

国际的

标准

国际标准化组织

11737-1

第三版

2018-01

保健产品灭菌微生物学方法

第 1 部分:

产品上微生物群的测定

卫生产品标准化——微生物学方法——第 1 部分:产品微生物种群终结

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

参考号:国际标准化组织 11737-1:2018(英)

ISO 2018

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

版权保护文件

ISO 2018

保留所有权利。除非另有规定，或在其实施工过程中有所要求，否则未经事先书面许可，不得以任何形式或通过任何电子或机械手段复制或使本出版物的任何部分，包括影印或在互联网或内部网上发布。可以向以下地址的国际标准化组织或申请人所在国家的国际标准化组织成员机构申请许可。

国际标准化组织版权办公室

CP 401 Ch. 德布兰登特 8 CH-1214 游标, 日内瓦, 瑞士电话。+41 22 749 01 11 传真+41 22 749 09
47 copyright@iso.org www.iso.org

在瑞士出版

二

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

内容

页

序.....四

介
绍.....视觉识别系统

1

范
围.....1

2

规范性参考文
献.....1

3 个术语

和定
义.....1

4

一般要
求.....4 4.1 文
件.....4 4.2 管理责
任.....5 4.3 产品实
现.....5 4.4 测量、分析和改
进.....5

5

产品选择.....	
.....5.1 概述.....	5.1
.....5.2 样品项目部分.....	5.2
.....6 生物负荷的测定方法和微生物特征.....	6
.....6.1 生物负荷的测定.....	6.1
.....6.1.1 选择合适的方法.....	6.1.1
.....6.1.2 抑制物质的中和.....	6.1.2
.....6.1.3 微生物的去除.....	6.1.3
.....6.1.4 微生物的培养.....	6.1.4
.....6.1.5 微生物的计数.....	6.1.5
6.2 生物负荷的微生物特征.....	6.2
6	
7	
生物负荷测定方法的验证.....	7.1
概述.....	7.1
.....8.7.2 验证.....	8.7.2
.....8	8
8	
生物负荷的常规测定和数据解释.....	8.1
概述.....	8.1
.....8.2 检测和板计数的极限.....	8.2
.....8.3 微生物特征.....	8.3
.....8.4 治疗范围的生物负荷数.....	8.4
据.....	8.5
生物负荷峰值.....	8.5
.....9.8.6 生物负荷水平.....	9.8.6
.....9.8.7 数据分析.....	9.8.7
.....9.8.8 统计方.....	9.8.8

法.....9

9

生物负荷测定方法的维护.....9 9.1
产品和/或制造过程的变更.....9 9.2 生物负
荷测定方法的变更.....9 9.3 生物负
荷测定方法的重新认证.....9

附件一(信息)微生物群测定指南

关于产
品.....

.....10

附件 B(信息)确定生物负荷方法指南.....27

附件三(信息)生物负荷回收效率的验证.....37

附件 D(信息性)典型责任分配.....45

文献

学.....47

三

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

序

国际标准化组织是国家标准机构(国际标准化组织成员机构)的世界性联合会。编制国际标准的工作通常通过国际标准化组织技术委员会进行。每一个对一个已设立技术委员会的主题感兴趣的成员机构都有权在该委员会中有代表。国际组织，政府和非政府组织，与国际标准化组织联络，也参与这项工作。国际标准化组织与国际电工委员会在所有电工标准化问题上密切合作。

国际标准化组织/国际电工委员会指令第 1 部分描述了用于编制本文件的程序以及用于进一步维护的程序。尤其应注意不同类型的国际标准化组织文件所需的不同批准标准。本文件是根据国际标准化组织/国际电工委员会指令第二部分的编辑规则起草的。

提请注意本文件的某些内容可能是专利权的主题。国际标准化组织不负责识别任何或所有此类专利权。在文件编制过程中确定的任何专利权的细节将在导言和/或收到的国际标准化组织专利声明清单中(见 www.iso.org/patents)。

本文件中使用的任何商品名称都是为了方便用户而提供的信息，并不构成背书。

有关标准自愿性质的解释、与合格评定相关的国际标准化组织特定术语和表达的含义，以及国际标准化组织在《技术性贸易壁垒》中遵守世界贸易组织(世贸组织)原则的信息，请参见以下网址：www.iso.org/iso/foreword.html。

本文件由国际标准化组织/技术合作委员会 198《保健产品灭菌》编写。

第三版取消并取代了第二版(国际标准化组织 11737-1:2006)，后者已经过技术修订。它还纳入了技术勘误表 ISO 11737-1:2006/Cor.1:2007。

与前一版本相比，主要变化如下：

“生物负荷峰值”一词是作为生物负荷的正常和一致的一部分引入的，并提供了数据的例子；

—补充说明包装测试通常不会进行，除非它是产品的一个组成部分；

提供了关于最可能数(MPN)技术及其应用的更多信息；

提供了提高检测限和正确使用数据的方法细节；

—删除了一些关于评估生物负荷数据的统计方法的讨论，因为这些数据不典型或不需信息；

—增加了一个表，其中包含选择生物负荷回收效率方法的标准，解释了校正系数的使用，并消除了技术改造中提到的< 50 %的生物负荷回收效率值；

—提供了有关生物负荷法适用性试验的应用和性能的更多信息；

—在直接计数、估计计数和超出理想范围的计数的详细规则中增加了一节；

—增加了一个表格，以澄清制造商或实验室的典型职责；

四

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

—对基于风险的方法的关注有所增加，包括生物负荷数据的使用目的。

在国际标准化组织网站上可以找到国际标准化组织 11737 系列中所有零件的清单。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

v

介绍

无菌保健产品是指不含活微生物的产品。规定灭菌过程验证和常规控制要求的国际标准要求，当需要提供无菌保健产品时，灭菌前保健产品的偶然微生物污染应降至最低。这种产品是非无菌的。灭菌的目的是灭活微生物污染物，从而将非无菌产品转化为无菌产品。

用于消毒保健产品的物理和/或化学试剂灭活纯微生物培养物的动力学通常可以用存活微生物的数量和用消毒剂处理的程度之间的指数关系来最好地描述。不可避免的是，这意味着无论应用何种程度的治疗，微生物存活的可能性总是有限的。对于给定的治疗，存活的概率由微生物的数量和抗性以及治疗期间微生物存在的环境决定。因此，在进行灭菌处理的群体中，任何一种产品的无菌性都不能得到保证，而被处理群体的无菌性是根据产品上存在活微生物的概率来定义的。

ISO 9001 给出了设计和开发、生产、安装和服务质量管理体系的一般要求，ISO 13485 给出了医疗器械生产质量管理体系的特殊要求。质量管理体系标准认识到，对于制造过程中使用的某些工艺，该工艺的有效性不能通过产品的后续检验和测试来完全验证。灭菌就是这种过程的一个例子。因此，灭菌过程要经过使用验证，灭菌过程的性能要定期监控，设备要得到维护。

已经制定了国际标准，规定了用于保健产品灭菌过程的验证和常规控制程序(例如，见国际标准化组织 14937、国际标准化组织 11135、国际标准化组织 11137 系列、国际标准化组织 17665 系列和国际标准化组织 14160)。然而，重要的是要意识到，暴露在经过适当验证和精确控制的灭菌过程中，并不是保证产品无菌并适合其预期用途的唯一因素。此外，对于灭菌过程的有效验证和常规控制，重要的是要意识到该过程中在微生物数量、特性和性质方面存在的微生物挑战。

术语“生物负荷”用于描述存在于产品和/或无菌屏障系统上或之中的活微生物群体。生物负荷知识可用于以下几种情况：

- 灭菌过程的验证和重新鉴定；
- 生产过程控制的常规监控；
- 原材料、部件或包装的监控；
- 评估清洁过程的效率；
- 一项全面的环境监测方案。

生物负荷是来自多种来源的微生物贡献的总和，包括原材料、部件制造、装配过程、制造环境、装配/制造辅助设备(例如压缩气体、水、润滑剂)、清洁过程和成品包装。为了控制生物负荷，应该注意这些来源的微生物状况。

不可能精确地列举生物负荷，实际上，生物负荷的确定是使用一种确定的方法。由于医疗保健产品的设计和构造材料多种多样，因此在所有情况下确定生物负荷的单一方法是不可行的。也不可能定义在所有情况下用于移除

视觉识别系统

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

准备计数的微生物。此外，用于微生物计数的培养条件的选择将受到可能存在于保健产品上或保健产品中的微生物类型的影响。

本文件规定了测定生物负荷需要满足的要求。此外，它在附件中提供指导，以提供被认为适合符合要求的解释和方法。可以使用指南中给出的方法以外的方法，如果这些方法能有效地达到本文件的要求。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

七

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

国际标准 ISO 11737-1:2018(英)

保健产品灭菌微生物学方法

第 1 部分:

产品上微生物群的测定

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

1 范围

本文件规定了要求，并就保健产品、组件、原材料或包装上或包装内的活微生物群体的计数和微生物特性提供了指导。

微生物特征的性质和程度取决于生物负荷数据的预期用途。

注 1

有关第 1 至 9 条的指引，请参阅附件甲。

注 2

本文件不适用于病毒、朊病毒或原生动物污染物的计数或鉴定。这包括去除和检测海绵状脑病的病原体，如羊瘙痒病、牛海绵状脑病和克罗伊茨费尔特-雅各布病。

在国际标准化组织 22442-3、ICH Q5A(R1)和国际标准化组织 13022 中可以找到灭活病毒和朊病毒的指南。

注 3

本文件不适用于保健产品生产环境的微生物监测。

2 个规范性参考

以下文件在文本中的引用方式使得其部分或全部内容构成本文件的要求。对于注明日期的参考文献，仅引用的版本适用。对于未注明日期的参考文件，适用参考文件的最新版本(包括任何修订)。

国际标准化组织 10012 《测量管理系统——测量过程和测量设备的要求》

国际标准化组织 13485，医疗设备质量管理体系法规要求

国际标准化组织 15189，医学实验室——质量和能力要求

国际标准化组织/国际电工委员会 17025，测试和校准实验室能力的一般要求

3 术语和定义

就本文件而言，适用以下术语和定义。

国际标准化组织和国际电工委员会在以下地址维护用于标准化的术语数据库：

——国际电工委员会电子媒体：在 <http://www.electropedia.org/>提供

——国际标准化组织在线浏览平台：<http://www.iso.org/obp> 提供

1

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

3.1

一批

在规定的生产周期内生产的、旨在或声称在特性和质量上一致的规定数量的产品(3.16)

资料来源：国际标准化组织 11139：—1)，3.21]

3.2

生物负担

产品(3.16)和/或无菌屏障系统(3.22)上或其中的活微生物种群

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.23]

3.3

生物负荷校正因子

应用于活计数的数值,以补偿产品(3.16)中微生物的不完全去除和/或微生物培养失败

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.24]

3.4

生物负荷估计

通过对生物负荷(3.2)计数应用生物负荷校正因子(3.3)建立的值(3.10)

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.25]

3.5

生物负荷法适用性

评估测试方法以证明其允许微生物生长的能力

[资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.168, 修改——“生物负担”已被添加到该术语中。]

3.6

生物负荷峰值

个体生物负荷(3.2)值明显大于集合中的其他生物负荷值

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.26]

3.7

修正

消除发现的不合格的措施

条目注释 1:可以结合纠正措施进行纠正(3.8)。

[资料来源:国际标准化组织 9000:2015, 3.12.3, 已修改-条目注释 1 已被修改, 条目注释 2 已被删除。]

3.8

校正动作

消除不合格原因并防止再次发生的情况行动

条目注释 1:不合格的原因可能不止一个。

条目注释 2:采取纠正措施防止复发, 而采取预防措施(3.15)防止发生。

条目注释 3:纠正(3.7)和纠正措施是有区别的。

[资料来源:国际标准化组织 9000:2015, 3.12.2, 修改后——“情况”已被添加到定义中, 条目注释 3 已被替换。]

1)正在准备中。出版时的阶段:国际标准化组织/DIS 11139:2017。

2

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

3.9

文化条件

用于促进微生物萌发、生长和/或繁殖的生长培养基和培养方式的组合

条目注释 1:培养方式可以包括温度、时间和任何其他指定的培养条件。

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.71]

3.10

建立

通过理论评估确定并通过实验证实

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.107]

3.11

兼性微生物

能够有氧和无氧代谢微生物

[资料来源:国际标准化组织 11139:—, 3.114]

3.12

保健产品

医疗设备，包括体外诊断医疗设备，或医疗产品(3.16)，包括生物制药

[资料来源:国际标准化组织 11139:—， 3.132]

3.13

微生物特征

微生物分类的过程

条目注释 1:类别可以广泛地基于，例如，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。

[资料来源:国际标准化组织 11139:—， 3.170]

3.14

专性厌氧微生物

在没有分子氧的情况下生存和生长的有机体

资料来源:国际标准化组织 11139:——， 3.186]

3.15

预防性措施

消除潜在不合格或其他潜在不良情况原因的行动

条目注释 1:潜在不合格可能有多个原因。

条目注释 2:采取预防措施防止事故发生，而采取纠正措施(3.8)防止事故再次发生。

资料来源:国际标准化组织 9000:2015， 3.12.1]

3.16

结果

过程的有形结果

原材料、中间体、子组件、保健产品(3.12)。

例子

资料来源:国际标准化组织 11139:——， 3.219]

3

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

3.17

回收效率

测量特定技术从产品中去除、收集和/或培养微生物的能力(3.16)

