



中华人民共和国国家标准

GB/T 19973.1—2019

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测定

Sterilization of medical devices-Microbiological methods-

Part 1:Determination of a population of microorganisms on products

(ISO 11737-1:2018, IDT)

文稿版次选择

— XX — XX 发布

XXXX — XX — XX 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..... II

引言..... III

1 范围..... 1

2 规范性引用文件..... 1

3 术语和定义..... 1

4 一般要求..... 4

5 产品选择..... 4

6 生物负载的测定方法和微生物鉴定..... 5

7 生物负载测试方法的确认..... 7

8 生物负载的常规测定及数据解释..... 7

9 生物负载测试方法的维护..... 8

附录 A（资料性附录） 产品上微生物总数的测定指南..... 9

附录 B（资料性附录） 生物负载测定方法指南..... 23

附录 C （供参考） 生物负载回收率验证..... 31

附录 D （供参考） 典型的职责分配..... 39

参考文献..... 42

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 19973.1-2015《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，主要技术内容变化如下：

- 引用“生物负载峰值”概念作为生物负载内容的一部分，并提供相关数据示例；
- 生物负载测试过程中，产品包装通常不会检测，除非它是产品的组成部分；
- 提供“最可能数量”（MPN）技术及其应用的更多信息；
- 增加提高“改进检测限”（LOD）的方法及数据应用的详细信息；
- 因部分用于评估生物负载数据的统计方法不典型或不需，所以删除这部分内容；
- 新增选择生物负载回收率方法的标准表，说明校正因子（CF）的使用方法，并删除技术指南中关于<50%的生物负载有效回收率的规定；
- 提供更多关于生物负载测定方法适用性鉴定技术的应用和性能的信息；
- 增加直接平板计数、估计计数和超出理想范围计数的详细规则；
- 增加界定制造商或实验室责任的表格；
- 增加对基于风险（包括生物负载数据的使用目的）的生物负载测定方法的关注。

引 言

无菌产品是指不含有活的微生物的产品。在需要提供一个无菌产品时,用于规定灭菌过程确认和常规控制要求的国际标准要求,需将产品灭菌前的微生物污染降至最小。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。

利用物理方法或化学制剂来灭活产品上微生物培养物的动力学,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来描述。这意味着无论施加的处理程度如何,微生物总能以有限的概率存活下来。对于特定的处理条件,微生物存活的概率取决于微生物的数量和抗性以及处理期间微生物存在的环境。由此可见,无法保证经受灭菌处理的产品组中的任何一个产品的无菌性,但可以根据产品上微生物的存活概率来定义该组产品的无菌性。

关于产品设计和开发、生产、安装和服务的质量管理体系的一般要求可参考 ISO 9001 标准;对于医疗器械生产质量管理体系的特殊要求可参考 ISO 13485 标准。根据质量管理体系的标准,对于无法通过后续的产品检验和测试验证其有效性的制造过程我们定义其为特殊过程,例如灭菌。因此,灭菌过程需经过确认;同时,对于灭菌过程的日常监测和设备维护是十分必要的。

已有相关法规标准规定了医疗器械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 系列,ISO 17665 系列和 ISO 14160。但也应认识到,正确的灭菌确认和精确的灭菌过程控制并不是保证产品无菌以符合其预期用途的唯一要素。了解灭菌过程中存在的微生物挑战,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活微生物总数。生物负载数据可应用于多种情况:

- 灭菌过程确认和再确认;
- 制造过程控制的常规监控;
- 原材料,部件或包装的监测;
- 清洁过程效率的评估;
- 整体环境监测计划。

生物负载是指由多种微生物污染源产生的总和,包括原材料,部件制造,制造工艺,制造环境,组

装/制造辅助手段（例如压缩气体，水，润滑剂）、清洁工艺和成品包装。为了控制产品的生物负载，应该注意这些来源的微生物状态。

不可能准确地计数产品生物负载，实际上是通过标准化的方法来确定生物负载。由于医疗器械的设计和材料种类繁多，所以通过单一方法定义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去除所有情况下的微生物用以计数。此外，计数微生物培养条件的选择可能受医疗器械上或其中微生物类型的影响。

本文件规定了确定生物负载需满足的要求。资料性附录提供了满足生物负载控制要求的手段的解释和方法。如果附录外的方法能够有效地符合本文件的要求，亦可以使用。

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（或其中）的活微生物计数和微生物鉴定要求，并提供指南。

注1：微生物表鉴定的特性和范围取决于生物负载数据的预期用途。

注2：关于第1至9条的指导见附件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，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 标准规定了灭活病毒和朊病毒的适用指南。

本文件不适用于医疗器械生产环境的微生物监测。

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，仅所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。

ISO 10012, Measurement management systems — Requirements for measurement processes and measuring equipment

ISO 13485, Medical devices — Quality management systems — Requirements for regulatory purposes

ISO 15189, Medical laboratories — Requirements for quality and competence

ISO/IEC 17025, General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

3 术语和定义

以下术语和定义适用于本文件。

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。

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。

3.3 生物负载校正因子 bioburden correction factor

用以补偿无法从产品和/或微生物培养中完全采集的数值。

3.4 生物负载估算 bioburden estimate

通过将生物负载校正因子应用于生物负载计数而建立的值。

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。

3.6 生物负载异常峰值 bioburden spike

单个产品生物负载值远大于同组中其他产品的生物负载值。

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

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4：一个不合格可以有若干个原因。

注5：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6：纠正和纠正措施是有区别的。

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：培养方法可能包括培养要求的温度、时间和其他条件。

3.10 建立 establish

通过理论评估确定，并经试验证实。

3.11 兼性微生物 facultative microorganism

能够进行有氧和无氧代谢的微生物

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）。

3.13 微生物表征 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。

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有机体。

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7：一个潜在不合格可以有若干原因。

注8：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。

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。

3.17 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。

3.18 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。

3.19 样品份额 sample item portion; SIP

被测试的医疗器械规定部分。

3.20 规定 specify

在批准的文件中详细约定的内容。

3.21 无菌的 sterile

无存活微生物的。

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。

3.23 确认 validation

为确定某一过程可持续生产出符合预定规格产品所需结果的获取、记录和解释的文件化程序。

注9：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10：“已确认”一词用于指定相应的状态。

注11：确认所使用的条件可以是真实的，也可以是模拟的。

4 一般要求

4.1 文件

4.1.1 应规定生物负载测定程序。

4.1.2 应由指定人员（见 4.2.1）审查和批准本部分要求的文件和记录。根据 ISO 13485、ISO 15189 或 ISO / IEC 17025 标准要求，文件和记录应受控。

4.1.3 应保留原始观测、计算、导出数据和最终报告记录。记录应包括参与取样、制备和测试的所有人员的身份识别。

4.1.4 应对计算和数据传输设备进行适当的核查。

4.2 管理职责

4.2.1 应对本部分所述实施和执行相关程序的责任及权限进行规定。相关权责应根据 ISO 13485、ISO 15189 或 ISO / IEC 17025 标准指定给合格人员。

4.2.2 如果由具有独立质量管理体系的组织承担执行本部分的要求，应明确规定相关方的责任和权限。

注：有关其他信息，请参见附录D。

4.2.3 应保证能够正确执行指定测试和测量过程的设备的可用性。

4.3 产品实现

4.3.1 应规定采购程序。这些程序应符合 ISO 13485、ISO 15189 或 ISO / IEC 17025 标准要求。

4.3.2 应在符合 ISO 13485、ISO 15189、ISO / IEC 17025 或 ISO 10012 标准的情况下，设定满足本文件规定的设备（包括用于测试目的仪器）校准要求。

4.3.3 应规定包括质量测试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

4.4.1 分析测量的不确定性、精确度和偏差通常不适用验证生物负载测试方法和结果，这一类型的数据分析除了在评价实验室的整体能力外可能不是必需的。

4.4.2 对于不合格品的控制，应当规定不合格结果的调查、纠正、纠正措施及预防措施的程序。这些程序应符合 ISO 13485，ISO 15189 或 ISO / IEC 17025 标准的要求。

5 产品选择

5.1 总则

5.1.1 选择和处理用于测定生物负载的产品的过程中，应确保所选产品能够代表常规生产产品，包括包装材料和工艺等方面。

5.1.2 如果为了测定多种产品的生物负载而对其进行分类，应记录产品类别中包含该产品的基本原则。同时，本原则应包括确定从产品族中选择测定生物负载的产品能代表整个产品族的内容。

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 样本份额 (SIP)

5.2.1 整个产品 ($SIP = 1,0$) 或部分产品 ($SIP < 1,0$) 均可用于测定生物负载。

5.2.2 如果使用部分产品 ($SIP < 1,0$) 测定生物负载,则该部分产品 (SIP) 应能够充分代表整个产品的生物负载。所选部分产品的确定应基于产品生物负载是否均匀分布,如 5.2.3 至 5.2.5 所述。

5.2.3 当生物负载分布已知时,以下内容适用:

- a) 如果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中选择 SIP ;
- b) 如果产品生物负载不均匀分布, SIP 应包括:
 - 1) 所选部分产品成比例地代表成品的每种材料,或
 - 2) 产品中含有对灭菌过程最严重的微生物挑战(数量和/或类型)的部分。

