



中华人民共和国医药行业标准

YY/T XXXX. 2—XXXX

创面敷料试验方法 第2部分：微生物学试验

Test methods for wound dressings—
Part 2: Microbiological Test

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

草案版次选择

(本草案完成时间：)

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

发 布

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。

本文件是《创面敷料试验方法》的第2部分。

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。

本文件由全国医用防护器械标准化工作组（SAC/SWG 30）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

创面敷料作为创面的机械屏障，用于创面渗出液的吸收，提供一个有利于创面愈合的环境。目前，创面敷料发展迅速，并且呈现多样化的发展趋势。《创面敷料试验方法》由三部分构成。

- 第1部分：液体控制和机械性能试验。给出创面敷料液体控制和机械性能试验方法。
- 第2部分：微生物学试验。给出了创面敷料的微生物学试验方法。
- 第3部分：生物学试验。给出了创面敷料的生物学试验方法。

创面敷料试验方法

第2部分：微生物学试验

范围

本文件规定了创面敷料的微生物学试验方法，包括无菌检查、微生物限度检查、细菌内毒素检查、生物负载测定、无菌试验和阻菌性试验方法。

本文件适用于创面敷料，其他类型医疗器械产品可参照本文件进行。

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。

GB18280.2 医疗保健产品灭菌 辐射 第2部分：建立灭菌剂量

GB/T 19973.1 医疗保健产品灭菌 微生物学方法 第1部分：产品上微生物总数的确定

YY/T1477.1 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版 第四部

术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

样品份额 sample item portion, SIP

用于测试医疗保健产品的规定部分。

[来源：ISO 11139:2018,3.244]

无菌检查 test for sterility

在经无菌加工或灭菌工艺处理的产品上所进行的药典规定的技术操作。

[来源：ISO 11139:2018, 3.298]

无菌试验 test of sterility

开发、确认或再鉴定过程中要求的一项技术操作，用于确定产品或其份额上是否有存活微生物存在。

生物负载试验 test of bioburden

测定产品存活微生物总数的试验方法。

回收率 recovery efficiency

衡量某一特定技术从产品上转移、采集和/或培养微生物的能力。

[来源：ISO 11139:2018,3.228]

生物负载校正因子 bioburden correction factor

用以存活微生物计数时补偿无法完全从产品和/或微生物培养中采集的数值。

[来源：ISO 11139:2018,3.24]

生物负载估计值 bioburden estimate

通过将生物负载校正因子应用于生物负载计数而确定的值。

[来源：ISO 11139:2018,3.25]

阻菌性能

指接触性创面敷料能够阻止外界环境中的微生物透过，避免造成创面感染的性能。

干态 low moisture condition

敷料的两面都不湿的状态。该状态下的敷料，创面无渗出液或极少量渗出液，而敷料的外表面处于干燥状态。

注：敷料未声称阻水的，视为外表面处于干燥状态。

半湿态 semi wet condition

敷料的一面是湿的状态。该状态下的敷料，创面有渗出液渗出，而敷料外表面处于干燥状态，即“外干内湿”；或者，创面无渗出液或极少量渗出液，而敷料外表面预期可处于潮湿状态，即“外湿内干”。

注：敷料未声称阻水的，视为外表面处于干燥状态；敷料声称阻水的，视为外表面处于潮湿状态。

湿态 wet condition

敷料的两面都是湿的状态。该状态下的敷料，创面有渗出液渗出，而敷料外表面预期可处于潮湿状态。

注：敷料声称阻水的，视为外表面处于潮湿状态。

4 无菌检查

4.1 材料与仪器

4.1.1 培养基

无菌检查用培养基通常为硫乙醇酸盐流体培养基（FTM）和胰酪大豆胨液体培养基（TSB）。培养基的配制、灭菌、贮藏以及质量控制等宜符合《中国药典》1101、9203的要求。

4.1.2 菌种

菌种的来源、复苏、贮藏、传代、使用等应符合《中国药典》1101、9203的要求。

4.1.3 稀释液、冲洗液

无菌检查用稀释液、冲洗液通常为0.1 %无菌蛋白胨水溶液、pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液等，其制备宜符合《中国药典》1101的要求。

4.1.4 仪器

天平、压力蒸汽灭菌器、洁净工作台、生物安全柜、薄膜过滤装置、培养箱等。

4.2 试验环境

供试品处理及接种培养基宜在不低于万级洁净实验室内的洁净工作台或生物安全柜内进行，或在不低于十万级洁净实验室内的隔离器系统中进行。涉及生物安全的操作，应在生物安全实验室内的生物安全柜中进行。

4.3 方法开发

4.3.1 检验量

通常选择整件供试品（不含包装）进行每种培养基的检查。

4.3.2 供试品处理及接种培养基

产品类别	供试品处理及接种培养基
创面敷贴	将供试品剪碎，等量接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中。