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.228]

3.18

重新认证

重复部分或全部验证(3.23), 目的是确认特定工艺的持续可接受性

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.235]

3.19

样本项目部分

被测试的保健产品(3.12)的定义部分

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.244]

3.20

指定

在批准的文件中详细规定

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.263]

3.21

贫瘠的

不含活微生物

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.275]

3.22

无菌屏障系统

最小化微生物侵入风险并允许无菌(3.21)产品(3.16)在使用时无菌展示的最小包装

资料来源:国际标准化组织 11139:——, 3.276]

3.23

确认

通过提供客观证据确认特定预期用途或应用的要求已经满足的过程

条目注释 1:验证所需的客观证据是测试或其他形式确定的结果, 如执行替代计算或审查文件。

条目注释 2:“已验证”一词用于表示相应的状态。

条目注释 3:验证的使用条件可以是真实的, 也可以是模拟的。

[资料来源:国际标准化组织 9000:2015, 3.8.13, 修改后——“过程”已被添加到定义中。]

4 一般要求

4.1 文件

4.1.1 应规定确定生物负荷的程序。

4

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

4.1.2 本文件要求的文件和记录应由指定人员审查和批准(见 4.2.1)。文件和记录应根据国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025 进行控制。

4.1.3 保留的记录应包括所有原始观察、计算、衍生数据和最终报告。记录应包括参与取样、准备和测试的所有人员的身份。

4.1.4 计算和数据传输应接受适当的检查。

4.2 管理责任

4.2.1 应规定实施和执行本文件中描述的程序的责任和权限。应根据国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025 将责任分配给有能力的人员。

4.2.2 如果本文件的要求由具有独立质量管理体系的组织承担, 则应规定各方的责任和权限。

更多信息见附件 D。

注意

4.2.3 正确执行规定测试和测量所需的所有设备项目都应可用。

4.3 产品实现

4.3.1 应规定采购程序。这些程序应符合国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025。

4.3.2 应规定符合国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189、国际标准化组织/国际电工委员会 17025 或国际标准化组织 10012 的文件系统，用于校准所有设备，包括满足本文件要求的测试仪器。

4.3.3 应规定用于确定生物负荷的材料的制备和灭菌方法，包括适当的质量测试。

4.4 测量、分析和改进

4.4.1 就生物负荷测试方法和结果而言，测量不确定度、精度和偏差通常不适用，因此这种类型的数据分析可能没有必要，除非是在评估实验室的整体能力时。

4.4.2 对于不合格品的控制，应规定不合格结果的调查和纠正、纠正措施和预防措施的程序。这些程序应符合国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025。

5 产品选择

5.1 概述

5.1.1 用于确定生物负荷的产品选择和处理程序应确保所选产品代表常规生产，包括包装材料和工艺。

5

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

5.1.2 如果为了确定生物负荷而将产品归入一个产品系列，应记录将产品归入一个产品系列的理由。基本原理应包括确保从产品系列中选择的产品所确定的生物负荷代表整个产品系列的标准。

5.1.3 应考虑确定与制造相关的生物负荷的时间，因为生物负荷会随着时间的推移而变化。

5.2 样品项目部分

5.2.1 整个产品(SIP = 1, 0)或部分产品(SIP < 1, 0)可用于确定生物负荷。

5.2.2 如果使用小于 1.0 的 SIP，则其尺寸应足以充分代表整个产品的生物负荷。如 5.2.3 至 5.2.5 所述，所选部分的确定应基于生物负荷是否均匀分布。

5.2.3 当生物负荷分布已知时，适用以下条件：

a) 如果生物负荷均匀分布在物品上和/或物品中，则可以从物品的任何部分中选择 SIP

如果生物负荷分布不均匀，SIP 应包括

1) 按比例代表制造产品的每种材料的产品部分，或

2) 产品中对灭菌过程具有最严重微生物挑战(数量和/或类型)的部分。

当选择包含最严重微生物挑战的部分时，应建立测试的 SIP 的生物负荷与整个产品生物负荷的关系。

5.2.4 如果生物负荷分布未知，则 SIP 应包括所选产品的部分，这些部分按比例代表制造产品的每种材料。

5.2.5 可根据尺寸特征(如长度、质量、体积或表面积)来计算吸入口(见表 a1 示例)。

注：一些规定灭菌过程验证和常规控制要求的标准规定了 SIP 充分性的标准，如国际标准化组织 11137 系列。

6 生物负荷的测定方法和微生物特征

6.1 生物负荷的测定

6.1.1 选择合适的方法

该方法应适合数据的使用目的。该方法应包括以下技术：

a) 如果需要，中和抑制物质；

b) 如果合适，去除微生物；

c) 微生物的培养；

6

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

d) 微生物计数。

6.1.2 抑制物质的中和

如果产品的物理或化学性质使得物质会被释放，从而对产品生物负荷的检测产生不利影响，那么应使用一个系统来中和、去除或(如果不可能的话)最小化任何此类释放物质的影响。应证明该系统的有效性。

见附件 B 描述了可用于评估杀微生物或微生物静态物质释放的技术。

6.1.3 微生物的去除

6.1.3.1 对于已确定的产品，其中去除活微生物是该方法的一部分，应考虑去除的效率，并记录该考虑的结果(见 4.1.3)。至少应考虑以下因素：

- a) 该技术去除微生物的能力；
- b) 微生物的可能类型及其在产品上的位置；
- c) 去除技术对微生物生存能力的影响；
- d) 被测产品的物理或化学性质。

6.1.3.2 对于已鉴定的产品，如果去除活微生物不是该方法的一部分(例如，产品的直接培养)，应考虑微生物计数的效率，并记录该考虑的结果(见 4.1.3)。至少应考虑以下因素：

- a) 微生物的可能类型及其在产品上的位置；
- b) 被测产品的物理或化学性质。

6.1.4 微生物的培养

应在考虑可能存在的微生物类型和待测试产品的物理或化学性质后选择培养条件。应记录这一考虑的结果和做出决定的理由(见 4.1.3)。

6.1.5 微生物的计数

计数技术应在考虑可能存在的微生物类型后选择。应记录这一考虑的结果和做出决定的理由(见 4.1.3)。

6.2 生物负荷的微生物特征

6.2.1 应选择适当的生物负荷微生物表征技术。

注意微生物特性对于检测产品生物负荷的变化是必要的，这种变化可能影响生物负荷数据的某些方面的使用(例如，建立灭菌过程)。此外，了解微生物的类型有助于确定污染源。

6.2.2 生物负载应使用以下一种或多种技术进行表征：

- a) 菌落形态；

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

- b)细胞形态学;
- c)差异染色;
- 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, 例如基于模式或指纹的技术或基于序列的技术;
- g)蛋白质组学方法, 例如质谱。

7 生物负荷测定方法的验证

7.1 概述

应验证并记录确定生物负荷的方法。

关于验证和经典微生物学方法的使用, 请参见 A.7.1。

注意

7.2 验证

验证应包括以下内容:

- a)评估试验方法的适用性, 以证明试验中没有抑制生长;

注 1:如果使用接种的产品, 生物负荷恢复效率测试的数据可以支持没有生长抑制。

- b)评估从产品中去除微生物的技术是否充分, 如果

如果适合生成数据的目的, 移除是该方法的一部分(即生物负荷回收效率);

注 2 附件 C 提供了关于生物负荷回收效率验证的信息。

- c)评估微生物计数技术的充分性, 包括培养条件和微生物计数技术;

- d)评估微生物表征技术的适用性。

8 生物负荷的常规测定和数据解释

8.1 概述

生物负荷的常规测定应通过采用规定样本大小和取样频率的记录取样计划来进行。

8.2 检测和板计数的限制

生物负荷的测定应使用为产品或产品系列规定的方法进行(见 5.1.2)。所选择的方法应考虑影响结果的因素，如检测极限和平板计数。

8.3 微生物特征

生物负荷的微生物表征应在一定程度上取决于生物负荷测定数据的用途(见 6.2)。

8

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

8.4 治疗范围的生物负荷数据

如果生物负荷数据用于确定灭菌过程的处理程度(即基于生物负荷的方法)，应满足灭菌过程开发、验证和常规控制的适当标准中规定的适用于使用生物负荷数据的任何要求。

8.5 生物负荷峰值

如果生物负荷数据显示的测试结果明显大于其他值(生物负荷峰值)，则应根据数据的用途对这些数据进行适当的影响评估。

8.6 生物负荷水平

应规定产品或产品组上或其中生物负荷的可接受水平。如果超过这些水平，应采取措施(见 4.4.2)。必要时，应审查和修订可接受的水平。

8.7 数据分析

从一段时间内获得的生物负荷测定得出的数据应用于确定趋势。

8.8 统计方法

如果使用统计方法来定义样本大小、采样频率和/或可接受水平，则应符合国际标准化组织 13485。

9 生物负荷测定方法的维护

9.1 产品和/或制造过程的变更

应审查产品和/或制造工艺的变化，以确定它们是否可能改变生物负荷，同时考虑到生物负荷数据的使用目的。应记录审查结果(见 4.1.2)。如果有可能改变生物负荷，应进行特定的生物负荷测定，以评估任何变化影响的程度和性质。

9.2 生物负荷测定方法的变更

应对生物负荷测定常规方法的任何变化进行评估。该评估应包括对变更对测定结果的影响的评估。应记录评估结果(见 4.1.3)。

注:对变化的评估表明，以前的验证和生物负荷回收效率仍然适用。

9.3 生物负荷测定方法的重新鉴定

原始验证数据(见 7.2)和任何后续的再验证数据应按照文件程序在规定的的时间间隔进行审查。应记录审查结果和进行的任何重新认证(见 4.1.3)。

9

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

附件一

(信息性)

产品微生物群测定指南

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

注意

文件。

为便于参考，本附件中的编号与本文件主体中使用的编号一致

A.1 与范围相关

本附件给出了本文件中规定要求的实施指南。给出的指导并不是详尽无遗的，而是强调应该注意的重要方面。

可以使用本附件中给出的方法以外的方法，但这些替代方法应被证明能有效达到本文件的要求。

本附件不是评估符合本文件要求的检查表。

A.2 与规范性参考文献相关

没有提供指导。

A.3 与术语和定义相关

没有提供指导。

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。然而,质量管理体系中用于待灭菌保健产品验证和监控的控制生物负荷测定所必需的最低要素在文本中的适当位置被规范引用(特别参见第 4 条)。请注意控制保健产品生产或再加工所有阶段的质量管理体系标准(见国际标准化组织 13485)。

A.4.1 文件

在国际标准化组织 13485 中,文件部分的要求涉及文件(包括规范和程序)和记录的生成和控制。

计算机可用于实验室直接和间接收集、处理和/或存储数据。用于此类应用的硬件和软件都应受到控制。

使用中的计算机系统应在硬件和软件两方面进行识别,这些方面的任何变化都应记录在案,并得到适当的批准。

如果通过电子数据处理技术进行计算,软件(如电子表格计算)应在使用前进行验证,并应保留验证记录。

10

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

对于软件,应该有描述以下内容的文档:

- a)运行在计算机系统上的应用软件;
- b)操作软件;
- c)正在使用的数据包。

所有软件在投入使用前都应经过验证。

如果计算机软件是内部开发的,应开发适当的程序以确保以下内容:

- 保留开发文档,包括源代码;
- 保留验收测试记录;
- 记录对程序的修改;
- 设备的变化在投入使用前进行记录和正式测试。

这些控制也应适用于任何商业软件包的修改或定制。

应该有程序来检测或防止对软件程序的未授权更改。

组织、制表和/或使数据服从统计或其他数学程序的软件程序，或以其他方式处理或分析电子存储数据的软件程序，应允许检索原始数据条目。可能需要归档计算机数据的特殊程序，这些程序应记录在案。

文件和记录的控制要求在国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025 中有规定。

技术记录的要求在国际标准化组织/国际电工委员会 17025 中有规定。

关于计算机软件质量管理体系的应用指南，请参见国际标准化组织/国际电工委员会 90003。

A.4.2 管理责任

在国际标准化组织 13485 中，管理责任部分的要求涉及管理承诺、客户焦点、质量政策、规划、责任、权限、沟通和管理评审。

从进行生物负荷测定中获得的数据应该是可靠的。在受控条件下进行测定很重要。因此，用于测定的实验室设施，无论是在保健产品制造商的现场还是位于偏远的地方，都应根据记录在案的质量体系进行管理和操作。

生物负荷的确定可以涉及不同的当事人，每个当事人负责方法或程序的某些要素。(关于典型职责的指南，见附件 D。)本文件要求定义接受特定责任的一方，并记录该责任定义。这种权力和责任的定义被记录在被识别方的质量管理体系中。接受规定要素责任的一方必须将这些要素分配给有能力的人员，并通过适当的培训和资格证明其能力。

如果在保健产品制造商的直接管理下在实验室中进行生物负荷测定，实验室的操作属于制造商的质量管理系统。如果使用外部实验室，所有测试都应根据公认的当前/有效的最佳实验室实践(如国际标准化组织 15189，

11

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

国际标准化组织/国际电工委员会 17025)，且数据应由称职、知情的专业人员进行评估。

任何实验室都应致力于提供优质服务，这一承诺应作为质量政策记录在案。实验室组织内的权限和责任线应正式建立并记录在案。应指定个人负责实验室质量管理体系的建立，并有权确保该体系得以实施。