当选择包含最严重的微生物挑战的部分产品时,应表明所测试的 SIP 的生物负载与整个产品生物负载的关系。

5.2.4 如果生物负载分布未知,则 SIP 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。

5.2.5 SIP 可以根据尺寸特征进行计算,例如长度,质量,体积或表面积(详情见表 A.1)。

注:一些规定了灭菌过程的验证和常规控制要求的标准同时包含了 SIP 选择充分性的要求,例如:ISO 11137 系列。

6 生物负载的测定方法和微生物鉴定

6.1 生物负载的测定

6.1.1 选择合适的方法

根据生物负载数据的使用目的,选择适合的测定方法。测定方法应包括以下内容:

- a) 中和抑制物质(若需要);
- b) 适当去除微生物;
- c) 微生物的培养;
- d) 微生物的计数。

6.1.2 抑制物质的中和

如果产品的物理或化学等特性使其释放出对产品生物负载测试产生不利影响的抑制物质,则应建立中和、去除抑制物质的相关制度;即使不能完全去除抑制物质,也应最小化其对生物负载测试的影响。同时,应证明所建立制度的有效性。

注：附录B描述了评估微生物杀灭剂或微生物抑制物质对生物负载测试影响的方法。

6.1.3 微生物的采集

6.1.3.1 对于将采集产品活微生物作为测定产品生物负载方法的一部分，应评价该方法的采集效率并形成文件（见 4.1.3）。评价过程应考虑以下事项：

- a) 该方法采集微生物的能力；
- b) 产品上可能存在的微生物类型及位置；
- c) 采集技术对微生物活力的影响；
- d) 待测产品的物理或化学性质。

6.1.3.2 对于未将采集产品活微生物作为测定产品生物负载方法的一部分（例如产品的直接培养），应考虑其微生物计数的效率并记录评价结果（见 4.1.3）。评价过程应考虑以下事项：

- a) 产品上可能存在的微生物类型及位置；
- b) 待测产品的物理或化学性质。

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作决定的理由形成记录（见 4.1.3）。

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，选择其计数技术。应对考虑的结果和所作决定的理由形成记录（见 4.1.3）。

6.2 微生物鉴定

6.2.1 选择适当的微生物鉴定技术

注：当使用产品生物负载数据时（例如建立灭菌过程），需要对微生物类型进行鉴定以确认产品生物负载是否发生变化，因为这些变化可能影响产品生物负载的确认。此外，微生物鉴定有助于企业识别污染源。

6.2.2 通过以下一种或多种技术进行微生物鉴定：

- a) 菌落形态；
- b) 细胞形态；
- c) 染色差异；
- d) 使用选择性和/或差异条件进行培养；

- e) 生化特性;
- f) 基因型分析, 例如, 指纹识别技术或序列分析技术;
- g) 蛋白质组学方法, 例如质谱。

7 生物负载测试方法的确认

7.1 通则

生物负载测试方法应经过确认并形成文件。

注: 典型的生物负载测试方法确认详见A.7.1。

7.2 方法确认

方法确认应包括以下内容:

- a) 评估测试方法的适宜性, 以证明测试过程对微生物无生长抑制作用;

注: 如果使用接种产品进行测试, 生物负载恢复效率测试数据可作为测试方法不抑制微生物生长的证明。

- b) 如果生物负载测试方法中包含微生物收集技术, 应对该技术的回收效率做充分评估。

注: 生物负载回收效率验证指南详见附录C。

- c) 对包含培养条件及微生物计数技术在内的微生物计数适宜性进行充分评估。

- d) 评估微生物鉴定技术的适用性。

8 生物负载的常规测定及数据解释

8.1 通则

应按照规定了取样大小及取样频率的标准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)。选择测试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

判定是否进行生物负载的微生物鉴定取决于生物负载测定数据的使用目的(见6.2)。

8.4 生物负载数据的其他应用

如需使用生物负载数据来确定灭菌过程的处理程度(即基于生物负载的方法), 则生物负载数据应满足灭菌过程设定、验证和常规控制指定标准中规定的使用要求。

8.5 生物负载峰值

如果生物负载数据显示某一测试结果明显大于其他测试值（生物负载峰值），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

应规定医疗器械产品或产品族的生物负载的可接受限量。如果超过可接受限量，则应采取措施（见 4.4.2）。必要时应审查和修订可接受限量。

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 统计方法

应用统计学方法来定义取样大小、取样频率和/或可接受限量时，所使用的统计学方法应用应符合 ISO 13485。

9 生物负载测试方法的维护

9.1 产品和/或制造过程的变更

根据产品生物负载数据的使用目的，审查产品和/或制造过程发生的变更，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（见 4.1.2）。如果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对包括测定结果在内的影响，并记录评估结果（见 4.1.3）。

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标准化的程序进行审查，并对审查结果和再确认过程形成记录（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，本附录中的编号与本文件正文中使用的编号相对应。

A.1 范围

本附录为实施本文件中规定的要求提供了指南。附录中所提供的指导并非面面俱到，只是强调需要注意的重要方面。

可以使用本附录之外的方法，但是这些替代方法应该是证明有效地符合本文件的要求。

本附录不是作为评估是否符合本要求的核对清单。

A.2 规范性参考文件

没有提供指导。

A.3 相关术语和定义

没有提供指导。

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/T0287-2003）

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、处理或储存数据。所有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。

若是经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，包含以下信息：

—计算机系统上的应用软件；

—运用软件；

—所用数据包。

所有计算机在运行之前都应该经过确认。

若计算机软件是机构内部开发的，宜开发适当的过程，确保以下信息：

—保存包括源代码在内的开发文件；

- 保存合格测试记录；
- 程序的修改文件化；
- 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。

宜有测试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入口的功能。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/IE17025中规定了技术资料的要求。

也可参见ISO/IE90003。

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，在控制条件下进行生物负载的测定是十分重要的。因此，不论测定所用的实验设备是在医疗器械制造商所在地还是在离厂区较远的地方，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（见附录D标准责任指南）。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，在适用的情况下，所有的实验应符合现有的最佳实验室标准（如ISO15189，ISO/IEC 17025），并且数据由有能力的专业人士评估。

任何实验室宜对提供质量服务做出保证，并作为质量方针将承诺形成文件。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，并有权确保质量管理体系的实施。

实验室的运行宜经过定期的内部审核。实验室宜将审核结果形成文件并提交实验室管理层评审。（如ISO15189，ISO/IEC 17025）

ISO 13485中规定了对职责权限的要求以及对人力资源的要求。

对资源提供的要求在ISO 13485中进行了规定

对设备的要求在ISO 15189和ISO/IEC 17025中进行了规定。

A. 4.3 产品的实现

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，以及对检测和测量装置的校准。

宜有识别每台实验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他部件宜是无菌的。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。

培养基质量测试宜包括促生长实验。通常，在每批培养基上使用不超过100CFU低菌量的微生物进行促生长性实验。药典中有对促生长性实验的描述。一些药典（如美国药典、欧洲药典描述了合适的微生物）。也可以采用其他公认的对培养基质量控制的定量或半定量的分析方法。

ISO 13485中规定了对采购的要求。特别是ISO 13485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。

ISO 13485规定了对监测和测量设备的校准要求。

对设备和测量溯源性的要求则在ISO /IEC 17025进行了规定。

A. 4. 4 测量、分析和改进—不合格品控制

A. 4. 4. 1 微生物试验结果一般不符合数学分布模型。因此, 测量不确定度、精度和偏差可能不是必须的, 除非是为了评估整体的实验室能力。对于微生物负载测试的方法, 通过确定微生物负载的回收效率测试, 应该考虑到测量不确定度, 精度和偏差。

A. 4. 4. 2

YY/T 0287—2003中对测量、分析和改进方面的要求涉及过程进行调查。调查的结初始阶段宜包含评估结果是正确的还是错误的。下列情况可能导致错误, 遇到类似情况, 宜加以指出:

- 样品不当(例如非代表性、非均质和不合格物料);
- 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;
- 试验方法的偏差(例如稀释误差、过滤的误差、无菌技术误差)。

如果计算是起因于取样或实验误差, 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以下几点:

- a) 数据用途相关的结果的意义(例如灭菌过程的有效性)。
- b) 增加样品量和/或取样频次需要。
- c) 制作过程的评定结果, 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) 清洁剂/润滑剂/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) 环境条件和检测结果(包括季节因素, 例如有);
 - 8) 包装材料及包装过程;
 - 9) 储存条件。
- 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, 需要证明其具有有效性。

ISO 13485, ISO 15189 以及ISO/IEC 17025规定了纠正措施过程。

A. 5 产品选择

A.5.1 总则

A.5.1.1 宜对产品取样和选择过程应该规范，进行操作时要避免因疏忽而引起的污染以及是样品中微生物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) 随机或指定的频率取样品；
- b) 使用常见生产过程，生产的产品专门用于微生物负载实验；
- c) 抽取不适用于销售的可被废弃或不合格的产品。