创口贴	
水胶体敷料	
纤维敷料	
泡沫敷料	
隔离敷料	
碳纤维和活性炭敷料	
含壳聚糖敷料	
含银敷料	
粉末敷料	若产品溶于培养基，将产品直接接种至培养基；若不溶于培养基，采用适宜的方法溶解供试品后进行薄膜过滤。
凝胶敷料	若产品溶于培养基，将产品直接接种至培养基；若不溶于培养基，采用适宜的方法溶解供试品后进行薄膜过滤。
液体、膏状敷料	液体： 直接过滤，或混合至含不少于 100MI 适宜稀释液的无菌容器中，混匀，立即过滤。如供试品具有抑菌作用，须用冲洗液冲洗滤膜，冲洗次数一般不少于三次，所用的冲洗量、冲洗方法同方法适用性试验。 膏状： 混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯中，剧烈振摇，使供试品充分溶解，如果需要可适当加热，加热温度一般不超过 40° C，最高不得超过 44° C，趁热迅速过滤。对仍然无法过滤的供试品，于含有适量的无菌十四烷酸异丙酯中的供试液中加入不少于 100mL 的适宜稀释液，充分振摇萃取，静置，取下层水相作为供试液过滤。过滤后滤膜冲洗及接种培养基照非水溶性制剂供试品项下的方法操作。
生物敷料	将供试品剪碎，等量接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中。 若包装中含有液体，应同时对液体进行试验。
胶原贴敷料	将供试品剪碎，等量接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中。 若包装中含有液体，应同时对液体进行试验。

4.3.3 培养及观察

宜参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法进行培养及观察。

4.3.4 阳性对照试验

宜参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法进行阳性对照试验。

4.3.5 阴性对照试验

宜参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法进行阳性对照试验。

4.3.6 结果判断

应符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法的要求。

4.4 方法确认

4.4.1 方法适用性试验

进行供试品无菌检查时，宜参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该供试品的无菌检查。若检查方法或供试品等发生变化可能影响检验结果时，应重新进行方法适用性试验。

4.4.2 方法回收率确认试验

当采用培养基洗脱法和薄膜过滤法时，除进行方法适用性试验外，宜结合风险评估及方法原理，参照GB/T 19973.1进行方法回收率确认试验来了解微生物回收率。

常规测试

4.5.1 检验数量

应符合《中国药典》1101 无菌检查法中表 2 的规定。

4.5.2 检验方法

宜采用经4.4确认的方法进行试验。

4.5.3 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称、批号、规格型号；
- b) 检验数量；
- c) 检验量；
- d) 供试品处理及接种培养基方法；
- e) 观察结果；
- f) 结果判断。

5 微生物限度检查

5.1 材料与仪器

5.1.1 培养基

微生物限度检查用培养基通常为胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基、甘露醇氯化钠琼脂培养基和溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基等，培养基的配制、灭菌、贮藏以及质量控制等应符合《中国药典》1105、1106、9203的要求。

5.1.2 菌种

菌种的来源、复苏、贮藏、传代、使用等应符合《中国药典》1105、9203的要求。

5.1.3 稀释液

微生物限度检查用稀释液通常为pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液、pH6.8无菌磷酸盐缓冲液、pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液、pH7.6无菌磷酸盐缓冲液照缓冲液、0.9%无菌氯化钠溶等，其制备应符合《中国药典》1106的要求。

5.1.4 仪器

天平、压力蒸汽灭菌器、洁净工作台、生物安全柜、微生物过滤装置、培养箱等。

5.2 试验环境

供试品处理及接种培养基宜在不低于万级洁净实验室内的洁净工作台或生物安全柜内进行。涉及生物安全的操作，应在生物安全实验室内的生物安全柜中进行。

5.3 方法开发

5.3.1 检验量

除另有规定外，一般供试品的检验量为10g、10ml或100cm²。

5.3.2 供试液制备

产品类别	供试品处理方法
创口贴	去掉防粘层或保护层，将作用面朝上放置 在无菌玻璃或塑料器皿上，在粘贴面上覆盖一层适宜的无菌多孔材料（如无菌纱布），避免供试品粘贴在一起。将处理后的供试品放入盛有适宜体积并含有表面活性剂(如聚山梨酯 80 或卵磷脂) 稀释液的容器中。使用袋蠕动（均质）或振摇。
液体、膏状敷料	液体敷料可直接将液体作为供试液。膏状敷料可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。使用涡旋混合或振摇。
含银敷料	加入中和剂后，用适宜的稀释液制成 1:10 供试液。使用袋蠕动（均质）或振摇。
胶原贴敷料	挤出液直接作为供试液或用适宜的稀释液制成1:10供试液。

