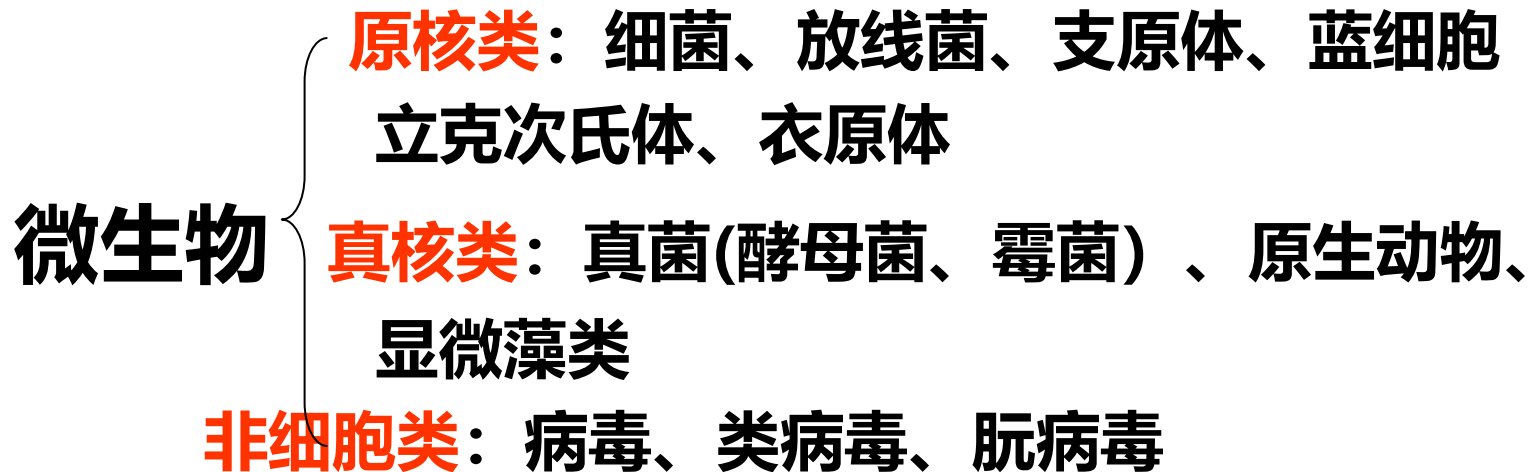


生物负载测定

微生物的定义和分类

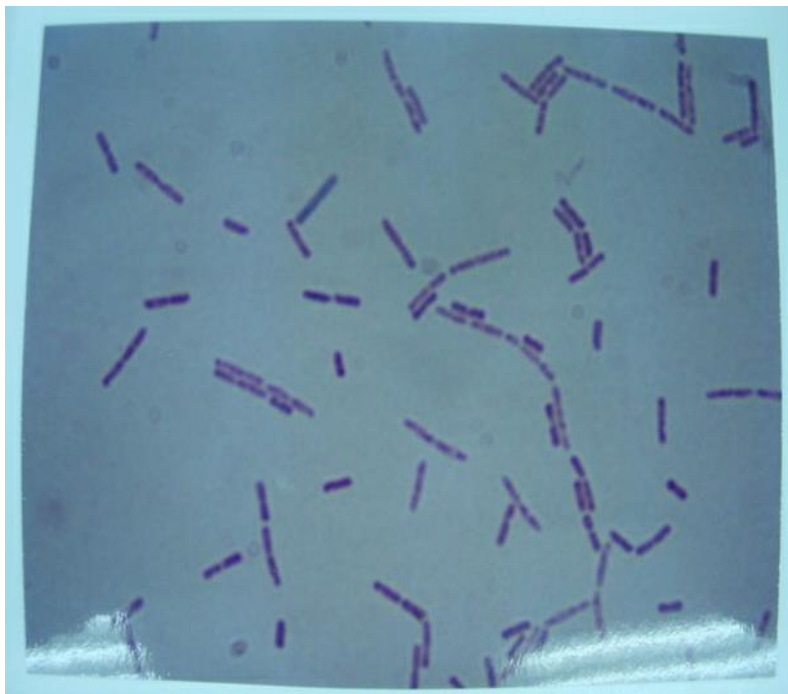
⑩ 定义：

一切肉眼看不见或看不清楚的微小生物的总称。

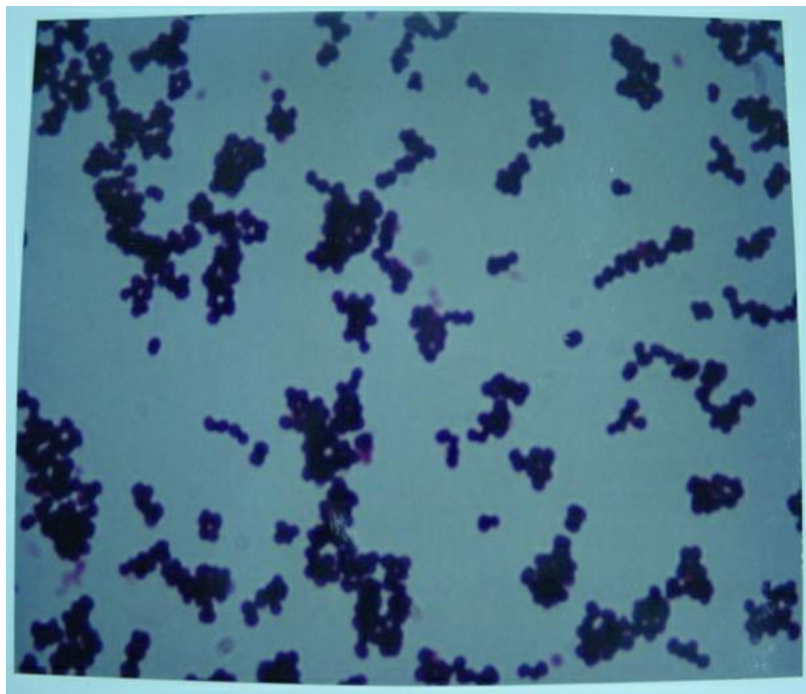


细菌细胞形态显微镜检照片

- 放大1000倍杆菌

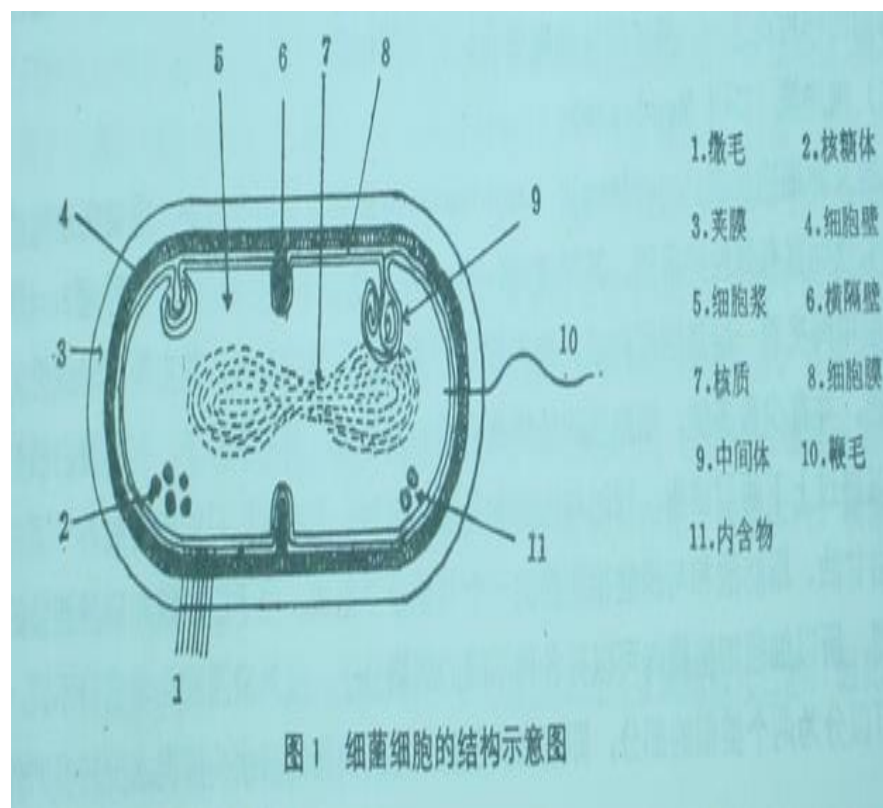


- 放大1000倍球菌

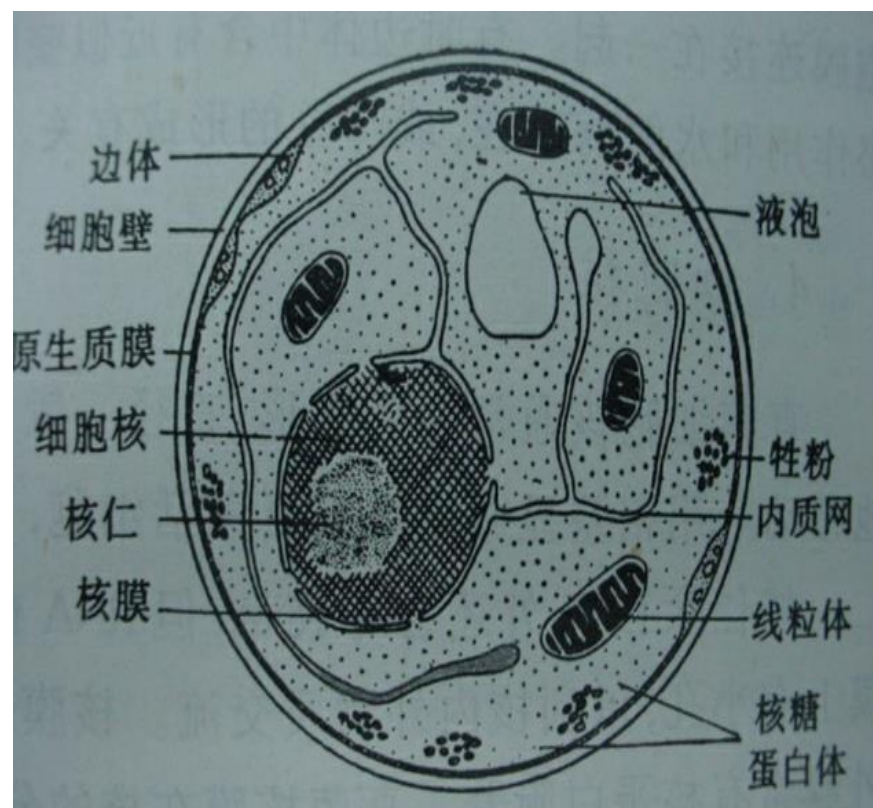


微生物细胞结构示意图

• 细菌细胞结构图



• 真菌细胞结构图



微生物的五大共性

1、体积小，面积大

巨大的营养吸收面、代谢废物的排泄面和环境信息的接受面

2、吸收多，转化快

高速生长的物质基础，活的化工厂。

3、生产旺，繁殖快

大肠埃希菌20min分裂1次，48小时后的重量则达到地球的4000倍。