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。

负载取样时，产品应该包装在通常的包装内。通常情况下，把产品的包装去掉后，足够对其进行微生物负载实验，实验忽略了包装系统。根据无菌标签声明，内部包装组件，如托盘或产品插入件，可能需要根据一些因素进行测试，例如，当包装是产品的一个组成部分时，需要是无菌的，或者为了进行特定的评估。

A.5.1.2 当为系列产品建立微生物负载检测时，应该考虑到微生物负载数据的使用（如原材料的控制、接收到的零部件、过程步骤的评估，灭菌过程的鉴定）。为系列的产品进行微生物负载检测时，应该考虑到以下：

- a) 原材料的性质和来源；
- b) 部件的性质和来源；
- c) 制造过程的复杂性，即处理程度、过程步骤数；
- d) 使用的制造工艺类型；
- e) 制造或装配环境；
- f) 产品设计及尺寸；
- g) 生产设备；
- h) 制造的地点；

此外，微生物的数量和种类也会影响产品系列的生物负载试验方法的选择。对于每个产品系列，应选用主产品或代表性产品用于生物负载的常规测定。主产品的选择应该基于已记录的基本原理。

如果系列中的产品被认为是等同的，那么具有代表性的产品就可以是用于生物负载的测定。可以定期监测所选择的产品或者可以轮流挑选小组的其他产品。如果常规检测所选择的产品，那么具有等效的同系列的其他产品的应定期监测或者合理的提供。

A.5.1.3 若生物负载产生的数据用于建立灭菌过程，则产品的抽样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灭菌之间的时间段。

A.5.2 样品份额

A.5.2.1 在可行的情况下，生物负载的测定应充分利用整个产品，如果实验室的容器很难容纳整套产品，在这种情况下使用样品份额，应该考虑整个产品生物负载的分布。如果预期生物负载在产品上的分布是不均匀的，在产品污染最严重的区域，应该被识别出来。这区域应该包括在选中的样品份额内。

A.5.2.2 应尽可能将产品的大部分用于样品份额。样品份额应该是具有一定的代表性，可以确定整个产品的生物负载。当是大型产品时要仔细选择样品份额，如外科手术袍或外部引流工具的测试时。

A.5.2.3 应考虑到导致产品上的微生物分布的生产部分。

A. 5. 2. 4 可以从更严苛的灭菌过程选择样品份额，选择样品份额的例子如带有连接或活塞等导管类的装置。

A. 5. 2. 5 给出了选择不同样品份额计算基础的产品示例表A.1。在准备或装配样品部分时，在取样时应该小心。如果从产品上分离一部分，这应该在清洁的、受控制的环境条件下进行(例如在洁净工作台内)，以避免增加污染。

示例表 A. 1

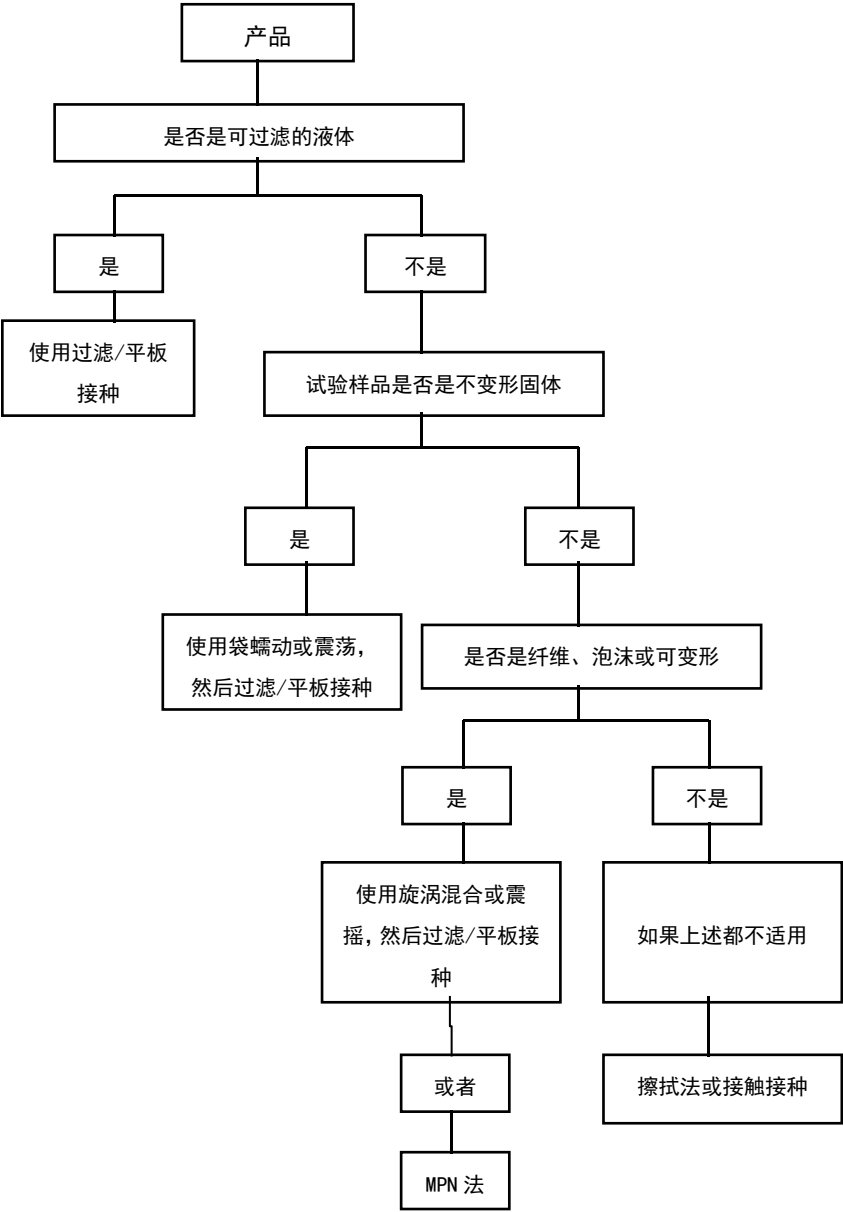
产品份额依据	产品
表面面积	植入类（不能吸收）
质量	粉类、隔离衣、植入类（可吸收）
长度	导管类（直径不变）
体积	装在容器的液体类

A. 6 生物负载微生物的鉴定和测定方法

A. 6. 1 生物负载测定

A. 6. 1. 1 适当方法的选择

图A.1是生物负载测定方法的选择初期的判定树。这个图既适用于培养方法，也适用于非培养方法。
对于一个生物含量高且采用培养方法的产品，要保证有足够的稀释量已获得可计数的结果和防止诸如菌落聚集或数量过多而无法计数的平板。



注1:此判定树不排除使用替代的、测定生物负载快速的微生物方法(如自荧光法、流式细胞仪、直接荧光法、过滤法和固相血细胞计数)。

注2:此判定树不包含所有可测试的产品类型或者所有类型的可以使用的测试方法。

图 A.1 生物负载方法判定树

对于一种生物负载含量很低的产品来说,可能无法从个别产品单元中回收可检测到的生物负载,即使使用合适的经过验证回收效率生物负载测试方法。在估计平均生物负载时应谨慎其中零菌落检测,以避免高估真正的产品生物负载。所需的负载检测方法的检测限度应反映负载数据的预期用途,并且,如有必要,应尽可能降低检测限,在合理可行的范围内。

为了优化低微生物负载产品的生物负载测定方法,有必要对其考虑使用另一种方法。举例说明在a到e。

- a) 混合样本方法:将多个产品单元混合在一起检验。对于这种方法,应该确定微生物污染水平回收效率。多个产品单元分成各个单元以估计每单元的菌落数。混合的单位可以估计每单位少量的菌落。然而,它没有提供任何信息关于组成样本的单个单元的生物负载的分布或变异性。在每个单元的菌落数目一致的情况下,可以使用混合法。要注意到混合法可能会降低发现在制造过程中疏忽的变化的可能性,这取决于混合的方法。
- b) 最可能数法,见 B3.3
- c) 对微生物类群的组合和剔除试验方法: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。如果实验评估没有厌氧菌显示出来,这样以后就可以取消这个测试了。此外,如果在微生物菌落计数发现需氧孢子,同时真菌数均不高,那么有可能需要将好氧菌、细菌孢子和真菌测试成合并一个单一的测试。例如,过滤全部的提取液通过一个单一的过滤器,将其放置在一个适当的通用的培养基,然后培养温度为(如,30°C 到 35°C, 20°C 到 25°C)。其他的例子包括使用培养温度(30±2)°C,或者在别的温度范围内用于检测特定微生物种群的。以这种方式消除稀释因子(如果消除是合理的)可以最小化过高估计平均生物负载。

- d) 检测方法的一半限制:这有助于计算生物负载的结果,当更小的值出现在生物负载结果中。这种方法提供了一个较低的生物负载结果,当较小比例的结果为每平板 0 菌落时(更多信息请见参考文献[24])。
- e) 基于泊松的“小于”值替代方法:这提供了一种确定平均生物负载估计值的方法。

生物负载通常不是典型地分布在产品的整个制造过程中,使它可以用于泊松分布进行统计分析。对生物负载应用泊松分布应仔细考虑生物负载与信息预期用途的关系。(更多信息请参考[24]和[20]。)

