

传统型血袋无菌检测新技术研究

张萌萌, 莫伟娜, 栾园园, 马延兴, 郝树彬* (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, 济南 250101)

摘要 目的: 建立传统型血袋无菌检查新方法。方法: 以传统型血袋为研究对象, 采用“培养基冲洗法”“培养基灌装法”2种新的无菌检查方法和传统薄膜过滤法进行方法适用性试验, 以确定所设计方法对该产品的适用性; 另选取萎缩芽孢杆菌(ATCC 9372)作为代表性菌株污染血袋, 选取4个稀释梯度, 进行3种方法的检出率对比研究以得到最优的无菌检查方法。结果: 方法适用性试验中试验菌均生长良好; 3种不同方法中培养基灌装法检出率最高, 其次为培养基冲洗法, 均优于传统的薄膜过滤法。结论: 3种方法均适用于传统型血袋产品的无菌检查; 但培养基灌装法检出率高且降低了假阳性概率及试验操作成本, 为传统型血袋无菌检验的首选方法。若存在产品材质影响结果观察等情况, 可选择培养基冲洗法进行该类产品的无菌检验。

关键词: 传统型血袋; 无菌检查; 方法适用性; 薄膜过滤法; 培养基冲洗法; 培养基灌装法

中图分类号: R95; Q93-332 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)02-0154-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.02.007

Study on New Technology for Sterility Test of Traditional Blood Bags

Zhang Mengmeng, Mo Weina, Luan Yuanyuan, Ma Yanxing, Hao Shubin* (Shandong Institute of Medical Device and Pharmaceutical Packaging Inspection, NMPA Key Laboratory for Quality Evaluation of Medical Materials and Biological Protective Devices, Jinan 250101, China)

Abstract Objective: To establish a new method for sterility test of traditional blood bags. **Methods:** Taking traditional blood bags as the research object, and the two new sterility test methods of "medium flushing method", "medium filling method" and the traditional membrane filtration method were carried out to determine the applicability of the designed method to the product. *Bacillus atrophicus* (ATCC 9372) was selected as the representative strain to contaminate the blood bag, and four different dilution gradients were selected to conduct comparative study on the detection rates of the three methods, so as to obtain the optimal sterility test method. **Results:** All the bacteria grew well in the applicability test; among the three methods, the medium filling method had the highest detection rate, followed by the medium flushing method, which were superior to the traditional membrane filtration method. **Conclusion:** The three methods are suitable for sterility test of traditional blood bags. However, the medium filling method has a high detection rate and reduces the false positive probability and the operating cost of the test, so it is the preferred method for the sterility test of traditional blood bags. When the material of the product affects the observation of the results, the medium flushing method could be chosen to conduct the sterility test of such products.

Keywords: traditional blood bags; sterility test; method applicability; membrane filtration method; medium flushing method; medium filling method

血袋是大输液类典型产品,通常由血袋、管路等组成,为封闭的单袋或多联袋系统,用于血液或血液成分的采集、处理、保存和输注^[1]。主要分为传统型血袋和含特殊组件的血袋系统2种,为无菌提供,一次性使用。GB14232.1-2004《人体血液及血液成分袋式塑料容器第1部分:传统型血袋》对塑料血袋的定义为可带采血管和针、输血插口、抗凝剂和(或)保养液,以及转移管的袋式塑料容器和附属血袋。血袋既关系到献血者的健康,又影响到用血者的安全,终端灭菌可降低外源污染因子污染传播的风险,从而减少输血风险和医疗事故^[2-4]。一般情况下,含保存液的血袋多采用高压蒸汽灭菌和辐照灭菌,不含保存液的血袋采用环氧乙烷灭菌。无菌检查是保证医疗器械安全性的关键环节,是无菌医疗器械的必检项目^[5-7]。适合的无菌试验方法对于医疗器械的无菌检查至关重要,既要确定该方法的适用性,又要尽可能地提高方法检出率,同时降低假阳性和假阴性概率^[8-9]。