实验室的运作应定期接受内部审计。实验室管理层应记录和审查审计结果(例如，参见国际标准化组织 15189 或国际标准化组织/国际电工委员会 17025)。

对责任、权力和人力资源的要求在国际标准化组织 13485 中有规定。

国际标准化组织 13485 规定了提供资源的要求。

对设备的要求在国际标准化组织 15189 和国际标准化组织/国际电工委员会 17025 中有规定。

A.4.3 产品实现

在国际标准化组织 13485 中，产品实现部分的要求与产品生命周期有关，从客户要求的确定、设计和开发、采购、生产控制以及监控和测量设备的校准。

应该有一个系统来识别每台实验室设备的维护要求。不需要校准的设备应明确标识。

与产品、洗脱液、培养基等接触的任何设备或其部件，测试期间应无菌。所有用于从产品中去除微生物的微生物培养基和洗脱液的制备应确保无菌。

培养基的适当质量测试应包括生长促进测试。一般来说，生长促进试验是在每一批中使用数量不超过 100 个菌落形成单位的少量[选定微生物接种物进行的。一些药典[版(如美国药典、欧洲药典)描述了生长促进试验，详述了合适的微生物。媒体质量控制的其他公认的定量和半定量方法也是可以接受的。

采购要求在国际标准化组织 13485 中有规定。特别要注意的是，国际标准化组织 13485 中对采购产品的验证要求适用于从组织外部收到的所有产品和服务。

国际标准化组织 13485 中规定了监控和测量设备的校准要求。

国际标准化组织/国际电工委员会 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 生物负荷测试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之外，测量的不确定性、精确度和偏差可能不是必需的。对于生物负载测试方法，不确定度、精确度和偏差的测量通过确定生物负载回收效率来考虑。

12

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

A.4.4.2 国际标准化组织 13485 的测量、分析和改进部分的要求涉及过程监控、不合格产品控制、数据分析和改进(包括纠正和预防措施)。

应调查所有超过规定水平和/或表明不利趋势的生物负荷结果。调查的初始阶段应该包括评估结果是真实的还是错误的。以下情况可能会导致错误，应予以解决：

—不合适的样品(例如，不具代表性、不均匀、不合格的材料)；

- 不适当的取样材料(如拭子、容器、包装);
- 运输/搬运/储存条件不合适;
- 不合适的测试材料(如储存、移液器、过滤设备);
- 不正确的处理或测试方法;
- 不合适的培养基或稀释剂;
- 不适当的实验室环境;
- 不适当的孵化环境;
- 计算或抄写错误;
- 测试方法的偏差(例如稀释误差、过滤误差、无菌技术误差)。

如果结果是由于取样或实验室误差造成的，超过规定水平的生物负荷结果应通过使用同一批产品的新样品的另一次测定进行验证，如果可能的话。如果产品支持微生物生长并会导致无效数据，或者如果同一批次不再可用，则应使用新批次。

如果原始结果被确认为真实的发现，那么在调查的第二阶段至少应考虑以下因素：

- a)结果与数据使用目的相关的含义(例如灭菌过程的有效性);
- b)需要增加样本大小和/或频率;
- c)针对以下内容的制造过程评估:
 - 1)原材料/组件(如供应商、变更);
 - 2)清洁/润滑/制造液体;
 - 3)运输/容纳容器;
 - 4)工作面;
 - 5)人员着装/卫生/习惯;
 - 6)搬运/组装;
 - 7)环境条件和监测结果(包括季节因素，如有);
 - 8)包装材料和程序;
 - 9)储存条件;

d)回收微生物的微生物特征，包括：

1)潜在来源；

13

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

2)与以前分离株的比较。

根据调查结果，可能需要采取具体的纠正措施。如果需要采取纠正措施，应证明其有效性。

纠正措施的程序在国际标准化组织 13485、国际标准化组织 15189 和国际标准化组织/国际电工委员会 17025 中有规定。

A.5 产品选择

A.5.1 概述

A.5.1.1 应记录选择和处理产品样品的程序。应进行这些测试，以避免无意中的污染和样品中微生物数量和类型的显著变化。取样技术应保持一致，并允许基于事件和基于时间的生物负荷比较。

在选择用于测定生物负荷的产品样品时，有几种可能性：

- a)取一个实际产品(随机或以特定频率)；
- b)使用常规制造程序制造专门用于生物负荷测试的产品；
- c)拿走不适合销售的产品，这些产品可能会被报废或以其他方式拒收。

选择取决于许多因素，但第一个先决条件是所选产品应具有代表实际产品的生物负荷。如果决定使用被拒绝的产品，该产品应该已经经历了生产的所有必要阶段，包括可能的清洁和包装过程。

当取样测定生物负荷时，产品应包含在通常的包装中。通常，在产品从包装系统中取出后对其进行生物负荷测定，并从测定中省略包装系统就足够了。根据无菌标签声明，内部包装组件(如托盘或产品插件)可能需要根据以下因素进行测试

—什么是无菌的，

—当包装是产品的组成部分时，或

—用于具体评估。

A.5.1.2 在建立用于生物负荷测定的产品系列时，应考虑生物负荷数据的使用(例如，原材料的控制、引入部件的接受、工艺步骤的评估、灭菌工艺的鉴定)。在建立用于生物负荷测定的产品系列时，应考虑以下因素：

- 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、过程步骤的数量；
- d)使用的制造工艺类型；
- e)制造和/或装配环境；
- f)产品设计和尺寸；
- g)制造设备；

14

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

h)制造地点。

此外，微生物的数量和类型会影响产品系列生物负荷测试方法的选择。对于每个产品系列，应选择一个主产品或代表性产品进行生物负荷的常规测定。主产品的选择应基于记录在案的基本原理。

如果一个家族中的产品被认为是等同的，那么可以选择一个代表性的产品来确定生物负荷。可以定期监控所选产品，也可以轮流选择该组的其他成员。如果选定的产品受到常规监控，则应定期监控该系列中其他产品的持续等效性，或提供理由。

A.5.1.3 如果来自生物负荷测定的数据将用于建立或维持灭菌过程，则产品样品选择和生物负荷测定之间的时间间隔应代表最后一个制造步骤完成和产品灭菌之间的时间间隔。

A.5.2 样品项目部分

A.5.2.1 只要可行，生物负荷的测定应利用整个产品，尽管如果产品不能容纳在可用的实验室测试容器中，这可能是不可行的。在这种情况下，使用 SIP。应考虑生物负载在整个产品中的分布。如果预计整个产品的分布不均匀，应确定受污染最严重的产品区域。该区域应包含在所选的 SIP 中。

A.5.2.2 产品的尽可能大的一部分应用于 SIP。SIP 应具有代表性，以便能够确定整个产品的生物负荷。在测试大型产品(如手术服或外部引流套件)时，必须仔细选择产品的 SIP。

A.5.2.3 应考虑有助于微生物在产品上分布的制造方面。

A.5.2.4 可从对灭菌过程有更严重挑战的装置中选择的 SIP 的例子是带有连接装置、旋塞等的管路装置。

A.5.2.5 表 A.1 给出了采用各种 SIP 计算基础的产品示例

当准备或组装 SIP 时，在操作产品时应小心谨慎。如果要从产品中分离部分，应在受控环境(如层流柜内)的清洁条件下进行，以避免增加污染。

SIP 的基础	结果
表面面积	植入物(不可吸收)
块	粉末长袍 植入物(可吸收)
长度	管道(直径一致)
卷	容器中的液体

15

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

A.6 生物负荷的测定方法和微生物特征

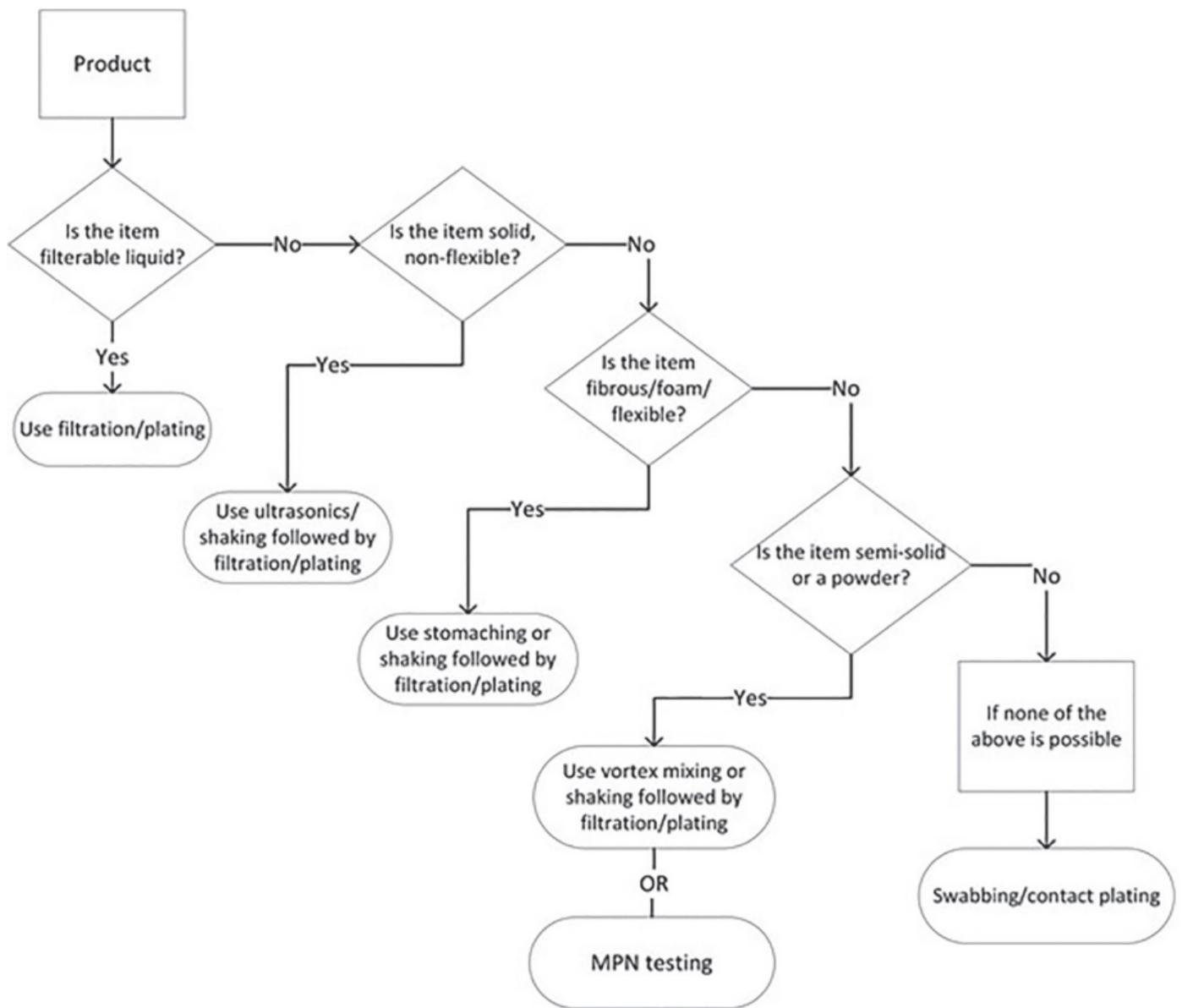
A.6.1 生物负荷的测定

A.6.1.1 选择合适的方法

图 a1 是一个决策树，在选择生物负荷测定方法的初始阶段具有普遍的应用。这个数字可以适用于基于文化和非文化的方法。

对于具有高生物负荷且采用培养方法的产品，确保进行足够数量的稀释以获得可计数的结果，并防止诸如菌落掩蔽或数量过多而无法计数(TNTC)平板等问题。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23



注 1:该决策树不排除使用替代的快速微生物学方法来确定生物负荷(例如, 自体荧光、流式细胞术、直接表荧光、过滤技术和固相细胞术)。

注 2:此决策树不包括所有类型的可测试产品或所有类型的可使用测试。

图 a1—选择生物负荷测定方法的决策树

对于生物负荷非常低的产品，即使使用了具有验证的生物负荷回收效率的合适的生物负荷测试方法，也不可能从单个产品单元中回收可检测的生物负荷。在检测到零菌落的情况下，应谨慎估计平均生物负荷，以避免高估真正的产品生物负荷。生物负荷试验方法的预期检测极限应反映生物负荷数据的预期用途，如有必要，生物负荷试验方法的设计应尽可能将检测极限降至最低。

为了优化低生物负荷产品的生物负荷测定方法，有必要考虑使用替代方法。例子在 a)到 e)中给出。

集合样本方法:将多个产品单元组合成一个测试。生物负担

应该确定这种方法的恢复效率。集合样本的总可回收 cfu 除以集合单位的数量，以估计每单位的 cfu。单元集合可以允许估计每单元的 CFu 数量较低；然而，它没有提供关于组成汇集样本的单个单位的生物负荷分布或可变性的信息。在单位 cfu 数量一致的情况下，可以使用池。

需要注意的是，根据汇集的方法，汇集可能会降低检测制造过程中意外变化的能力。

最大可能数(MPN)方法:见 B.3.3

组合和消除微生物群的测试方法:针对许多类型的

产品不需要将提取物分成几部分进行单独的测试，如需氧菌、厌氧菌、孢子和真菌。如果评估显示厌氧菌测试没有显示，那么将来可以取消该测试。此外，如果在需氧细菌计数中检测到需氧孢子，并且真菌计数不高，那么可以将需氧细菌、细菌孢子和真菌测试合并成一个测试。例如，通过放置在合适的通用培养基上的单个过滤器过滤全部体积的提取液，然后在两个不同的温度(例如 30°C至 35°C和 20°C至 25°C)下培养该培养基。其他例子包括在(30±2)°C下使用单一培养，或者在适合检测特定微生物群体的其他温度范围下培养。以这种方式消除稀释因子(前提是消除是合理的)可以最小化高估平均生物负荷的可能性。

