

中华人民共和国国家标准

GB/T 19973.1—2023/ISO 11737-1:2018

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(II)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.43)。

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、朊病毒或原生动物污染物的计数或鉴定，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,则应适当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

在规定的时间内,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，应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，则可选择有一个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。样品份额应具有代表性，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

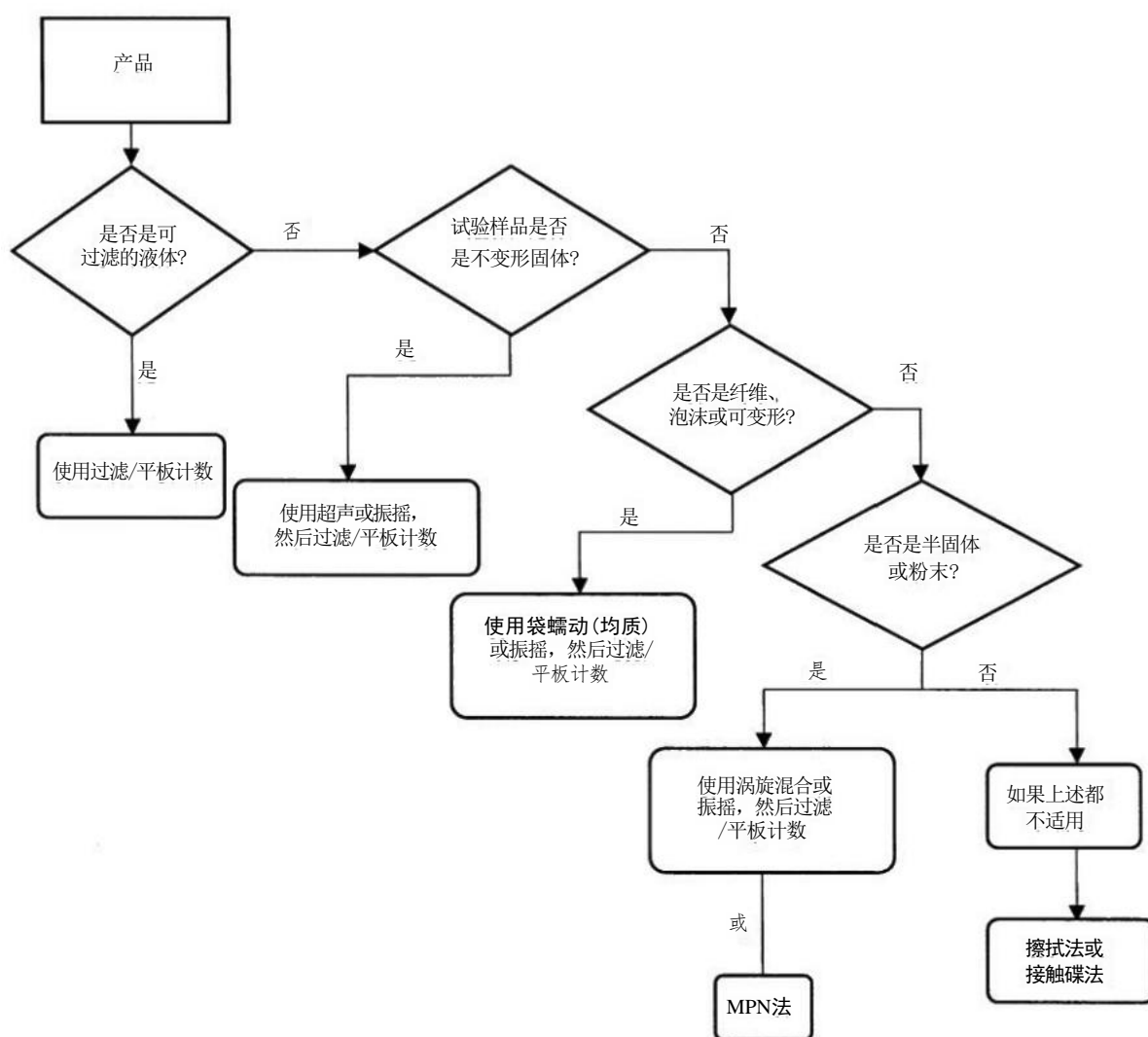
A.6 生物负载测定及其微生物鉴定的方法

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

微生物类型	固体培养基	液体培养基	培养条件
兼性菌、非苛养菌、需氧菌	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 °C~35 °C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°C~25 °C培养5 d~7 d
厌氧细菌	强化梭菌琼脂 Schaedler琼脂 血琼脂 兼性厌氧菌琼脂 大豆酪蛋白消化琼脂(胰酪大豆胨琼脂) 哥伦比亚琼脂 Wilkens-Chalgren琼脂	罗伯逊肉汤 硫乙醇酸盐流体培养基	30 °C~35 °C培养3 d~7 d
<p>本表未详尽列举所有示例。 所列培养条件为示例的微生物类型常用的条件。 • 在厌氧条件下培养。若培养基经过预还原，可以提高其性能。 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。</p>			

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、吲哚),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，并过滤么浸提液，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)；

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/935000033114011243>