注：因营养条件的限制，实际不可能发生。

4、适应强，易变异

极端环境的惊人适应能力

5、分布广，种类多

空气、水体、土壤、动植物都有分布，微生物有10多万种。

微生物的存在对医疗器械的影响

- **活的微生物对灭菌影响**

非过度灭菌的工艺因医疗器械上生物负载增加，灭菌难度加大，可能导致灭菌失败。

- **活的微生物对使用者危害**

灭菌不彻底的无菌医疗器械，根据使用方式的不同，可能出现炎症、菌血症等病理反应。

- **微生物尸体对使用者的危害**

典型例子：G-菌细胞壁脂多糖成分(内毒素)通过输液进入人体血液，致使人体发热。

基本概念

- **生物负载的定义**

一件产品和/或无菌屏障上或其中存活的微生物总数。

**※对灭菌来说：生物负载应为无菌屏障内的所有微生物。
因为，灭菌需要杀灭屏障内的所有微生物。**

※对使用来说：生物负载应为产品与人体的接触面，因为屏障通常不与人的自然腔道、血管、肌肉等接触。

※对生产过程控制来说：生物负载应是屏障内所有的微生物，反映过程的控制水平。

基本概念

- **校正因子 correction factor**
用于补偿无法从产品和/或微生物培养中完全采集的数值。
- **培养条件 culture conditions**
促进微生物复苏、生长和/或繁殖所采用的培养基和培养方式。
- **回收率 recovery efficiency**
用一特定技术从产品上采集和/或培养微生物能力的测定值。
- **样品份额 (SIP) sample item portion**
从某一产品单元上取出的用于试验的部分。

产品选择的基本原则

- 选择和处理用于生物负载测定的产品的程序，应能确保所选产品对包括包装材料和过程的常规生产具有代表性。
- 若为**生物负载测定的目的对产品进行分类**，应记录每一分类内包含这一产品的理由。理由应包含所选产品在是整个分类里具有代表性的标准。
- 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。