检测方法的一半限制:这有助于计算生物负荷平均值

“生物负荷结果中存在的值。当较小百分比的结果为每板 0 CFU 时，这种方法提供了较低的生物负荷结果(更多信息参见参考[24])。

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荷估计值的方法。

生物负载在整个制造过程中通常不会以这样的方式分布在产品上，即可以使用泊松分布进行统计分析。应结合信息的预期用途仔细考虑泊松分布在生物负荷中的应用。(更多信息请参考参考文献[24]和[20]。)

确定生物负荷的方法的选择应考虑产品上或产品中生物膜的可能出现。除非采取适当的生物负荷控制措施，否则当与液体接触时，产品上或产品中可能会形成生物膜。含有组织的保健产品有可能出现生物膜。

A.6.1.2 抑制物质的中和

见附件二

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

A.6.1.3 微生物的去除

见附件二

A.6.1.4 微生物的培养

原材料的性质、制造方法和产品制造的条件是影响产品生物负荷的因素，在选择培养基和培养条件时应加以考虑。除非可能存在挑剔的微生物，一般用途、非选择性培养基和培养条件都是合适的。在制造商的参与下，实验室关于使用标准生物负载培养条件的建议足以作为考虑和理由。

选择培养基和培养条件时，至少应考虑以下因素：

a)

培养基和培养条件的单一组合不能支持所有微生物的生长；条件的选择应尽量减少由于在不同培养基上计数相同微生物而高估平均生物负荷的可能性；

b) 验证作业可能需要使用比常规培养基更广泛的培养基和培养条件；

c)

可能的微生物污染源和可能遇到的微生物类型，记住一些污染源可能随季节变化。

由合成材料制成的保健产品不太可能被专性厌氧菌污染。由组织或其他天然材料制成的保健产品可能有被专性厌氧菌污染的风险。

培养基和培养条件的例子见表 A.2

应该注意的是，所有非选择性厌氧培养方法都可以支持兼性厌氧微生物的生长。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

18

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

表 A.2 —培养基和培养条件的示例 a

类型 微生物	固体介质	液体介质	孵化条件 b

兼性、非苛求、需氧细菌	大豆酪蛋白消化琼脂(胰蛋白胨大豆琼脂)营养琼脂血琼脂基础 葡萄糖胰蛋白胨琼脂(平板计数琼脂)	大豆酪蛋白消化肉汤(胰蛋白胨大豆肉汤)营养肉汤	30°C至 35°C持续 3 d 至 7 d
酵母和霉菌	沙堡罗葡萄糖琼脂麦芽提取物琼脂玫瑰红琼脂 氯霉素琼脂大豆酪蛋白消化琼脂(台盼酮大豆琼脂)马铃薯葡萄糖琼脂台盼酮琼脂(平板计数琼脂)	萨布劳德葡萄糖肉汤麦芽提取物肉汤 大豆酪蛋白消化肉汤(胰蛋白胨大豆肉汤)	20°C至 25°C持续 5 天至 7 天
厌氧细菌	强化梭菌琼脂沙德勒琼脂血液琼脂 苛求厌氧菌琼脂大豆酪蛋白消化琼脂(胰蛋白胨大豆琼脂)哥伦比亚琼脂 威尔肯斯-查尔格伦·阿加克	罗伯逊煮肉汤巯基乙酸盐液体肉汤	30°C至 35°C持续 3 d 至 7 d
<p>a 这份清单并不详尽。 列出的培养条件表明了常用于所列微生物类型的条件。c 在厌氧条件下培养。如果预先减少培养基，可以提高性能。一些用于兼性、非苛求、需氧细菌的培养基能够支持酵母和霉菌的生长。</p>			

A.6.1.5 微生物的计数

实验室可以指定计数技术，这足以作为考虑和理由。另见 B.6

A.6.2 生物负荷的微生物特征

A.6.2.1 必要的表征程度取决于产品的性质、检测人群的多样性和数据的使用(如灭菌资格)。

A.6.2.2 可使用多种方法来表征包含保健品上或保健品中生物负荷的微生物。生物负载的典型微生物表征方法包括菌落

19

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

形态学、细胞形态学、染色特性、选择性培养和微生物鉴定。关于这些方法的细节如下。

a)当获得菌落计数时，菌落形态易于记录。描述殖民地

形态学有些主观，包括颜色、形状、大小、纹理、边缘、海拔和群体的其他物理上可观察到的特征。仅这些信息不利于趋势分析(见 A8)。它通常可用于区分细菌和霉菌分离株，并初步确定平板上的菌落是否可能是相同的微生物。为了确定污染源，需要更具体的方法进行进一步的表征。

通常使用细胞形态学和染色技术，例如湿式和革兰氏染色

来表征微生物。这些方法的好处是它们需要最少的设备和时间，并且可以提供关于微生物一般特征的有价值的信息。通过物理描述和湿悬置对真菌(即霉菌和酵母)进行表征对于大多数分离株来说就足够了。

选择性培养和差异培养基可用于抑制特定细胞的生长

微生物，为某些微生物进行选择，或帮助区分某些微生物和其他微生物(例如特定培养基上菌落的颜色)，这些微生物可用于表征微生物。

微生物鉴定可以使用表型或基因型方法，或两者结合进行

两者都有。经典的表型试验，如菌落和细胞形态、革兰氏和孢子染色反应、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)，通常能提供细菌所属的类群或属的一些指示。更复杂的生化和血清学试验，或基因分型或蛋白质组学方法可以根据属、种或菌株水平鉴定细菌。酵母和霉菌也可以采用类似的方法。形态和生理特性的结合可以用来建立属，生物化学同化可以用来区分物种。

表 A.3 提供了关于常见生物负荷表征方法的信息。

表 A.3 — 常见生物负荷表征方法的属性

方法	例子	特征
群体形态学	形式、立面、边缘、尺寸、颜色	低的
细胞形态学	形状(棒、球菌、酵母) 大小、聚集(簇、链)解剖(真菌结构)	低至中等
染色特性	鉴别染色(革兰氏反应、孢子染色、耐酸性)真菌染色	低至中等
选择性培养和差异培养基	热休克、孵育参数、选择性培养基	中度到高度
属/种鉴定	遗传和生化识别技术和系统	高的

A.7 确定生物负荷的方法的验证

A.7.1 概述

一般来说，经典微生物学方法在生物负荷测定的验证中对用户提出了挑战。通常不需要验证经典微生物学方法或国家和国际标准及药典中描述的方法。这些方法只需在其独特的使用条件下验证其准确性和可靠性即可。这种行为通常足以证实生物负荷测定的有效性。

20

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

在生物负荷测试方法的验证中，有两个方面需要考虑。第一是中和测试系统中的抑制因子以允许微生物复制的能力(生物负载法适用性)，第二是从产品中去除和培养微生物的能力(生物负载回收效率)。

当确定生物负荷的方法包括从产品中去除微生物时，最重要的是去除过程的效率。去除和培养过程的验证称为生物负荷回收效率(详见附件 C)。

A.7.2 验证

A.7.2.1 生物负荷方法的适用性

生物负载法适用性测试用于证明产品不会阻止微生物的生长或检测。该产品可包含在生物负荷试验条件下对微生物有抑制作用的物质。

在测试含有抗菌物质的产品时，应使用稀释或适当的灭活/中和方法。

从产品中洗脱出来的物质的抑制作用应在初步实验中进行研究，以评估产品中是否含有在生物负荷试验条件下可抑制微生物生长的物质。如果设备包含已知或已证明为惰性的材料，则记录的基本原理可能是可以接受的。

应考虑生物负荷法的适用性

a)当有新产品或改良产品时，以及

b)每当试验条件发生变化时(例如培养条件、提取培养基)。

给定杀微生物或微生物静态物质适用性的方法(例如，具有有效膜冲洗程序的膜过滤)在产品中的应用可能不需要特定于产品的生物负载方法适用性测试。

A.7.2.2 生物负荷回收效率

基本上有两种传统方法可用于验证从保健产品中去除微生物的效率(参见第 1.4 节)。这些方法是

—重复回收:重复处理产品样品，然后定量评估回收程度，或

—接种产品:用已知水平的微生物接种的产品，随后对回收程度进行定量评估。

第一种方法具有利用天然微生物的优点，但通常需要中等到高的初始生物负荷。如果是这种情况，那么可以根据产品和/或配置来优选第一种方法。第二种方法创建了一个用于测试目的的模型系统，但提出了与回收天然微生物相比如何的问题。更多信息见表 C1

更多的非传统产品(例如，含有粉末、液体、抗菌剂、多种成分的复杂或复杂产品)可能需要结合多种方法来评估生物负荷回收效率。更多信息，请参考附件 C。

对于被过滤的液体产品，或者当使用 MPN 方法时，不需要确定生物负荷回收效率和计算生物负荷校正因子。然而，仍然应该评估测试方法是否适合枚举。

21

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

A.7.2.3 枚举和培养条件

有关枚举的进一步指导，请参见 B.6

选择用于确定生物负荷的培养条件(即培养基和培养条件)不能预期检测到所有潜在的微生物。因此，在实践中，生物负担很可能被低估。然而，必须就适当的文化条件做出决定。

一种评估培养条件的方法包括根据对生产过程、环境、材料和预期存在的微生物的了解来选择培养条件。如果特定的产品特征表明需要额外的评估，那么将典型培养条件下列举的微生物与替代培养条件下检测到的微生物进行比较。如果这种方法表明在典型培养条件下检测到低比例的生物负荷，则应重新考虑替代培养条件以优化测定。这对于抗菌剂会影响微生物生长的保健产品来说尤其重要。

当选择用于微生物表征的技术时，考虑以下因素：

- 考虑到灭菌鉴定的方式，对制成品的风险；
- 以前可用的数据；
- 生成数据的目的；
- 制造过程的性质(例如所涉及的水、手动、自动)和产品。

A.8 生物负荷的常规测定和数据解释

A.8.1 概述

为了证明微生物质量的有效控制已经得到实施和保持，应制定一个监控产品和/或组件的计划。

通常的做法是使用 3 到 10 个项目的样本量进行生物负荷水平的常规监测。

如果生物负荷数据用于满足另一个国际标准(例如, 国际标准化组织 11137 系列)的要求, 则该标准已经可以预先定义样本大小和测试频率, 这将取代此处推荐的样本大小。

样本量的合理选择主要取决于两个因素。

待检测生物负荷的变化。

这将取决于与生物负荷水平变化(增加或减少)相关的后果, 以及生物负荷信息是如何应用的。为了早期检测平均生物负荷水平的微小变化, 可能需要大样本量。

个体项目上存在的活微生物数量估计值的变化。

这种可变性的程度将决定检测给定变化所需的样本量。这种估计中较小的项目间差异将需要比较大的项目间差异更小的样本量来检测变化。

更大的样本量可以提高检测重大变化的信心。

22

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

应当认识到, 生物负荷数据的使用方式会影响检测给定幅度变化的期望置信度。应合理选择要检测的变化幅度和实现检测的概率。

应合理选择监测频率, 同时考虑各种因素, 包括以下因素:

历史数据的可用性;

—生成数据的目的;

—制造过程的性质;

—产品的生产频率;

—及时检测生物负荷变化的重要性;

—季节性和环境变化。

取样可以基于时间(如每月、每季度)或产量(如交替批次)的频率进行。然而, 为了建立基线水平, 通常的做法是在新产品的初始生产过程中以更高的频率确定生物负荷, 并且随着生物负荷知识的发展, 降低该频率。

生物负荷测定的频率应允许检测生物负荷的变化, 例如, 由于季节变化、制造变化或材料变化。

A.8.2 检测和板计数的极限

A.8.2.1 检测极限

在确定生物负荷值时，应考虑生物负荷试验方法的检测限。对于微生物学报告，当对提取物的一部分进行生物负荷测试，并回收零个菌落时，结果通常报告为小于“X”，其中“1/X”代表测试部分的分数。例如，如果在 400 毫升中提取产品并过滤提取物，零菌落的结果将被报告为少于 4 个菌落形成单位(即 < 4 个 CFU)。因此，本例的 LOD 为 4。在微生物报告中，小于 4 CFU 的结果意味着整个提取物可能含有 0、1、2 或 3 CFUs，但是微生物报告规则要求报告为小于 4 CFU。

个体生物负荷结果以整数报告，因为该数字代表菌落形成单位。使用生物负荷数据的平均值或其他数学计算通常报告为小数点后一位。

LOD 可以通过以下方式得到改善：

- a) 测试方法的修改(例如过滤更大部分的提取物)；
- b) 汇集多个样本；
- c) 使用另一种测试方法，如 MPN。

A.8.2.2 板计数

在其他工业应用的已公布标准微生物学方法中，建议选择包含可接受范围的板(例如，小于 200 CFU、25 CFU 至 250 CFU 或 30 CFU 至 300 CFU)。这适用于进行多次稀释的情况，因此可以从中选择。然而，生物负荷测试并不总是这样，因为

