

生物负载回收率对医疗器械辐照灭菌剂量的影响

张悦

(北京市射线应用研究中心 北京 100015)

摘要 根据不同实验参数测试出的生物负载回收率的差异,评价其对产品辐照灭菌剂量的影响。选取股骨柄、骨蜡和双极球头等 3 种产品,运用不同的检测标准分别测试每种产品的生物负载回收率,结合 ISO11137-2:2013 中方法 1 的原理,得出不同的生物负载结果对应的产品辐照灭菌的最低剂量。产品生物负载回收率的差异,导致了产品生物负载和灭菌剂量的差异,同时也直接对产品的灭菌质量控制造成了影响。

关键词 辐照, 灭菌剂量, 回收率, 生物负载, 医疗器械

中图分类号 R187

DOI: 10.11889/j.1000-3436.2019.rj.37.060401

Effects of bioburden-recovery on radiation sterilization dose of medical devices

ZHANG Yue

(Beijing Research Center for Radiation Application, Beijing 100015, China)

ABSTRACT The aim is to evaluate the effects of bioburden-recovery on the radiation sterilization dose of various products based on the differences in the bioburden-recovery obtained using different experimental parameters. Three types of products including femoral stem, bone wax, and bipolar ball head were selected and subjected to bioburden-recovery tests using different testing standards. Further, the minimum irradiation sterilization dose of the products corresponding to different results of bioburden was obtained based on the ISO 11137-2: 2013 (Method 1) standard. The test results indicate that the different bioburden-recovery of the products lead to a difference in bioburden and sterilization dose, which directly affects the quality control of sterilization.

KEYWORDS Irradiation, Sterilization dose, Recovery, Bioburden, Medical devices

CLC R187

随着对产品灭菌质量控制的重视程度不断提升,越来越多的生产企业选择运用 ISO 11137 系列标准中的原理,完成对产品辐照灭菌参数的建立^[1]。建立灭菌剂量实验包括生物负载实验方法适用性实验、生物负载实验、生物负载微生物种类鉴别实验、验证剂量实验、无菌实验,以及无菌检查方法适用性实验等。在建立灭菌剂量实验中,生物负载检测数据作为关键值,决定了产品

最终灭菌剂量的结果^[2],生物负载与灭菌剂量之间的关系十分密切。近年来,国内开展了医疗器械如何选择合适的灭菌剂量设定方法的研究,如龚频等^[3]将 ISO11137-2:2013 标准中的灭菌剂量设定方法和实验过程制作成了“灭菌剂量设定方法筛选表”;对医疗器械生物负载检测方法的研究,如王文庆等^[4]介绍了手术单、手术衣和洁净服的生物负载水平测定方法;刘清芳^[5]对全国 52

第一作者:张悦,女,1982 年 3 月出生,2004 年毕业于北京联合大学应用文理学院,生物技术专业,目前从事医疗器械辐照灭菌研究,助理研究员,E-mail: daicy0312@163.com

收稿日期:初稿 2019-07-19;修回 2019-09-02

First author: ZHANG Yue (female) was born in March 1982, and graduated from the College of Applied Arts and Sciences of Beijing Union University in 2004, majoring in biotechnology. Now she engages in radiation sterilization of medical devices as an assistant professor, E-mail: daicy0312@163.com

Received 19 July 2019; accepted 02 September 2019

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，建立了不同生物负载水平频数分布图。

有报道^[3-5]对医疗器械辐照灭菌剂量设定方法的选择以及医疗器械生物负载检测技术进行了独立的研究。但是，如果生物负载检测所采用的洗脱方法不合理，或者对生物负载实验所选用的检测标准的适用性未进行评价等，这些因素均会导致生物负载检测方法不适用以及检测数据不准确，造成了微生物数量检出率低、微生物种类丢失以及产品辐照灭菌剂量的差异，给后续的产品灭菌质量控制带来了直接影响。因此，生物负载与灭菌剂量是密不可分的^[6-7]。本文选取股骨柄、双极球头和骨蜡 3 种产品，运用不同的检测标准测试生物负载回收率，分析了生物负载对产品灭菌剂量

