

医疗保健产品辐射灭菌初始污染菌检测技术研究

刘清芳

(苏州大学放射医学和公共卫生学院 苏州 215123)

摘要 对全国52个厂家的148种不同出口医疗器械产品进行初始污染菌检测技术的研究,为辐照剂量设定提供微生物参数。对148种医疗器械进行微生物培养条件、洗脱技术、校正因子、细菌总数检测技术的选择和验证。建立了不同生物负载水平频数分布图,验证了五种洗脱技术的洗脱能力。初始污染菌检测技术研究能为医疗产品辐照剂量设定提供精确的微生物信息。

关键词 辐射灭菌, 初始污染菌, 剂量设定

中图分类号 R817, R817-3, R144.1, R817.9+3

辐照是一种优良的灭菌方法,其操作简便、灭菌效果好,适用范围广,经辐照灭菌后的产品储存时间长。产品的初始污染菌信息是确定辐照剂量的基础,初始污染菌数检测是通过使用初始污染菌估计技术和对该技术进行验证共同完成的。由于产品理化性质的多样性和污染菌的广谱性,不可能对所有情况均选用同一种估计技术。对某一特定的产品,初始污染菌数估计技术的选择应建立在以下的考虑上:与产品污染微生物洗脱率相关的因素;污染微生物的种类和分布;辐照产品的理化性质。为了确保其准确性和稳定性,对所选的初始污染菌数估计技术,要进行验证效果的确认:1. 如果洗脱是其中的一个操作部分,其充分性应得到验证。2. 依据污染微生物种类。

选择合适的培养基和培养条件,验证其对微生物的抑制或促进作用。3. 如果产品本身会释放杀菌或抑菌物质,则要对其进行中和、除去或最小化预处理。鉴于国内未见有初始污染菌检测技术研究报道,为了能对初始污染菌数进行精确估计,进行了初始污染菌检测技术的研究。

1 材料与方法

1.1 实验试剂和仪器

1.1.1 样品的选择、收集和制备 (1) 样品来源:来自全国52个厂家的148份送检样本,样品种类包括无纺布类产品(无纺布片、手术衣、手术巾等)、纱布类产品(纱布片、绷带等)、高分子类产品(手术薄膜、手套、输液管等)、金属类(针头)及其它,其

中大件(Large product)5份,小件(Small product)143份。(2) 样品制备:对于不能对整个产品进行实验室操作的大件样本,制成产品份额(SIP),但必须证明微生物分布的均匀性:将大件产品等分为20份样品($SIP = 0.05$),进行无菌实验,阳性样品数达到17个,则可以用产品份额替代整个产品。

1.1.2 洗脱液制备 蛋白胨溶液(0.1%蛋白胨+0.05%吐温80+0.9%生理盐水);0.02mol/L磷酸盐缓冲液(0.02mol/L磷酸盐溶液+0.05%吐温80+0.9%生理盐水);1/4林格氏液(148mmol/L氯化钠+2.4mmol/L氯化钾+2.3mmol/L氯化钙+0.05%吐温80);蛋白胨缓冲液(0.067mol/L磷酸盐溶液+0.43148mmol/L氯化钠+0.1%蛋白胨+0.05%吐温80);0.9%生理盐水;洗脱液配制后,经115℃灭菌30min备用。

1.1.3 培养基 细菌培养基:营养琼脂;霉菌培养基:虎红琼脂培养基;无菌培养基:硫乙醇酸盐培养基;均由上海市疾病预防控制中心提供,按照处方规定进行配制,灭菌;后备用。

1.1.4 标准菌株 枯草杆菌(ATCC9372);金黄色葡萄球菌(ATCC6538);白色念珠菌悬液(CMCC(B)64941);生孢梭菌(CMCC(B)64941);藤黄微球菌(CMCC(B)28001);短小芽胞杆菌(E601);由上海微生物研究所提供,制备过程参照《消毒灭菌技术》(卫生部),放置于4℃的冰箱中备用。