—许多产品生物负荷低，板数少于 30 CFU，并且

—当计数较低时，不一定需要多次稀释。

23

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

对于这些情况，记录和使用小于例如 30 CFU 的计数是合适的。

平板计数可以用三种不同的方法确定：

- a) CFU 的直接计数；
- b) 估计计数；
- c) 超出可计数或估计范围的计数。

直接计数直接使用任何有助于精确计数的方法(计数计数器、标记板等)将所有菌落制成表格。)

当板的一部分上的菌落可以被计数并相乘以表示板的剩余部分时，可以执行估计计数。

当存在扩散菌落时，估计计数是获得计数的一种方法。这种技术通常应用于扩散的菌落不会遮挡其他菌落(由于大小或不透明)。

如果可以基于可辨别菌落的存在来近似该值，则超出可计数或估计范围的计数可以半定量。但是，如果做不到这一点，应指定一个数不清的结果(TNTC)。从一组样本的平均值中忽略 TNTC 结果是可以接受的做法。应该调查 TNTC 的结果。

当使用重复的平板计数、稀释因子或等分试样时，应相应地调整平板计数，以获得单一产品的计数。

A.8.3 微生物特性

如果根据微生物特性，回收的微生物类型不是正常生物负荷的一部分，应考虑评估这些分离物存在的相关性。

A.8.4 治疗范围的生物负荷数据

没有额外的指导。

A.8.5 生物负荷峰值

生物负荷数据可以证明一个值明显大于一组值中的其他值(通常称为生物负荷峰值)。这种生物负荷峰值可能出现在以下两种情况之一：

- a)该值不是生物负荷分布的正常和一致部分；
- b)该值可以是生物负荷分布的正常和一致的部分。

通过对生产实践、微生物测试和样品处理的调查，可以确定生物负荷峰值不是生物负荷分布的正常和一致的部分。参考这一小节来决定如何处理这种情况。

通过回顾历史数据，可以确定生物负荷峰值是生物负荷分布的正常和一致的一部分。历史数据可以证明更大值的周期性出现在预期范围内，使其成为生物负担的一个持续部分。如果这些数据由产品中常见的微生物组成，这就使其成为生物负担的正常部分。在确定灭菌过程的处理程度时，应包括这些峰值。例如，由于原材料不一致，或者制造过程涉及过度处理，可能会出现生物负载高峰。

在表 A.4 中给出的示例中，10 个批次中有 3 个批次(批次 2、5、6)包含明显大于批次平均值的单个值(在本示例中，是批次平均值的 5 倍或更多倍)。已经确定这些高值是生物负荷的正常和一致的一部分。因此，这些批次的高值和/或批次平均值包含

在确定总体平均生物负荷以确定灭菌过程的处理程度时，可能需要考虑较高的值。

Table A.4 — Example of bioburden data containing bioburden spikes

Batch #	Item #										Average (CFU/ device)
	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 生物负荷水平

当超过规定水平时，应采取预定的措施。如果纠正措施导致影响生物负荷的过程发生变化，应获取新数据，并为产品建立新水平。

用于生物负荷的特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，那么可以在评估给定产品的前三批或更多批之后设置这些水平。当设置新生产线的临时水平时，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。对于某些产品来源，预计生物负荷会有显著的季节性变化。季节性湿度和/或温度水平/变化也会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，一段时间后应重新评估生物负荷数据，以验证原始水平是否合适。

历史生物负荷数据用于建立生物负荷水平，通常定义为警报水平和行动水平。这些级别的建立应考虑到基于信息使用意图所使用的方法。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，或评估制造过程中环境控制的有效性。

在确定这些水平的同时，还应考虑制定要采取的行动，如果超过了这个水平。这些行动应基于生物负载由活微生物组成的知识，生物负载测试以多种方式确定产品中中和/或产品上沉积的产品生物负载。这些微生物数据并不准确。相反，生物负荷的微生物数据中存在相当大的范围是很常见的。生物负荷的微生物数据也不需要符合任何统计分布。

确定生物负荷警报和行动水平的一种常见方法是使用标准差。在这种情况下，标准偏差计算用于理解数据的分散性，生物负荷数据是否符合特定的统计分布不太重要。

应调查被确定为异常高或异常低或不典型趋势的数据。在设置生物负荷监测水平时，可以从计算中忽略非典型数据，这些数据具有已确定的原因(例如实验室误差、制造过程中偶尔出现的高值)。当生物负荷数据

25

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

被分析用于与质量相关的决策时，单个测试结果，如“无增长”或“数量过多无法计数”(TNTC)，被包括在分析中。

A.8.7 数据分析

随着时间的推移收集的数据的图形表示有助于区分实际趋势和采样可变性。图形表示还可以指示微生物种群发生了显著变化，即使生物负荷值在预设水平内。

在对从生物负荷测定中获得的数据进行统计计算之前，尤其是在记录了许多观察结果的情况下，有必要对数据进行处理，以揭示重要特征。这可以通过将测量值分组形成频率表和图表的定性方式来实现。完成后，可以检查数据的趋势。

有许多趋势分析技术可以应用于生物负载。这些趋势技术可以是，但不限于，生物负荷平均值或生物负荷估计的趋势、休哈特控制图(国际标准化组织 7870-2)、基于范围的控制或累积和图(国际标准化组织 7870-4)。每种不同的技术都可以用来建立一个可能的偏离结果通常的随机分布，并突出偏差。

在某些情况下，利用这些技术中的一种以上来确定是否要基于可用数据集采取行动或者是否需要额外的数据可能是合适的。

A.8.8 统计方法

国际标准化组织 13485 要求规划和实施适当的测量和分析方法，包括选择适当的统计方法。对从各种产品的生物负荷测定中得出的数据的检查说明了这些数据的可变性。一组中的测定结果在项目组中会有所不同，因此，数据分析通常使用方法。显然，这些平均值可以取高、中或低值，平均值会随时间变化。此外，构成生物负荷的微生物类型也可以变化。

从生物负荷测定中得到的数据的频率分布的一个普遍观察到的特征是分布是偏斜的，并且可以显示显著的拖尾。对于低或中等数据，模态值为零。在这种情况下，生物负荷通常较低，但偶尔会有较高的值，即使控制措施得到有效应用。

A.9 生物负荷测定方法的维护

A.9.1 产品和/或制造过程的变更

还应审查产品和/或制造工艺的变化对生物负荷测定方法有效性的任何潜在影响。应记录审查结果(见 4.1.2)。在某些情况下,可能有必要改变和/或重新鉴定生物负荷测定方法。

A.9.2 生物负荷测定方法的变更

没有提供指导。

A.9.3 生物负荷测定方法的重新认证

没有提供指导。

26

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

附件二

(信息性)

生物负荷测定方法指南

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.1 概述

B.1.1 生物负荷测定可用于多种情况。负责进行此类确定的个人应考虑方法开发和验证需要进行的程度。此外,应考虑进行测定的特殊情况,例如,决定取样率、使用的方法、培养基的性质和相关孵育条件。

B.1.2 确定生物负荷的过程的关键步骤顺序如图 B.1 所示。负责进行此类确定的个人应使用原材料、组件、制造环境、生产过程和产品性质的知识,为各步骤选择合适的技术。为了正确的方法开发和验证,最初可能需要采用不同方法的组合,以建立最适合常规使用的方法。

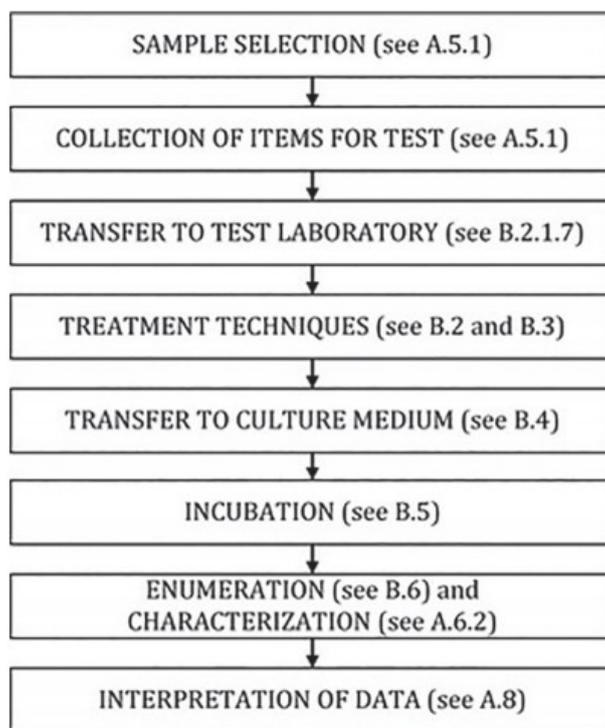


图 B.1 —确定生物负荷过程的关键步骤顺序

B.2 使用洗脱去除微生物的方法

B.2.1 概述

B.2.1.1 本附录中描述的几种方法可以结合使用，以增加发现的微生物数量并降低可变性。

27

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.2.1.2 微生物对表面的粘附程度随表面性质、涉及的微生物和存在的其他材料(如润滑剂)而变化。污染物的来源也会影响粘附程度。为了去除微生物，所用的处理方法可以包括用某种形式的物理力冲洗或直接表面取样。表面活性剂可以用来提高回收率，但是应该认识到高浓度的表面活性剂可以抑制微生物的生长。

B.2.1.3 对于与非无菌流体接触的材料，微生物可能以生物膜的形式出现，除非采取适当的生物负荷控制措施。生物膜是一种结构，在这种结构中，微生物被包裹在一种强烈粘附于表面的基质中。生物膜中的微生物对灭菌过程的抵抗力会增强。生物膜可以很快形成，并且可以在含有组织的保健产品或用过的设备上发展到更大的程度。在这种情况下，应考虑生物膜形成的可能性，不应假定 B.2.2 中概述的处理方法适用于从生物膜中完全释放微生物。如果在重复回收过程中记录了重复的高微生物计数，则在去除技术的验证过程中可以获得生物膜存在的指示。内毒素水平高也可能是生物膜的标志。

B.2.1.4 在生物负荷测定过程中使用的任何处理都应是可重复的，并应避免可能影响微生物生存能力的条件，如过度空化、剪切力、温升或渗透休克。

B.2.1.5 有些治疗比其他治疗更容易控制。在选择治疗和设计合适的治疗条件时，应考虑变量和控制变量的方法。例如，对于给定的处理，可以延长或改变机械搅拌的性质以增加微生物的去除。

B.2.1.6 某些处理方法可以分解被测产品(例如分解、胃内加工和涡流)。分解材料的存在会使微生物的计数变得困难。可能需要额外的处理，例如从洗脱液中分离出分解的物质。应小心确保获得的计数具有代表性。某些类型的微生物比其他类型的微生物更容易聚集/再聚集，主要是基于它们的相对疏水性。

B.2.1.7 应尽一切努力尽快将测试项目转移到实验室。如果转移延迟是不可避免的，应选择储存物品的条件，以尽量减少微生物数量的变化。应该指定最大存储时间。干燥可能是微生物数量显著减少的原因，在选择储存条件和储存时间时应予以考虑。

B.2.2 移除技术

B.2.2.1 胃内加工

B.2.2.1.1 将测试项目和已知体积的洗脱液装入无菌胃袋中。往复式桨叶在袋子上操作，迫使洗脱液通过并环绕物品。

B.2.2.1.2 应定义治疗时间。

B.2.2.1.3 该方法特别适用于柔软、纤维状和/或吸收性材料，但也不适用于任何会刺破袋子的材料(例如包含针头或刚性物品的装置)。

B.2.2.1.4 如果使用相对大量的洗脱液，该方法可以产生微生物浓度低的悬浮液。如果可行，洗脱液应过滤。

28

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.2.2.2 超声波处理

B.2.2.2.1 将试验项目浸入合适容器中已知体积的洗脱液中。在超声波浴中处理容器和内容物，或者将超声波探头浸入包含的洗脱液中。微生物也可以通过超声波处理灭活，特别是通过更多的能量转移，并且使用探针比在超声波浴中更有可能灭活。超声波处理方法应根据 B9 进行评估

B.2.2.2.2 应定义超声波治疗的标称频率和治疗持续时间。此外，应确定物品放置在超声波浴中的位置。应考虑限制同时处理的物品数量，因为通过屏蔽可以降低一些超声波处理功率。

B.2.2.2.3 该技术特别适用于不渗透固体的物品和形状复杂的产品。它可能对某些医疗保健产品有破坏性，尤其是那些含有电子元件的产品，如植入式脉冲发生器。

B.2.2.2.4 超声能量和超声持续时间不应导致微生物的破坏和死亡或洗脱液过热。

B.2.2.3 摇动(机械或手动)

B.2.2.3.1 将测试项目浸入合适容器中已知体积的洗脱液中，并在机械振荡器上振荡(例如往复、轨道或手腕动作)一段规定的时间/周期数，以帮助微生物的去除。可以使用手动摇动，但其效果会因操作者而异。

B.2.2.3.2 应定义摇动的时间和频率。

B.2.2.3.3 可以添加规定尺寸的玻璃珠，以增加表面磨损，从而提高生物负荷回收效率。添加玻璃珠的大小，以及摇动的时间和频率，不应导致过热和/或对微生物的可能损害。

玻璃珠的加入将增加微生物附着的表面积。

注意

B.2.2.4 涡流混合

B.2.2.4.1 将试验项目浸入封闭容器中已知体积的洗脱液中，该容器放置在涡流混合器的旋转垫上，从而产生涡流。产生的涡流将取决于手动施加的压力。涡流的变化会导致可变的移除。