部分液体产品可能存在支持微生物生长的现象

SIP取样的基本要求

- 如果已验证生物负载在本产品上或内是均匀分布的，则SIP可以是该产品的任何部分。
- 否则，样品应包含能代表所制产品的每种相应材质而随机选取的产品部位。
- 若已知生物负载分布，可以从认为对灭菌工艺最有严峻挑战的产品部分选择SIP。

SIP选择	产品
表面积	植入物（不可吸收）
质量	粉末 手术服 植入物（可吸收）
长度	管路（直径一致）
体积	流体

生物负载的测定

生物负载的微生物鉴定

- 鉴定的意义

通过微生物的鉴定，了解微生物的基本来源，为日常微生物的控制提供依据；灭菌工艺的的适合性提供依据（是否存在耐受特定灭菌因子的芽孢菌的存在）。

- 通常鉴定的方法

※**常规鉴定**：染色特性；细胞形态；菌落；选择性培养的使用；生化特性；

※**分子水平鉴定**：DNA测序后与数据库提供遗传序列比对。

生物负载测定方法的确认

- 若测定方法中包括采集产品上微生物，则对该技术适当性的评价；
 - ※确定回收率,以便得到修正系数；
 - ※液体类的产品非常便捷,通常不需要回收率.
- 对包括培养条件和微生物计数技术在内的微生物计数适当性的评价；
 - ※不是所有的微生物可以通过单一培养基能有效培养出来的。
- 微生物鉴定技术适合性的评价。

常规测定和数据判读

- 确定样品大小和取样频率。
- 测定方法要规定,并形成作业指导书
- 根据生物负载的使用目的确定鉴定的程度,通常鉴定是否存在芽孢
- 生物负载数据用于确定灭菌工艺的处理程度, 则根据具体要求进行应满足灭菌工艺设定、验证和常规控制特定标准中规定的关于生物负载数据使用的切实可行的要求。
- 规定医疗器械上或屏障内的生物负载的可接受限量。中国有GB15980-1995的标准, 但未有明确的国际标准。如果生物负载的信息用于设定灭菌条件, 则限量比较好设定。
- 根据一段时间得到的生物负载测定数据来确定趋势, 进行趋势管理。

生物负载测定方法的维持

- 产品和/或生产过程的改变
通常重新进行回收率的测试或生物负载的测试。
- 生物负载测定方法的改变
应对生物负载测定常规方法的任何变化进行评价。
 - ✘评价测定结果的变化的影响；
 - ✘设 新的回收率。
 - ✘先前进行的确认和回收率是否仍有效。
 - ✘生物负载测定方法的重新确认

重复回收确定回收率

- **重复回收进行回收率确认**

使用自然的产品，初次采集的微生物数值占连续多次采集总数值的比值。

- **方法的理论基础**

生物负载的确认方法应重复进行，直到回收的微生物累计数量没有明显增加。每重复一次后，从产品上或产品部分上洗脱液全部回收并计数。比较连续回收得到的累计结果。

注意：本方法未必精确。产品上回收的微生物数量及实际存在的微生物数量之间的确切关系永远无法验证。

重复回收确定回收率

- 产品要求

本身具有一定的微生物负载水平，如果产品本身负载水平低，则不适合采用该方法，应采用产品人工接种法。

- 重复采集的次数

准确的重复次数通常取决于产品特性，构成生物负载的微生物和初始污染水平等。预试验可用于确定重复的次数。

- 在某些产品上，进行重复处理后有必要确定产品上是否还存在存活微生物。这可以通过以下方法实现：

✘用熔化的回收培养基涂在产品表面上，让培养基变硬，然后使产品在规定的培养条件下进行培养形成的菌落计数。

✘将产品浸于液体回收培养基中，在规定的培养条件下，检查是否生长。浸于液体培养基并培养后，若产品中的一小部分出现存活的微生物，可通过MPN方法来计数结果。但是若全部结果都表明有微生物生长，则不能采用MPN法，应重新考虑确认方法。

重复回收的修正系数

处理	产品数				
	1	2	3	4	5
1	60	50	70	55	45
2	10	12	5	2	3
3	1	0	2	0	0
4	0	1	0	0	1
琼脂覆盖	2	1	2	1	0
总的菌落计数	73	64	79	53	49