和灭菌质量控制带来的影响。

1 材料与方法

1.1 样品、试剂和仪器

股骨柄、双极球头和骨蜡均为常规生产和包装的植入性医疗器械。每种样品均为随机抽取的同一规格的 257 件样品，具体数量和批次构成见表 1。表 1 中生物负载方法适用性实验的方案 1 是依据 2015 版《中华人民共和国药典》^[8]建立；方案 2 是依据 ISO 11737-1：2018《医疗保健产品灭菌-微生物学方法-第 1 部分：产品上微生物群落的测定》^[9]建立。其他检测项目实验方法一致。检测整件样品，样品份额（SIP）均为 1。

表 1 每种样品的数量和批次
Table 1 Number and batch of each sample

检测项目 Testing items	所需样品数量(产品单元) Sample quantity required (product item)		备注 Remarks
	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2	
生物负载方法适用性实验 Applicability of the bioburden experimental method	10	3	来自生物负载实验3批产品中的1批 One batch of products from three batches of bioburden experiments
生物负载实验 Bioburden test	30	数据同方案1 Data same to scheme 1	独立的3批产品,每批10件 Independent 3 batches of products, 10 product item in each batch
无菌实验 Sterility test	101	101	上述3批产品之后生产的1批产品 One batch of products produced after the three batches mentioned above
无菌检查方法适用性实验 Applicability of the sterility experimental method	6	6	批次同无菌实验 Batch same sterility test
合计 Total	257		

洗脱液为氯化钠-蛋白胨缓冲液（pH=7.0），由北京陆桥技术股份有限公司提供，按产品说明进行配制、灭菌。培养基包括胰酪大豆胨琼脂培养基、硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基，由北京陆桥技术股份有限公司提供，按产品说明进行配制、灭菌。标准菌株包括铜绿假单胞菌 CMCC（B）10104（3 代工作用菌）、金黄色葡萄球菌 CMCC（B）26003（3 代工作用菌）、枯

草芽孢杆菌 CMCC（B）63501（3 代工作用菌）、白色念珠菌 CMCC（F）98001（3 代工作用菌）、黑曲霉 CMCC（F）98003（4 代工作用菌）、生孢梭菌 CMCC（B）64941（3 代工作用菌）、大肠埃希氏菌 CMCC（B）44102（3 代工作用菌）和枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC9372（4 代工作用菌），由杭州微球科技有限公司提供，菌含量均为 10~100 cfu/0.1mL。

实验设备包括滤器（300 mL）、水系微孔滤膜

(直径 50 mm, 孔径 0.45 μm) 和无油真空泵 (GM-0.33A) 等过滤装置; 电子天平 (分度值 0.1 g); 高压蒸汽灭菌器 (最高使用压力 0.235 MPa, 灭菌温度 105 ~135 $^{\circ}\text{C}$); 通用型大容量微生物培养箱 (最高工作温度 75 $^{\circ}\text{C}$, 温度精度 ± 1 $^{\circ}\text{C}$); 微生物培养箱 (环境温度 5~70 $^{\circ}\text{C}$, 温差 ± 1 $^{\circ}\text{C}$); 智能型恒温恒湿箱 (最高工作温度 60 $^{\circ}\text{C}$, 温度精度 ± 1 $^{\circ}\text{C}$); 集菌仪 (电源 220 V/50 Hz, 功率 100 W, 转速 0~220 r/min); 生物安全柜 (型号 BHC-1300IIA2)。

1.2 方法和步骤

1.2.1 生物负载方法适用性实验测试方法

依据 ISO11737-1: 2018, 向样品所选部分接种浓度为 10~100 cfu/0.1 mL 的标准菌株 (ATCC9372) 悬液 0.1 mL, 并在生物安全柜正常开启的层流状态下干燥。在干燥过程中, 菌液始终保持在样品表面。用与生物负载测试时等量的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (pH=7.0) 浸提样品,

手工振荡 100 次, 洗脱样品表面的微生物, 制备成试验组供试液。取供试液进行抽滤, 用与供试液同体积的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (pH=7.0) 冲洗滤膜, 将滤膜置于胰酪大豆胨琼脂平板上, 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~7 d。同时, 需测定菌悬液中的存活微生物数, 将 0.1 mL 菌悬液过滤, 用 100 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (pH=7.0) 冲洗滤膜, 滤膜在胰酪大豆胨琼脂平板上 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~7 d。回收率=试验组菌落数/菌悬液存活菌落数。