B.2.2.4.2 应定义要使用的容器、混合时间和混合器的设定速度。

B.2.2.4.3 该方法快速简单，但主要适用于小容器中的小物品。应评估运行涡流混合器的不同人员之间的去除差异。

B.2.2.5 冲洗

B.2.2.5.1 洗脱液通过测试项目的内腔。液体流动可以由重力或泵送引起。或者，可以用洗脱液填充产品，夹紧并搅拌。

29

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.2.2.5.2 应定义装置和洗脱液之间的接触时间、冲洗速率和流体体积。

B.2.2.5.3 设备配置和内腔尺寸可以限制从内表面完全去除微生物所需的物理力。

B.2.2.6 混合(分解)

B.2.2.6.1 将试验项目浸入合适容器中已知体积的洗脱液中。将物品混合或切碎一段时间。

B.2.2.6.2 规定的时间取决于项目和搅拌器，但不应延长，以免导致洗脱液过热和可能对微生物造成损害。

B.2.2.6.3 该技术提供了一种将物品分成足够小的部分的方法，以便通过电镀技术来列举微生物。

B.2.2.7 擦拭

B.2.2.7.1 拭子由吸收材料组成，通常安装在某种形式的棒或手柄上。取样材料可以是可溶的或不可溶的。

B.2.2.7.2 正常使用方法是用水湿润拭子，并擦拭物品的预定表面积。在某些情况下，生物负载回收效率可以通过首先润湿表面，然后用干拭子擦拭来提高。将拭子转移到稀释剂中并搅拌以从拭子中去除微生物。或者，在可溶性拭子的情况下，拭子溶解在稀释剂中。

B.2.2.7.3 拭子是对形状不规则或相对难以接近的区域进行取样的有用方法。当要对大面积进行采样时，它们也很有用。

B.2.2.7.4 由于拭子操作方式的变化，该技术特别容易出错。此外，表面上的所有微生物不太可能被拭子收集。收集到的一些微生物可能会被困在拭子本身的基质中。由于这些问题，使用这种方法的恢复率通常很低。

B.2.2.7.5 拭子中不应存在杀微生物剂或微生物抑制剂。

B.2.3 洗脱液、稀释剂和运输介质

B.2.3.1 在生物负荷测定过程中，洗脱液可用于从产品中去除微生物。运输介质可用于转移去除的微生物进行计数，稀释剂可用于获得含有可计数数量微生物的悬浮液。

B.2.3.2 洗脱液和稀释剂的性质会对所用方法的整体效率产生显著影响。在选择稀释剂或洗脱液时，应考虑其组成(如成分及其浓度、渗透压和酸碱度)。理想情况下，组合物应该不会发生微生物的增殖或失活；然而，对于所有潜在的污染物，可能无法确定这一点。

B.2.3.3 当液体用于从固体表面去除微生物时，可以考虑加入温和的表面活性剂，见表 B1。

30

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.2.3.4 常用的洗脱液和稀释剂包括表 B.1 中给出的那些

解决办法	水中浓度	应用程序
缓冲氯化钠-蛋白胨溶液	0, 067 米磷酸盐 0, 43 %氯化钠	一般

	0, 1 %蛋白胨	
卡尔冈林格	1/4 强度	藻酸钙拭子的溶解
蛋白胨水	0.1%至 1.0%	一般
磷酸盐缓冲盐水	0.02 米磷酸盐 0.9%氯化钠	一般
套环	1/4 强度	一般
氯化钠	0.25%至 0.9%	一般
硫代硫酸盐林格	1/4 强度	余氯中和
水	不适用	水样稀释。计数前可溶性物质等渗溶液的制备
注:该列表并非详尽无遗。表面活性剂, 例如聚山梨醇酯 80, 可以添加到洗脱液和稀释剂中。根据具体应用, 通常使用 0.1 %至 1%的浓度。用于任何特定处理的合适浓度需要仔细选择, 因为可能会发生起泡。		

B.3 不使用洗脱去除微生物的方法

B.3.1 接触电镀

B.3.1.1 接触板或载玻片是将固化的培养基涂在表面上的手段, 目的是使有活力的微生物附着在培养基表面。然后培养平板或载玻片以产生列举的菌落。

B.3.1.2 这种系统具有易于使用的优点。结果与与固化培养基接触的面积直接相关。

B.3.1.3 细胞在表面的自然聚集、菌落在琼脂界面的扩散、琼脂的干燥和厌氧位置的可能性是潜在的缺点。

B.3.1.4 只有当其他方法不适用时, 才应使用该方法, 因为效率通常较低。接触板和滑板通常仅在平坦或至少规则的表面上有用。

B.3.2 琼脂覆盖

B.3.2.1 琼脂覆盖包括用熔化的琼脂培养基涂覆产品表面, 并使其固化, 然后孵育以产生可见菌落。这种方法并不常用, 但可以在生物负荷低且产品配置合适的情况下使用。

B.3.2.2 细胞在表面的自然聚集、菌落在琼脂界面的扩散、琼脂的干燥和厌氧位置的可能性是潜在的缺点。此外, 一些微生物在不利温度下覆盖后不一定会保持存活状态, 这可能导致假阴性结果或妨碍正确评估。

B.3.3 最大可能数(MPN)方法

b . 3 . 3 . 1 MPN 方法是一种公认的、有充分记录的方法，用于估计微生物随机分布的产品中的活微生物数量。该方法特别适用于具有低平均数生物负荷的产品。

B.3.3.2 该方法包括采集产品的复制样品(按体积或重量计)，每个样品/子样品中平均含有相同数量的活微生物(因此要求分布具有随机性)，并通过转移到液体培养基中培养，对每个样品中活微生物的存在进行单独评分。一般来说，相同的培养基和条件参照国际标准化组织 11737-2，为期七天，是合适的。可以将一定范围的稀释液接种到营养培养基中，使得接种培养基的一部分在随后的培养中不产生可见的生长。根据一组重复中阳性试验的发生频率，对样品或采集样品的散装产品中存在的活微生物数量进行估计；估计值的 95 %置信限相对较宽。该估计值及其置信限来自[出版的 MPN 表]，该表是在假设复制样品中存在的活微生物数量根据泊松分布分布在平均数附近的基础上发展起来的。美国食品和药物管理局 BAM 附录 2[]包括一个计算 MPN 95 %置信水平的电子表格。

B.3.3.3 应用 MPN 方法的关键要求是微生物种群在被调查产品中的随机分布。因此，MPN 方法对于确定液体保健产品、粘性流体、粉末的生物负荷或在用作单一产品洗脱液的液体中估计生物负荷的情况下具有价值。

B.3.3.4 MPN 方法易于执行，并且该方法的统计基础使其更适用于一般评估而不是精确测定。MPN 计算用公式(B.1)表示：

$$MPN 1 = \times n S1/IP$$

(B.1)

其中 Ln 是测试的数字/增长的负数。

B.3.3.5 对于生物负荷计数和计算，每种产品的 MPN 结果可以等同于每种产品的 CFU 结果。

B.3.3.6 如果存在杀微生物或杀微生物物质，将适用 B.8 中概述的考虑因素。

B.4 转移至培养基

B.4.1 概述

B.4.1.1 处理通常会生成微生物悬浮液。悬浮液中活微生物的计数可以使用下述技术之一进行。

B.4.1.2 在转移到培养基之前，可能需要进行额外的处理，以破坏微生物聚集体，从而减少低估。在某些情况下，用于从被测物品中去除微生物的技术也可以破坏这些聚集体。

B.4.1.3 杀微生物或杀微生物物质的存在将影响培养方法的选择。如果洗脱液中存在杀微生物或微生物静止物质，可以通过稀释、过滤或化学灭活将其降低至无效浓度。

B.4.2 膜过滤

B.4.2.1 洗脱液的过滤，然后将过滤器在合适的生长培养基上培养，得到可见菌落，是计数活微生物的有效方法。合适的公称孔径不大于 0.45μ 的过滤器通常足以捕获微生物；然而，如果预期产品上或产品中存在的微生物证明这一点，则应考虑使用较小的孔径。

B.4.2.2 通常需要真空源，或者在某些情况下需要压力源。应小心避免过大的背压，否则会导致薄膜过滤器变形或损坏。

B.4.2.3 对含有颗粒(如纤维产品残余物)的洗脱液进行膜过滤可能很困难，因为颗粒会堵塞过滤器。

B.4.2.4 培养时，膜过滤器可以放置在琼脂表面或充满液体营养培养基的吸收垫上。对膜过滤器表面产生的菌落进行计数和分离，以进行微生物表征。

B.4.2.5 膜过滤对低浓度微生物的悬浮液特别有用。

B.4.2.6 当怀疑液体基质含有杀微生物或微生物静止物质时，过滤也是有用的，因为微生物从洗脱液中被除去，并可在培养前在膜过滤器上清洗。某些类型的膜可以吸收或释放抑制微生物生长的物质，因此重要的是只使用适合微生物计数的膜过滤器。薄膜过滤器和洗脱液应该兼容。

B.4.3 浇注电镀

B.4.3.1 使用倾注平板技术，在大约 45°C 的温度下，将悬浮液的独立等分试样与熔融琼脂培养基混合；然后让混合物在培养皿中固化。培养平板并计数菌落。

B.4.3.2 灌注电镀不会将微生物从洗脱液中分离出来。如果存在杀微生物或杀微生物物质，将适用 B.8 中概述的考虑因素。

B.4.3.3 淋洗液的量是有限的。因此，这种方法可能对微生物浓度低的悬浮液不具有所需的灵敏度。

B.4.3.4 希望保持琼脂温度尽可能低，以避免对微生物造成损害，因为即使 45°C 也会使一些环境微生物失活。因此，尽管使用羧甲基纤维素作为定型剂的改性在特殊情况下是可能的，但是浇注电镀在可检测的微生物类型方面有局限性。

B.4.4 铺展电镀

B.4.4.1 使用铺板技术，使用铺板装置将等份悬浮液铺展在培养基表面。

B.4.4.2 应吸收分散在培养基表面的等分悬浮液，以便形成离散的菌落；吸收的需要决定了可以用一个平板处理的等分试样的体积。

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.4.4.3 如果存在杀微生物或杀微生物物质，将适用 B.8 中概述的考虑因素。

B.4.4.4 可铺展的洗脱液数量有限。因此，这种方法可能对微生物浓度低的悬浮液不具有所需的灵敏度。

B.4.5 螺旋电镀

B.4.5.1 螺旋电镀技术使用自动化设备，在固体介质表面沉积等分悬浮液。悬浮液以递减的速度在螺旋轨道中从培养板的中心向外围扩散。适当培养后，当总平板计数或扇形计数是计算的基础时，使用特定的计数网格和计数技术建立原始悬浮液中活微生物的计数。

B.4.5.2 螺旋电镀技术已显示出可重现的结果，这些结果与使用常规系列稀释和表面铺展技术的结果非常相关。由于设备的设计和毛细管和小体积的使用，螺旋电镀主要有助于接种分散良好、无材料聚集和含有高浓度微生物的悬浮液

B.4.5.3 如果存在杀微生物或杀微生物物质，将适用 B.8 中概述的考虑因素。

B.5 培养(培养基和培养条件)

B.5.1 表 A.2 中给出了一些培养基和培养条件的例子。该列表并不包括所有的培养基和培养条件，对产品中存在的生物负载微生物的类型的确定，包括通过分子手段的确定，可以触发这些或许多其他微生物培养培养基的包含或排除。

B.5.2 应该注意的是，所有非选择性厌氧培养方法都允许兼性厌氧微生物的生长。然而，这些微生物的范围可以随着不同的培养基和培养条件而有很大的不同。

B.6 计数(计数菌落)

B.6.1 在使用菌落计数的计数技术中，应建立处理各种情况的程序，例如

a)检测小菌落(例如使用立体显微镜)，

b)计数和报告异常菌落(例如扩散器)，

c)列举和报告[拥挤的车牌，例如模糊的菌落或太多而无法计数的(TNTC)车牌]，以及

d)报告连续稀释的计数。

B.6.2 在使用菌落计数的计数技术中，应考虑平板上产生的菌落数。这个数目应该是这样的，即每一种有活力的微生物都能够以可见的菌落表达自己，而不会受到其近邻的不利影响。

B.6.3 标准平板计数惯例通常规定平板菌落数的下限。该限制基于可供选择的多种稀释液的可用性。多重稀释不一定适用于生物负荷低的医疗保健产品的生物负荷测定。

34

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

B.6.4 计数板时，应评估技术人员之间结果的可变性。有关技术人员之间可接受可变性的参考示例，请参见标准方法 9215 异养平板计数。

B.6.5 纤维的存在可防止离散菌落的形成，从而使计数变得困难。

B.6.6 如果存在传播的微生物，使用仔细倾倒在测试板表面的琼脂层可以提供更容易在培养后列举的测试结果。

B.6.7 对于自动计数方法，应根据国际标准化组织/国际电工委员会 17025 对系统进行验证。

B.6.8 如果使用多种测试条件(例如一个平板的需氧计数和另一个平板的真菌计数)，并且没有回收菌落，则 LOD 值是累积的。例如，如果需氧菌计数 < 2 CFU，真菌计数 < 2 CFU，那么总计数 < 4 CFU。

B.7 检测微生物的其他技术

除菌落计数外，其他技术也可用于确定生物负荷。这些包括代谢活动的测量(例如阻抗测量或表荧光)。这种方法被称为“间接”方法，因为要对前面定义的活微生物数量有意义，它们必须根据菌落计数进行校准。替代技术应具有足够的灵敏度来检测低水平的微生物。通常，检测到的数字下限超过 100 CFU。