确定生物负载方法的选择应考虑到产品上或产品内生物膜可能出现。当与液体接触,生物膜可以在产品上或产品中形成,除非采取适当的生物负载控制措施。含有组织的医疗器械有生物膜发生的潜在可能性。

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

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,需选择合适的非选择性培养基和培养条件。实验室的建议,在制造商的投入下,使用标准的生物负载培养条件下可以作为考虑和理由。选择的条件应减少高估平均生物负载的可能性,在不同培养基上微生物计数相同。

选择培养基和培养条件时,至少宜考虑到下列几点:

- a) 一个培养基和培养条件的组合不能使所有微生物生长;
- b) 验证试验比常规检测需要使用更多种培养基和更广泛的培养条件;
- c) 合成材料制成的医疗器械不太可能受到专性厌氧菌的污染。由组织或其它天然材料制成的医疗器械可能受到专性厌氧菌的污染。

表A.2中罗列了培养基和培养条件示例。

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。

表 A. 2 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 (平皿计数琼脂)	大豆消化酪素肉汤 (胰蛋白胨大豆肉汤) 营养豆汤	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	沙保罗葡萄糖肉汤 麦芽提取肉汤 大豆消化酪素肉汤 (胰蛋白胨大豆肉汤)	20℃~25℃培养 5 天~7 天

	大豆消化酪素琼脂 (胰蛋白胍大豆琼脂) 马铃薯葡萄糖琼脂 葡萄糖胰蛋白胍琼脂 (平皿计数琼脂)		
厌氧细菌	强化梭菌琼脂 ^c Schaedler 琼脂 ^c 血琼脂 ^c 兼性厌氧菌琼脂 ^c 大豆酪蛋白消化琼脂 (胰蛋白胍大豆琼脂) ^c Wilkins-Chalgren 琼脂 ^c 霍伦比亚琼脂 ^c	罗伯逊庖肉汤 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。如果预先减少培养基，可以提高性能。 d 一些用于非选择性需氧菌的培养基也支持酵母菌和霉菌的生长。			

A. 6. 1. 5 微生物的计数

实验室可以说明详细计数的方法，这将作为考虑和原理。见 B.6。

A. 6. 2 生物负载的微生物鉴定

A. 6. 2. 1 微生物的鉴定的必要程度取决于产品的性质、微生物菌落的多样性，以及数据的使用情况(例如灭菌资格)。

A. 6. 2. 2 可以用一系列的的方法对在医疗器械上或在医疗器械内微生物组生物负载进行微生物的鉴定。典型的微生物鉴定方法包括菌落形态、细胞形态、染色性能、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) 当菌落计数时，菌落形态很容易记录。描述菌落形态在某种程度上是主观的，包括颜色、形状、大小、质地、边缘、高度和其他物理观察到的菌落特征。仅这些信息对趋势没有帮助(参见 A. 8)。它通常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。为了进一步鉴定污染源，需要更具体的方法。
- b) 细胞形态学和染色技术，如湿贴法和革兰氏染色法，经常被用来鉴定微生物。这些方法的好处是它们只需要最少的设备和时间，并且可以提供有关微生物的一般特征的有价值的信息。通过对真菌进行物理描述和湿贴的描述(即霉菌和酵母菌)，就足以对大多数分离物进行。
- c) 选择性培养和差异培养基可以抑制特异性微生物生长，选择某些微生物，或帮助把某些微生物与其他微生物区别(例如在特定培养基上菌落的颜色)，此方法是有用的在鉴定微生物。
- d) 微生物鉴定可采用表型或基因型方法，或两者结合进行。典型的表型试验，如菌落和细胞形态、革兰氏染色和孢子染色反应、有氧或无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)，通常提供了细菌所属的类群或属的一些指示。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，物种或菌株水平。类似的方法可以用在酵母和霉菌上。形态学和生理特性的结合可用于鉴定属，生化同化用于区分物种。

表 A.3 提供了常用生物负载鉴定方法的信息。

表 A. 3 常用生物负载的鉴定方法

方法	举例	特异性
菌落形态	形态、海拔、边缘、大小、颜色	低
细胞形态	形状(棒状、球菌状、酵母)、大小，聚合(集群，链)、 解剖学(真菌结构)	低到中
染色特性	染色(革兰氏反应、孢子染色、耐酸性、真菌染色)	低到中
选择性培养和差异培养基	热冲击，培养参数，选择性培养基	中到高
种属鉴定	遗传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

一般来说，经典的微生物学方法在验证生物负载测定方法时候给使用者带来了挑战。通常不需要验证经典的微生物学方法或国家和国际标准和药典中描述的方法。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。这些行为通常足以证实测定生物负载的有效性。

在生物负载检测方法的验证中，有两个方面需要考虑。第一个是中和测试系统中的抑制因子使微生物能够繁殖的能力(生物负载方法的适宜性)，第二个是从产品中洗脱和培养微生物的能力(生物负载的回收效率)。

当测定生物负载的方法包括从产品中洗脱微生物，最令人关注的是洗脱效率。洗脱和培养过程的验

证被称为生物负载回收效率(详见附件 C)。

A. 7. 2 验证

A. 7. 2. 1 生物负载法适宜性

生物负载法进行适宜性试验是为了证明该产品不会抑制微生物的生长或检测。产品可能含有抑菌性物质在生物负载试验条件下。

含有抑菌性的产品在产品检测中应采用稀释或适当的灭活或中和方法。

在实验的初步阶段应该研究产品洗脱物的抑制作用,以评价该产品在生物负载试验条件下是否含有抑菌性物质。如果该产品包含已知或已证明为惰性的材料,则可在有合理的解释的文件记录下也是可接受的。

应考虑生物负载法的适用性

a)有新产品或改进产品时

b)当测试条件发生变化时(如培养条件、提取液)。

将具有杀微生物或微生物抑制物质(例如具有经验证的膜漂洗程序的膜过滤)的适用性的方法应用于产品,可能不需要产品特异性生物负载方法适用性测试。

A. 7. 2. 2 生物负载回收效率

基本上有两种传统方法可用于验证从医疗器械上采集的微生物的回收效率(见 C.1.4)。这些方法是

- 重复处理: 重复处理样品, 然后定量评估回收程度, 或

- 接种产品: 接种已知数量的微生物至产品上, 然后定量评估回收程度。

更多非传统产品(例如含有粉末, 液体, 抗微生物剂, 多种组分的复杂产品)可能需要组合方法来评估生物负载回收效率。有关其他信息, 请参阅附录 C.1

对于过滤的液体产品, 当使用 MPN 方法时, 不需要确定生物负载回收效率和生物负载校正因子的计算。但是仍应评估测试方法的适合性。

A. 7. 2. 3 计数和培养条件

有关计数的进一步指导, 见 B.6。

选择的测定生物负载的培养条件(即培养基和培养条件)不能预期检测所有潜在的微生物。因此, 在实践中生物负载很可能会被低估。然而, 还是应该选择适当培养条件。

评估培养条件的一种方法是包括对生产工艺, 环境, 材料和预期存在的微生物的了解的基础上来评估培养条件。如果特定产品特征表明需要进行额外评估, 则将在典型培养条件下计数的微生物与通过替代培养条件检测的微生物进行比较。如果这种方法表明在典型的培养条件下检测到更低比例的生物负

载，则应重新考虑替代培养条件以优化测定。这对于有抑菌性物质得医疗器械尤其重要。

在选择用于微生物确认的技术时，请考虑以下因素：

- 考虑到灭菌资格的模式，对成品的风险；
- 以前可用的数据；
- 生成数据的目的；
- 制造过程的性质（例如涉及水，手动，自动化）和产品

A.8 生物负载的常规测定和数据分析

A.8.1 概述

为了证明对微生物特征已进行和保持有效控制，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 3-10 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；

这取决于生物负载水平变化（增加和减少）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。

这种差异化程度将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用于检测变化的样品量要小。

检测明显变化时，大样品量能提高信任度。

应意识到检测一给定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做出合理选择，这些方面包括：

- 历史数据的可用性
- 数据生成的目的
- 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（如每月）或者按照生产量（如每隔多少批次）频率进行取样。但是为了建立基线水平，在新产品的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 检测限和平板计数

A.8.2.1 检测限

生物负载值。对于微生物学报告，当测试一部分提取物的生物负载，并且回收为零菌落时，通常报告结果小于“X”，其中“1 / X”代表测试部分的分数。例如，如果产品在 400ml 中提取并且过滤了 1/4 的提取物，则报告零菌落的结果小于 4 个菌落形成单位（即 <4CFU）。因此，此示例的检测限为 4。在微生物报告中，<4 CFU 的结果意味着整个提取物可能包含 0,1,2 或 3 个 CFU，但微生物报告规则要求将其报告为 <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其他数学计算通常报告留一个小数位。

检测限可以通过以下方式改进：

- a) 对测试方法的修改（例如过滤大部分提取物）；
- b) 混合多个样本；
- c) 使用另一种测试方法，例如 MPN。

A. 8. 2. 2 平板计数

在用于其他工业应用的公开的标准微生物学方法中，建议选择含有可接受范围的平板（例如，小于 200CFU，25CFU 至 250CFU，或 30CFU 至 300CFU）。当进行多次稀释并因此可以选择时，这是适用的。然而，通过生物负载测试，情况并非总是如此