目前,医疗器械主要按照2020年版《中华人民共和国药典》(以下简称药典方法)和GB/T14233.2-2005《医用输液、输血、注射器具检验方法第2部分:生物学试验方法》(以下简称国标方法)进行无菌检查^[10-11]。针对血袋产品的无菌检查方法主要有2种,分别是药典方法“用50~100 mL冲洗液分别冲洗内壁,收集冲洗液进行薄膜过滤”和国标方法“将容器内已装有的液体直接作为供试液或将空容器按容器内表面积每10 cm²加入浸提介质1 mL,振摇数次,制备供试液”。2种方法均需进行冲洗,若洗脱率较低,会直接引起试验结果的假阴性。且若按国标方法中的浸提比例进行操作,血袋中加入的浸提液较少,不足以洗脱至整个产品。在这种情况下,本研究选取了“培养基冲洗法”和“培养基灌装法”2种新的无菌检测技术^[12],其中培养基冲洗法是指采用培养基代替无营养成分的冲洗液对容器内腔进行冲洗,然后对培养基回收后进行直接培养;培养基灌装法是指将培养基灌装入容器内腔直接进行培养。本研究以传统型血袋为研究对象,采用“培养基冲洗法”“培养基灌装法”2种新的无菌检查方法与传统薄膜过滤法进行方法适用性试验;选取萎缩芽孢杆菌(ATCC 9372)作为代表性菌株污染血袋,并选取4个稀释梯度,进行3种方法的检出率对比研究以得到最优的无菌检查方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

IPP750plus型低温培养箱(Memmert公司); AW200SG型厌氧工作站(ELECTROTEK公司); MS1602S型电子天平(METTLER TOLEDO公司); AVC-6D1型超净工作台(ESCO公司); BSC-2000 II A2-X型生物安全柜(济南鑫贝西生物技术有限公司); DX-150-2D双扉灭菌器(Systec公司); GmbH DE-90型高压灭菌器(Systec公司); LSIS-B2V/VIC111型电热干燥箱(MMM公司); SYMBLFH03型集菌仪(Merck Millipore公司)。

1.2 材料

1.2.1 样品

一次性使用塑料血袋(规格:100 mL空袋,批号:20200411),购自于山东威高集团医用高分子制品股份有限公司。

1.2.2 培养基与试剂

硫乙醇酸盐流体培养基(FTM,规格:500 g,批号:6314700)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB,规格:500 g,批号:6307716)均购自于美国BD公司;胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA,规格:90 mm,批号:20201025-2)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA,规格:90 mm,批号:20201107)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB,规格:400 mL,批号:20201112)、硫乙醇酸盐流体培养基(FTM,规格:200 mL,批号:20201229),均购自于北京三药科技开发公司。以上培养基适用性检查均符合《中华人民共和国药典》2020年版规定。0.9%氯化钠注射液(规格:500 mL,批号:SD20083107),购自于山东华鲁制药有限公司。

1.2.3 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、生孢梭菌[CMCC(B)64941]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]均购自于北京三药科技开发公司。萎缩芽孢杆菌ATCC 9372(浓度:1.9×10⁸ cfu·0.1 mL⁻¹),购自于Mesa Labs。

1.2.4 耗材

一次性使用溶药注射器(规格:30 mL,批号:200217),购自于山东新华安得医疗用品有限公司。

薄膜过滤器(规格:CNHALA310,批号:

T19A33131), 购自于MILLIPORE公司。

2 试验方法

2.1 无菌检查方法适用性试验

2.1.1 菌液制备

将金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉分别按照菌株说明书进行操作, 使用前将未开启的西林瓶平衡至室温, 吸取复溶液1 mL加入1支西林瓶中, 涡旋震荡5~10 s, 制成每0.1 mL含菌数不大于100 cfu的菌悬液。取0.1 mL菌悬液, 按平皿法测定菌落数, 每株试验菌平行制备2个平皿以确认其浓度符合要求。

2.1.2 适用性试验

薄膜过滤法: 使用一次性使用注射器向每个血袋中注入100 mL 0.9% 无菌氯化钠溶液, 手动振摇2 min后, 无菌操作, 回收冲洗液, 使用集菌仪将冲洗液经薄膜过滤器过滤, 过滤完成后向滤器中加入100 mL FTM/TSB培养基进行培养。