1.1.5 仪器及设备 生化培养箱LRH-150-13型;净化工作台:YJ-875S型,清洁级为100级;高压灭菌器:YXQ SG41-280型;隔水式电热恒温培养箱:PYX-DhS-280型;离心机:LXJ-2型;旋涡振荡器:

第一作者:刘清芳,男,1953年5月出生,1978年毕业于苏州医学院医疗专业,医学硕士,副教授,研究方向:辐射流行病学

收稿日期:初稿 2007-03-05,修回 2007-06-26

XW-80A (2800r/min); 滤过装置、真空泵、2XZ-0.5型; 过滤器, 孔径 $0.45\mu\text{m}$ 。

所有的数据资料均采用 SPSS 10.0 统计软件进行分析处理。

1.2 试验方法及步骤

所有的实验操作和步骤均在净化工作台中进行, 以防止意外污染。

整个实验包括二个步骤: 1 实验前对实验技术的选择和验证; 2 对样品进行初始污染菌检测。

1.2.1 实验前实验技术的选择和验证 实验前, 需对实验技术进行选择 and 验证, 内容包括: 培养基及培养条件的选择和验证、洗脱技术(洗脱液、洗脱方式)的选择和验证、产品释出物检测、建立回收效率并计算校正因子。

1.2.2 培养基及培养条件的验证^[1] 临用前, 所有的培养基经确认无菌后方可应用。

新售培养基接种一定量的规定标准菌株(<100 个/mL), 30~35 培养 24h, 生长丰盛者即培养基验证通过。

无菌培养基进行灵敏度检测, 分别接种藤黄微球菌、生孢梭菌和白色念珠菌悬液各 3 管, 30~35 下培养, 逐日记录实验结果(记录是否长菌), 以未接种管作阴性对照。24h 内, 阳性数达到至少 2 管, 则灵敏度达到要求。

1.2.3 洗脱技术的选择和验证^[2] 取载体, 用已知标准菌株制成菌片, 选择上述数种洗脱液(蛋白胨水溶液、0.02mol/L 磷酸盐缓冲液、1/4 格林氏液和 0.9% 生理盐水), 进行洗脱液的选择; 在洗脱方式上, 采用涡旋振荡法(2800r/min)。洗脱技术洗脱能力的验证采用重复回收(Repetitive recovery)的方法, 实验结果重复 5 次。

1.2.4 产品释出物检测 产品经制备和灭菌后, 转移到 100mL 营养肉汤中, 30~35 培养 24h。以无菌操作接种标准菌株于上述肉汤中, 30~35 继续培养 24h, 观察有无细菌生长, 有菌生长者为产品无有害物释出物。无菌生长者为产品存在有害释出物, 应考虑去除该释出物, 宜加相应中和剂, 中和释出物的抑菌作用。

1.2.5 校正因子的验证 对于污染菌量低的样品, 采用模拟染菌的方法: 即将产品灭菌后, 接种大约 100 个细菌芽胞, 于通风柜中干燥, 分别进行四次洗脱和浇平板, 最后滤干, 并平铺于无菌平皿中, 用培养基覆盖并计数, 根据第一次回收的细菌数和

总细菌数, 计算回收效率, 得到校正因子; 对于污染菌量较高的产品, 直接进行洗脱四次, 并计算校正因子。

1.2.6 初始污染菌检测 采用所选洗脱技术后, 进行如下步骤实验操作:

技术路线^[3]: 样品的选择、收集和制备→样品的洗脱处理^[4](或者直接置于无菌平皿)→转移注皿→培养计数→数据记录→根据产品的微生物数和校正因子计算产品的初始污染菌。

2 结果及其分析

大件样品, 经制备后, 无菌试验阳性样品数均达到了至少 17 个, 因此, 取其 $SIP = 1/20$ 可代表整个产品。实验技术选择和验证结果及结果分析培养基和培养条件均符合规定要求。产品释出物经稀释或中和后符合要求。各洗脱液洗脱能力有明显差别 $p=0.000<0.01$ (见表 1)。