5.3.3 微生物采集

振摇法（手工或机械方式）：将供试液进行振摇，宜规定接触时间、冲洗液用量、振摇频率。

超声法:将装有供试品的容器在超声波清洗器中进行处理,宜规定超声处理的额定频率、处理时间、产品放置位置。

如果如上方法不适用，也可采用经验证的其他方法进行。

5.3.4 微生物计数检查

根据供试品的理化特性与生物学特性，参照《中华人民共和国药典》 2020年版 四部1105，选用以下方法进行微生物计数检查。

取相当于1g、1ml或10cm²供试品的供试液，过滤，冲洗，冲洗后取出滤膜，菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基上培养。

取规定量供试液，按平皿法（包括倾注法和涂布法）接种培养基，每稀释级每种培养基至少制备2个平板。

5.3.5 控制菌检查

取供试品，照4.1.3.3制备1：10供试液。取相当于1g、1ml或10cm²供试品的供试液，参照《中华人民共和国药典》 2020年版 四部1106进行试验。

5.3.6 培养及观察

宜符合《中华人民共和国药典》 2020年版 四部1105、1106的要求。

5.3.7 阴性对照试验

宜参照《中华人民共和国药典》 2020年版 四部1105、1106进行阴性对照试验。

5.3.8 结果判断

宜符合《中华人民共和国药典》 2020年版 四部1105、1106的要求。

5.4 方法确认

5.4.1 方法适用性试验

进行供试品微生物限度检查时，按照《中国药典》1105、1106进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该供试品的微生物限度检查。若检查方法或供试品发生变化可能影响检验结果时，应重新进行方法适用性试验。

5.4.2 方法回收率确认试验

当采用微生物计数检查时，除进行方法适用性试验外，宜结合风险评估及方法原理，参照GB/T 19973.1进行方法回收率确认试验来了解微生物回收率。

5.5 常规测试

5.5.1 检验数量

一般宜随机抽取不少于2个最小包装的供试品。该检验数量不包括阳性对照试验供试品用量。

5.5.2 检验方法

宜采用经5.4确认的方法进行试验。

5.5.3 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称、批号、规格型号；
- b) 检验数量；
- c) 检验量；
- d) 供试液制备方法
- e) 微生物采集方法
- f) 微生物计数检查方法
- g) 控制菌检查方法
- h) 观察结果；
- i) 结果判断。

6 细菌内毒素检查

6.1 材料与仪器

6.1.1 标准品

细菌内毒素国家标准品、细菌内毒素工作标准品。宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法的要求。

6.1.2 鲎试剂

宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法的要求。

6.1.3 细菌内毒素检查用水

用作溶剂、稀释剂及浸提介质。宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法的要求。

6.1.4 反应容器

安瓿、试管、微孔板等。宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法的要求。

6.1.5 仪器

电热鼓风干燥箱、恒温水浴箱/试管恒温仪、旋涡混合器、洁净工作台等。

6.2 试验环境

细菌内毒素检查通常不需要在受控环境(例如洁净室, 洁净工作台或生物安全柜等)内进行, 试验人员应遵循基本的无菌技术以防止污染。

6.3 方法开发

6.3.1 供试液制备

产品类别	供试液制备方法
创面敷贴	将整件供试品浸没于无热原器皿内, 必要时可将供试品剪碎, 加入浸提介质进行浸提得供试液。
创口贴	
水胶体敷料	
纤维敷料	
泡沫敷料	
碳纤维和活性炭敷料	
含壳聚糖敷料	
含银敷料	
胶原贴敷料	
隔离敷料	
粉末敷料	取供试品, 加入细菌内毒素检查用水使其完全溶解得供试液; 若供试品不溶于水, 可加入Tris缓冲液、HCL或其他物质进行溶解得供试液。
凝胶敷料	取供试品, 用细菌内毒素检查用水进行稀释得供试液; 若供试品不溶于水或在水中溶解度较低, 可采取超声波、加热助溶、添加助溶剂(如乙醇等)或调解pH等方法行溶解得供试液。
膏状敷料	
液体敷料	直接将原液作为供试液。
生物敷料	将整件供试品浸没于无热原器皿内, 必要时可将供试品剪碎, 加入浸提介质进行浸提得供试液; 若供试品保存于液体中, 直接将液体作为供试液。

注: 对需要浸提的供试品, 一般在(37±1)℃条件下浸提不少于1h, 也可采用其他经验证的浸提条件。浸提介质的体积取决于不同供试品的尺寸和结构组成, 应保证浸提介质能充分接触和浸提供试品。