- 许多产品具有低生物负载，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 例子的计数是合适的。

平板计数可以通过三种不同方式确定：

- a) 直接计算 CFU；
- b) 估计数；
- c) 超出可数或估计范围的数量。

直接计数是使用任何便于准确计数的方法（计数器，标记平板等）直接数出所有菌落。

当可以对板的一部分上的菌落计数，将其计算以代表板的剩余部分时，可以进行估计计数。

估计计数是在菌落扩散时获得计数的一种方法。当扩散的菌落不影响其他菌落计数时（由于大小或不透明性），通常使用该方法。

如果基于可辨别菌落的存在来近似该值，则可以对超出可计数或估计范围的计数进行半定量。但是，如果无法做到这一点，则应分配过多的计数结果（TNTC）。从一组样本的平均值中省略不能计数的结果是可接受的做法。应调查 TNTC 结果。

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

A. 8.3 微生物特征

如果在微生物鉴定方面发现了不属于正常生物负载的微生物类型，则应考虑评估这些分离物存在的相关性。

A. 8.4 生物负载数据的治疗程度

没有额外的指导。

A. 8.5 生物负载峰值

生物负载数据显示比一组值中的其他值更大的值（通常称为生物负载峰值）。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和一致的部分；
- b) 该值是生物负载分布的正常且一致的部分。

通过对制造实践，微生物测试和样品处理的研究，可以确定生物负载峰值不是生物负载分布正常且一致的部分。请参阅本子条款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否是生物负载分布的正常且一致的部分。历史数据可以证明周期性出现的价值更高，在预期范围内，使其成为生物负载的一致部分。如果这些数据由通常在产品上发现的微生物组成，则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，应包括这些尖峰处理。例如，由于不一致的原材料或涉及过度处理的制造工艺，可能发生生物负载尖峰。

在表 A.4 给出的示例中，10 批次有 3 个批次（批次 2,5,6），其中包含的个别值明显大于批次平均值（在此示例中，是批次平均值的五倍或更多倍）。确定这些高值是生物负载的正常且一致的部分。因此，在建立总体平均生物负载时，可能需要考虑包含高值的那些批次和/或批次平均值，用于确定灭菌过程的处理程度。

表 A. 4 含有生物负载峰值的生物负载数据示例

批次	编号										平均值（菌落数/每板）
	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

当超过指定的水平时，应采取预定的行动方案。如果纠正措施导致影响生物负载的过程发生变化，则应获取新数据并为产品建立新的水平。

用于生物负载的指定水平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，如果希望建立临时水平，则可以在评估给定产品的前三批或更多批次之后设置这些水平。在为新产品线设置临时水平时，也可以使用来自类似产品，制造过程和/或制造环境的历史数据。对于某些产品消息来源，

可以预期生物负载的重大季节性变化。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。基于连续的测试结果，生物负载数据应在一段时间后重新评估，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，通常定义为警报级别和行动级别。建立这些级别应考虑到基于使用信息的意图所使用的方法。例如，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环境控制在制造过程中的功效。

随着水平的建立，如果超过水平，则应考虑采取行动。这些行动应基于生物负载上存活微生物的知识，生物负载测试确定以各种方式沉积在产品中和/或产品上的产品生物负载。预计微生物的数据是不准确。相反，通常在生物负载上的微生物数据中存在相当大的范围。没必要也别预期生物负载的微生物数据符合任何统计分布。

确定生物负载警报和动作水平的一种常用方法是使用标准偏差。在这种情况下，标准偏差的计算用于理解数据的分散，并且生物负载数据是否适合特定的统计分布不太重要。

应调查被识别为异常高或低或非典型趋势的数据。在设定生物负载监测水平时，可以从计算中省略具有确定原因（例如实验室错误，在制造过程中偶然发现的高值）的非典型数据。当生物负载数据被分析用于与质量相关的决策时，个别测试结果，例如“无增长”或“太多无法计数，都应包含在分析中。

A.8.7 数据分析

随时间收集的数据的图形表示可用于区分实际趋势和抽样可变性。图形表示还可以表明即使生物负载值位于预设水平内，但是微生物数量发生了显著变化。

对由生物负载测定的数据进行统计前，特别是在许多观测值被记录的情况下，有必要以适当的方式处理这些数据，以便能够展现它们的重要特点。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生物负载平均值或生物负载估计的趋势，休哈特控制图(ISO7870-2)、基于范围的控制（BOR）或者累计和图（ISO7870-4）。在这些不同的方法中，每一种方法均能用于建立常见的结果随机分布的可能偏移，并且突出偏离的结果。

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要根据可用的数据采取措施或者是否需要额外的数据。

A.8.8 统计方法

依照 ISO13485 的要求，应制定和执行适当的测量和分析方法，包括选择合适的统计方法。对于从广泛的产品进行生物负载所得到的数据，检查这些数据将会列举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。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。

对于由生物负载测定得到的数据，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拖尾。对于低值或者中间值数据，最常见的值是零，这种情况下，生物负载通常很低，即使实施了有效地措施控制，但是偶尔有高的值。

A.9 生物负载测定方法的维持

A.9.1 产品和/或制造过程的变更

还应检查产品和/或制造过程的变化，以确定对确定生物负载的方法的功效的任何潜在影响。应记录审查结果（见 4.1.2）。在某些情况下，可能需要改变和/或重新确定生物负载测定方法。

A.9.2 生物负载测定方法的变化

没有提供指导。

A.9.3 负载测定方法的重新确认

没有提供指导。

附 录 B
(资料性附录)
生物负载测定方法指南

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应考虑到在确定了取样速率、所用方法、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。为选择合适的研发和确认方法，初期可能需要将多种方法结合起来以确立最适合常规使用的方法。

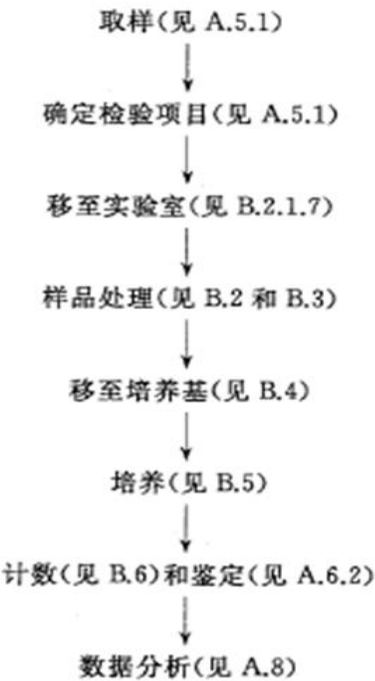


图 B.1 生物负载测定过程中关键步骤的顺序

B.2 使用洗脱液采集微生物的方法

B.2.1 总则

B.2.1.1 此附录中描述的方法可以组合使用，以增加可发现的微生物的数量并减少变异性。

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它材料（例如润滑剂）的影响。污染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冲洗（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，除非采取了适当的生物负载控制措施，否则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。在包含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拓展到相当大的范围。这种情况下，应考虑生物膜形成的可能性，应不宜认为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。高水平的内毒素也可表明生物膜的出现。

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

B.2.1.5 有些处理比其它方法更易于控制。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采集。

B.2.1.6 某些处理方法（如碎裂、袋蠕动和涡旋）可能会分解待测产品，分解的材料会致使微生物计数困难。这时需要进行其它处理，如将分解的材料从洗脱液中分离出来。应注意要保证得到的计数具有代表性。某些类型的微生物会比其它类型的微生物更容易聚集/再聚集，主要是因为其具有疏水性。

B.2.1.7 应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应避免微生物的丢失或改变。应规定贮存最长时间。干燥会使微生物数量明显减少，所以在选择贮存条件和贮存时间时应加以考虑。

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 应规定处理时间。

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 若使用了大量的洗脱液，可能会生成含有低浓度微生物的悬浮液，应过滤掉洗脱液（若可行）。

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。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。应根据B.9要求验证超声法。

B.2.2.2.2 应规定超声处理的常规频率和处理时间。而且，还应规定试验样品在超声波清洗器中的安放位置。应注意限制同时进行处理的试验样品数量，因为超声波能源在穿过防护物时会被减弱。

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应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）振摇一段时间或循环振摇数次。也可用手工振摇，但其效力会因操作人员而异。

B.2.2.3.2 应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应导致过热和/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，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。涡旋中的变化会使微生物采集产生差异。

B.2.2.4.2 应规定所用容器、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。应评估涡旋混合器不同操作人员间的采集差异。

B.2.2.5 冲洗

B.2.2.5.1 让洗脱液通过试验样品的内腔。可以靠重力或泵来导入液体。另外也可让产品充满洗脱液，夹住并摇动。

B.2.2.5.2 应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采集微生物所必需的冲力。

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搅切试验样品。

B.2.2.6.2 时间取决于试验样品和混合器，但是时长不应造成洗脱液过热和对微生物造成潜在伤害。

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 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，并用棉拭子擦拭预先界定的试验样品的表面。在有些情况下，可以通过先湿润表面，然后用干棉拭子擦拭的方法提高生物负载回收率。将棉拭子转放至稀释液中并搅动，以采集棉拭子上的微生物。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抽样。

