检测医疗器械非织造布包装材料中初始污染菌的方法

李 翠[1]，马 恒[1]，苗策禹[2]，刘兴翠[1]，郝树彬[1]*
（1. 山东省医疗器械和药品包装检验研究院，国家药品监督管理局医用卫生材料及生物防护器械质量评价重点实验室，山东济南 250101；2. 山东省食品药品审评查验中心，山东济南 250101）

摘要：建立了一种适合医疗器械初包装材料即非织造布包装材料的初始污染菌检测方法。通过设计不同的微生物洗脱方式及参数，根据方法回收率的比较结果得到超声波洗脱法的洗脱效果最好，微生物平均回收率（n=10）达 52.2%。通过单因素试验以及正交试验，确定超声波洗脱法采集微生物的最佳工艺参数，即超声时间 10 min，超声功率 40 kHz，洗脱液中 Tween-80 的用量为 2 g/L，洗脱液体积 200 ml，此时微生物采集回收率提高到 67.2%，较未优化前提高了 15.0%，为该包装材料的初始污染菌检测方法提供了参考。

关键词：医疗器械；非织造布包装材料；初始污染菌
中图分类号：R181 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2022)04-0567-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.04.021

Detection Methods of Initial Contaminating Bacteria in Nonwoven Packaging Materials

LI Cui[1], MA Heng[1], MIAO Ceyu[2], LIU Xingcui[1], HAO Shubin[1]*
(*1. NMPA Key Lab. for Quality Evaluation of Medical Materials and Biological Protective Devices, Shandong Institute of Medical Device and Pharmaceutical Packaging Inspection, Jinan 250101; 2. Food and Drug Evaluation and Inspection Center of Shandong Province, Jinan 250101*)

ABSTRACT: A detection method of initial contaminating bacteria was established for the determination of primary packaging material of medical devices, namely nonwoven packaging materials. By designing different microbial elution methods and parameters, and according to the comparison results of the method recovery, the average microbial recovery (n=10) of ultrasonic elution method was the highest that reached 52.2%. According to the results of single factor experiment and orthogonal experiment, the ultrasonic elution method to collect microorganism was determined as the optimal with the following settings: the ultrasonic time was 10 min, the ultrasonic power was 40 kHz, the amount of Tween-80 in the eluent was 2 g/L, and the eluent volume was 200 ml. The recovery of microorganism collection was increased to 67.2%, which was 15.0% higher than that before optimization, which provided a reference for the initial contamination bacteria detection of the packaging material.

Key Words: medical device; nonwoven packaging material; initial contaminating bacteria

医疗器械初包装是指与医疗器械直接接触的包装材料，即医疗器械的单包装或内包装。据美国 FDA 统计，约 13%医疗器械产品的不合格召回都直接或间接与其外包装有关，如果包装的无菌屏障系统失效，将会对患者和医护人员的生命健康造成威胁[1]。全球多地将销往医疗机构并用于机构内灭菌的预成型无菌屏障系统视为医疗器械进行管理[2]。

初始污染菌，又称生物负载，是指产品和（或）包装上存活的微生物总数。医疗器械初包装作为无

收稿日期：2021-05-17
作者简介：李 翠(1989—)，女，硕士，从事医疗器械检测和相关标准化、科研工作。
通信作者：郝树彬(1979—)，男，高级工程师，从事医疗器械检测和相关标准化、科研工作。
E-mail：530082989@qq.com

菌医疗器械的重要组件，其初始污染菌的控制意义重大。目前，医疗器械包装行业绝大多数是控制医疗器械本身的初始污染菌含量，对于与医疗器械直接接触的初包装材料中的初始污染菌，由于没有相应的行业标准或国家标准加以控制，导致监管部门也没有实际的管控能力，且医疗器械外包装材料的厂商也很难做到初始污染菌的试验和数量控制。但是，无菌医疗器械初包装上的生物负载会影响无菌医疗器械灭菌剂量参数的设定，若仅注重产品上的生物负载，而忽略产品初包装的生物负载，会给无菌医疗器械产品的质量控制带来较大的风险[3]。