培养基冲洗法: 使用一次性使用注射器向每个血袋中注入公称容量的FTM/TSB培养基, 手动振摇2 min后, 取培养基直接转移至无菌试管中进行培养。

培养基灌装法: 使用一次性使用注射器向每个血袋中注入公称容量的FTM/TSB培养基, 盖上护帽直接进行培养。

试验组: 取经薄膜过滤法/培养基冲洗法/培养基灌装法处理后获得的盛有FTM培养基的容器各3份, 分别接入不大于100 cfu的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌, 置32.5 °C培养5 d, 观察结果; 取经薄膜过滤法/培养基冲洗法/培养基灌装法处理后获得的盛有TSB培养基的容器各3份, 分别接入不大于100 cfu的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉, 置22.5 °C培养5 d, 观察结果。

对照组: 另取装有同体积培养基的相应容器, 加入等量试验菌, 同试验组培养, 观察结果。

2.2 3种方法检出率对比研究

2.2.1 人工污染典型试样

a. 菌悬液制备

用移液枪取0.1 mL浓度为 1.9×10^8 cfu · 0.1

mL⁻¹的ATCC 9372菌悬液加入到9.9 mL 40%酒精溶液中, 制成 1.9×10^6 cfu · 0.1 mL⁻¹的菌悬液, 并依次梯度稀释至 1.9×10^4 cfu · 0.1 mL⁻¹、 1.9×10^2 cfu · 0.1 mL⁻¹, 将浓度为 1.9×10^2 cfu · 0.1 mL⁻¹的菌悬液记为A(梯度1), 取5 mL菌悬液A加入到5 mL 40%酒精溶液中得到菌悬液1/2A(梯度2), 并依次梯度稀释得到菌悬液1/4A(梯度3)、菌悬液1/8A(梯度4)。分别取梯度1至梯度4的菌悬液100 μL进行菌落计数, 每个梯度选取2个平板进行计数。

b. 人工污染试样的制备

将“2.2.1”节制备的梯度1至梯度4的ATCC 9372菌悬液0.1 mL接种至无菌血袋内部, 晃动血袋使菌悬液分散在血袋中, 然后置于干燥箱中在55 °C下烘干4 h, 每个接种梯度制备90个染菌血袋。

2.2.2 供试品处理及接种培养基

每个接种梯度各取30个染菌血袋, 按照“2.1.2”节下薄膜过滤法/培养基冲洗法/培养基灌装法进行操作。

2.2.3 阳性对照

每种方法各取4个无菌血袋, 按照“2.1.2”节下薄膜过滤法/培养基冲洗法/培养基灌装法进行操作。向胰酪大豆胨液体培养基/硫乙醇酸盐流体培养基中加入ATCC 9372, 使其梯度浓度同梯度1至梯度4。

2.2.4 阴性对照

每种方法各取4个无菌血袋, 按照“2.1.2”节下薄膜过滤法/培养基冲洗法/培养基灌装法进行操作。

2.2.5 培养及观察

将上述含胰酪大豆胨液体培养基的滤器/试管/血袋在22.5 °C的低温培养箱中培养14 d后观察结果; 将上述含硫乙醇酸盐流体培养基的滤器/试管/血袋在32.5 °C的低温培养箱中培养14 d后观察结果。阳性对照培养5 d。

3 试验结果

3.1 无菌检查方法适用性试验的试验结果

计数结果见表1。

表1 菌落计数结果

项目	金黄色葡萄球菌 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	大肠埃希菌 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	生孢梭菌 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	枯草芽孢杆菌 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	白色念珠菌 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	黑曲霉 / (cfu · 0.1 mL ⁻¹)
平皿 1	88	84	45	99	80	72
平皿 2	96	72	54	85	92	88

血袋3种不同无菌试验方法的无菌检查方法适用性试验结果见表2。试验组各容器中试验菌生长情况与对照管比较,结果均生长良好。表明“2.1.2”节中的3种方法均可以用来进行血袋的无菌检查。

表2 无菌检查方法适用性试验结果

方法	金黄色葡萄球菌	大肠埃希菌	生孢梭菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉
薄膜过滤法	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	--++++
培养基冲洗法	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	--++++
培养基灌装法	+++++	+++++	+++++	+++++	-++++	--++++