注:一些快速微生物学方法(如生物发光、酶法、细胞计数法)可以提供生物负载中微生物的范围和相对数量的详细信息，并允许评估可能发生的可变性。它们也能比直接培养更快地提供生物负荷信息。

B.8 影响生物负荷测定的物质释放的筛选

B.8.1 筛选的目的是调查可从产品释放到悬浮液中的物质对潜在脆弱微生物生存能力的影响。这是一个方法的例子，可以用来评估技术是否符合 6.1.2。

B.8.2 选择产品，每个产品都应接受常规使用的微生物去除技术。如果去除技术使用洗脱液，B.8.3 可以适用，而如果产品直接引入培养基，B.8.4 可能更合适。

B.8.3 洗脱液不应抑制从产品中去除的微生物的生长。

B.8.4 如果将产品直接引入生长培养基(例如，在 MPN 估计中；参见 B.3.3)，可以使用药典中描述的方法适用性试验。在该试验中，将产品与少量微生物一起引入培养基，并在与常规生物负荷测定相同的条件下培养。使用的微生物数量应该大约为 50 到 100 个。结果评估见 B.8.5。经过一段时间后，检查培养基的可见生长。

如果保健产品含有一种可以缓慢释放到培养基中的抗微生物物质，那么在培养期结束时用少量微生物挑战产品-培养基组合是合适的。

35

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

B.8.5 如果接种的微生物数量和回收的数量明显不同，或者在适宜性试验中没有观察到微生物生长，则应重新考虑生物负荷测定技术。有必要引入稀释、中和或过滤阶段，以减少、灭活或去除抑制物质。

如果需要评估洗脱液的效果，可以将已知数量的微生物接种到洗脱液和对照溶液中，时间与常规生物负荷测定所建议的时间相近。洗脱液中回收的微生物在处理结束时计数，并与对照溶液中的计数进行比较。

B.9 身体压力不利影响的筛选

物理力可用于从产品中去除微生物(见 B.2.2)。应该考虑这些力对生物负荷测定的影响。如果需要评估物理力的影响，已知的低数值(不超过 100 CFU)应暴露在没有装置的情况下使用的物理力下。微生物的计数给出了物理力作用的量度。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

36

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

附件三

(信息性)

生物负荷回收效率的验证

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

C.1 概述

C.1.1 验证前

在开始验证之前，应该为每种产品或其部件或产品组证明并定义移除技术。应包括产品、样品大小、回收技术选择等的书面理由。

C.1.2 为生物负荷回收效率的目的对产品进行分组

相似的产品或其部件可以被组合在一起作为产品组和为生物负荷回收效率验证选择的代表性产品。纳入的评估标准可以包括类似类型的原材料、设计和尺寸、制造工艺、制造环境、制造人员和制造地点。生物负荷回收效率验证的结果可应用于该组的所有产品，以备将来测试。

C.1.3 样本大小

C.1.3.1 应选择要确定生物负荷回收效率的产品或其部件的数量。

C.1.3.2 常见的方法是利用三到十种产品进行恢复验证测试。样本大小应主要基于进行测试的目的(例如,支持辐射灭菌剂量的证实,或过度灭菌周期)。当审查生物负荷回收效率结果时,对结果一致性或缺乏一致性的审查可以表明应该应用不同的提取方法。或者,更大的样本量可以更准确地确定生物负荷回收效率。

C.1.4 生物负荷回收效率方法选择指南

C.1.4.1 生物负荷回收效率用于建立生物负荷校正系数,该系数可应用于生物负荷数据,以说明去除技术后残留在产品上和/或未被所用培养条件检测到的微生物。通过包含生物负荷校正因子而调整的生物负荷数据被理解为更准确地表示真实的生物负荷计数;这被称为生物负荷估计。生物负荷恢复效率测试也可用于比较生物负荷测试方法。

C.1.4.2 选择生物负荷回收效率方法(即重复回收与接种产品)的主要决定因素是自然产生的产品生物负荷水平。一般来说,重复回收法最适用于产品生物负荷较高的产品,接种产品法最适用于产品生物负荷较低的产品。生物负荷回收效率结果和相应的生物负荷校正因子可以根据生物负荷提取参数(例如重复回收的提取次数和类型,或者接种产品的使用与重复回收)而不同。因此,考虑收集生物负荷数据的原因和确定生物负荷回收效率的目的非常重要。

37

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

C.1.4.3 表 C.1 总结了在选择合适的生物负荷回收效率方法时应考虑的典型产品和方法特征。

	恢复方法	
	重复恢复	接种产品
原则	在单个样品上重复应用特定技术。	用特定水平的芽孢杆菌孢子悬浮液接种产品。根据各种因素,其他细菌也是合适的。
结果特征	中度至高度(如 100 CFU 至 1000 CFU)或高度(如 > 1000)	生物负荷低(如 < 100 CFU)或非常低(如 < 10 CFU)的产品。

	CFU)生物负荷的产品。 通常包括以下产品类型:—具有多种材料或表面的产品; —具有粘合或编织基体的产品(例如织物、卷材、泡沫);—组装在一起使用的多组件产品; —带有粘合剂/胶水的产品; 动物来源的装置, 尤其是从屠宰场获得的装置。	通常包括以下产品类型:—易于溶解或分解的产品(如可溶性材料); —简单的塑料装置(例如, 以最少的操作注射成型); —组件很少的产品; —具有抗菌特性的产品; —清洁的产品。
与实际生物负荷的相关性	代表自然生物负担的性质和类型。	不太能代表自然生物负担的性质和类型。 孢子通常比许多其他细菌更容易清除, 尤其是当人工沉积而不是在原位形成孢子时。
结果的一致性	由于可变的自然生物负荷, 重复样品之间预期的结果不太一致。	复制样品之间预期的结果更加一致。
大约测试时间	3 天至 7 天(取决于自然生物负荷)。	2 天到 5 天(取决于所用的微器官)。
测试复杂性	会更加劳动密集型。	劳动强度可以降低。
方法挑战	自然生物负荷的稳定性, 不一致/可变生物负荷。	悬浮液干燥、结壳、粘附或不粘附期间结块。

C.1.4.4 如果产品在单独的容器中测试和/或使用不同的技术测试不同的部件, 则具有不同类型组件(如试剂盒、粉末)的复杂产品可能需要一种以上类型的生物负载回收效率测定。这可能需要对使用不同方法测试的项目应用一个以上的生物负荷校正系数。

C.1.4.5 如果生物负荷低, 并且如果需要更大样本量的被测产品, 那么可以将多个产品作为一个集合样本一起测试。在这种情况下, 单个产品上的生物负荷分布是不可见的。如果产品要定期汇集用于测试生物负载回收效率, 应以同样的方式进行测定。例如, 如果在常规测试期间将五种产品合并, 则应使用五种合并的产品进行生物负荷回收效率测定。

集合产品测试的生物负载回收效率结果可能因集合产品的数量而异。如果汇集的产品数量发生变化, 则应考虑对生物负荷回收效率进行新的评估。

使用重复恢复的验证

注意:这种方法使用生物负载,因为它在产品上自然发生,用于验证过程。有时它被称为“彻底的恢复”。

C.2.1 概述

C.2.1.1 该方法的基本原则是,应重复生物负荷测定方法,直到发现回收的微生物数量显著减少。每次重复后,洗脱液从产品或产品部分中完全回收并列举。比较连续回收率的累积结果。然而,应该注意的是,这种方法不一定精确。回收的微生物数量和产品上的实际数量之间的确切关系不能总是得到证明。

重复的确切次数取决于许多因素,包括产品的性质、构成生物负荷的微生物和初始污染水平。测试类似产品的初步实验或经验可用于确定要应用的重复次数。

C.2.1.2 最初应用去除方法后计数的菌落数表示为所有重复中菌落总数的一部分(即生物负荷回收效率)。

C.2.1.3 使用需氧菌计数进行重复回收已经是行业标准。好氧菌计数通常构成保健产品中的大多数微生物,因此,它是其他类型计数的恢复特性的有效表示。重复回收测试根据微生物附着在产品上的方式来衡量测试方法去除微生物的效率,因此这些动力学通常适用于所有类型的微生物。

C.2.2 举例说明生物负荷校正系数的计算

C.2.2.1 在本例中,通过重复治疗进行验证的一组数据显示在表 C.2 中。本例中的数据涉及十种重复保健产品,并包括重复恢复试验中的五种治疗。

C.2.2.2 根据表 C.2 中的数据,移除的比例可按表 C.3 所示进行计算

39

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

表 C.2 —重复恢复数据示例

产品项目	处理/提取(CFU)					总共 5 次治疗(CFU)	第一处理移除
	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%
首次治疗的平均恢复率			48.2%			CF = 2, 07 = 2, 1	
最坏情况下的恢复值			27.3%			CF = 3, 66 = 3, 7	
注:处理栏 1 至 5 中显示的计数已使用稀释因子进行了调整。使用未经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, 零计数是可以接受的。							

表 C.3 — 重复恢复数据示例

产品项目	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
通过第一次治疗恢复的数量	450	200	90	1 200	450	200	930	1350	120	480
恢复的总数	685	670	330	1 940	830	700	2 340	1 940	220	950
通过第一次治疗恢复	65.7%	29.9%	27.3%	61.9%	54.2%	28.6%	39.7%	69.6%	54.5%	50.5%
首次治疗的平均恢复	48.2%				校正系数= 2, 07 = 2, 1					

率		
最坏情况下的恢复值	27.3%	校正系数= 3, 66 = 3, 7

C.2.2.3 使用第一次处理的平均回收率和适当舍入，生物负荷回收效率的生物负荷校正系数将如公式(C.1)所示:

100

48 2

, = =

(C.1)

对于某些应用，使用最低恢复百分比值以反映最坏情况可能是合适的。这一决定取决于生物负荷估计的用途。对于表 C2 中给出的数据，包括适当舍入在内的最坏情况生物负荷校正系数将如公式(C2)所示:

100

27 3

, = =

(C.2)

40

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

C.3 产品接种方法

C.3.1 使用接种产品的验证

C.3.1.1 为了建立生物负荷回收效率，可以通过将已知数量的选定微生物接种到产品上来产生人工生物负荷。微生物可以是营养细胞，但最常见的方法是利用需氧细菌孢子。营养微生物的使用在实践中很困难，因为干燥时会丧失生存能力。

微生物接种有局限性，例如悬浮液的结壳、粘附或不粘附，以及接种物水平的结块和变化。接种产品时应考虑这些限制。

C.3.1.2 应制备用于接种产品的微生物悬浮液，并测定其活菌数。

C.3.1.3 建立适当的稀释可能需要初步实验。典型地，在产品上沉积已知水平的活微生物是合适的，这将在板计数步骤中产生可计数的范围。

C.3.1.4 应选择要确定生物负荷回收效率的许多产品或其部件。应逐个考虑无菌产品是否必要。每种产品接种一定体积的微生物悬浮液，如果适合特定产品，允许在层流条件下干燥。接种物的活菌数在接种时确定。

悬浮液应以这样的方式分布在产品上，即包括最难去除自然污染物的部分。接种时还应考虑产品的各种材料类型。

由吸收材料制成的产品的接种可以通过浸入选定微生物的悬浮液中来完成。这种方法可以使微生物在产品上均匀分布。

C.3.1.5 确定生物负荷的定义方法用于评估从产品中去除的接种微生物的数量。

C.3.1.6 去除的微生物数量表示为接种到产品上的数量的一部分。该分数可以针对每种产品进行计算，并用于建立生物负载回收效率。

C.3.2 举例说明使用产品接种计算生物负荷校正系数

C.3.2.1 在本例中，表 C.4 显示了通过接种回收进行验证的一组数据。这些数据涉及三个复制产品项目。

C.3.2.2 为了验证，选择了产品接种方法，因为初步实验表明生物负荷非常低。

C.3.2.3 制备萎缩芽孢杆菌(以前为枯草芽孢杆菌尼日尔变种)的水悬浮液，并测定悬浮液的活菌数。

41

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

C.3.2.4 制备悬浮液的稀释液，使 0.1 毫升等分试样平均含有 100 个孢子。每个装置接种 0.1 毫升这种稀释的悬浮液，并在层流下干燥。

C.3.2.5 对接种的产品进行选择的去除技术，去除的孢子平均数量为 76 个，范围从 68 到 83 个。

CFU 平均接种量	样品	恢复 接种量 CFU	回收效率 %
100	1	76	76, 0
	2	83	83, 0
	3	68	

			68, 0
		AVG 复苏	75, 7

C.3.2.6 生物负荷回收效率的生物负荷校正系数，包括适当的舍入，如公式(C.3)所示：

100

75 7

, = =

(C.3)

在一些应用中，可以决定使用百分比清除范围的最低值，以反映最坏的情况。这一决定将受到数据用途的影响。对于上述数据，最坏情况下的生物负荷校正系数，包括适当的舍入，将如公式(C.4)所示：

100

68 = =

(C.4)

C.3.3 举例说明两种生物负荷回收效率方法的比较

C.3.3.1 在本例中，表 C.5 中显示了两组用于回收验证的数据。公司根据风险建立了生物负荷回收效率的内部验收标准。这些数据涉及用一种技术测试的五种产品(初始测试)，平均回收率低于既定标准。因此，在现有技术中增加了一个额外的步骤，以确定生物负荷回收效率是否提高了(第二次测试)。