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。有些收集到的微生物会被棉拭子本身吸附。因为上述原因，此方法回收到的微生物数通常较低。

B.2.2.7.5 棉拭子中不宜含有灭菌剂或抑制剂。

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，洗脱液可用于从产品上采集微生物，用转送培养基可用于转送采集到的微生物并计数，用稀释液则可获得含有可计数微生物的悬液。

B.2.3.2 洗脱液和稀释液的特性对所用方法的总体效率有明显影响。选择稀释液和洗脱液时，应注意它的成分（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；但是不能确定这种方法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、琼脂的干燥、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，只有在其它方法不适用的情况下才宜适用。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、琼脂的干燥、可能存在厌氧菌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总是会维持活性状态，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依据，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并培养，单独记下有可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天是适宜的。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。根据一组重复取样中阳性结果的频率，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%的可信区间是相对宽的。该估算和其置信界限来自MPN表格，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中包含了用于计算MPN 95%置信度的电子数据表。

B.3.3.3 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，对于液体用的医疗产品、粘性液体、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。

B.3.3.4 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。按照（B.1公式）计算MPN。 $MPN = Ln \times 1/SIP$ ，其中Ln是试验的数量/阴性生长的数量

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 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,还需进行额外的处理,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 μm 的过滤器适于采集微生物。

B.4.2.2 通常需要一真空源,某些时候需要压力源。宜注意避免负荷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浸泡了液状营养培养基的吸附纸上。对膜过滤器表面上形成的菌落进行计数,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,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要求的灵敏度。

B.4.3.4 琼脂的温度应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,平板倾注对可检测的某些类型微生物存在局限性,尽管在特定情况下可以使用羟甲基纤维素作为凝固剂。

B.4.4 平板涂抹

B.4.4.1 平板涂抹是使用涂抹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应被吸收,才能形成离散的菌落;吸收决定了一个培养基表面所能处理的悬液体积。

B.4.4.3 如果存在杀菌或抑菌物质,B.8中关于这方面的描述的考量会适用。

B.4.4.4 平板涂抹的洗脱液量受限量。因此该方法对于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向外周递减涂抹。经过培养后，对全部或部分板，运用专门的技术栅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抹法得出的结果具有良好的一致性。由于器械的设计和毛细管和小容量（悬液）的使用，螺旋涂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 如果存在杀菌或抑菌物质，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.2中列出了一些培养基和培养条件的示例。该清单并不详尽。对产品中生物负载微生物类型的测定，包括通过分子法，可能会选择出一些微生物培养基。

B.5.2 应该注意所有非选择性厌氧培养法会使兼性厌氧微生物生长。但是，此微生物生长的种类根据不同的培养基和培养条件会有很大不同。

B.6 计数（计算菌落）

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（如使用立体显微镜）
- b) 计算和报告异常聚落（如涂抹器）
- c) 列举和报告密集的平板（如菌落不清楚或太多而无法技术）
- d) 报告连续稀释后的计数

B.6.2 在使用计算菌落的计数中，应焦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通常指定一块平板上的菌落数量的下限。该限值根据多种稀释液的可获得性确定。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 应评估不同技术人员所得出结果之间的差异。标准方法9215异养平板计数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 纤维的存在可能会影响离散菌落的形成，致使计数困难。

B.6.6 如果存在涂抹的微生物，使用倾注在试验平板上的琼脂可以提供在一个培养后更易计数的试验结果。

B.6.7 对于自动技术方法，宜根据ISO/IEC 17025对系统进行确认。

B.6.8 如果运用了多种试验条件（例如一个平板上计算喜氧微生物，在另一个平板上计算细菌），且没有发现菌落，那么累计LOD值。例如，喜氧微生物数 $<2\text{CFU}$ ，细菌数 $<2\text{CFU}$ ，那么总数为 $<4\text{CFU}$ 。

B.7 检测微生物的其它技术

生物负载测定还可使用菌落计算以外的其它技术。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 100CFU。

注：有一些快速的微生物方法（例如生物体发光、酶催化、血细胞计数）可以提供有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差异性。这些方法相较于直接培养，提供生物负载信息的速度更快。

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，都应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 洗脱液应不抑制由产品上采集的微生物的生长。

B.8.4 如果产品是直接放入到培养基中（例如在MPN估计中，参见B.3.3），可以使用药典中描述的适宜试验。试验中，产品连同少量微生物一起放入到培养基中，并使用常规生物负载测定的建议条件进行培养。使用的微生物数量应约为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应对混合了少量微生物的产品—培养基组合进行挑战试验。

B.5 若接种的微生物数量和回收数量有很大不同，或在适宜的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、灭活或去除抑制物质。

若需要重新评估洗脱液的影响，可以将已知数量的微生物接种到洗脱液和受控溶液中，时间大致与常规生物负载测定时建议的时间一致。最后计算从洗脱液中回收的微生物，并与从受控溶液中回收的微生物数量作比较。

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）。应评价这些力对生物负载测定的影响。如果需要评估物理力的影响，将物理力作用于已知数量的少量微生物（不多于 100CFU）。对微生物进行计数能测量出物理力的影响。

附 录 C

（供参考）

生物负载回收率验证

C.1 综述

C.1.1 验证前

在开始验证之前，应当对每个产品，或其部件，或产品组的去除技术进行论证和定义。记录的基本原理应包括产品，样品大小，回收技术的选择等。

C.1.2 用于生物负载回收效率目的的产品分组

类似的产品或其部件可以作为一个产品组，选择一个代表性的产品用于生物负载回收效率验证。包含的评估标准可包括相似类型的原材料，设计和尺寸，制造工艺，制造环境，制造人员和制造位置。生物负载回收效率验证的结果可以应用于该组中的所有产品以供将来测试。

C.1.3 样品量

C.1.3.1 应选择要确定生物负载回收效率的产品或其部件的数量。

C.1.3.2 常见的方法是使用三到十个产品进行回收验证测试。样品量应主要基于进行测试的目的（例如，支持辐射灭菌剂量的确认，或过度杀菌循环）。在审查生物负载回收效率结果时，对结果一致性的审查，或缺乏一致性结果可以表明应该应用不同的提取方法。或者，更大的样品量可以更准确地确定生物负载回收效率。

C.1.4 生物负载回收效率方法选择指导原则

C.1.4.1 执行生物负载回收效率以建立生物负载校正因子，该因子可应用于生物负载数据以解释在去除技术之后和/或未被所用培养条件检测的产物上残留的微生物。通过包含生物负载校正因子进行调整的生物负载数据被理解为更准确地表示真实的生物负载计数；这被称为生物负载估计值。生物负载回收效率测试也可用于比较生物负载测试方法。

C.1.4.2 选择生物负载回收效率方法（即重复回收与接种产品）的主要决定因素是天然存在的产品生物负载的水平。通常，重复回收方法最适用于具有较高产品生物负载的产品，接种产品方法最适用于具有较低产品生物负载的产品。生物负载回收效率结果和相应的生物负载校正因子可以基于生物负载提取参数（例如重复回收的提取的数量和类型，或使用接种产品与重复回收）而不同。因此，重要的是要考虑收集生物负载数据的原因以及生物负载回收效率确定的目的。

C.1.4.3 [表C.1](#)总结了在选择合适的生物负载回收效率方法时应考虑的典型产品和方法特征。

表 C.1 选择生物负荷回收效率方法的一般考虑因素

	回收方法	
	重复回收	接种产品
原则	在单个样品上重复应用指定的技术。	接种具有特定水平的芽孢杆菌孢子悬浮液在产品上。其他细菌也可能是合适的，这取决于多种因素。
产品特征	具有中等至高（例如100CFU至1000s CFU）或高（例如> 1000CFU）生物负载的产品。 通常包括以下产品类型： — 有多种材料或表面的产品； — 粘合或编织基质的产品（如织物，卷材，泡沫）； — 多组分产品组装在一起使用； — 带粘合剂/胶水的产品； — 动物源性器械，尤其是当从屠宰场材料获得。	具有低（例如<100CFU）或非常低（例如<10CFU）生物负载的产品。 通常包括以下产品类型： — 容易溶解或崩解的产品（例如可溶性材料）； — 简单的塑料器械（例如以最小的处理注塑成型）； — 组件极少的产品； — 具有抗菌特性的产品； — 已清洁的产品。
与实际生物负载的相关性	代表天然生物负载的性质和类型。	不太具有代表性的天然生物负载的性质和类型。 孢子通常比许多其他细菌更容易去除，特别是当手动沉积而不是原位形成孢子时。
结果的一致性	由于可变的天然生物负载，重复样品之间预期的结果不太一致。	在重复样品之间更一致的预期结果
大概测试时间	3天至7天（视自然生物负载）。	2天至5天（取决于使用的微生物）。
测试复杂性	可能会更加劳动密集型。	可能会减少劳动密集型。
方法面临的挑战	天然生物负荷的稳定性，不一致/可变生物负载。	在悬浮液的干燥，结壳，粘附或不粘附期间结块。