第一次处理： 60 50 70 55 45

总数： 73 64 79 58 49

第一次处理的回收率： 82% 78% 89% 95% 92%

第一次处理后的平均回收率： = 87.2 % 范围= 78%~95%

计算中已包括了琼脂覆盖得到的菌落数。某些医疗器械可能会无法应用琼脂覆盖。

**运用首次处理后平均回收率，
回收效率的修正系数可为：**

$$\frac{100}{87.2} = 1.15$$

**有些应用中可使用平均回收率范围的最低值，以反应出最坏情况。
这一决定将会影响数据的使用。**

产品接种法确定回收率

- **产品接种法确定回收率**

产品上人工接种微生物后，初次采集的微生物数量占 接种到产品上的微生物的比值。可为每一产品计算百分率，并用其确立回收率。

- **产品的要求**

产品首先应进行适合的灭菌，并确保可能对微生物有抑制的灭菌介质的有效去除。

如用EO灭菌时，则应验证残留水平是否存在对微生物的抑制作用。

产品接种法确定回收率

- 接种的微生物

最常用 需氧菌芽孢接种，因为使用细菌繁殖体时，常因干燥失去活性，所以通常不使用繁殖体。

芽孢悬液分布在产品上，应包括最难洗脱的部位。

但应注意为了刻意追求WORST CASE，将芽孢全部接种在最难的位置，导致回收率过低的异常。

接种法的修正系数

- 制备悬液稀释液，每0.1mL中含有100个芽孢。向器械所选部分接种0.1mL该稀释悬液，并在单项流状态下干燥。
- 注意接种体积，体积过大不易干燥；体积过小，则分布不均匀。
- 使经接种的产品经受得住所选采集技术，采集的平均芽孢数是35，其范围为25~45之间。
- 回收率的修正系数如下：
$$\frac{100}{35} = 2.9$$

微生物采集技术和设备

- 袋蠕动

将试验样品和一已知体积的洗脱液装在一个无菌胃型袋中。开动往复式搅棒，使洗脱液贯穿试验样品内外。

应规定处理时间。

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）。

若使用了较大大量的洗脱液，可能会生成含有低浓度微生物的悬浮液。可使用膜过滤法滤掉洗脱液。

微生物采集技术和设备

- 超声波洗脱

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进行处理。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。根据要求应验证超声法。

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治疗的试验样品数量，以便阻断超声处理源。

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。

超声处理能量和超声处理持续时间不应太强或太长，以免破坏微生物并导致死亡，或是使洗脱液过热。

微生物采集技术和设备

- 振摇（机械或手工方式）

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）进行振摇。也可用手工振摇，但其效力会因操作人员而异。

应规定振摇时间和频率。

可以加入一定大小的玻璃微珠增加表面磨损以及由此提高回收效率。加入的玻璃微珠的大小以及振摇时间和频率不能导致过热和/或对微生物造成可能的破坏。

增加玻璃微珠将增加微生物可附着的表面积。

微生物采集技术和设备

- 涡旋混合

将试验样品浸入装有已知体积洗脱液的密闭容器内，该容器压在放置在旋涡混合器的旋转垫以形成涡旋。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洗脱产生差异。

应规定所用容器、混合时间以及设定的混合器的速度。

该方法操作简单快捷，但仅适用于小的试验样品。

- 冲洗

让洗脱液通过试验样品的内腔。可以靠重力或泵来使液体流动。另外也可将洗脱液充入产品中，夹住并抖动。

应规定器械与洗脱液的接触时间、冲洗速度及液体体积。

器械结构及腔体尺寸会限制从内表面完全移除微生物所必须的冲力。

微生物采集技术和设备

- 搅切（碎裂）

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搅切或振摇试验样品的时间。

根据试验样品和搅切器来规定搅切时间，但不应超过会导致洗脱液过热和对微生物造成破坏。

该技术提供了将试验样品分成足够小的部分的方法，以便通过接种平板培养技术对微生物进行计数。

- 擦拭

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。

通常使用的方法是用洗脱液湿润棉拭子，并用棉拭子擦拭界定好的试验样品的表面。在有些情况下，可以先润湿表面，然后用干棉拭子擦拭，这样可提高回收效率。然后将棉拭子转放至洗脱液中，并搅动从棉拭子上洗脱微生物。另外，若使用的是可溶性棉拭，拭子会溶解到稀释液中。