6.3.2 供试液内毒素限值确定

供试液内毒素限值为供试品浸提液中可能存在的内毒素最大允许量。在选择凝胶法进行供试液内毒素检查时, 须选择不大于供试液内毒素限值的适宜灵敏度的鲎试剂; 如果没有合适灵敏度的鲎试剂, 应在风险评估的基础上, 通过调整浸提介质体积或产品内毒素限值以满足供试液内毒素检查需求。根据式(1)计算:

$$E = \frac{K \times N}{V} \dots\dots\dots (1)$$

附录(Annex) A式中:

- E—供试液内毒素限值(EU/mL);
- K—供试品内毒素限值(EU/件);
- N—供试品数量(件);

V —供试液体积（mL）。

USP<161>章节中规定一般医疗器械细菌内毒素限值为每件不超过20 EU，与脑脊液接触的细菌内毒素限值为每件不超过2.15 EU。

6.3.3 检验技术选择

宜按照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法中的凝胶法或光度测定法进行。

6.3.4 结果判定

宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法的要求。

6.4 方法确认

供试品初次进行细菌内毒素检查之前应先参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1143细菌内毒素检查法进行干扰试验，以检验供试品对所选用的试验方法是否有抑制或增强作用。若鲎试剂、检查方法或供试品等发生可能影响检查结果的变化时，应重新进行干扰试验。为确保所选择的处理方法能有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性，要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验。

如果供试液存在干扰作用，通常通过稀释供试液排除干扰；也可以直接选择经稀释的供试液进行干扰试验和常规测试。稀释倍数不超过最大有效稀释倍数(MVD)。根据式（2）计算：

$$MVD = \frac{E}{\lambda} \quad (2)$$

附录(Annex) B式中：

MVD—最大有效稀释倍数；

E ——供试液内毒素限值（EU/mL）；

λ ——所用鲎试剂灵敏度标示值（EU/mL）。

6.5 常规测定

6.5.1 检验数量

同一批号一般宜随机抽取3～10个最小包装的供试品。

6.5.2 检验方法

宜采用经6.4确认的方法进行试验。

6.5.3 产品内毒素含量报告

一般以EU/件为单位报告内毒素含量。

6.6 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 供试品名称、批号、规格型号；
- b) 检验数量；
- c) 检验量；
- d) 供试液制备方法；
- e) 细菌内毒素限值；
- f) 结果判定。

7 生物负载试验

7.1 材料与仪器

7.1.1 培养基

生物负载测定用培养基通常为胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）。培养基的配制、灭菌、贮藏以及质量控制等宜符合《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：微生物计数法和9203药品微生物实验室质量管理指导原则的要求。当产品中有疑似厌氧菌时，可增加适宜的培养基。

7.1.2 菌种

表1列举了生物负载测定常用菌种。以下菌种用于培养基的适用性检查、方法适用性试验。菌种的来源、复苏、贮藏、传代、使用等宜符合《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：微生物计数法和9203药品微生物实验室质量管理指导原则的要求。

注1：方法回收率确认试验一般采用芽孢杆菌芽孢。
注2：可增加从生产环境及产品分离的常见污染菌株作为试验菌株。

表1:常用菌种

菌种类型	常用菌种
需氧菌	金黄色葡萄球菌
	铜绿假单胞菌
	枯草芽孢杆菌
霉菌和酵母菌	白色念珠菌 黑曲霉

7.1.3 洗脱液、稀释液

宜采用GB/T19973.1规定的洗脱液、稀释液。

7.1.4 仪器

天平、压力蒸汽灭菌器、生物安全柜、薄膜过滤装置、培养箱等。

7.2 试验环境

微生物采集及转移至培养基宜在不低于十万级洁净实验室内的生物安全柜或洁净工作台或百级洁净区域内进行。涉及生物安全的操作，应在生物安全实验室内的生物安全柜中进行。

7.3 方法设计

7.3.1 检验数量

随机选取同批次3~10件产品。

7.3.2 样品份额（SIP）

宜符合GB/T19973.1的要求。

7.3.3 微生物采集

产品类别	供试品处理
创面敷贴	去掉防粘层或保护层，将作用面朝上放置于无菌玻璃或塑料器皿上，在粘贴面上覆盖一层适宜的无菌多孔材料（如无菌纱布），避免供试品粘贴在一起。将处理后的供试品放入盛有适宜体积并含有表面活性剂（如聚山梨酯 80 或卵磷脂）稀释液的容器中。使用袋蠕动（均质）或振摇。
创口贴	
隔离敷料	

