(第二次试验)。

表 C.5 两种回收方法的生物负载回收率百分比比较

方法	生物负载回收率 %					平均回收值
	1	2	3	4	5	
首次试验 使用《美国药典》规定的 Fluid D 进行 5 min 机械振摇	37.3	25.2	50.2	33.7	29.5	35.2

表 C.5 两种回收方法的生物负载回收率百分比比较 (续)

方法	生物负载回收率 %					平均回收值
	1	2	3	4	5	
第二次试验 使用《美国药典》规定的 Fluid D 进行 5 min 机械振摇+样品超声处理 2 min	60.2	64.7	72.1	68.2	54.5	63.9

C.3.3.2 调整原始方法后,生物负载回收率得到了提升,并符合规定标准。根据生物负载数据的用途和所需精度来考虑是否需要得到更多一致的数据,或者是否需要进一步提高生物负载回收率,以便更好地估计回收的生物负载。

C.4 生物负载回收率在复杂产品中的应用

C.4.1 表 C.6 示例中,需使用多种回收方法来估计复杂产品的生物负载水平。本示例说明了如何将两种不同的生物负载校正因子应用于相应的生物负载数据组。为确定该复杂产品的生物负载水平,需要将所有 3 个生物负载估计值相加。

C.4.2 测试组织和生物制品时,可以参考 AAMI TIR37 获取进一步指南。设计为随时间分解的产品(如药物洗脱产品或生物可吸收制品)宜在生物负载回收率试验方法开发中考虑此类变化。

表 C.6 利用两个生物负载校正因子和 MPN 结果确定的复杂产品的生物负载估计值

容器	生物负载回收率 %		
	产品部分 1 使用冲洗法进行测试	产品部分 2 使用 5 min 机械振摇法 进行测试	产品部分 3 粉末材料使用 MPN 进行测试
1	49.5	79.3	N/A
2	53.9	89.4	N/A
3	38.4	67.4	N/A
4	64.3	76.0	N/A
5	29.7	69.3	N/A
平均回收率	47.2	76.3	N/A
相应校正因子	2.1	1.3	N/A ^a
复杂产品的生物负载回收率和 MPN 结果实际应用			
生物负载回收率/CFU	5	100	80 包括稀释因子
生物负载估计值/CFU	$2.1 \times 5 = 10.5$	$1.3 \times 100 = 130.0$	80
产品总生物负载估计值/CFU	$10.5 + 130.0 + 80 = 220.5$		
^a 可能需要应用稀释因子。			

C.5 数据分析与生物负载校正因子的应用

C.5.1 由于设计、材料、产品结构、生产工艺等方面的差异,本文件未对生物负载回收率结果做出特定要求。但是,若生物负载回收率结果低于目标值或期望值,宜尝试另一种方法(例如增加一种提取方法或延长当前方法的提取时间)以确定是否可以获得更好的结果。

在确定医疗保健产品的期望生物负载回收率值时可以考虑的项目包括:

- a) 灭菌确认方法(例如过度杀灭或基于生物负载);
- b) 生物负载数据的用途(例如支持灭菌确认方法、原料筛选、趋势分析);
- c) 被测产品或材料类型(例如塑料和金属或可吸收材料);
- d) 所用回收方法的充分性(例如超声处理、振荡或者两者结合);

根据这些因素,低生物负载回收率(例如某可吸收的或复杂的产品回收率为 20%)是可以接受的。考虑使用最低回收率百分比值来反映最保守的最差情况估计值可能是适当的,如 C.2.2.3 和 C.3.2.6 中所述。宜注意在某些情况下生物负载回收率测定是非必需的(例如组件或原料筛选,或者产品为液体且全部内容物均被过滤的情况)。

与更可预测的物理科学测试方法(例如化学或物理)相比,微生物测试方法通常会产生更多的差异。这种较大的差异的主要原因在于微生物是有生命的,在不同的条件下,其数量会随时间发生改变。其他能影响生物负载回收率的因素包括微生物聚集、产品表面附着的微生物一致性、产品的表面特性(例如特定有机硅材料涂层、高空隙表面区域)、培养条件和(或)微生物检测或测定能力的固有局限性。

尽管如此,根据生物负载数据的关键性和用途,生物负载回收率有时不宜过低或不宜分布过广;若需要,宜研究采集方法进一步改进(例如通过产品拆卸、提高机械振摇强度、腔体主动冲洗、延长冲洗时间、改进洗脱液)。在有些情况下,生物负载数据的关键性和用途决定了宜尽可能获取更好的回收结果,比如使用生物负载数据确立一个“基于生物负载”的灭菌过程(例如辐照灭菌,特别是需要低生物负载量的剂量确认方法)时。而当回收率结果用于生物负载组成检查时,则可以不必花太多精力和物力去获取更好的回收结果。