表 c . 5——两种回收方法生物负荷回收效率百分比的比较

技术

%生物负荷回收效率平均回收率 1 2 3 4 5

初始测试

用美国药典液体 D 进行 5 分钟机械摇动

37, 3 25, 2 50, 2 33, 7 29, 5 35, 2

第二次测试

用美国药典液体超声处理样品 5 分钟机械振荡+ 2 分钟

60, 2 64, 7 72, 1 68, 2 54, 5 63, 9

C.3.3.2 在修改原始技术后，生物负荷回收效率确实提高并符合既定标准。生物负荷数据的用途和所需的准确性将影响是否需要更一致的数据，或者生物负荷回收效率是否应该更高，以便更好地估计回收的生物负荷。

42

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

C.4 复杂产品测试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荷水平。该示例显示了两种不同的生物负荷校正因子如何应用于相应的生物负荷数据组。为了确定这种复杂产品的生物负荷水平，应将所有三个生物负荷估算值相加。

C.4.2 当测试组织和生物产品时，可从 AAMI TIR37 获得额外的指导。随着时间的推移有意分解的产品(如药物洗脱或生物可吸收产品)应考虑到生物负荷回收效率测试方法开发过程中的这些变化。

表 C.6 利用两个生物负荷校正因子和 MPN 结果确定的复杂产品生物负荷估计

容器	%生物负荷回收效率 产品部分#1 用冲洗法测试	%生物负荷回收效率 产品部分#2 测试使用 机械摇动五(5)分钟	%生物负荷回收效率 产品部分#3 使用粉末材 料的 MPN 测试
1	49, 5	79, 3	不适用
2	53, 9	89, 4	不适用
3	38, 4	67, 4	不适用
4	64, 3	76, 0	不适用
5	29, 7	69, 3	不适用
平均回收效率	47, 2	76, 3	不适用
相应的校正系数	2, 1	1, 3	N/Aa
生物负载回收效率和 MPN 结果的复杂产品实际应用			
生物负担恢复(在 CFU)	5	100	80 包括稀释因子

生物负担估计(CFU)	2, $1 \times 5 = 10, 5$	1, $3 \times 100 = 130, 0$	80
产品的总生物负荷估计 (在 CFU)	$10, 5 + 130, 0 + 80 = 220, 5$		
可能需要应用稀释系数。			

C.5 生物负荷校正因子的数据分析和应用

C.5.1 由于设计、材料、产品配置、制造工艺等的可变性。本文件不要求获得特定的生物负荷回收效率结果。然而，如果生物负荷回收效率结果低于目标或期望值，则应尝试另一种技术(例如添加另一种提取方法或延长当前提取方法)来确定是否可以获得更好的结果。

在确定保健产品所需的生物负荷恢复效率值时可以考虑的项目包括:

- a) 灭菌验证方法(例如，过度杀灭与基于生物负荷);
- b) 使用生物负荷数据(例如，支持灭菌验证方法、原材料筛选、趋势分析);

43

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

正在测试的产品或材料的类型(例如塑料和金属与吸收材料);

- d) 所用回收方法的稳健性(例如超声波处理、摇动或两者的组合)。

基于这些概念，低生物负荷回收效率(例如，吸收剂或复杂产品为 20 %)可以被认为是可接受的。如 C.2.2.3 和 C.3.2.6 中所述，考虑使用最低回收百分比值来反映最保守的最坏情况估计可能是合适的。此外，应该注意的是，有时不需要确定生物负载回收效率(例如，成分或原材料筛选，或者如果产品是过滤全部内容物的液体)。

在微生物测试方法中，预期获得比在更可预测的物理科学测试方法(例如化学或物理)中通常观察到的更多的可变性。这种较大的可变性很大程度上是由于微生物是有活力的，微生物的数量会随着时间的推移而变化，这取决于条件。还影响生物负载回收效率的其他因素可以包括微生物的聚集、沉积在产品表面上的微生物的一致性、产品的表面特征(例如，具有特定硅氧烷材料的涂层、高多孔表面积)、培养条件和/或检测或测量微生物的能力的固有限制。

然而，根据生物负荷数据的关键程度和用途，出乎意料的低或广泛分布的生物负荷回收效率可能并不合适，如果是这样的话，应研究进一步改进去除技术(例如通过拆卸、更强烈的机械振动、空腔的主动冲洗、冲洗时间的延长、洗脱液的修改来增强)。生物负荷数据的关键性和目的可以保证更多的努力和资源以获

得更好的恢复结果的一个例子是，当生物负荷数据被用于建立“基于生物负荷的”灭菌过程(例如，辐射灭菌，特别是需要低生物负荷计数的剂量证实方法)时。生物负荷数据的关键程度和用途可能不值得为获得更好的恢复结果付出更多努力和资源的一个例子是生物负荷成分筛选的应用。

C.5.2 在计算生物负荷回收效率时，没有必要将检测极限(例如，“小于”值)应用于零 CFU 值。

C.5.3 在审查生物负荷回收效率结果时，将所有值四舍五入到小数点后一位是合适的。

C.5.4 通过将生物负荷平均值乘以校正系数，将生物负荷校正系数应用于生物负荷数据。当应用了生物负荷校正因子后，得到的值称为生物负荷估计。在一些应用中，可以决定应用所获得的范围中的最低生物负荷恢复效率值来确定生物负荷校正因子，以反映最坏的情况。这一决定将受到数据用途的影响。

44

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

附件 D

(信息性)

典型的职责分配

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

制造商和实验室应达成协议，为完成本文件中定义的要求分配责任(4.2.2)。最终，制造商有责任确保满足要求。本附录给出了典型作业的信息。表 D1 中给出的要求是简略的。有关每个要求的详细信息，请参见具体条款。

条款	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	程序规范	r	r
4.1.2	文件和记录的审查和批准	r	r
4.1.2	文件和记录的控制	r	r
4.1.3	记录内容	不适用	r
4.1.3			r

	人员身份	不适用	
4.1.4	计算和数据传输的检查	不适用	r
4.2.1	实施和执行程序	不适用	r
4.2.2	职责分配	r	r
4.2.3	设备可用性	不适用	r
4.3.1	采购程序	不适用	r
4.3.2	设备校准	不适用	r
4.3.3	材料的制备和灭菌	不适用	r
4.4.1	不确定度测量	不适用	不适用
4.4.2	结果调查、纠正和预防措施	r	i
产品选择			
5.1.1	产品的选择和取样	r	i
5.1.2	产品系列的基本原理	r	i
5.1.3	取样的执行时间	r	i
5.2	样本项目部分	r	i
生物负荷的测定方法和微生物特征			
6.1.1	方法选择	r	r
6.1.2	抑制作用最小化	i	r
6.1.3	生物负荷去除效率	i	r
6.1.4	培养条件的选择	i	r
键 R =责任			

这可能涉及提供协助或信息，不适用

注:作为实验室基本方法验证的一部分，测试方法的一般能力被显示和记录。验证的产品特定方面作为产品特定报告的一部分进行记录。

45

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

条款	本文件的要求	典型责任	
		制造商	实验室
6.1.5	枚举技术的选择	不适用	r
6.2.1	微生物鉴定技术的选择	r	r
生物负荷测定方法的验证			
7.2 a)	测试方法适用性	r	r
7.2 b)	移除技术	r	r
7.2°c)	枚举的充分性	不适用	r
7.2 d)	微生物特征	不适用	r
生物负荷的常规测定和数据解释			
8.1	抽样检验方法	r	i
8.2	测试方法的选择	r	r
8.3	微生物表征程度	r	i
8.4	考虑适用的标准和要求	r	i
8.5	钉鞋的处理	r	i
8.6	可接受水平的规范	r	不适用

8.7	趋势	r	不适用
8.8	统计方法的应用	r	不适用
生物负荷测定方法的维护			
9.1	考虑制造/工艺变化	r	i
9.2	测试方法的改变	i	r
9.3	方法验证数据的审查	r	r
<p>键</p> <p>R =责任</p> <p>这可能涉及提供协助或信息，不适用</p> <p>注:作为实验室基本方法验证的一部分，测试方法的一般能力被显示和记录。验证的产品特定方面作为产品特定报告的一部分进行记录。</p>			

46

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

文献学

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

[1]

ISO 7870-2 控制图第 2 部分:休哈特控制图

[2]

国际标准化组织 7870-4, 控制图第 4 部分:累积和图

[3]

国际标准化组织 9000:2015, 质量管理体系——基础和词汇

[4]

国际标准化组织 9001, 质量管理体系——要求

[5]

国际标准化组织 11135, 医疗保健产品灭菌环氧乙烷医疗器械灭菌过程的开发、验证和常规控制要求

[6]

国际标准化组织 11137(所有部件), 医疗保健产品灭菌-辐射

[7]

国际标准化组织 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

国际标准化组织 11139:—2), 保健产品的灭菌—词汇

[8]

[9]

国际标准化组织 11737-2, 医疗器械灭菌微生物学方法第 2 部分:灭菌过程定义、验证和维护中无菌性试验

[10]

国际标准化组织 13022, 含有活人体细胞的医疗产品——风险管理的应用和加工实践的要求

[11]

国际标准化组织 14160 《保健产品的灭菌——利用动物组织及其衍生物的一次性医疗器械的液体化学灭菌剂——医疗器械灭菌过程的表征、开发、验证和常规控制要求》

[12]

国际标准化组织 14937, 《医疗保健产品的灭菌——灭菌剂特性和医疗器械灭菌过程的开发、验证和常规控制的一般要求》

[13]

国际标准化组织 17665(所有部件), 保健产品灭菌-湿热

[14]

国际标准化组织 20857, 医疗保健产品灭菌干热医疗器械灭菌过程的开发、验证和常规控制要求

[15]

国际标准化组织 22442-3, 利用动物组织及其衍生物的医疗器械第 3 部分:病毒和可传播海绵状脑病病原体的消除和/或灭活的验证

[16]

软件工程——将国际标准化组织 9001:2008 应用于计算机软件的指南

[17]

AAMI TIR37, 医疗保健产品灭菌—辐射—生物制品和组织基产品灭菌指南

[18]

ASTM D4855-97, 试验方法比较的标准实施规程

[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]

生物负荷分布度量的注释:对数正态分布。伽玛和电子束面板。2010年3月

[21]

用于测试原材料微生物含量的模型系统。Pharm. 技术。1980年, 4(2), 49-51

2)正在准备中。出版时的阶段:国际标准化组织/DIS 11139:2017。

47

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18
09:23

[22]

[23]

[24]

[25]

[26]

[27]

[28]

[29]

[30]

[31]

[32]

[33]

[34]

[35]

[36]

[37]

[38]

[39]

[40]

[41]

48

生物负荷估计:不仅仅是数学,还有微生物学。来自现场的 AAMI 工业灭菌研究。2013

布达佩斯专利和程序微生物保藏国际认可条约,布达佩斯,1977年4月28日,1980年9月26日修订

低生物负荷产品的平均生物负荷值的估计,医学博士+医学博士。2011年7月,33(7)

柯林斯,加州大学,林恩,下午,格兰奇,J.M.柯林斯和林恩的微生物学方法。第七版。牛津巴特沃斯-海涅曼有限公司。1995

已更正 J.C. M.P.N.表格。欧洲微生物学杂志。1983年,17,301-305

美国食品和药物管理局细菌分析手册,附件2,2010年10月

北卡罗来纳州霍尔。皮下产品上出现异常高的灭菌前微生物计数(“峰值”)。辐射状。物理化学。1983年,22(3-5),663-666

AOAC 国际定性和定量微生物学方法验证指南。AOAC 国际杂志。1999年,82(2),402-415

国际协调会议分析方法验证:定义和术语(CPMP/ICH/381/95)

国际协调会议分析方法验证:方法学(CPMP/ICH/281/95)

空气中细菌定量测定方法的比较和总活菌数的评估。应用环境。微生物。1982年,44(1),179-183

个人数字助理生物负荷恢复验证工作组。技术报告:生物负载恢复验证。肠胃外科学技术杂志。1990年,44(6),324-331

掌上电脑技术报告第33号。交替和快速微生物检测方法的评估、验证和实施。2013

欧洲药典,第5.1.6章微生物质量控制的替代方法。欧洲药品和医疗质量管理局。2015年,27.1:8

使用超声波能量评估表面微生物污染。应用微生物。1967年,15(6),1345-51

莱斯, 东部, 贝尔德, R.B., 伊顿, A.D., 克莱塞里, L.S.(编辑)。水和废水检验的标准方法。第22版。美国公共卫生协会、美国水利协会、水环境联合会, 2012年

无菌测试。制药工程。1987年11月/12月, 35-37日

石油基软膏的改进可行计数法。J. Pharm. Sci. 1964, 53, 103-107

美国药典, USP 40/NF 35, 2017, < 1223 >替代微生物学方法的验证, 美国药典有限公司:马里兰州洛克维尔, 2017年

美国药典, USP 40/NF 35, 2017, < 1225 >药典程序验证和< 1226 >药典程序验证。美国药典会议有限公司, 马里兰州洛克维尔, 2017年

国际标准化组织 2018 -保留所有权利

本页故意空白。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

本页故意空白。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

本页故意空白。

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

国际标准化组织 11737-1:2018(英)

normen-Download-Beuth-tüV süd AG Verlag-KDnr . 7031496-LFnr . 8247813001-2018-01-18 09:23

ics 11.080.01; 07.100.10

价格基于 48 页

国际标准化组织 2018 -保留所有权利