目前，对于医疗器械生产行业来说，常用的灭菌包装材料有：多孔材料（即透气性材料，如纸、非织造布包装材料）以及不透性材料（如塑料薄膜等）；常用的包装形式（无菌屏障系统）有：软吸塑盒、硬吸塑盒、顶头袋、窗口袋等[4]。非织造布包装材料具有纸张、薄膜和布三者的性能[5]，其由无数的细小聚乙烯纤维纺黏连而成的纺黏型烯烃，这种独特的喷纺技术能生产出质量轻、强度高、耐久性强、非常坚韧的非织造布材料，该产品应用在医疗器械包装方面，让人们可以利用更少量的包装材料来保护较重的、精巧的或形状独特的部件，是目前公认的最好的医疗包装材料。

非织造布材料因其独特的结构，具有良好的防湿防干、抗微粒物的性质，并能够很好地阻挡细菌侵入，在抗微生物渗透性方面有较强的优势；具体表现为出色的微生物阻隔性能：即使在高污染环境中，非织造布材料依然能保持高度抵抗细菌孢子及其他污染微生物入侵的能力[6]。该材质在微生物阻隔方面的特殊优势，一定程度上也加剧了在其初始污染菌的检测中对污染物的洗脱难度。本研究以非织造布包装材料包装袋为研究对象，通过设立不同试验参数对微生物回收率进行对比分析，进而通过试验优化，以期建立适合医疗器械非织造布包装材料的初始污染菌检测方法。

1　仪器与试药

Stomacher 400 型拍打式匀浆器（英国 Seward 公司）；WS-100D 型往复式摇床（德国 Wiggens 公司）；KQ-100DE 型超声波清洗器（昆山超声仪器有限公司）；Miuiflexplus Mxp pump01 型微生物过滤装置和水系微孔滤膜（直径 50 mm，孔径 0.45 μm）均购与美国 Millipore 公司；MS1602TS 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液（批号 K0432Y）和胰酪大豆胨琼脂培养基（批号 K2542Y）均购于广东环凯技术股份有限公司；蛋白胨（北京奥博星生物技术有限责任公司，批号 20200618）；氯化钠（含量≥ 99.5%，批号 20181226）和 Tween-80（化学纯，批号 20200609）均购于国药集团化学试剂有限公司。

萎缩芽孢杆菌 ATCC9372 芽孢悬液（美国 MesaLabs 公司，菌含量 2.1×10^5 cfu/ml，批号 SSG-610）。

非织造布包装材料卷袋（安庆市康明纳包装公司，规格 100 mm×100 m）。

2　方法与结果

2.1　微生物采集方式的选择

本次试验依据 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》[7]，根据非织造布包装材料的特殊性，选择采用袋蠕动（采用拍打式匀浆器，200 r/min，2 min）、往复式振摇（采用往复式摇床，250 r/min，5 min）、手动振摇（2 min）、超声波洗脱（采用超声波清洗器，40 kHz，5 min）4 种微生物采集（洗脱）方式，洗脱液参照欧洲标准委员会 EN 14683: 2019《Medical face masks−Requirements and test method》附录 D 中口罩生物负载检测所用的洗脱液[8]，其中活性成分改用 Tween-80 溶液（含蛋白胨 1 g/L、氯化钠 5 g/L、Tween-80 2 g/L），参照 GB/T 19973.1—2015 中的人工接种法进行回收率对比研究[7]。①制备接种芽孢悬液：用 40% 乙醇稀释萎缩芽孢杆菌 ATCC9372 芽孢悬液至菌浓度为 500 ～ 1 000 cfu/ml，并精确测定接种芽孢悬液 0.1 ml 中的芽孢数；②制备人工污染试样：取试样面积为 100 cm^2，向试样上接种上述接种芽孢悬液 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，菌液始终保持在试样表面），干燥完成后，剪碎备用；③洗脱：将上述制备的人工污染试样分别投入洗脱液 200 ml 中，浸泡 30 min 后，采用上述 4 种洗脱方式，每种方法分别制备 10 个人工污染试样；④计算微生物回收率：取人工污染试样 200 ml 进行薄

膜过滤，用 pH 7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液冲洗滤膜，将滤膜置胰酪大豆胨琼脂培养基平板上，于 30 ～ 35 ℃培养 3 d。点计平板上的菌落数并进行记录，按公式［回收率 = 试样洗脱菌落数（cfu）/ 接种芽孢数（cfu）×100％］计算每个试样的回收率。

