

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXXX—XXXX

纳米医疗器械生物学评价 抗菌性能试验

Evaluation of nanomaterial medical devices-Test for antimicrobial performance

（征求意见稿）

（本草案完成时间：2023 年 8 月）

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

XXXX – XX – XX 发布

XXXX – XX – XX 实施

目 次

前言 II

引言 III

1 范围 1

2 规范性引用文件。 1

3 术语和定义 1

4 主要设备、试验材料、试剂及其配制 1

5 抗菌性能评价试验方法 2

6 试验报告 7

附录 A（规范性） 平皿计数法..... 8

参考文献 9

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会纳米医疗器械生物学评价分技术委员会（SAC/TC248/SC1）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

TC248SC1征求意见稿

引 言

随着我国纳米技术产业突飞猛进的发展，一些纳米材料被应用于医疗器械产品的研发，如含纳米材料敷料、纳米材料涂层导管等。纳米材料的小尺寸效应和表面活性高等特点使其易于透过细菌细胞膜，直接作用于细胞，甚至细胞内核酸，从而发挥抗菌抑菌作用。例如纳米银发挥抗菌作用的可能机制为：破坏和穿透细菌细胞膜，改变其结构和通透性；同时进入细胞内部，通过改变细胞的DNA结构以及干扰蛋白质合成等方式，从而杀灭微生物；除此之外，纳米银释放的银离子的电荷作用，也可以影响细胞成分相互作用，改变代谢途径，甚至遗传物质，从而发挥抗菌作用。不同的纳米材料发挥抗菌作用的机理可能不一样，其抗菌效果也不尽相同，因此，抗菌性能是该类医疗器械有效性评价的主要内容之一，也是其进入临床研究或注册上市的准入门槛。

针对无机纳米材料的抗菌性能评价可参考GB/T 21510。然而，当前缺少评价应用纳米材料医疗器械抗菌性能的标准化方法。现行常规的抗菌性能评价方法没有针对纳米材料特点，存在一定的不适用性，无法有效地评价该类产品的抗菌性能。如，常规抑菌环法，考察纳米银敷料时，由于纳米银附着方式不同，一些产品的抑菌圈不明显，不能对其抗菌能力客观地评价。

本文件针对应用纳米材料医疗器械的抗菌作用特点，建立了适合应用纳米材料医疗器械的抗菌性能标准化试验方法，为合理开展该类产品的抗菌性能检测评价提供技术支持。

纳米医疗器械生物学评价 抗菌性能试验

1 范围

本文件规定了应用纳米材料医疗器械的抗菌性能试验方法，包括平皿法、吸收法和振荡法。

本文件适用于应用纳米材料医疗器械的抗菌性能评价。

注：目前主要包括与体表创面接触的含纳米材料医疗器械或纳米材料涂层医疗器械。其他类型的应用纳米材料医疗器械可参考本文件给出的方法。

2 规范性引用文件。

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 30544.4-2019 纳米科技 术语 第4部分：纳米结构材料

YY/T 1477.1 接触性创面敷料性能评价用标准试验模型 第1部分 评价抗菌活性的体外创面模型

《中华人民共和国药典》（2020年版）

《消毒技术规范》2002年版

3 术语和定义

《消毒技术规范》2002年版和《中国药典》2020年版界定的术语和定义适用于本文件。

3.1

纳米材料 nanomaterial

任一外部维度、内部或表面结构处于约1nm~100 nm之间尺寸范围的材料。

[来源：GB/T 30544.4-2019，2.3，有修改]

3.2

抗菌 antimicrobial

采用化学或物理方法杀灭细菌和真菌或妨碍其生长繁殖及其活性的过程。

[来源：《消毒技术规范》2002年版，1.3.30，有修改]

3.3

菌落形成单位 colony forming unit, cfu

在活菌培养计数时，由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落，称为菌落形成单位，以其表达活菌的数量。