注:“-”代表试验菌生长微弱、缓慢或不生长;“+”代表试验菌生长良好。

3.2 3种方法检出率对比研究的试验结果

用于人工污染血袋产品的不同梯度菌悬液平板计数结果见表3;使用3种不同无菌试验方法分别测试4个梯度的染菌血袋试样并分别计算检出率(检出率/%=阳性数量/染菌总数),结果见图1、

图2。如图1、图2所示,3种不同方法中培养基灌装法检出率最高,其次为培养基冲洗法,均优于传统的薄膜过滤法。且培养基冲洗法和培养基灌装法对于低微生物污染的检出率更高,检测更灵敏。

表3 用于人工污染血袋产品的不同梯度菌悬液平板计数结果

	梯度 1/ (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	梯度 2/ (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	梯度 3/ (cfu · 0.1 mL ⁻¹)	梯度 4/ (cfu · 0.1 mL ⁻¹)
平皿 1	206	108	46	34
平皿 2	196	98	43	23

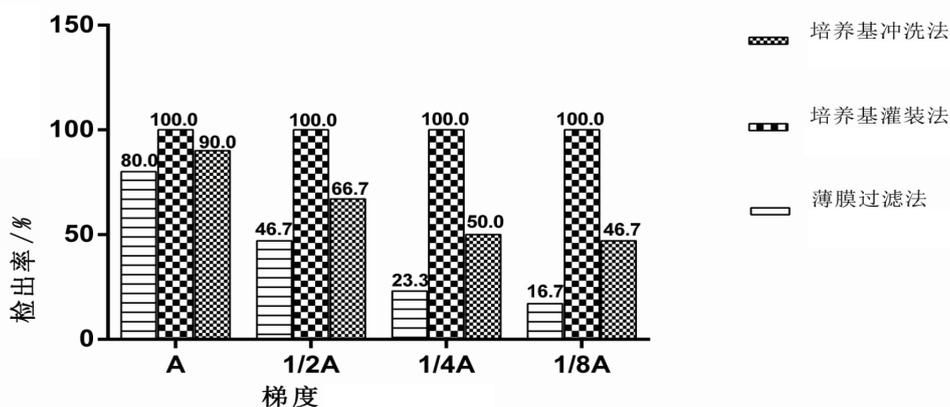


图1 血袋不同梯度不同无菌试验方法的检出率比较(TSB)

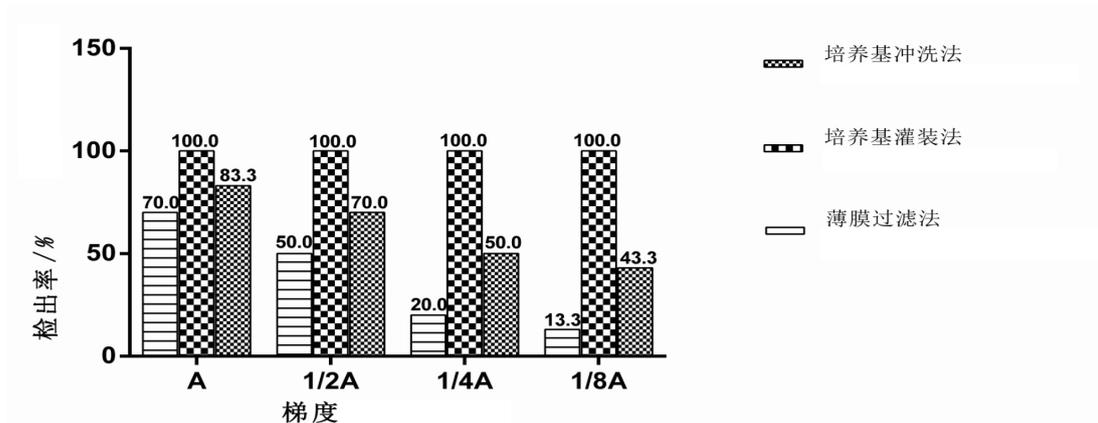


图 2 血袋不同梯度不同无菌试验方法的检出率比较 (FTM)

采用 SPSS Statistics 17 软件对数据进行卡方检验分析, 结果见表 4。血袋的 2 个较高稀释度 (梯度 3、梯度 4) 的培养基冲洗法与薄膜过滤法存在显著差异 ($p < 0.05$), 血袋的培养基灌装法与薄膜过滤法各稀释梯度均存在显著差异 ($p <$