C.1.4.4 如果在单独的容器中测试产品和/或使用不同的技术测试不同的部件，则具有不同类型的组件（例如，试剂盒，粉末）的复杂产品可能需要多于一种类型的生物负荷回收效率测定。 这可能需要对使用不同方法测试的部件应用多于一个生物负荷校正因子。

C.1.4.5 如果生物负载较低，并且如果需要更大样品量的测试产品，则可以将多种产品一起作为合并样品进行测试。在这种情况下，单个产品的生物负载分布是不可观察的。如果要对产品进行常规合并以进行测试，则应以相同的方式进行生物负载回收效率测定。例如，如果在常规测试期间合并五种产品，则应使用五种合并产品进行生物负载回收效率测定。

对合并产品进行测试的生物负载回收效率结果可能是合并产品数量所特有的。如果合并的产品数量发生变化，则应考虑对生物负载回收效率进行新的评估。

C.2 使用重复回收进行验证

注：这种方法的验证过程使用在产品上自然发生的生物负载。有时它被称为“彻底回收”。

C.2.1 综述

C.2.1.1 该方法的基本原则是应重复生物负载测定方法，直至所回收的微生物数量显着减少。每次重复后，从产品或产品部分中完全回收洗脱液并进行计数。比较连续回收累积的结果。然而，应该注意，该方法不一定精确。不能总是证明回收的微生物数量与产品上的实际数量之间的确切关系。

所应用的确切重复次数取决于许多因素，包括产品的性质，构成生物负载的微生物和初始污染水平。可以使用初步实验或测试类似产品的经验来确定要应用的重复次数。

C.2.1.2 在初始应用去除方法后计数的菌落数表示为来自所有重复的菌落总数的一部分（即生物负载回收效率）。

C.2.1.3 使用需氧菌计数进行重复回收已经成为行业标准。需氧菌计数通常构成医疗产品上的大部分微生物，因此，它是其他类型计数的回收特性的有效表示。重复性回收测试根据它们如何粘附到产品上来测量去除微生物的测试方法的效率，因此这些动力学通常适用于所有类型的微生物。

C.2.2 用于说明生物负载校正因子的计算的示例

C.2.2.1 在这个例子中，通过重复处理进行验证的一组数据显示在表C.2中。该例子中的数据涉及十种重复的医疗产品，并且在重复性回收测试中包括五种处理方法。

C.2.2.2 根据表C.2中的数据，移除的比例可以如表C.3所示计算。

表 C.2 重复回收数据示例

产品号	处理/提取（CFU）					总计5次处理 (CFU)	第一次处理移 除率
	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	1940	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%		CF=2.07=2.1		
最差情况回收值			27.3%		CF=3.66=3.7		
注：使用稀释因子调整处理列1至5中显示的计数。 使用未调整的计数来计算回收效率也是可以接受的，在这种情况下，计数为零是可以接受的。							

表 C.3 重复回收数据示例

产品号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
首次处理的回收数量	450	200	90	1 200	450	200	930	1350	120	480
总的回收数量	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				
最差情况回收值	27.3%					校正因子（CF）=3.66=3.7				

C.2.2.3 过首次处理的平均回收率和适当的修约，生物负载回收效率的生物负载校正因子的公式（C.1）所示：

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

对于某些应用，可以使用最低恢复百分比值以反映最坏情况。 该决定可取决于生物负载估算的使用目的。 对于表C.2中提供的数据，包括适当修约的最差情况生物负载校正因子如公式（C.2）所示：

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

C.3 产品接种法

C.3.1 使用接种产品进行验证

C.3.1.1 可以通过接种已知数量的选定微生物至产品中，以确定生物负载回收效率。微生物可以是营养细胞，但最常见的方法是使用需氧细菌芽孢。操作中使用细菌营养体是困难的，因为干燥时微生物可能失活。

微生物接种具有局限性，例如悬浮液的结壳，粘附或不粘附，以及接种物水平的聚集和变化。接种产品时应考虑到这些限制。

C.3.1.2 应制备用于接种产品的微生物悬液，并测定其活菌计数。

C.3.1.3 初步实验可能需要建立适当的稀释度。通常，将已知水平的活微生物附着在产品上是合适的，这将在平板计数步骤期间导致可数的范围。

C.3.1.4 应选择一些需要测定生物负载回收效率的产品或其部分。应根据具体情况考虑是否需要无菌产品。每个产品接种一定体积的微生物悬浮液，如果适用于特定产品，在层流气流条件下干燥。接种时测定接种物的活菌计数。

悬浮液应该以这样的方式分配到产品上，考虑到产品上最难去除天然污染物的部分。该产品的不同类型的材料也应考虑接种。

接种由吸收性材料制成的产品可以通过浸入选定微生物的悬浮液来完成。这种方法可以在产品上产生均匀的微生物分布。

C.3.1.5 使用规定的生物负载测定方法评估从产品中移出的接种微生物数量。

C.3.1.6 移出的微生物数量表示为接种到产品上的数量的一部分。可计算各产品的该分数，并用于建立生物负载回收效率。

C.3.2 使用产品接种计算生物负载校正因子的示例

C.3.2.1 在这个例子中，表C.4列出了一组用于接种回收验证的数据。这些数据涉及三个重复产品项目。

C.3.2.2 因为首次实验表明产品生物负载水平非常低，验证时，选择了产品接种方法。

C.3.2.3 制备萎缩芽孢杆菌（以前称为枯草芽孢杆菌黑色变种）的水悬浮液，并测定了悬浮液的活菌数。

C.3.2.4 制备悬浮液的稀释液，使得0,1 ml溶液中含有平均100个孢子。每个装置接种0,1ml这种稀释的悬浮液并使其在层流气流下干燥。

C.3.2.5 使用选择的移出技术操作接种的产品，移出孢子的平均数量为76，其范围从68至83。

表 C.4 接种回收率验证的样品数据

平均接种物计数 CFU	样品	回收的接种物 计数 CFU	回收效率 %
100	1	76	76,0
	2	83	83,0
	3	68	68,0
		平均回收率	75,7

C.3.2.6 生物负载回收效率的生物负载校正因子，包括适当的修约，将按照公式（C.3）所示：

$\frac{100}{75,7} = 1,32 = 1,3 \text{ (C.3)}$

在某些应用程序中，可以决定使用百分比清除范围的最低值反映最坏情况。这个决定将受到数据使用的影响。对于上述数据，最差情况下的生物负载校正因子（包括适当的修约）将按照公式（C.4）所示：

$\frac{100}{68} = 1,47 = 1,5 \text{ (C.4)}$

C. 3. 3 举例说明比较两种生物负载回收效率方法

C. 3. 3. 1 在本例中，表C.5列出了两组用于恢复验证的数据。 公司根据风险建立了生物负载回收效率的内部可接受标准。这些数据涉及用一种技术（首次测试）测试的五种产品，其中平均回收率低于既定标准。因此，在现有技术中增加了一个其它步骤，以确定是否提高了生物负载回收效率（第二次测试）。

表 C. 5 两种回收方法的生物负载回收效率百分比比较

技术	%生物负载回收率					平均回收值
	1	2	3	4	5	
首次试验 使用USP流体D进行5分钟机械振摇	37,3	25,2	50,2	33,7	29,5	35,2
第二次测试 使用USP流体进行5分钟机械振摇+样品超声处理2分钟	60,2	64,7	72,1	68,2	54,5	63,9

C. 3. 3. 2 修改原始技术后，生物负载回收效率确实提高并符合既定标准。 生物负载数据的目的和所需的准确度将影响是否需要更多一致性数据，或者生物负载回收效率是否应该更高，以便更好地估计回收的生物负载。

C. 4 复杂产品检验的生物负载回收效率

C. 4. 1 在表C.6所示的例子中，需要多种回收方法来估计复杂产品的生物负载水平。 这个例子展示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。 为了确定该复杂产品的生物负载水平，应将所有三个生物负载估计值相加。

C. 4. 2 在测试组织和生物制品时，可以从AAMI TIR37获得额外的指导。 随着时间的推移预期分解的产品（例如， 药物洗脱或生物可吸收产品）应该解释生物负载回收效率测试方法开发中的这些变化。

表 C. 6 采用 2 个生物负载校正因子和 MPN 结果确定的复杂产品生物负载估计值

容器	%生物负载回收率 产品部分#1 使用冲洗测试方法	%生物负载回收率 产品部分#2 使用机械摇动五（5）分钟法	%生物负载回收率 产品部分#3 使用粉末材料的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
复杂产品的生物负载回收效率和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）	$10,5 + 130,0 + 80 = 220,5$		
*可能需要应用稀释因子。			

C.5 生物负载校正因子的数据分析与应用

C.5.1 由于设计、物料、产品配置、生产工艺等方面的差异，本文件不要求获得特定的生物负载回收效率结果。但是，如果生物负载回收效率结果低于目标值或期望值，则应尝试另一种技术（例如，另一种提取方法或延长当前提取方法）以确定是否可以获得更好的结果。

在确定医疗保健产品所需的生物负载回收效率时，可考虑的项目包括以下内容：

- 灭菌验证方法（例如 过度杀死vs.基于生物负载法）；
- 使用生物负载数据（例如支持灭菌验证方法、原材料筛选、趋势分析）；
- 被测试产品或物料类型（如：塑料和金属与可吸收材料）；
- 使用回收方法的稳健性（如：超声，震动，或者两者的结合）；