依据 2015 版《中华人民共和国药典》, 供试微生物为 ≤ 100 cfu/0.1 mL 的菌悬液, 每种微生物做 3 个实验 (见表 2), 用滤膜过滤。接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌的胰酪大豆胨琼脂培养基在 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养不超过 3 d, 接种白色念珠菌和黑曲霉的胰酪大豆胨琼脂培养基在 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养不超过 5 d。回收率=(试验组菌落数-供试品组菌落数)/菌液组菌落数。

表 2 依据药典的生物负载测试方法适用性实验使用的滤液
Table 2 Filtrates utilized in the applicability experiment of bioburden testing methods based on pharmacopoeia

分组 Groups	滤液成分 Contents in filtration solution
试验组 Experimental group	1) ≤ 100 cfu/0.1 mL 的菌悬液 1) Microorganisms suspension solution ≤ 100 cfu/0.1 mL 2) 样品提取液 2) Sample extracted solution 3) pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (作为冲洗液) 3) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) (as a flushing fluid)
供试品组 Sample group	1) 样品提取液 1) Sample extracted solution 2) 0.1 mL pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 2) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) 0.1 mL 3) pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (作为冲洗液) 3) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) (as a flushing fluid)
菌液组 Bacterial fluid group	1) ≤ 100 cfu/0.1 mL 的菌悬液 1) Microorganisms suspension solution ≤ 100 cfu/0.1 mL 2) pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (用量等同于样品提取液) 2) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) (equivalent to the volume of sample extract) 3) pH=7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (作为冲洗液) 3) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) (as a flushing fluid)

1.2.2 生物负载测试方法——薄膜过滤法

根据样品体积大小, 取一定量的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (pH=7.0) 用于浸提样品。采用手工振荡 100 次的方式洗脱样品表面的微生物, 制备

成供试液。取供试液进行抽滤, 用与供试液同体积的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 (pH=7.0) 冲洗滤膜, 将滤膜置于胰酪大豆胨琼脂平板上培养, 30~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 3~7 d。

1.2.3 验证剂量

根据生物负载的结果，从ISO 11137-2: 2013方法1的对应表格中查到无菌保证水平（SAL） 10^{-2} 的灭菌剂量为验证剂量。用Co-60辐照装置，按验证剂量照射做无菌实验和无菌方法适用性实验的样品。

1.2.4 无菌检测——薄膜过滤法

根据样品体积大小，取一定量的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液（pH=7.0）用于浸提样品（用量与生物负载检测一致）。采用手工振荡100次的方式，洗脱样品表面的微生物，制备成供试液。将此供试液用全封闭式集菌仪过滤，之后用100 mL无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液（pH=7.0）冲洗滤膜。集菌培养器中分别加入100 mL硫乙醇酸盐流体培养基和100 mL胰酪大豆胨液体培养基培养滤膜。硫乙醇酸盐流体培养基培养温度30~35℃，胰酪大豆胨液体培养基培养温度20~25℃，培养时间均为14 d。阳性对照管中加入<100 cfu/0.1 mL的金黄色葡萄球菌悬液，培养温度30~35℃，培养不超过72 h。

1.2.5 无菌检测方法适用性实验

供试微生物为<100 cfu / 0.1 mL的菌悬液。采用薄膜过滤法，用全封闭式集菌仪做滤膜过滤。向装有硫乙醇酸盐流体培养基的6个滤筒，分别接入<100 cfu的金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、生孢梭菌各2个；向装有胰酪大豆胨液体培养基的6个滤筒，分别接入<100 cfu的枯草芽孢杆菌、白色

念珠菌、黑曲霉各2个。其中，1个滤筒接入供试品，另1个滤筒作为对照（见表3）。硫乙醇酸盐流体培养基培养温度为30~35℃，胰酪大豆胨液体培养基培养温度为20~25℃，培养时间不超过5 d。

表3 无菌检测方法适用性实验使用的滤液
Table 3 Filtrate utilized in the applicability of sterility testing method

实验号	滤液成分
Test No.	Contents in filtration solution
实验1	0.1 mL 菌悬液
Test 1	Microorganisms suspension solution 0.1 mL
实验2	1) 0.1 mL 菌悬液
Test 2	1) Microorganisms suspension solution 0.1 mL 2) 样品提取液(同样品的无菌检查) 2) Sample extracted solution (see sterility test) 3) 100 mL 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(pH=7.0) 3) Asepsis sodium chloride-buffered peptone water (pH=7.0) 100 mL