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的方法。该方法也可用于大面积区域的取样。

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。有些微生物会被棉拭子本身吸附，以致于被检测不到。

棉拭子中不应含有灭菌剂或抑菌剂。

洗脱液体

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		稀释含水样品; 计数前制备可溶材料的等渗压溶液;
⚠ 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。		

微生物采集技术和设备

- 接触板

接触板或玻璃片可用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。

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。

表面上自然集聚的细胞群、菌落在琼脂表面散布、琼脂干燥、可能存在厌氧菌等都是潜在的不利因素。

由于该方法的回收率通常较低，所以只有在其它方法不适用的情况下才使用。接触板和玻璃片通常只适用于平的或规则的表面。

- 琼脂覆盖

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（最高温度在45°C），培养至产生可见菌落。

表面上自然集聚的细胞群、菌落在琼脂表面散布、琼脂干燥、可能存在厌氧菌等都是潜在的不利因素。

微生物采集技术和设备

- 最大可能数（MPN法）
- MPN法是一种沿用已久并有充分文献根据，用于估算在产品内随机分布的存活微生物数量的方法。它主要用于食品和水产品等行业（与液体、粉末和半固体的产品或者原材料一起使用）。这种方法尤其适用于生物负载平均数低的产品。
- 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），然后通过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。当具有足量的洗脱液，可将其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。用表现出生长的稀释度，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（DeMan_[18]），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。
- 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，对于液体用的医疗器械、黏性液体、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。但是，这种方法并不普遍适用于在固体医疗器械上的生物负载测定。典型的情况是，在这些器械上构成低平均值生物负载的若干微生物的分布通常是随机的，一个总数的微生物总是有高比例的不可检测的有机物和少量的带“峰值”的微生物（实质构成平均值生物负载）。在MPN的应用中，“峰值”将会被简单地记录为一个正值，因而，只以公式化的方式构成此平均值，而不是用数字表示。这可能导致对生物负载估计过低，而得出一个不符合要求的结果。
- 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。

微生物采集技术和设备

- 膜过滤法
- 洗脱液过滤后，将滤器放到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 0.45μ 的过滤器适于采集微生物。
- 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。
- 膜过滤法更适用于微生物浓度较低的悬液。

微生物采集技术和设备

- 平板倾注

使用平板倾注技术，将一定量的悬浮液在在约45°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。

- 平板涂抹

平板涂抹技术是用涂抹器将一定量悬液涂在固体培养基表面。

- 螺旋涂板

螺旋涂板技术运用自动装置将一定量微生物悬液涂在固体培养基表面上。悬液涂抹是以递减的速度从培养板中心以螺旋线轨迹向周边运动。经过培养后，对全板或部分板，运用专用的计数栅和计数技术来统计原始悬液中的存活微生物数量。

微生物采集技术和设备

- 检测微生物的其它方法

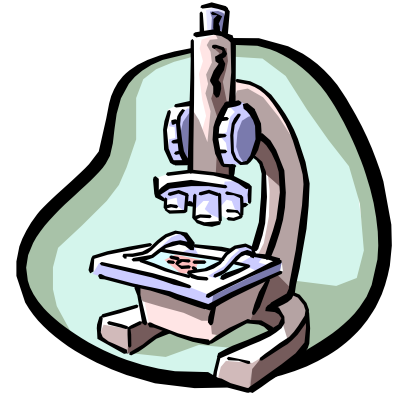
估计生物负载时还可使用菌落计算以外的其他方法。这包括测定新陈代谢物的活性（例如：新陈代谢物测定或落射表面荧光）。这些方法称为“间接法”，为了建立起与以往确定的存活微生物数量的关系，它们必须对照菌落计数进行校准。这些技术的一个主要限制就是需要相对较高的微生物数悬浮在样品洗脱液中。一般来说，所检测到的微生物数量的下限超过100 CFU。

微生物鉴定 (一)