粉末敷料	用适宜的稀释液制成 1:10 供试液，使用超声或振摇。
凝胶敷料	可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。使用涡旋混合或振摇。
水胶体敷料	溶解后直接作为供试液
纤维敷料	
泡沫敷料	可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。使用涡旋混合或振摇。
液体、膏状敷料	液体敷料可直接将液体作为供试液。膏状敷料可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。使用涡旋混合或振摇。
生物敷料	清洗去除灭菌剂。振摇法或超声法
碳纤维和活性炭敷料	用适宜的稀释液制成 1:10 供试液，使用超声或振摇。
含壳聚糖敷料	可在稀释液中加入表面活性剂如 0.1%(ml/ml)的聚山梨酯 80，使供试品分散均匀。使用涡旋混合或振摇。
含银敷料	加入中和剂后，用适宜的稀释液制成 1:10 供试液。使用袋蠕动（均质）或振摇。
胶原贴敷料	挤出液直接作为供试液或用适宜的稀释液制成1:10供试液。

振摇法（手工或机械方式）：将产品整体或拆解后浸入装有冲洗液的适当容器中进行振摇，宜规定接触时间、冲洗液用量、振摇频率。

超声法：将产品整体或拆解后浸入装有冲洗液的适当容器中，将容器在超声波清洗器中进行处理，或将超声探头浸入到容器内冲洗液中进行洗脱，宜规定超声处理的额定频率、处理时间、产品放置位置。

均质器处理：将供试品和已知体积的洗脱液装在一个无菌均质袋中。拍击板往复作用于袋子表面，迫使洗脱液通过和围绕供试品。宜规定处理时间、冲洗液用量。

当单件产品生物负载较低时，可以合并多件产品进行微生物采集。对于液体类供试品，直接将液体作为供试液。如果如上方法不适用，宜按照GB/T 19973.1选择其他适宜方法。

7.3.4 移至培养基

取供试液，采用标称孔径不大于0.45 μm，直径一般为50mm的分析滤膜进行薄膜过滤；供试液薄膜过滤前，先将少量冲洗液过滤以润湿滤膜。需要时，对过滤后的滤膜进行冲洗。取出滤膜，菌面朝上贴于TSA平板上。

7.3.5 微生物培养

将TSA平板在（30~35）℃培养（3~7）天。

7.3.6 微生物计数

菌落蔓延生长的平板不宜计数。每张滤膜上的菌落数宜不超过50cfu。当菌落数较多时，可取适宜稀释级的供试液进行测试。若滤膜上无菌落生长，记为<1cfu。

7.4 方法确认

7.4.1 方法回收率确认试验

按照GB/T 19973.1进行方法回收率确认试验，得到生物负载校正因子。由于接触性创面敷料一般生物负载含量较低，通常选择产品接种法进行方法回收率确认试验，通过在产品上接种已知数量的选定微生物形成人工生物负载确定回收率。许多特殊产品或复杂产品存在不易接种或接种后不易干燥等情况，可将产品放置于自然环境或用菌悬液浸泡等方式提高其生物负载后，采用重复回收法来确认回收率。对液体供试品，无需进行方法回收率确认试验。

7.4.2 方法适用性试验

若产品可能含有在生物负载测试条件下有抑菌作用的物质，除进行方法回收率确认试验外，宜参照《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：微生物计数法进行方法适用性试验，以证明产品不会抑制微生物生长或检出。

7.5 菌数报告

以每件试样为单位报告计数结果。

7.6 生物负载估计值

7.6.1 按式（3）计算每件产品的生物负载估计值。

$$M_i = f \times Y_i (3)$$

附录(Annex) C式中：

M_i —第*i*件产品生物负载估计值，单位为菌落形成单位（cfu）；

f —生物负载校正因子；

Y_i —第*i*件产品菌落数，单位为菌落形成单位（cfu）。

7.6.2 所有产品生物负载估计值的均值即为该批产品生物负载估计值。

试验报告

- a) 供试品名称、批号、型号；
- b) 检验数量；
- c) 样品份额；
- d) 生物负载校正因子；
- e) 每个试样的生物负载估计值；

8 无菌试验

8.1 材料与仪器

8.1.1 培养基

无菌试验用培养基通常为胰酪大豆胨液体培养基（TSB）。培养基的配制、灭菌、贮藏以及质量控制等宜参照《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法和9203药品微生物实验室质量管理指导原则进行。其中，培养基的适用性检查时培养温度为（30±2）℃。当产品中有疑似厌氧菌时，可增加适宜的培养基。

8.1.2 菌种

表1列举了无菌试验常用菌种，这些菌种用于培养基的适用性检查、方法适用性试验。菌种的来源、复苏、贮藏、传代、使用等宜符合《中华人民共和国药典》2020年版 四部1101无菌检查法和9203药品微生物实验室质量管理指导原则的要求。