3.4

受试样品 test sample

从应用纳米材料医疗器械产品制备的样品，含有相应比例的纳米材料组分。

3.5

对照样品 control sample

除不含纳米抗菌材料组分外，其余与受试样品一致。

4 主要设备、试验材料、试剂及其配制

a) 主要设备

II级生物安全柜；

恒温培养箱；

真菌培养箱；

恒温水浴箱；

压力蒸汽灭菌器；

显微镜，等。

b) 试验材料

1) $\Phi 90$ mm 灭菌玻璃平皿或无菌聚苯乙烯平皿；

2) 移液管、tip 管等实验室常用器具；

3) 带盖烧瓶、灭菌容器瓶。

c) 试验菌株

1) 革兰氏阳性菌：金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, ATCC6538、CMCC (B) 26003)；

革兰氏阴性菌：铜绿假单胞菌 (ATCC15442、CMCC (B) 10104) 或肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*, ATCC 4352、CMCC (B) 46117) 或大肠埃希菌 (ATCC 8099、CMCC (B) 44102)；

2) 真菌：白色念珠菌 (*Candida albicans*, ATCC 10231、CMCC (F) 98001)。

注：根据实际使用场景，可以采用其他的试验菌株及相应的培养基和培养条件。

d) 主要试剂及其配制

试剂应为分析纯的或适用于微生物试验。试验用水应为用于制备微生物用培养基的分析级的纯化水，可通过蒸馏、离子交换或者反渗透装置过滤等方法制取，应无毒和无抑菌物质。

1) 胰蛋白胨大豆肉汤培养基 (TSB)

胰蛋白胨15 g、大豆蛋白胨5 g、氯化钠5 g，用水最终定容至1000 mL，灭菌后，pH为7.2 $\pm$ 0.2。

2) 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 (TSA)

胰蛋白胨15 g、大豆蛋白胨5 g、氯化钠5 g、琼脂15 g，用水最终定容至1000 mL，灭菌后，pH为7.2 $\pm$ 0.2。

3) 营养肉汤培养基 (NB)

蛋白胨5 g、牛肉膏3 g、用水最终定容至1000 mL，灭菌后，pH为7.2 $\pm$ 0.2。

4) 沙氏葡萄糖琼脂培养基 (SDA)

动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物15 g、葡萄糖40 g、琼脂20 g，用水最终定容至1000 mL，灭菌后在25℃时pH为5.6 $\pm$ 0.2。

5) 沙氏葡萄糖液体培养基 (SDB)

动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物10 g、葡萄糖20 g，用水最终定容至1000 mL，灭菌后在25℃时pH为5.6 $\pm$ 0.2。

6) SCDLP液体培养基

酪蛋白胨17 g、大豆蛋白胨3 g、葡萄糖2.5 g、氯化钠5 g、磷酸氢二钾2.5 g、卵磷脂1 g、吐温807 g、用水最终定容至1000 mL，灭菌后，pH为7.2 $\pm$ 0.2。

7) 磷酸盐缓冲液 (PBS, 0.03 mol/L, pH 7.2)

无水磷酸氢二钠2.83 g、磷酸二氢钾1.36 g、水最终定容至1000 mL，灭菌后，pH为7.2 $\pm$ 0.2。

5 抗菌性能评价试验方法

5.1 琼脂平皿扩散法

5.1.1 试验原理和适用性

受试样品与带有试验菌的琼脂培养基接触一定时间后，培养基与受试样品接触部位，及其边界处会出现无试验菌生长的区域，即抑菌带，通过测定抑菌带的大小评价受试样品有无抗菌能力。

5.1.2 样品制备

不同类型的受试样品制备方法如下：

a) 敷料类产品：选取含有纳米材料涂层部位（或直接与人体接触部位）为受试样品，每种试验菌用受试样品制成直径为 25 mm $\pm$ 5 mm，每 4 片(块) 一组。