2 结果

2.1 生物负载检测结果

不同检测标准对应的生物负载检测结果见表4。

表4 样品的生物负载检测结果
Table 4 Bioburden test results of the samples

样品名称 Sample name	菌回收率 / % Bacteria recovery		生物负载 / cfu Bioburden	经回收率修正的生物负载 / cfu Bioburden corrected by recovery	
	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2		方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2
股骨柄 Femoral stem	86.0	51.0	1.70	2.00	3.30
双极球头 Bipolar ball head	111.2	72.0	3.40	3.10	4.70
骨蜡 Bone wax	116.5	62.0	0.53	0.45	0.85

2.2 验证剂量

根据生物负载结果和ISO 11137-2: 2013方法

1，得到3种样品的验证剂量，见表5。

表5 样品的验证剂量
Table 5 Verification dose of the samples

样品名称 Sample name	验证剂量 Verification dose / kGy	
	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2
股骨柄 Femoral stem	3.6	4.1
双极球头 Bipolar ball head	4.1	4.5
骨蜡 Bone wax	2.3	2.9

2.3 最终灭菌剂量

3种样品实施的验证剂量（见表6）均符合

表6 3种样品的最终灭菌剂量
Table 6 Final sterilization dose of the three samples

样品名称 Sample name	实施的验证剂量 / kGy		无菌实验结果		无菌方法适用性实验结果		最终灭菌剂量 / kGy	
	Verification dose for implementation		Results of sterility test		Results of applicability of the sterility experimental method		Final sterilization dose	
	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2	方案1 Scheme 1	方案2 Scheme 2
股骨柄 Femoral stem	3.64	4.23	阴性 Negative	阴性 Negative	无抑菌物质 No bacteriostasis	无抑菌物质 No bacteriostasis	15.2	16.1
双极球头 Bipolar ball head	4.02	4.45	阴性 Negative	阴性 Negative	无抑菌物质 No bacteriostasis	无抑菌物质 No bacteriostasis	16.1	16.6
骨蜡 Bone wax	2.48	3.04	阴性 Negative	阴性 Negative	无抑菌物质 No bacteriostasis	无抑菌物质 No bacteriostasis	13.1	14.1

3 讨论

根据上述结果可以看出，用同样的微生物转移方法洗脱样品表面的微生物，按照2015版《中华人民共和国药典》方法得出的菌回收率要高于按照ISO 11137-2: 2013标准得出的菌回收率。但是，经药典方法得出的菌回收率修正的生物负载结果要低于ISO标准得出的菌回收率修正的生物负载结果。通过具体的实验方法看出，药典与ISO标准的方法适用性实验在检测原理上是有区别的。因此，针对不同产品，对于检测标准的合理性选择，是要进行评价的。

生物负载结果的差异造成了后续验证剂量和最终灭菌剂量的差异。最终灭菌剂量相对较低，虽然可以降低辐照成本，但是增加了产品灭菌质量的风险。产品的灭菌剂量是根据其生物负载水平确定的，要以建立灭菌剂量实验中得出的生物

ISO 11137-2: 2013的要求。最大剂量没有超过预定剂量的10%，最大和最小剂量的算术平均值不小于预定剂量的90%。经无菌方法适用性实验证实，3种样品均无抑菌物质。无菌检测结果均为阴性，且阴性对照为阴性结果，阳性对照为阳性结果，无菌实验结果有效。由于无菌检测结果符合要求，查ISO 11137-2: 2013方法1中的对应表格，可得到 10^{-6} 无菌保证水平对应的灭菌剂量。

负载结果，对常规生产产品的生物负载进行质量控制。因此，如果在产品确定灭菌参数时，收集的生物负载数据不准确，会直接影响产品的灭菌质量和日常质控工作。例如：生物负载检出率偏低，会导致微生物数量和种类的丢失，无法得到真实的生物负载数据，一旦出现无菌检测阳性，灭菌不彻底的情况，会给原因分析工作带来困难；如果只关注灭菌后的无菌检测结果，就会使生物负载这个质控上的关键环节失去意义。