注1：若适用，方法回收率确认试验一般采用芽孢杆菌芽孢。

注2：可增加从生产环境及产品常见中分离的常见污染菌株作为做试验用菌株。

8.1.3 稀释液、冲洗液

采用GB/T19973.1规定的洗脱液、稀释液。

8.1.4 培养容器

薄膜过滤器、试管、三角瓶等。

8.1.5 仪器

天平、压力蒸汽灭菌器、薄膜过滤装置、洁净工作台、生物安全柜、培养箱等。

8.2 试验环境

同4.2。

8.3 方法开发

8.3.1 样品份额（SIP）

宜符合GB/T19973.2的要求。

8.3.2 产品处理及接种培养基

同4.3.3

8.3.3 培养及观察

宜符合GB/T19973.2的要求。培养条件一般采用 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ ，培养14天。

8.3.4 阴性对照

同4.3.5。

8.3.5 结果判断

宜按照GB/T19973.2判断是否有微生物生长。

8.4 方法确认

8.4.1 方法适用性试验

同4.4.1。其中，培养温度为 $(30\pm 2)^{\circ}\text{C}$ 。

8.4.2 方法回收率确认试验

同4.4.2。

8.5 常规测定

8.5.1 检验数量

宜符合GB18280.2等灭菌过程确认及常规控制标准要求。

8.5.2 检验方法

采用经8.4确认的方法进行试验。

8.5.3 试验报告

试验报告中宜给出下列信息：

- a) 产品名称、批号、型号；
- b) 灭菌日期；
- c) 灭菌批号；
- d) 灭菌剂量（若适用）；
- e) 检验数量；
- f) 样品份额；
- g) 产品处理及接种培养基方法；
- h) 观察结果；

i) 结果判断。

9 阻菌性

9.1 试剂及材料

- 9.1.1 粘质沙雷菌 (*Serratia marcescens*) ;
- 9.1.2 营养肉汤培养基;
- 9.1.3 营养琼脂培养基;
- 9.1.4 无菌生理盐水;
- 9.1.5 无菌拭子。

9.2 挑战微生物制备

9.2.1 挑战接种物制备

从粘质沙雷菌工作菌株斜面上挑取粘质沙雷菌菌落，在营养琼脂培养基平板上划线接种，26℃条件下过夜培养制得挑战接种物，用于干态阻菌性试验和半湿态（外干内湿）阻菌性试验。制备好的平板宜当日使用。

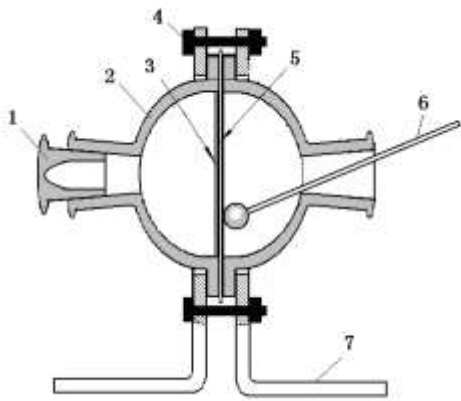
9.2.2 挑战菌液制备

从4.1制得的挑战接种物平板上挑取粘质沙雷菌单菌落接种于营养肉汤培养基中，26℃条件下过夜培养，获得浓度约为109cfu/mL的挑战菌液，用于半湿态（外湿干内）和湿态阻菌性试验。制备好的挑战菌液宜当日使用。

9.3 干态阻菌性

9.3.1 试验装置

图1为干态阻菌性试验装置示意图。挑战室用于盛放挑战接种物，采样室用于擦拭采样。试验前，采用经确认过的灭菌程序对试验装置进行灭菌备用。



- 说明：
- 1—玻璃塞；
 - 2—玻璃试验装置；
 - 3—挑战接种物；
 - 4—固定螺钉；
 - 5—供试样品；
 - 6—无菌拭子；
 - 7—支架。

图1 干态阻菌性试验装置示意图

9.3.2 试验步骤

a) 样品夹持

分别取3个样品，使样品内表面朝向采样室，将样品夹持到挑战室和采样室之间。夹持方式宜经过确认，确保不发生挑战微生物的泄漏。对于面积较大的样品，可剪下剩余部分或将其包裹在实验装置周围；对于面积较小的样品，可采用面积较大的样品原材料进行测试，或者可以采用适宜的方式填充缺失部分用于测试。

b) 加入挑战微生物

用无菌拭子抹取挑战接种物，并通过挑战室口接种到样品外表面上，尽量涂抹均匀。

c) 样品挑战

以适宜的方式封闭试验装置的挑战室口和采样室口，确保不会产生外来污染，将试验装置放入26℃培养箱中至24 h。

d) 穿透微生物检查

到规定时间后，在无菌生理盐水中预先湿润无菌拭子并挤掉多余的水分，通过采样室口尽量擦拭样品所有内表面，然后以擦拭营养琼脂平板表面的方式进行接种。每个样品使用三个无菌拭子擦拭样品，分别在三个营养琼脂平板上进行接种，期间应多次转动拭子。将营养琼脂平板置于26℃培养24 h。