0.05)。血袋的稀释度 (梯度 2、梯度 3、梯度 4) 的培养基冲洗法与培养基灌装法存在显著差异 ($p < 0.05$)。随着稀释梯度的增加, 方法之间的差异越显著。

表 4 血袋产品在不同培养基中对于 3 种检测方法的卡方检验结果

方法	培养基	梯度	χ^2	p
培养基冲洗法 - 薄膜过滤法	TSB	梯度 1	1.176	0.478
		梯度 2	2.443	0.118
		梯度 3	4.593	0.032
		梯度 4	6.239	0.012
	FTM	梯度 1	1.491	0.222
		梯度 2	2.500	0.114
		梯度 3	5.934	0.015
		梯度 4	6.648	0.010
培养基灌装法 - 薄膜过滤法	TSB	梯度 1	6.667	0.031
		梯度 2	21.818	< 0.001
		梯度 3	37.297	< 0.001
		梯度 4	42.857	< 0.001
	FTM	梯度 1	10.588	0.001
		梯度 2	20.000	< 0.001
		梯度 3	40.000	< 0.001
		梯度 4	45.882	< 0.001

续表 4

方法	培养基	梯度	χ^2	p
培养基冲洗法 - 培养基灌装法	TSB	梯度 1	1.404	0.236
		梯度 2	12.000	0.001
		梯度 3	20.000	< 0.001
		梯度 4	21.818	< 0.001
	FTM	梯度 1	3.491	0.062
		梯度 2	8.336	0.004
		梯度 3	20.000	< 0.001
		梯度 4	23.721	< 0.001

4 讨论

芽孢杆菌属细菌在自然界分布较为广泛, 由于能够产生抗逆性内生孢子, 可耐受各种不良的环境; 该菌群中的萎缩芽孢杆菌 (ATCC 9372) 是一株重要的芽孢杆菌属菌株, 被广泛应用在农业、工业、科研、医疗和卫生等领域^[13]。另该悬液中溶剂为40%乙醇, 易挥发, 污染血袋内腔后干燥时间更短。故本研究选用萎缩芽孢杆菌ATCC 9372芽孢悬液作为代表性菌株污染试样。本研究选择4个稀释梯度考察回收率是为了保证所选择的接种稀释度能够对不同检测方法的检出率进行比较。

薄膜过滤法、培养基冲洗法、培养基灌装法的方法适用性试验结果证明3种方法均适用于血袋产品的无菌检查, 该检验量的产品在特定检验条件下无抑菌作用或抑菌作用可以忽略不计^[4]。除了产品的检验数量及检验量外, 供试品处理及接种培养基的方式影响菌的检出率, 需进一步通过检出率的高低等条件来确定方法的优劣, 以保障检测结果的准确性和有效性。培养基灌装法4个稀释梯度的检出率均为100%, 在低微生物污染的情况下也均能检出, 培养基灌装法最适合传统型血袋的无菌检验: 培养基灌装法无需对产品进行洗脱, 是对产品上的可能附着的所有微生物进行检查, 提高了检出率, 降低了假阴性概率; 同时简化了操作步骤, 减少了污染风险, 降低了假阳性概率。本研究结果表明: 薄膜过滤法整体检出率较低, 尤其是低微生物污染的情况下存在假阴性风险。另有文献^[6,15-19]报道, 薄膜过滤法需使用集菌仪及薄膜过滤器等设备及耗

材, 试验成本高, 操作过程繁琐, 容易引入污染造成假阳性。若出现因产品材料透明度的限制而影响培养基浑浊度观察等情况, 可选择培养基冲洗法进行试验, 宜充分冲洗产品内腔。从本研究结果可知, 培养基冲洗法较薄膜过滤法, 检出率有明显提高。培养基冲洗法使用有营养成分的冲洗液, 细菌具有趋向性, 具有丰富营养物质的培养基在相同的洗脱方式下更利于菌的富集, 洗脱效果优于如0.9%氯化钠注射液等其他洗脱液。