注1：敷料类产品，可将圆片裁切成小条，排放在培养基上，每条之间留有小缝隙。减少由于敷料产品编织紧密影响需氧菌生长的阻菌性。

注2：敷料类产品试验前一天，无菌操作，取受试样品和对照样品，分别置于无菌容器中，在湿度箱(温度20℃ $\pm$ 2℃，

湿度70 %)中放置18 h~24 h。

b) 导管类产品可按其成品工艺定制受试样品, 直径为 25 mm±5 mm 片状, 每 4 片(块) 一组。

5.1.3 试验菌液的制备

接种试验菌株的新鲜培养物至适宜液体培养液中, 适宜温度下培养一定的时间, 上述培养物用PBS制备成试验菌液。制备菌液浓度为 1×10^8 CFU/mL~ 5×10^8 CFU/mL。

注: 一般细菌在 30 °C~35 °C培养 16 h~18 h 后, 酵母菌在 20 °C~25 °C培养 24 h~48 h 。

5.1.4 试验步骤

5.1.4.1 制备下层培养基。将冷至 40 °C~45 °C的熔化琼脂培养基, 倾注于无菌平皿(Φ90 mm)中, 每平皿 10 mL, 冷却至凝结。

5.1.4.2 准备上层培养基。准备 40 °C~45 °C的熔化琼脂培养基, 加入试验菌液, 振荡混匀至菌液浓度为 5×10^5 CFU/mL~ 5×10^6 CFU/mL, 向 5.1.4.1 中的平皿(倾注上层前预热)快速倾注 5 mL 上层培养基, 使其均匀分散铺在下层培养基表面, 待凝固后在 1 h 内使用。

无菌操作, 分别取受试样品(含纳米材料涂部位)和对照样品放于平皿, 各样片中心之间相距 25 mm 以上, 与平皿的周缘相距 15 mm 以上。贴放好后, 用无菌镊子轻压样片, 使受试样品(含纳米材料涂层面)和对照样品紧贴于平板表面。盖好平皿。每个平皿贴放 4 片受试样品, 1 片对照样品, 共 5 片。

5.1.4.3 将上述的琼脂培养基平皿, 置于培养箱中培养。细菌在 30 °C~35 °C培养 不超过 18 h, 酵母菌在 20 °C~25 °C培养不超过 48 h, 受试样品和对照样品应同时结束培养。

5.1.5 数据采集和分析结果判定

5.1.5.1 试验有效性判定条件

- 对照样品应无抑菌带产生。否则试验无效;
- 接种用的试验菌液浓度应符合要求(5.1.4.2)。否则试验无效。

5.1.5.2 结果计算和观察

测量抑菌带时, 应选均匀而完全无菌生长的抑菌带进行, 测量其直径应以抑菌带外沿为界。每个试样于不同部位随机至少测量3次, 按式(1)计算试样的抑菌带宽度。

$$H = (D - d) / 2 \dots\dots\dots (1)$$

式中:

H ——抑菌带宽度, mm;

D ——抑菌带外直径的平均值, mm;

d ——受试样直径, mm。

测量抑菌带后, 用镊子将琼脂上的样品轻轻移去, 肉眼或显微镜下观察并描述琼脂上样品下面的区域的试验菌生长情况。

5.1.5.3 结果评价

根据试验菌的有无生长和抑菌带及抑菌带宽度, 按表 1 评价受试样品的抗菌能力。

表 1 琼脂平皿扩散法抗菌性能评价

抑菌带宽度/mm	受试样下面试验菌生长情况	描 述	评 价
>1	无	抑菌带大于 1 mm, 没有繁殖	

0~1	无	抑菌带在 1 mm 之内，没有繁殖	效果好
0	无	没有抑菌带，没有繁殖	
0	轻微	没有抑菌带，有少量菌落生长，有生长抑制	效果较好
0	中等	没有抑菌带，与对照样品比较，菌落生长率少于 50%	有一定效果
0	大量	没有抑菌带，与对照样品比较，菌落生长率接近 100%	没有效果