微生物鉴定的方式和意义

- **方式**

形态鉴定、培养及生理特征、生化特征、
核酸特征鉴定
数值鉴定和自动鉴定



- **意义**

从鉴别污染微生物可了解洁净室清洁，消毒步骤的效性，特别是对消毒剤有效性评估有所帮助。微生物鉴别的结果也对调查污染的来源有参考价值。

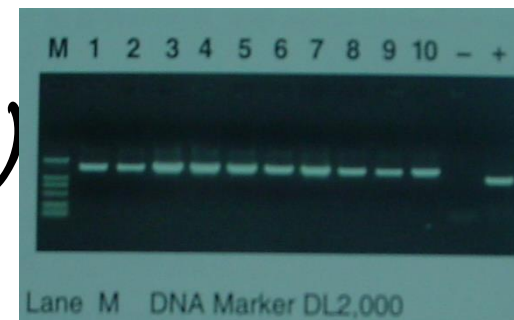
常用的微生物操作技术

- 接种：将含有或可能含有微生物的样品或培养物，种入培养基的技术方法。
- 斜面培养基接种法、半固体培养基接种法、液体培养基接种法、平板培养基接种法。
- 分离：使用一定的分离技术，将混杂存在的微生物尽可能在培养基中分开并且生长，从而获得单一的一种菌株的方法。
- 划线分离法、涂布分离法、倾注分离法
- 培养：通常接种后的培养基都要在适宜的环境中条件下进行培养。主要是温度、湿度、培养时间，特别是氧气和二氧化碳的需求。
- 需氧培养法、厌氧培养法、微需氧培养法、二氧化碳培养法

常用的微生物操作技术

- 染色：
- 原因：微生物细胞含水量一般为80%~90%，菌细胞对光的吸收和反射与水溶液相近，在光学显微镜下，菌体透明，与背景几乎无差别，故常借助染色使菌体吸着染料产生与背景较明显的差别。
- 常用细菌染色法
- 单染色法：仅使用一种染料，只能观察形态和排列
- 复染色法：革兰染色法，可将全部细菌分成2类，革兰阳性菌、革兰阴性菌。
- 芽孢染色法：很有用的一种染色法，因为芽孢对灭菌的压力比较大，存在灭菌失败的风险—特别是根据生物负载设定灭菌参数的方法。
- 鞭毛染色法

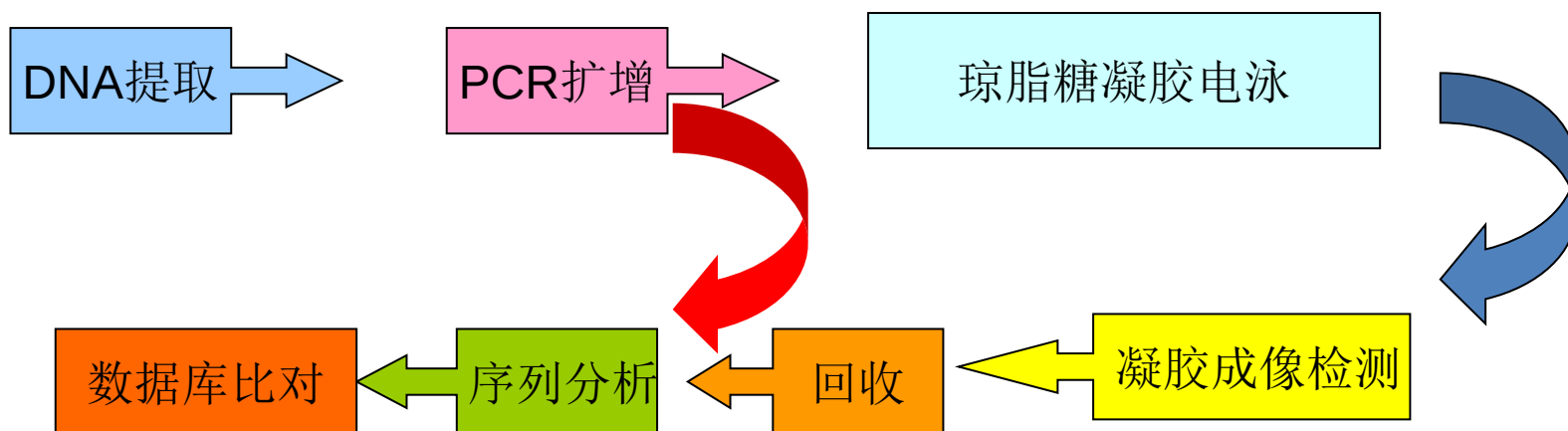
微生物鉴定 (二)



核酸特征鉴定之一

- 16SrRNA序列分析

基本步骤:



微生物鉴定 (三)

16SrRNA序列分析的注意事项

- 引物的选择
- PCR条件的设定



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTER OF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTER OF MEDICAL
DEVICE