C.5.2 在计算生物负载回收率时,不需要将检测限于 0 CFU 的值(例如:“<”值)。

C.5.3 在审核生物负载回收率结果时,所有值保留一位小数。

C.5.4 在生物负载数据计算时,将生物负载平均值乘以生物负载校正因子,得到的结果被称作生物负载估计值。在某些应用中,可以决定应用所得范围的最低生物负载回收率值来确定生物负载校正系数以反映最差情况。该决定将受到数据使用的影响。

附录 D
(资料性)
典型职责分配

制造商和实验室宜有协议分配,按双方职责以完成本文件规定的要求。最终,制造商有责任确保满足要求。本附录提供了有关典型任务的信息。表 D.1 中所列的要求是缩写的。每一要求的详细信息参考具体章条(第 4 章除外)。

表 D.1 典型责任分配

章条	本文件的要求	典型责任	
		制造商	实验室
质量管理体系要素			
4.1.1	程序规定	R	R
4.1.2	文件和记录的审核和批准	R	R
4.1.2	文件和记录的控制	R	R
4.1.3	记录的内容	N/A	R
4.1.3	人员身份	N/A	R
4.1.4	计算和数据传输检查	N/A	R
4.2.1	程序的实施和执行	N/A	R
4.2.2	职责分配	R	R
4.2.3	设备可用性	N/A	R
4.3.1	采购程序	N/A	R
4.3.2	设备校准	N/A	R
4.3.3	材料的制备和灭菌	N/A	R
4.4.1	不确定度测量	N/A	N/A
4.4.2	结果调查、纠正和预防措施	R	I
产品的选择			
5.1.1	产品的选择和取样	R	I
5.1.2	产品族的依据	R	I
5.1.3	取样时间	R	I
5.2	样品份额(SIP)	R	I
生物负载的测定和微生物鉴定的方法			
6.1.1	方法选择	R	R

表 D.1 典型责任分配 (续)

章条	本文件的要求	典型责任	
		制造商	实验室
6.1.2	抑菌作用最小化	I	R
6.1.3	生物负载采集率	I	R
6.1.4	培养条件的选择	I	R
6.1.5	计数方法的选择	N/A	R
6.2.1	微生物鉴定技术的选择	R	R
生物负载测定方法的确认			
7.2a)	测试方法适用性	R	R
7.2b)	采集技术	R	R
7.2c)	计数的充分性	N/A	R
7.2d)	微生物鉴定	N/A	R
生物负载的常规测定和数据说明			
8.1	取样计划	R	I
8.2	试验方法的选择	R	R
8.3	微生物鉴定的程度	R	I
8.4	适用的标准和要求的考虑	R	I
8.5	峰值的处理	R	I
8.6	可接受水平的规定	R	N/A
8.7	趋势	R	N/A
8.8	统计学方法的应用	R	N/A
生物负载测定方法的维护			
9.1	生产/过程变更的考虑	R	I
9.2	测试方法的变更	I	R
9.3	方法确认的数据审核	R	R
<p>说明：</p> <p>R——职责；</p> <p>I——这可能涉及提供帮助或信息；</p> <p>N/A——一般不适用。</p> <p>注：作为实验室基本方法确认的一部分，显示并记录了测试方法的一般能力，产品确认的特定方面被记录为产品特定报告的一部分。</p>			

参 考 文 献

- [1] ISO 7870-2 Control charts—Part 2: Shewhart control charts
- [2] ISO 7870-4 Control charts—Part 4: Cumulative sum charts
- [3] ISO 9000:2015 Quality management systems—Fundamentals and vocabulary
- [4] ISO 9001 Quality management systems—Requirements
- [5] ISO 10012 Measurement management systems—Requirements for measurement processes and measuring equipment
- [6] ISO 11135 Sterilization of health-care products—Ethylene oxide—Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
- [7] ISO 11137 (all parts) Sterilization of health care products—Radiation
- [8] ISO 11138-2 Sterilization of health care products—Biological indicators—Part 2: Biological indicators for ethylene oxide sterilization processes
- [9] ISO 11139:2018 Sterilization of health care products—Vocabulary
- [10] ISO 11737-2 Sterilization of medical devices—Microbiological methods—Part 2: Tests of sterility performed in the definition, validation and maintenance of a sterilization process
- [11] ISO 13022 Medical products containing viable human cells—Application of risk management and requirements for processing practices
- [12] ISO 14160 Sterilization of health care products—Liquid chemical sterilizing agents for single-use medical devices utilizing animal tissues and their derivatives—Requirements for characterization, development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
- [13] ISO 14937 Sterilization of health care products—General requirements for characterization of a sterilizing agent and the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
- [14] ISO 15189 Medical laboratories—Requirements for quality and competence
- [15] ISO 17665 (all parts) Sterilization of health care products—Moist heat
- [16] ISO 20857 Sterilization of health care products—Dry heat—Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices
- [17] ISO 22442-3 Medical devices utilizing animal tissues and their derivatives—Part 3: Validation of the elimination and/or inactivation of viruses and transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents
- [18] ISO/IEC 17025 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories
- [19] ISO/IEC/IEEE 90003 Software engineering—Guidelines for the application of ISO 9001:2015 to computer software
- [20] AAMI TIR37 Sterilization of health care products—Radiation—Guidance on sterilization of biologics and tissue-based products
- [21] ASTM D4855-97 Standard practice for comparing test methods
- [22] ICH Q5A(R1) Viral Safety Evaluation Of Biotechnology Products Derived From Cell Lines Of Human Or Animal Origin