5.2 吸收法

5.2.1 试验原理和适用性

将一定量的试验菌液接种至吸水性受试样品，接触一定时间后，采用洗脱试验样品回收试验菌液的方法，测定洗脱液中的菌落数并计算抑菌率，用于评价受试样品的抗菌性能。本方法适用于含纳米材料敷料等产品的抗菌性能的定量评价。

5.2.2 样品制备

无菌操作下取受试样品，剪切成一定面积（如3.8 cm×3.8 cm），同时称重（如1.0 g±0.1 g）。对照样品按上述方法制备。取6个受试样品和6个对照样品，分别放置于带盖的无菌容器内。敷料类产品试验前一天，置于无菌容器中，在湿度箱（温度20℃±2℃，湿度70%）中放置18 h~24 h。

5.2.3 试验菌液的制备

接种试验菌株的新鲜培养物至肉汤培养液中，适宜温度培养适宜的时间，上述培养物用PBS制备成试验菌液。制备菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL。

5.2.4 试验步骤

5.2.4.1 接种试验菌液

取试验菌液（5.2.3）0.2 mL，采用多点分散均匀接种在每个制备的样品上（5.2.2），注意操作，不要将菌液粘附在试验容器壁上，盖紧容器盖。

5.2.4.2 “0”时组-接种后洗脱

接种试验菌液后马上洗脱。取5.2.2制备对照样品和受试样品各3个，每个样品加入SCDLP培养基（或中和剂或洗脱振液）20 mL，手振摇（30 s、摆幅30 cm）或者漩涡振荡器（5次、5 s/次）或均质器振摇（无菌均质袋每面拍打1 min）洗下后，转移到无菌容器瓶中。吸取1.0 mL用PBS作适宜稀释，参照附录A计算菌落数。

5.2.4.3 试验组-培养后洗脱

取3个对照样品和3个受试样品（5.2.2），置于培养箱中37℃±2℃下培养18 h~24 h。将取培养后的样品，每个样品加入SCDLP培养基（或中和剂或洗脱振液）振摇洗脱液20 mL，手振摇（30 s、摆幅30 cm）或者漩涡振荡器（5次、5 s/次）或均质器振摇（无菌均质袋每面拍打1 min）洗下后，转移到无菌容器瓶中。吸取1.0 mL或用PBS作适宜稀释，参照附录A计算菌落数。

5.2.5 数据采集和分析结果判定

5.2.5.1 结果计算

按式（2）计算试样的菌落数。

$$M = C_b \times 20 \dots\dots\dots (2)$$

式中：

M ——每个样品的菌落数，CFU/个；

C_b ——按照附录 A 计算得到的菌液浓度，CFU/mL；

20——洗脱液的体积，mL。

5.2.5.2 判定条件

满足以下所有要求时，试验判定为有效；否则试验无效，重新进行试验。

- a) 接种用菌液浓度（5.2.3）应为 1×10^5 CFU/mL $\sim$ 5×10^5 CFU/mL；
- b) “0”时组 3 个对照样品菌量对数值极差应 <1 ；试验组 3 个对照样品菌量对数值极差应 <1 ；
- c) “0”时组 3 个受试样品菌量对数值极差应 <2 ；试验组 3 个受试样品菌量对数值极差应 <2 ；
- d) 试验组的对照样品菌量与“0”时组对照样品菌量的对数值减差应 ≥ 1 。