Table 1 Ability of different eluents

	Repetitive tests	Recovery effect	<i>p</i>
PWa	5	0.36±0.01	0.000
BPWb	5	0.67±0.02	
PBSc	5	0.66±0.02	
Ringer	5	0.58±0.03	
Saline	5	0.03±0.02	

Peptone water (PWa), Buffered peptone water (BPWb), Phosphate buffer saline (PBSc)

采用单因素方差分析, 其 $p=0.000<0.01$, 故统计学上认为各洗脱液的洗脱能力具有明显差别, 其中以蛋白胨缓冲液和磷酸盐缓冲液为最高, 两者无统计学差异($p=0.74>0.05$)。

经选择和实验验证, 选用如下洗脱技术:

洗脱液: 蛋白胨缓冲液

洗脱处理时间: 2min(超过 2min 以后, 洗脱效率已无明显升高) 见本实验室工作指导 SDFY-302-205。

洗脱处理方式: 旋涡振荡, 振荡频率为 2800 次/分。

校正因子的范围为 1.00~2.05, 在各类产品间有明显的差异 $p=0.000<0.01$ (见表 2)。

Table 2 Correct factor			
Category of product	Item No.	Correct factor	p
Blade	6	1.01±0.01	0.000
Non-weavon	14	1.48±0.05	
Plastic	18	1.37±0.03	
Rubber	32	1.27±0.014	
Gauze	34	1.49±0.03	
Linea	5	1.37±0.02	

采用单因素方差分析，其 $p=0.000<0.01$ ，故统计学上认为产品的洗脱率之间具有明显差别。其中，以无纺布类、塑料类、纱布类和羊肠线类的校正因子为高(相对应的洗脱率低)，它们之间无统计学差别意义($p=0.22>0.05$)。

产品平均初始污染菌数的变化范围为 $7.17 \sim 1.98 \times 10^5 \text{cfu / unit}$ ，其四分位数间距为 $1.6 \times 10^3 \text{cfu / unit}$ 。其中，平均初始污染菌数 $\leq 1000 \text{cfu / unit}$ 的有 86 份， $>1000 \text{cfu / unit}$ 的有 62 份。不同生物负载水平上频数分布见图 1，可见初始污染菌数在各水平上分布较为均匀。

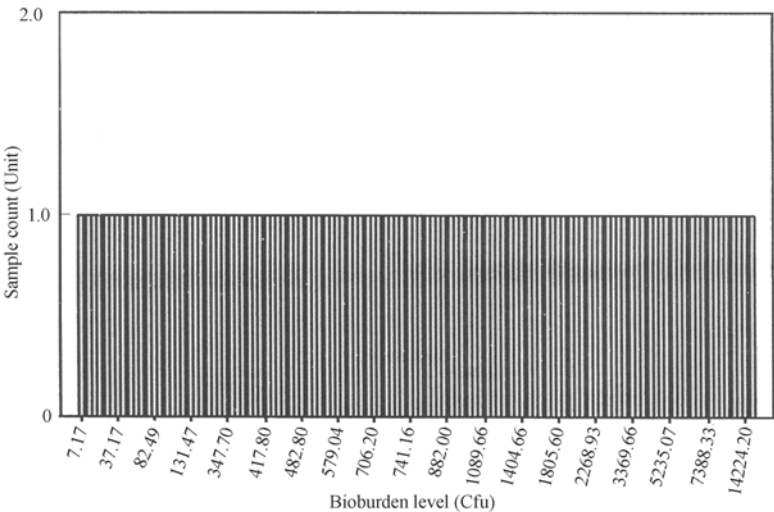


Fig.1 Bioburden level vs sample count

3 讨论

产品初始污染菌是厂家生产文明程度评判的重要指标之一，它同时也关系到医疗产品辐照灭菌剂量和临床应用的安全性^[5]。因此，正确地尽可能多地检出产品微生物，是初始污染菌数估计技术面临的重要课题，而初始污染菌检测是依靠初始污染菌数估计技术完成的。