- [23] Bailey, M. Notes on bioburden distribution metrics: The log-normal distribution. Panel on Gamma and Electron Beam. March 2010
- [24] Bonalsky, J. R. A Model system for testing raw materials for microbial content. *Pharm. Technol.* 1980, 4(2), 49-51
- [25] Bryans, T., Hansen, J. The Bioburden Estimate: Not Just Math, But Microbiology. AA-MI Industrial Sterilization Research from the Field. 2013
- [26] 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
- [27] Bushar, H.F., Kowalski, J.B., Mosley, G. Estimation of average bioburden values for low-bioburden products, *MD+DI*. July 2011, 33(7)
- [28] Collins, C. H., Lyne, P. M., Grange, J. M. Collins and Lyne's Microbiological Methods. 7th Edition. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. 1995
- [29] DeMan, J.C. M.P.N. Tables Corrected. *European J. Appl. Microbiol.* 1983, 17, 301-305
- [30] FDA Bacteriological Analytical Manual, Annex 2, October 2010
- [31] Halls, NA. et al. The Occurrence of Atypically High Presterilization Microbial Counts ("Spikes") on Hypodermic Products. *Radiat. Phys. Chem.* 1983, 22(3-5), 663-666
- [32] Hitchens, A.D., Mishra-Szymanski, A. AOAC International Qualitative and Quantitative Microbiology Guidelines for Methods Validation. *Journal of AOAC International.* 1999, 82(2), 402-415
- [33] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods; Definitions and Terminology (CPMP/ICH/381/95)
- [34] International Conference on Harmonization (ICH) Validation of Analytical Methods; Methodology (CPMP/ICH/281/95)
- [35] Lundholm, M. Comparison of Methods of Quantitative Determinations of Airborne bacteria and evaluation of total viable counts. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, 44(1), 179-183
- [36] PDA Bioburden Recovery Validation Task Force. Technical Report: Bioburden Recovery Validation. *Journal of Parenteral Science & Technology.* 1990, 44(6), 324-331
- [37] PDA Technical Report No 33. Evaluation, Validation and Implementation of Alternate and Rapid Microbiological Testing Methods. 2013
- [38] European Pharmacopoeia, Chapter 5.1.6 Alternative Methods for Control of Microbiological Quality. European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. 2015, 27.1:8
- [39] Puleo, J.R., Favero, M.S., Peterson, J.J. Use of ultrasonic energy in assessing microbial contamination on surfaces. *Appl. Microbiol.* 1967, 15(6), 1345-51
- [40] Rice, E.W., Baird, R.B., Eaton, A.D., Clesceri, L.S. (Eds). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22nd ed. American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012
- [41] Shirtz, J. T. Sterility Testing. *Pharmaceutical Engineering.* November/December 1987, 35-37
- [42] Sokolski, W.T., Chidester, C.G. Improved Viable Counting Method for Petroleum-Based Ointments. *J. Pharm. Sci.* 1964, 53, 103-107
- [43] US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1223> Validation of Alternative Microbio-

logical methods, United States Pharmacopeial Convention Inc.: Rockville, MD. 2017

[44] US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1225> Validation of Compendial Procedures and < 1226 > Verification of Compendial Procedures. United States Pharmacopeial Convention Inc., Rockville, MD. 2017

[45] Cochran W. Estimation of Bacterial Densities by Means of the Most Probable Number, Biometrics. 6:105-116, 1950

[46] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020

中 华 人 民 共 和 国
国 家 标 准
医疗保健产品灭菌 微生物学方法
第 1 部分：产品上微生物总数的确定
GB/T 19973.1—2023/ISO 11731-1:2018

*

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

服务热线: 400-168-0010

2023 年 3 月第一版

*

书号: 155066 · 1-72363

版权专有 侵权必究



GB/T 19973.1-2023



码上扫一扫 正版服务到