$$F = \lg C_t - \lg C_0 \dots\dots\dots (3)$$

式中：

F ——对照样品的菌数增长值；

C_t ——试验组 3 个对照样品培养 18 h $\sim$ 24 h 后的菌液浓度平均值；

C_0 ——“0”时组 3 个对照样品的菌液浓度平均值。

5.2.5.3 抑菌率的计算

按式（4）计算抑菌率。

$$A = (\lg C_t - \lg C_0) - (\lg T_t - \lg T_0) = F - G \dots\dots\dots (4)$$

式中：

A ——抑菌值；

G ——受试样品的菌数增长值；

T_t ——试验组 3 个受试样品培养 18 h $\sim$ 24 h 后的菌液浓度平均值；

T_0 ——“0”时组 3 个受试样品的菌液浓度平均值。

5.2.5.4 结果评价

根据试验结果，按表2评价受试样的抗菌性能。

表 2 吸收法抗菌性能评价

抗菌有效性	抑菌值
没有效果	$A < 2$
有一定效果	$2 \leq A < 3$
效果好	$A \geq 3$

5.3 振荡法

5.3.1 试验原理和适用性

将应用纳米材料医疗器械在液体条件下通过振荡培养，与试验菌充分接触一定时间后，通过测定振荡前后的菌液浓度的差值，评价受试样品的抗菌性能。

注：接触性创面敷料的性能评价也可参考 YY/T 1477.1。

5.3.2 样品制备

无菌操作下取受试样品，将受试样品剪切（或定制）成100 mm²表面积的材料，称取0.75 g±0.05 g 为一份样品。对照样品也按上述方法制备。

5.3.3 试验菌液的制备

接种试验菌株的新鲜培养物至肉汤培养液中，适宜温度培养适宜的时间，上述培养物用PBS溶液制备成试验菌液。制备菌液浓度为 1×10^5 CFU/mL~ 5×10^5 CFU/mL。

5.3.4 试验步骤

5.3.4.1 样品接种菌液

准备9个250 mL的灭菌三角烧瓶（或带盖无菌容器）。在其中3个瓶中分别加入对照样品（5.3.2）各1份，3个瓶中分别放入受试样品（5.3.2）各1份，另3个瓶不加样品作为空白对照。每个瓶分别加入磷酸盐缓冲液（4 d）70 mL。

5.3.4.2 “0”时组样品制备和培养

用移液管向3个对照样品瓶和3个空白样品（5.3.4.1）瓶中分别加入5 mL 试验菌液（5.3.3），试验菌液在PBS中的浓度为 1×10^4 cfu/mL~ 5×10^4 cfu/mL。盖好瓶盖。将上述制备好的样品瓶置于恒温摇床，温度为20℃~25℃的条件下，以300 r/min振摇1 min±10 s。吸取1.0 mL样液，用PBS作适宜稀释，参照附录A计算菌落数。

5.3.4.3 震荡试验组样品制备和培养

用移液管向另外3个受试样品瓶中分别加入5 mL 试验菌液（5.3.3），盖好瓶盖。连同制备的6瓶“0”时组样品瓶（5.3.4.2），置于恒温振摇床，在温度为20℃~25℃的条件下，以（150±50）r/min振摇1 h。吸取1.0 mL样液，或用PBS作适宜稀释，参照附录A计算菌落数。

注：更长时间培养的方法可参考YY/T 1477.1。

5.3.5 数据采集和分析结果判定

5.3.5.1 结果计算

按式（5）计算抑菌率：

$$M = C_b \times d \dots\dots\dots (5)$$

式中：

M ——每个样品的菌数；

C_b ——按照附录A计算得到的菌液浓度，cfu/mL；

d ——稀释倍数。

5.3.5.2 判定条件

当满足以下所有要求时，试验判定为有效；否则试验无效，重新进行试验。

- 3个空白样品菌液浓度（5.3.4.2）应为 1×10^4 cfu/mL~ 5×10^4 cfu/mL；
- 振摇培养18 h后的“0”时样品的菌液浓度应接近或者振摇前的高于“0”时活菌浓度；
- 按式（6）计算得到的菌数的增长值应 ≥ 1.5 ，白色念珠菌的增长值 ≥ 0.7 。

$$F = \lg W_t - \lg W_0 \dots\dots\dots (6)$$

式中：

F ——对照样品的菌数增长值；

W_t ——3个对照样品振摇培养18 h后的菌落平均值；

W_0 ——3个对照样品“0”时的菌落平均值。

5.3.5.3 抑菌率的计算

振摇培养18 h后，按式（7）计算抑菌率。

$A = \lg W_t - \lg Q_t \dots\dots\dots (7)$

式中：
A ——抑菌值；
W_t——3个对照样品振摇培养18 h后的菌液浓度平均值，CFU/mL；
Q_t——3个受试样振摇培养18 h后的菌液浓度平均值，CFU/mL。