本研究首次对国内 8 个省（直辖市）52 个厂家 7 大类 148 种不同的样品，按 ISO11137 标准附录 B 推荐的方法 结合每一个样品的特点和实验室条件，对试验中的每个步骤进行了试验验证和有效性确认，建立了规范的初始污染菌检测技术。

本次实验结果表明，初始污染菌洗脱效率与洗脱液的洗脱能力有关，其中以蛋白胨缓冲液和磷酸盐缓冲液的洗脱效率为高。另外，洗脱效率还受产品性质的影响，相对而言，橡胶、刀片类产品洗脱率较纱布、无纺布、塑料和羊肠线类产品高。

究其原因，可能与产品表面性质和微生物在产品中定位均有关，产品表面带电、强吸水性势必会增加微生物的粘附力，细菌被“包埋”也会增加洗脱难度。

实际上，就产品本身而言，其初始污染菌受诸多因素的影响，生产工艺不同，会导致初始污染菌的差异；生产厂家的文明生产水平不同，其初始污染菌的水平不同；生产地的气候、地理条件不同，甚至是生产的季节不同，也会影响产品初始污染菌水平及其抗性。

本次实验所检测的样品初始污染菌数存在很大的差别，最大的为绷带类产品，其初始污染菌数达到 $1.98 \times 10^5 \text{cfu / unit}$ ，最小的为创口贴类产品，其初始污染菌数仅为 7.17cfu / unit ，两者比值为 27704 倍。其中不可避免地存在产品大小对污染数影响的问题，在同一生产条件下生产的产品，即使污染程度相同(单位体积或面积的初始污染菌相同)，由于产品规格的原因，大件产品的微生物污染数要高得

多。这就给辐照剂量设定带来一个问题,即在进行辐照剂量设定时,是按单位产品进行的,这样大件产品所接受的剂量自然大,如果假设射线是足够均匀,可以想像,对于大件产品,其单位面积所接受的剂量要大得多,影响辐照灭菌的经济性,是一个值得考虑的问题。

本研究提供的洗脱技术和初始污染菌的检测方案,有助对生物及材料进行辐照灭菌处理时,对各种不同材质的医疗保健产品的初始污染菌有一个较精确的估计,以便在实际辐照灭菌时实施合适剂量辐照,以达到最佳灭菌效果,保证生产质量,提高经济效益。

参考文献

- 1 British pharmacopocia. Appendix X VIA: 1996: 251-53
- 2 ISO111737-1 Sterilition of medical device-miceobiological methods-Part 1: Estimation of microorganism on products: 2000: 15-30
- 3 ISO11737-7 Sterilizationon of medical device- microbiological methods-Part 1: Estimation of microorganism on products: 2000: 15-16
- 4 GB 16383-1996 Qaulition control stanadsrds for radiaton steriljiton of medical and hygienical products: 1996: 4-5
- 5 张同成, 刘清芳, 钟宏良, 等. 苏州大学学报,2002, 22(3): 241-243
ZHANG Togncheng, LIU Qingfamg, ZHONG Hongliang, et al. J Suzhou Inst Silk Text Technol, 2002, 22(3): 241-243

Research on determination of bio-burden for radiation sterilization of health care products

LIU Qinfang

(School of Radiation Medicine and Public Health, Soochow University, Suzhou 215123, China)

ABSTRACT In order to provide data of bio-burden for dose setting in radiation sterilization, determination of bio-burden on 148 kinds of health care products from 52 manufacturers were carried out. The culture of microorganisms, different elution technology, and correction coefficient of the microbiological methods have been used for determination of bio-burden. Frequent distribution of bio-burden was established. 5 kinds of elution processes were checked. Actual data of bio-burden for dose setting in radiation sterilization was gotten.

KEYWORDS Radiation sterilization, Bio-burden, Dose setting,

CLC R817, R817-3, R144.1, R817.9+3