4 结论

不同的检测标准和实验参数，都会带来不同的生物负载回收率和生物负载检测结果。开展医疗器械生物负载检测工作时，必须通过方法适用性实验，调整不同的实验参数，评价所用检测标准和检测方法的适宜性，才能得到对质量控制工

作有意义的生物负载数据。对产品的辐照灭菌剂量设定, 要依据长期积累的生物负载数据, 合理选取用于完成建立灭菌剂量实验的样品和其对应的生物负载水平^[10]; 对保证产品的灭菌质量, 更要控制好灭菌前产品的生物负载, 持续积累产品上的微生物数量和种类, 使质量控制数据具有完整性和追溯性。

参考文献

- 1 国际标准化组织. 医疗保健产品的灭菌 辐射 第2部分: 建立灭菌剂量: ISO 11137-2: 2013[S]. 瑞士: 国际标准化组织, 2013.
International Organization for Standardization. Sterilization of health care products-radiation-part 2: establishing the sterilization dose: ISO 11137-2: 2013[S]. Switzerland: International Organization for Standardization, 2013.
- 2 薛玲, 林华, 王辉. 北京市医疗器械产品 γ 射线辐射灭菌调研[J]. 首都医药, 2007, **18**: 4-5.
XUE Ling, LIN Hua, WANG Hui. Investigation on gamma-ray sterilization of medical devices in Beijing[J]. Capital Medicine, 2007, **18**: 4-5.
- 3 龚频, 汤晓斌, 陈达. 医疗保健产品辐照灭菌剂量设定方法的选择策略[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2014, **32**(5): 050204. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rrj.32.050204.
GONG Pin, TANG Xiaobin, CHEN Da. Strategy of choosing radiation sterilization dose setting methods for health care products[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2014, **32**(5): 050204. DOI: 10.11889/j.1000-3436.2014.rrj.32.050204.
- 4 王文庆, 张步增, 吴平. 手术单、手术衣和洁净服生物负载水平测定方法介绍[J]. 中国医疗器械杂志, 2014, **38**(2): 138-140.
WANG Wenqing, ZHANG Buzeng, WU Ping. Introduction to method for determination of bio-burden on surgical drapes, gowns and clean air suits[J]. Chinese Journal of Medical Instrumentation, 2014, **38**(2): 138-140.
- 5 刘清芳. 医疗保健产品辐射灭菌初始污染菌检测技术研究[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2008, **26**(1): 57-60.
LIU Qingfang. Research on determination of bio-burden for radiation sterilization of health care products[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2008, **26**(1): 57-60.
- 6 胡金慧. 医疗器械辐射灭菌中无菌质量的责任[J]. 中国医疗器械信息, 2007, **13**(4): 39, 67.
HU Jinhui. Responsibility of medical device sterile quality in radiation sterilization[J]. China Medical Device Information, 2007, **13**(4): 39, 67.
- 7 丛丽红, 朱南康, 滕维芳. γ 辐射灭菌医疗器械初始污染菌的检测、统计与分析[J]. 辐射研究与辐射工艺学报, 2009, **27**(6): 374-376.
CONG Lihong, ZHU Nankang, TENG Weifang. Determination, statistics, and analysis of initially contaminated microorganisms on medical devices treated by γ -radiation sterilization[J]. Journal of Radiation Research and Radiation Processing, 2009, **27**(6): 374-376.
- 8 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Publishing House, 2015.
- 9 国际标准化组织. 医疗保健产品灭菌-微生物学方法-第1部分: 产品上微生物群落的测定: ISO 11737-1: 2018[S]. 瑞士: 国际标准化组织, 2018.
International Organization for Standardization. Sterilization of health care products-microbiological methods-part 1: determination of a population of microorganisms on products: ISO 11737-1: 2018[S]. Switzerland: International Organization for Standardization, 2018.
- 10 工业和信息化部. 医疗器械辐射灭菌 确认辐射灭菌剂量的生物负载数据分析方法: EJ/T 1243-2017[S]. 北京: 核工业标准化研究所, 2017.
Ministry of Industry and Information Technology. Radiation sterilization of medical devices--analysis method on bioburden data for the purpose of validation for sterilization dose: EJ/T 1243-2017[S]. Beijing: Institute for Standardization of Nuclear Industry, 2017.