5.3.5.4 结果评价

根据试验结果，按表3评价受试样的抗菌性能。

表 3 振荡法抗菌性能评价

抗菌有效性	抑菌值
没有效果	细菌 A<0.5、真菌<0.4
有效果	细菌 A≥0.5、真菌≥0.4

6 试验报告

- 试验报告中应包含以下信息：
- a) 受试样品：
来源、批号、型号/规格、性状、保存条件；
 - b) 对照样品：
来源、型号/规格；
 - c) 试验方法；
 - d) 试验菌株：
所用菌株名称、试验时浓度；
试验菌株培养条件及方法；
 - e) 试验条件：
培养基种类及培养条件；
 - f) 结果；
 - g) 结论。

附录 A (规范性) 平皿计数法

A.1 概述

通过培养后计算菌落形成数量的方法。平皿计数法包括倾注法和涂布法。每株试验菌每种培养基至少制备2个平皿，以算术均值作为计数结果。

A.1.1 倾注法

取按照试验步骤（5.2.4和5.3.4）制备的样液（或适宜稀释级）1 mL，置无菌平皿中，注入15 mL~20 mL温度不超过45℃熔化的胰酪大豆胨琼脂或沙氏葡萄糖琼脂培养基，混匀，凝固，倒置培养。计算各试验组的平均菌落数。

A.1.2 涂布法

取15 mL~20 mL温度不超过45℃的胰酪大豆胨琼脂或沙氏葡萄糖琼脂培养基，注入无菌平皿，凝固，制成平板，采用适宜的方法使培养基表面干燥。每一平板表面接种试验步骤（5.2.4和5.3.4）制备的样液（或适宜稀释级）不少于0.1 mL。按规定条件培养、计数。计算各试验组的平均菌落数。

A.2 培养、计数及菌数报告规则

A.2.1 培养和计数

除另有规定外，胰酪大豆胨琼脂培养基平板在30℃~35℃培养2~3天，沙氏葡萄糖琼脂培养基平板在20℃~25℃培养3天~5天，观察菌落生长情况，点计平板上生长的所有菌落数，计数并报告。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后，计算各稀释级供试液的平均菌落数，按菌数报告规则报告菌数。若同稀释级两个平板的菌落数平均值不小于15，则两个平板的菌落数不能相差1倍或以上。

A.2.2 菌数报告规则

需氧菌总数测定宜选取平均菌落数小于300 cfu的稀释级、霉菌和酵母菌总数测定宜选取平均菌落数小于100 cfu的稀释级，作为菌数报告的依据。

参 考 文 献

- [1] GB/T 20944.1 纺织品 抗菌性能的评价 第1部分：琼脂平皿扩散法
- [2] GB/T 20944.2 纺织品 抗菌性能的评价 第2部分：吸收法
- [3] GB/T 21510 纳米无机材料抗菌性能检测方法
- [4] ISO 20743: 2021 Textiles-Determination of antibacterial activity of textile products.
- [5] ISO/TS 23650:2021 Nanotechnologies Evaluation of the antimicrobial performance of textiles containing manufactured nanomaterials
- [6] Bruna T, Francisca M.B, Paul J, et al. Silver Nanoparticles and Their Antibacterial Applications[J].International Journal of Molecular Sciences,2021,22(13):7202
- [7] Bulman S.E.L, Tronci G, Goswami P, et al. Antibacterial Properties of Nonwoven Wound Dressings Coated with Manuka Honey or Methylglyoxal[J]. Materials, 2017, 10:954–968
- [8] Najahi-Missaoui W, Arnold R.D, Cummings B.S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet?[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2020, 22(1):385
-