结果显示，4 种洗脱方式（袋蠕动、往复式振摇、手动振摇、超声波洗脱）的平均回收率（n=10）分别为 19.9％、23.1％、31.8％、52.2％，RSD 分别为 12.0％、16.3％、14.6％、10.3％，超声波洗脱方式的微生物采集回收率最高。此外，在试验过程中发现，采用袋蠕动、往复式振摇、手动振摇 3 种洗脱方式，由于洗脱液中含有活性成分（Tween-80），在经过振摇或者拍打后出现较多泡沫，即便静置一段时间，泡沫的存在还是会影响过滤效果，导致上述 3 种方法表现出较低的微生物采集回收效率，故本研究选择超声波洗脱法。

2.2 超声波洗脱试验优化

2.2.1 超声波洗脱单因素试验设计及结果

上述 4 种洗脱方式中，超声波洗脱的微生物采集回收率最高，为优化该试验条件，将超声时间、超声功率、洗脱液中 Tween-80 的用量及洗脱液体积作为考察重点，通过单因素试验研究上述因素对微生物采集回收率的影响（分别进行 2 组平行试验）。

超声时间的选择：取 100 cm^2 样品，按“**2.1**”项下方法处理后，在超声功率 30 kHz、洗脱液中 Tween-80 用量 2 g/L、洗脱液体积 200 ml 的条件下，分别按 2、4、6、8、10、12 min 的超声时间进行处理。

超声功率的选择：取 100 cm^2 样品，按“**2.1**”项下方法处理后，在超声时间 8 min、洗脱液中 Tween-80 用量 2 g/L、洗脱液体积 200 ml 的条件下，分别按作用功率 15、20、25、30、35、40 kHz 进行处理。

洗脱液中 Tween-80 的用量：取 100 cm^2 样品，按“**2.1**”项下方法处理后，在超声时间 8 min、超声功率 30 kHz、洗脱液体积 200 ml 的条件下，分别按洗脱液中 Tween-80 用量为 1.5、2、2.5、3、3.5、4 g/L 进行处理。

洗脱液体积的选择：取 100 cm^2 样品，按“**2.1**”项下方法处理后，在超声时间 8 min、超声功率 30 kHz、洗脱液中 Tween-80 用量 2 g/L 的条件下，分别按洗脱液体积 140、160、180、200、240、260 ml 进行处理。

结果见图 1，随着超声时间和超声功率的增加，微生物采集回收率逐渐提高。附着在包装材料上的污染菌在超声作用下被洗脱下来，较长的超声作用时间和功率会促进污染菌与包装材料分离，加速对污染菌的洗脱。因此，选择超声时间 8、10、12 min 作为正交试验的超声波洗脱时间因素水平，超声功率 30、35、40 kHz 作为正交试验的超声波功率因素水平。洗脱液中添加适量的 Tween-80 能够提高微生物采集回收率，但 Tween-80 的用量持续增大后，洗脱液黏稠度增加，导致接种的污染菌与载体材料分离困难，洗脱效率明显降低。因此，选择 Tween-80 用量分别为 1.5、2、2.5 g/L 作正交试验的 Tween-80 用量因素水平。洗脱液体积对微生物采集效果的影响较小，但一定程度上也对污染菌的洗脱效率产生影响，因此选择峰点附近的 3 个点：180、200、240 ml 作为正交试验的洗脱液体积因素水平。