基于这些原理，低生物负载回收率（如：某可吸收或特别复杂的产品回收率20%）可以认为是可以接收的。考虑使用最低回收率百分比值反映最保守的最坏情况估计是适当的，如C.2.2.3和C.3.2.6中描写。也要注意某些情况下确定产品的回收率也是不必要的（如：子件或原材料的筛选，或某液体产品且其全部组成均被过滤）。

在微生物测试方法中，预计将获得，可预测的物理科学试验方法（例如，化学或物理学）中通常观察到的更多的变异。这种更大变化在于，微生物是可培养的，并且基于不同的条件，微生物的数量随时间的推移而改变。其他影响生物负载回收效率的因素包括微生物凝集，沉积在产品表面上的微生物的一致性，产品的表面特性（如：高空隙表面区域，特定有机硅材料涂层），培养条件和或微生物检测能力的固有局限性。

尽管如此，意料之外的低或是广泛分布的生物负载回收效率可能不是根据生物负载数据的关键性和目的而定，如果是这种情况，洗脱技术的进一步改进（如，通过拆卸增强，更密集机械摇动，腔的主动冲洗，冲洗时间的延长，洗脱液的改进）应被调查。

一个例子，在建立“基于生物负载”灭菌过程，生物负载数据的关键性和目的性可以确保获得更好的回收结果所需的更多的努力和资源（如，例如，辐射灭菌，特别是剂量确认方法需要低生物负载计数）。一个例子，在生物负载组分筛查应用中，生物负载数据关键性和目的可能不需要更多的努力和资源来获得更好的复原结果。

C.5.2 在计算生物负载回收效率时，无需应用检测限

（例如，a“小于”值）为零CFU值。

C.5.3 回顾生物负载回收率结果，适用于所有值求整保留小数位数一位。

C.5.4 生物负载纠正因子通过生物负载平均值乘以纠正因子应用于生物负载数值。当生物负载纠正因子应用于结果被称作生物负载估值。在一些应用中，可以决定应用最低的生物负载测定生物负载校正因子以反映的范围的回收效率值最坏的情况。这个决定将受到数据使用的影响。应用生物负载校正因子时，所得结果数值称为生物负载估计值。在一些应用中，可以决定应用范围内最低的生物负载回收率作为测定生物负载纠正因子以反映的最坏的情况。这个决定将受到数据使用的影响。

附 录 D
(供参考)
典型的职责分配

制造商和实验室应达成协议，为制造商和实验室之间应有协议来划分职责，最终制造商应负责确保保准的要求得到满足完成本文件规定的要求。最终，制造商负责以确保符合要求。本附件提供了有关典型任务的信息。关于表D.1所列的所需简略。有关每个条款的详细信息，请参阅具体条款要求。

表 D.1 责任的典型分配

子句	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	规程的质量标准	R	R
4.1.2	审查和批准文件和记录	R	R
4.1.2	文件和记录的控制	R	R
4.1.3	记录内容	N/A	R
4.1.3	人员身份	N/A	R
4.1.4	检查计算和数据传输	N/A	R
4.2.1	实施和执行程序	N/A	R
4.2.2	职责的分配	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	物料的制备和灭菌	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	产品的选择和抽样	R	I
5.1.2	产品类别的依据	R	I
5.1.3	取样时间	R	I
5.2	样品部分（SIP）	R	I
生物负载的测定方法和微生物特性鉴定			
6.1.1	方法选择	R	R
6.1.2	抑制作用最小化	I	R
6.1.3	生物负载清除效率	I	R
6.1.4	培养条件的选择	I	R
密钥 R=责任 I=这可能涉及提供帮助或信息 N/A=一般不适用 注意，作为实验室基本方法验证的一部分，测试方法的一般性能被展示并记录在案。产品验证的特定方面被记录为产品特定报告的一部分。			

表 D.1（续）

子句	本文件的要求	典型责任	
		制造商	实验室
6.1.5	列举技术的选择	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验证			
7.2a)	检测方法适用性	R	R
7.2b)	去除技术	R	R

7.2c)	列举的充分性	N/A	R
7.2d)	微生物表征	N/A	R
生物负载的常规测定和数据解读			
8.1	取样计划	R	I
8.2	试验方法的选择	R	R
8.3	微生物表征的程度	R	I
8.4	二.审议适用的标准和要求	R	I
8.5	加标处理	R	I
8.6	可接受水平的质量标准	R	N/A
8.7	趋势	R	N/A
8.8	统计方法的应用	R	N/A
生物负载测定方法的维护			
9.1	考虑生产/工艺变更	R	I
9.2	检测方法变更	I	R
9.3	方法验证数据审查	R	R
密钥 R=责任 I=这可能涉及提供帮助或信息 N/A=一般不适用 注意，测试方法的一般能力已被显示并记录为实验室基本方法验证的一部分。产品验证的特定方面记录在产品特定报告中。			

参 考 文 献

- [1]ISO 7870-2, 控制图-第2部分: 休哈特控制图
- [2]ISO 7870-4, 控制图-第4部分: 累积总和图表
- [3]ISO 9000:2015, 质量管理体系—基础和术语
- [4]ISO 9001, 质量管理体系-要求
- [5]ISO 11135, 保健产品灭菌-环氧乙烷-医疗器械的开发, 验证和常规控制灭菌过程的要求
- [6]ISO 11137 (所有部分), 保健产品灭菌—辐射
- [7]ISO 11138-2, 保健产品灭菌—生物指示剂—第2部分: 环氧乙烷灭菌过程的生物指示剂
- [8]ISO 11139:—2), 保健产品灭菌-词汇
- [9]ISO 11737-2, 医疗器械灭菌-微生物学方法-第2部分: 灭菌过程中无菌测试的定义, 验证及维护
- [10] ISO 13022, 含活性人体细胞的医疗产品-风险管理的应用和生产实践要求
- [11]ISO 14160, 保健产品灭菌-使用动物组织以及衍生产品的一次性医用器具用液体灭菌剂-灭菌程序特性描述,开发确认以及常规控制的要求
- [12]ISO 14937, 保健产品灭菌-医疗器械用灭菌剂的特性和灭菌方法的开发,验证及常规控制的一般要求
- [13]ISO 17665 (所有部分), 保健产品灭菌-湿热
- [14]ISO 20857, 保健产品灭菌-干热-医疗器械的开发、验证和常规控制灭菌过程的要求
- [15]ISO 22442-3, 利用动物组织及其衍生物的医疗器械-第3部分: 消除和/或病毒和传染性海绵状脑病 (TSE) 的药剂失活的验证
- [16] ISO/IEC 90003, 软件工程-为ISO 9001的应用指南: 2008年计算机软件
- [17] AAMI TIR37, 保健产品灭菌-辐射-指导对生物和组织为基础的产品的灭菌
- [18]ASTM D4855-97, 比较试验方法的标准规程
- [19] ICH Q5A(R1)来源于人或动物细胞系的生物技术产品的病毒安全性评价
- [20]Bailey, M. Notes on bioburden distribution metrics: The log-normal distribution. Panel on Gamma and Electron Beam. March 2010
- [21]Bonalsky, J.R. A Model system for testing raw materials for microbial content. Pharm. Technol. 1980, 4(2), 49 - 5
- [22]Bryans, T., Hansen, J. The Bioburden Estimate: Not Just Math, But Microbiology. AAMI Industrial Sterilization Research from the Field. 2013
- [23]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
- [24]Bushar, H.F., Kowalski, J.B., Mosley, G. Estimation of average bioburden values for low-bioburden products, MD+DI. July 2011, 33(7)
- [25]Collins, C.H., Lyne, P.M., Grange, J.M. Collins and Lyne' s Microbiological Methods. 7th Edition. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford. 1995
- [26]DeMan, J.C. M.P.N. Tables Corrected. European J. Appl. Microbiol. 1983, 17, 301-305
- [27]FDA Bacteriological Analytical Manual, Annex 2, October 2010
- [28]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

- [29]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
- [30]国际协调会议(ICH)分析方法的验证:定义和术语(CPMP/ICH/381/95)
- [31]国际协调会议(ICH)分析方法的验证:定义和术语(CPMP/ICH/281/95)
- [32]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
- [33]PDA Bioburden Recovery Validation Task Force. Technical Report: Bioburden Recovery Validation. Journal of Parenteral Science & Technology. 1990, 44(6), 324 - 331
- [34]PDA 第33号技术报告 代替和快速微生物测定法的评估、验证和执行 2013
- [35]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
- [36]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
- [37]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
- [38]Shirtz, J.T. Sterility Testing. Pharmaceutical Engineering. November/December 1987, 35-37
- [39]Sokolski, W.T., Chidester, C.G. Improved Viable Counting Method for Petroleum-Based Ointments. J. Pharm. Sci. 1964, 53, 103 - 107
- [40]US Pharmacopoeia, USP 40/NF 35 2017, <1223> Validation of Alternative Microbiological methods, United States Pharmacopeial Convention Inc.: Rockville, MD. 2017
- [41]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
-