e) 挑战微生物活力检查

到规定时间后，参照d) 进行操作，通过挑战室口擦拭样品外表面，以检查挑战微生物活力。

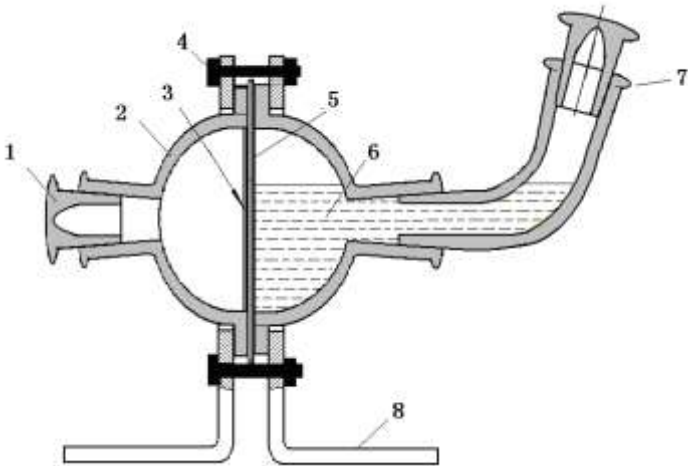
9.3.3 结果判断

用于活力检查的营养琼脂培养基平板上应有粘质沙雷菌生长，否则试验无效。如果用于样品内表面采样分析的营养琼脂平板上均无微生物生长，判为符合干态阻菌性要求。如果用于样品内表面采样分析的营养琼脂平板上有微生物生长，应采用适宜的微生物学方法检查其是否为粘质沙雷菌。若是粘质沙雷菌，则判为不符合干态阻菌性要求；若不是粘质沙雷菌，则说明有外来污染，试验无效。

9.4 半湿态（外干内湿）阻菌性

9.4.1 试验装置

图2为半湿态（外干内湿）阻菌性试验装置示意图。挑战室用于盛放挑战接种物，采样室用于盛放营养肉汤培养基。试验前，采用经确认过的灭菌程序对试验装置进行灭菌备用。



说明：

- 1—玻璃塞；
- 2—玻璃试验装置；
- 3—粘质沙雷菌接种物；
- 4—固定螺钉；
- 5—供试样品；
- 6—营养肉汤培养基；
- 7—玻璃弯管；
- 8—支架。

图2 试验装置示意图——半湿态（外干内湿）

9.4.2 试验方法

a) 样品夹持

按照9.3.2 a)进行操作。

b) 加入挑战微生物

按照9.3.2 b)进行操作。

c) 加入营养肉汤培养基

以无菌操作的方式向采样室内加满营养肉汤培养基。

d) 样品挑战

按照9.3.2 c)进行操作。

e) 穿透微生物检查

到规定时间后，肉眼观察营养肉汤培养基中微生物生长情况。

f) 挑战微生物活力检查

按照9.3.2 e)进行操作。

9.4.3 结果判断

用于活力检查的营养琼脂培养基平板上应有粘质沙雷菌生长，否则试验无效。如果营养肉汤培养基显示澄清，判为符合半湿态（外干内湿）阻菌性要求。如果营养肉汤培养基显示混浊，应采用适宜的微生物学方法检查其是否为粘质沙雷菌。若是粘质沙雷菌，则判为不符合半湿态（外干内湿）阻菌性要求；若不是粘质沙雷菌，则说明有外来污染，试验无效。

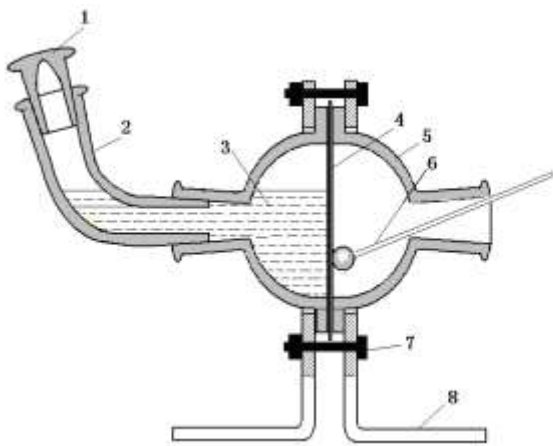
注：如有必要，可设置无菌营养肉汤培养基作为阴性对照（显示澄清）以及接种粘质沙雷菌的营养肉汤培养基作为阳性对照（显示混浊），以避免肉眼观察澄清或混浊可能的主观性错误。