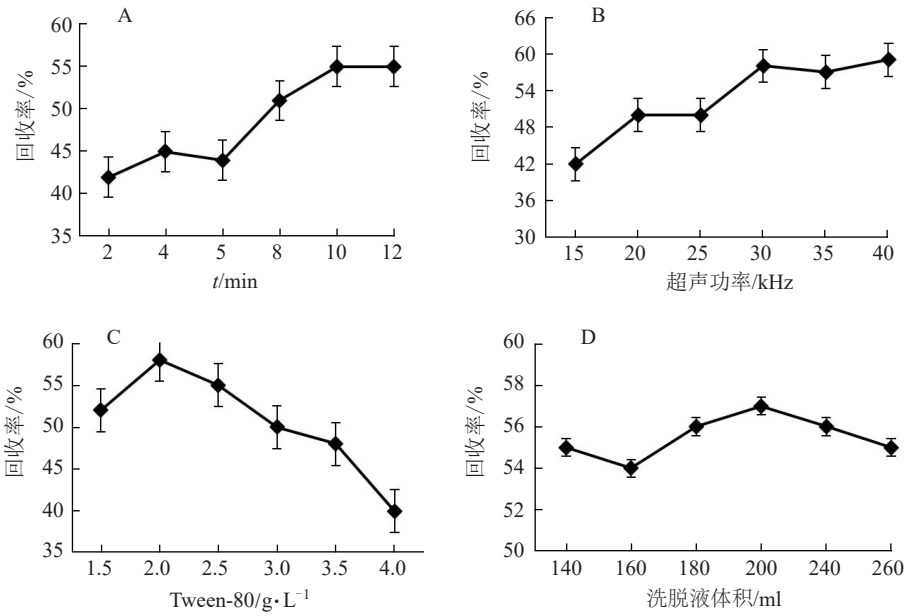
2.2.2 正交试验设计与结果

在上述单因素试验的基础上，对超声时间（A，8、10、12 min）、超声功率（B，30、35、40 kHz）、洗脱液中 Tween-80 的用量（C，1.5、2、2.5 g/L）、洗脱液体积（D，180、200、240 ml）4 个因素作 3 水平的正交试验 $L_9(3^4)$。以微生物采集回收率为评价指标，研究超声波洗脱法采集微生物的最优工艺。

正交试验结果显示，影响微生物采集回收率因素的顺序为 $C>B>A>D$，其中洗脱液中 Tween-80 的用量对微生物洗脱效果的影响最大，超声功率影响次之，影响最小的是洗脱液体积。由试验结果确定超声波洗脱法采集微生物的最佳工艺为 $A_2B_3C_2D_2$，即超声时间 10 min，超声功率 40 kHz，洗脱液中 Tween-80 的用量为 2 g/L，洗脱液体积 200 ml。

2.2.3 确证试验

通过正交试验结果得超声波洗脱法采集微生



A：超声时间，B：超声功率，C：Tween-80 的用量，D：洗脱液体积

图 1　单因素试验中微生物采集回收率曲线（*n*=2）

Fig.1　Microbial Collection Recovery Curves in Single Factor Tests（*n*=2）

物的最优工艺，按照该方法进行试验，重复 10 次，验证方法的重复性及稳定性。结果显示，在最优洗脱条件下，微生物采集平均回收率（*n*=10）提高到 67.2%，SD 为 4.2%，变异系数为 7%，较未优化前（52.2%）提高了 15.0%；符合《中华人民共和国药典》2020 年版四部 1105 非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法中规定的“微生物回收率应在 0.5 ～ 2 内”的要求。且该方法 SD 为 4.2%，变异系数为 7%，说明数值之间的离散程度较小，方法稳定性较好。

3　小结

本试验通过设计不同的洗脱方式及参数，根据方法回收率比较结果，结合非织造布包装材料结构的特殊性，在综合风险分析的基础上得到可行的试验方法。Tween-80 是一种非离子型表面活性剂，具有较强的去污能力，但是由于 Tween-80 的存在，袋蠕动、往复式振摇、手动振摇的过程中会出现大量泡沫而影响微生物回收，超声波洗脱法因避免过度振摇表现出较好的微生物洗脱效果；国际标准化组织（ISO）11737-1：2018 标准中也提到，超声波洗脱尤其适用于不可渗透的固体试验样品以及形状复杂的产品 [9]。通过单因素试验以及正交试验设计，得超声波洗脱的最佳方法，即样品取样面积为 100 cm^2，剪碎后在洗脱液（含蛋白胨 1 g/L、氯化钠 5 g/L、Tween-80 2 g/L）200 ml 中浸泡 30 min，超声波振荡 10 min，超声波功率为 40 kHz，采用薄膜过滤对洗脱液进行微生物回收。正交试验结果表明洗脱液中 Tween-80 的用量对微生物洗脱效果影响最大，且用量加大后洗脱效果反而较低，马妮等在对医用一次性防护服进行生物负载检测时，发现添加表面活性剂后的微生物回收率反而低于普通洗脱液，因此需严加控制表面活性剂的使用量 [10]。