培养基灌装法适用于没有抑菌成分的容器类医疗器械产品, 如血袋、输液袋、肠营养袋、引流袋、一次性使用注射器、一次性使用人体静脉血样采集容器等。本研究选取的血袋仅由单个袋体、采血管、护帽组成。实际临床使用血袋种类繁多, 结构复杂, 对于带采血针等其他部件的血袋应整体考虑其检测方法的适用性。对于使用培养基灌装法进行检测的产品应着重关注培养阶段器具密闭性的控制, 防止在培养过程中外源微生物污染, 如可使用夹片进行不自带闭合装置的管路的闭合等。

GB/T 14233.2-2005中3无菌试验是医疗器械行业内制定的专用医疗器械的方法, 被很多其他医疗器械产品的国家标准、行业标准和产品技术要求引用; 发布实施十余年以来, 随着《中华人民共和国药典》的数次换版以及人们对无菌试验风险评估要求的不断提高及检验方法的完善, 该标准中3.7.3供试液制备及3.7.4接种、培养和观察等部分内容亟待修订。本研究为传统血袋的无菌试验方法设计提供了新的角度和思路, 填补了国内针对该方法的方法

学研究空白,并为GB/T 14233.2-2005修订提供了数据支持。

参考文献:

- [1] 王俊平,赵晓华,蔡磊,等.一次性使用塑料采血袋检测与标准研究[J].中国输血杂志,2004,17(2):2.
- [2] 张艳梅,王新梅,姜燕娟,等.一次性采血袋评估过程中的质量控制[J].中国输血杂志,2010,23(4):2.
- [3] 曹志刚.血液细菌污染原因分析与预防[C]//中国输血协会.中国输血协会第四届输血大会论文集.2006:193.
- [4] Liu Wenyi, Li Daocheng, Xu Xinggang. Sterile Medical Device Release from Sterilization with Ethylene Oxide[J]. China Medical Device Information, 2019, 25(19):5.
- [5] 潘四春,刘思敏,李梦玉.医疗器械的无菌检验及注意事项[J].医疗装备,2012,25(9):5.
- [6] 郝擎,姚秀军,李晓,等.2018-2019年无源医疗器械国家抽检情况分析[J].中国药事,2021,35(1):7.
- [7] 郭焕君.微生物限度和无菌检查方法验证中存在的问题[J].食品界,2021(4):1.
- [8] 王灿,刘华,罗慧萍,等.2019年四川省药品无菌检查能力验证实施及结果分析[J].中国药事,2021,35(1):65-69.
- [9] Luan Qingling, Zhang Wenshi, Gao Yasong, et al. Application of Aseptic Inspection in Medical Devices[J]. China Medical Device Information, 2018, 24(9):3.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2020.
- [11] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.GB/T 14233.2-2005 医用输液、输血、注射器具检验方法第2部分:生物学试验方法[S].2005.
- [12] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化管理委员会.GB/T 19973.2-2018 医疗器械的灭菌 微生物学方法 第2部分:用于灭菌过程的定义、确认和维护的无菌试验[S].2018.
- [13] 刘波,李红,姚粟,等.枯草芽孢杆菌黑色变种 ATCC9372 的特性及其应用[J].中国消毒学杂志,2009(2):3.
- [14] Zheng Xiaoling, Liang Fayong, Tian Zhuo, et al. Study on Sterility Test Method of External Liquid Medical High-density Polyethylene Bottle[J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(6):730-733.
- [15] 肖雨清,尤世刚,姜美蓉,等.封闭式洗脱过滤培养法用于医疗器械无菌检查的实验研究[J].中华医院感染学杂志,2004,14(10):3.
- [16] 黄结,王涛.两种方法对导管医疗器具无菌检查的比较[J].中国药事,2015,29(11):1189-1191.
- [17] Li Wentao, Mao Yi, Sheng Fen, et al. Suitability Study of Aseptic Inspection Method with Sterilevaginal Dilator for Single Use[J]. Chin J Health Lab Tec, 2018, 28(12):1523-1525.
- [18] 厉高懋,潘伟婧,范佳一,等.无菌检查用隔离系统致假阴性检验结果风险的评估[J].中国医药工业杂志,2018,49(1):8.
- [19] 张丽莹.无菌检查中假阳性结果产生的原因及预防[J].江苏药学与临床研究,1999(4):2.

(收稿日期 2021年6月25日 编辑 肖妍)