9.5 半湿态（外湿内干）阻菌性

9.5.1 试验装置

图3为半湿态（外湿内干）阻菌性试验装置示意图。挑战室用于盛放挑战菌液，采样室用于擦拭采样。试验前，采用经确认过的灭菌程序对试验装置进行灭菌备用。

说明：



- 1—玻璃塞；
- 2—玻璃弯管；
- 3—挑战菌液；
- 4—供试样品；
- 5—玻璃试验装置；
- 6—无菌拭子；
- 7—固定螺钉；
- 8—支架。

图3 试验装置示意图——半湿态（外湿内干）

9.5.2 试验方法

a) 样品夹持

按照9.3.2 a) 进行操作。

b) 加入挑战微生物

向挑战室内加满挑战菌液。

c) 样品挑战

按照9.3.2 c) 进行操作。

d) 穿透微生物检查

按照9.3.2 d) 进行操作。

e) 挑战微生物活力检查

到规定时间后，用无菌拭子蘸取挑战菌液擦拭接种营养琼脂培养基平板，以检查挑战微生物活力。每个样品使用三个无菌拭子蘸取菌液，分别涂在三个营养琼脂平板上进行接种，并将平板置于26℃培养24 h。

9.5.3 结果判断

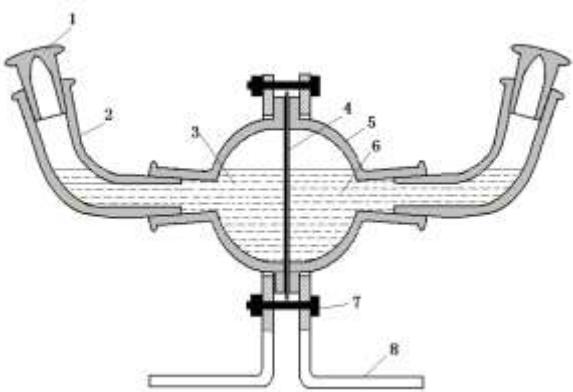
用于活力检查的营养琼脂培养基平板上应有粘质沙雷菌生长，否则试验无效。如果用于样品内表面采样分析的营养琼脂培养基平板上均无微生物生长，判为符合半湿态（外湿内干）阻菌性要求。如果用于样品内表面采样分析的营养琼脂培养基平板上有微生物生长，应采用适宜的微生物学方法检查其是否为

粘质沙雷菌。若是粘质沙雷菌，则判为不符合半湿态（外湿内干）阻菌性要求；若不是粘质沙雷菌，则说明有外来污染，试验无效。

9.6 湿态阻菌性

9.6.1 试验装置

图4为湿态阻菌性试验装置示意图。挑战室用于盛放挑战菌液，采样室用于盛放营养肉汤培养基。试验前，采用经确认过的灭菌程序对试验装置进行灭菌备用。



说明：

- 1—玻璃塞；
- 2—玻璃弯管；
- 3—挑战菌液；
- 4—供试样品；
- 5—玻璃试验装置；
- 6—TSB培养基；
- 7—固定螺钉；
- 8—支架。

图4 试验装置示意图——湿态

9.6.2 试验方法

a) 样品夹持

按照9.3.2 a) 进行操作。

b) 加入挑战微生物

按照9.5.2 b) 进行操作。

c) 加入营养肉汤培养基

按照9.4.2 c) 进行操作。

d) 样品挑战

按照9.3.2 c) 进行操作。

e) 穿透微生物检查

按照9.4.2 e) 进行操作。

f) 挑战微生物活力检查

按照9.5.2 e) 进行操作。

9.6.3 结果判断

用于活力检查的营养琼脂培养基平板上应有粘质沙雷菌生长，否则试验无效。如果营养肉汤培养基显示澄清，判为符合湿态阻菌性要求。如果营养肉汤培养基显示混浊，应采用适宜的微生物学方法检查其是否为粘质沙雷菌。若是粘质沙雷菌，则判为不符合湿态阻菌性要求；若不是粘质沙雷菌，则说明有外来污染，试验无效。

参考文献

- [1] GB/T19973.1 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。
- [2] GB/T19973.2 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。
- [3] GB18280.3 医疗保健产品灭菌 辐射 第2部分：剂量测量指南
- [4] GB 18671 一次性使用静脉输液针
- [5] YY/T 1282 一次性使用静脉留置针
- [6] YY/T0618 医疗器械细菌内毒素试验方法常规监控与跳批检验。
- [7] 《中华人民共和国药典》第四部
- [8] ISO 11737-1 Sterilization of health care products —Microbiological methods —Part 1:Determination of a population of microorganisms on products.
- [9]ISO 11737-2 2019 Sterilization of health care products-Microbiological methods-Part 2:Tests of sterility performed in the definition,validation and maintenance of a sterilization proces