本研究以医疗器械非织造布包装材料为研究对象，建立了该材质初始污染菌的检测方法。鉴于医疗器械初包装材料的多样性，其他材质如硬塑盒类、纸塑袋类，因其产品本身的材质属性与非织造布包装材料不一致，后期研究中发现本次研究所采用的超声波洗脱方式并不适用于后者，仍需就特定产品展开特定的方法研究。鉴于本次试验建立的初始污染菌检测方法的稳定性以及回收率均良好，使用者可参照本研究提供的检测方法及思路，结合自身产品的性状、特点建立适宜的方法。

参考文献：

[1] 李浩鹏, 杨 阳, 沈以凌, 等. 浅谈无菌屏障系统的现状及有效性验证[J]. 塑料包装, 2019, **29**(2): 25-26.

[2] 魏增江, 孙兆霞, 何泽文. 无菌医疗器械包装评价及审评要点[J]. 中国医疗器械信息, 2019, **25**(7): 4-6.

[3] 李梦媛, 沈以凌, 张 悦, 等. 无菌医疗器械包装生物负载对产品的影响[J]. 塑料包装, 2019, **29**(2): 27-29.

[4] 秦 蕾. 无菌医疗包装是无菌医疗器械安全的基本保证[J]. 中国医疗器械信息, 2015, **21**(4): 13-16.

[5] 杨朝银. TYVEK-未来包装的新材料[J]. 塑料科技, 1990, (3): 39-42.

[6] 佚名. 杜邦™Tyvek®在预防医院获得性感染(HAI)中的作用[J]. 中国医疗器械信息, 2012, **18**(11): 74-75.

[7] 国家标准化管理委员会. 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.

[8] European Committee for Standardization. EN 14683: 2019《Medical face masks-Requirements and test method》[S]. European: BSI Standards Publication, 2019.

[9] Comité Européen de Normalisation. Sterilization of health care products-Microbiological methods-Part 1: Determination of a population of microorganisms on products (ISO 11737-1:2018)[S]. Switzerland, 2018.

[10] 马 妮, 董慧明, 刘 霓, 等. 医用一次性防护服生物负载量检测技术研究[J]. 中国医疗器械信息, 2020, **26**(11): 9-11.

(上接第566页)

2 的质谱响应较高，但其溶液状态极不稳定，通过不断调整稀释液，发现 **2** 在酸性条件下稳定性较好，通过比较 **2** 在甲酸、高氯酸、盐酸溶液中的稳定性，最终选择 0.4%盐酸：乙腈 (90 ： 10) 作为稀释液，且 **2** 在 5 ℃放置 11 h 内稳定。

在进行加标回收率试验时发现，**1** 的加入会对 **2** 的检测造成较大的基质效应，因 **2** 的响应较好，通过降低 **1** 的质量浓度可以降低基质效应的影响。最终选择 **1** 的加入浓度为 50 μg/ml，可同时满足 **2** 的检测灵敏度及检测准确度要求。

参考文献：

[1] 石劲敏, 李 端. 手性非甾体类抗炎新药依托度酸[J]. 中国临床药学杂志, 2000, **9**(5): 321-324.

[2] 彭朝权, 余步云, 赵长林, 等. 依托度酸治疗骨关节炎的临床观察[J]. 广东药学院学报, 2000, **16**(2): 138-140.

[3] 余 莲. 新型非甾体抗炎药物——依托度酸[J]. 中国药业, 2001, **10**(4): 30-31.

[4] 马 磊, 马玉楠, 陈 震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(18): 2106-2111.

[5] 张乃华, 鲍广龙, 聂建兵, 等. 依托度酸的合成工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2021, **52**(4): 495-498.

[6] 徐梅桔, 方晓萍, 史 磊. HPLC 法测定依托度酸中的邻乙基苯胺和邻乙基苯肼[J]. 中国石油和化工标准与质量, 2020, **40**(20): 63-65.

[7] ICH. M7(R1). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk [EB/OL]. [2021-02-02]. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/m7-assessment-and-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential.