



中华人民共和国医药行业标准

YY 0719.4—2009/ISO 14730:2000

眼科光学 接触镜护理产品 第4部分:抗微生物防腐有效性试验及 测定抛弃日期指南

**Ophthalmic optics—Contact lens care products—
Part 4: Antimicrobial preservative efficacy testing and
determining discard date**

(ISO 14730:2000 Ophthalmic optics—Contact lens care products—
Antimicrobial preservative efficacy testing and determining discard date, IDT)

2009-06-16 发布

2010-12-01 实施



国家食品药品监督管理局 发布

目 次

前言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 原理	1
5 试验方法	1
附录 A (资料性附录) 膜过滤法操作程序实例	5
附录 B (资料性附录) 抛弃日期操作程序 I	7
附录 C (资料性附录) 抛弃日期操作程序 II	9
附录 D (资料性附录) 抛弃日期操作程序 III	12
附录 E (资料性附录) 抛弃日期操作程序 IV	15
附录 F (资料性附录) 其他菌种保藏机构的试验菌	17

前 言

YY 0719《眼科光学 接触镜护理产品》分为 7 个部分：

- 第 1 部分：术语；
- 第 2 部分：基本要求；
- 第 3 部分：微生物要求和试验方法及接触镜护理系统；
- 第 4 部分：抗微生物防腐有效性试验及测定抛弃日期指南；
- 第 5 部分：接触镜和接触镜护理产品物理相容性的测定；
- 第 6 部分：有效期测定指南；
- 第 7 部分：生物学评价试验方法。

本部分为 YY 0719 的第 4 部分。

本部分等同采用 ISO 14730:2000《眼科光学 接触镜护理产品 抗微生物防腐有效性试验及测定抛弃日期指南》。

本部分的附录 A、附录 B、附录 C、附录 D、附录 E、附录 F 为资料性附录。

本部分由全国医用光学和仪器标准化分技术委员会(SAC TC 103/SC 1)提出并归口。

本部分起草单位：国家食品药品监督管理局杭州医疗器械质量监督检验中心。

本部分主要起草人：陈靖云、虞海蓉、李家忠、马莉、何涛、齐伟明。

眼科光学 接触镜护理产品

第 4 部分:抗微生物防腐有效性试验及 测定抛弃日期指南

1 范围

YY 0719 的本部分规定了用于评价所有多次量防腐接触镜护理产品的抗微生物防腐作用的操作程序,并且给出了用于测定抛弃日期的指南,参见资料性附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E。

本部分可用于抛弃日期为 28 d 的产品。

本部分不适用于一次性使用的一次量包装无菌产品或采用物理屏障抗微生物污染的多次量容器(如气溶胶容器)。

注 1: 本试验的原理可用于超过 28 d 的抛弃日期。参见附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E。

注 2: 多个或混合微生物和(或)接触镜内含物或其他有机物的使用能影响特殊产品的表观抗微生物活性。对大量微生物的试验及抽取使用容器中部分样品的试验来评价其变化对发展接触镜护理产品可能是有价值的,但不在本标准的范围之内。

2 规范性引用文件

下列规范性文件中的条款通过 YY 0719 本部分的引用而成为本部分的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的更改或修订不适用于本部分。然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本部分。

YY 0719.1 眼科光学 接触镜护理产品 术语

YY 0719.2 眼科光学 接触镜护理产品 基本要求

3 术语和定义

YY 0719.1 中确立的术语和定义适用于 YY 0719 的本部分。

4 原理

4.1 本试验包括试验开始时用指定的微生物接入样品,14 d 时再接种,在规定的温度存放接种样品,在规定的时间内从接种样品中取样、培养来测定活菌数。通过较长时期的活菌计数来确定产品抑制微生物再生长的能力。

4.2 本试验中所用的试验菌的量并不代表实际中可能的微生物量,而是提供可计数的量来估算微生物活性降低率和程度。

4.3 在试验规定的温度条件下,经数次试验后,如果接种样品中的细菌明显减少,而酵母菌和霉菌不增加,则产品的抗微生物防腐性符合要求。性能标准见 5.6。

4.4 在培养和计数存活菌的过程中,应采取合适的方法除去残留的抗微生物剂或使其失效,该方法的有效性应经过验证。

5 试验方法

5.1 材料和试剂

5.1.1 试验菌

用表 1 所列菌株进行试验。

注:可使用附录 F 中其他菌种保藏机构的试验菌。

表 1 试验菌

菌株名称	等同 ATCC 编号
绿脓杆菌	ATCC 9027
金黄色葡萄球菌	ATCC 6538
大肠杆菌	ATCC 8739 或 8099
白色念珠菌	ATCC 10231
黑曲霉	ATCC 16404

5.1.2 培养基和试剂

5.1.2.1 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)或其他适合培养基。

5.1.2.2 沙氏葡萄糖琼脂(SDA)或其他适合培养基。

5.1.2.3 不含氯化钙和氯化镁的杜尔贝科(Dulbecco)磷酸盐缓冲液(DPBS):200 mg/L 的氯化钾,200 mg/L 的磷酸二氢钾,8 000 mg/L 的氯化钠以及 2 160 mg/L 的七水磷酸氢二钠或合适的稀释液。

5.1.2.4 杜尔贝科(Dulbecco)磷酸盐缓冲液,加 0.05%聚山梨酯-80(DPBST)或合适的稀释液。

5.1.2.5 按要求经验证的中和剂、培养基,例如 Dey-Engley 中和肉汤(DEB)和 Lethen 肉汤。

5.1.3 实验室器材

需配备下列实验室常用器材:无菌移液管、擦拭子、试管、培养皿(90 mm×20 mm~100 mm×20 mm)等,相应的仪器如测定菌液浓度的分光光度计,菌落计数仪和离心机等。

5.2 试验样品和试验菌的维护

试验样品应为上市的代表性产品。试验前从成品容器中直接取样。

应取三批样品用每种经制备的接种菌进行试验。

按菌种保藏机构的建议维护试验菌。

使用来自保藏菌种(ATCC,NCIB,NCTC,NCPF或其他认可的菌种保藏机构,见附录 F)不超过 5 次传代的菌种。每一次传代是前一次传代的次培养菌。

5.3 试验菌(接种菌)的制备

按表 2 所列的条件在琼脂斜面上培养每种试验菌。

表 2 试验菌生长的培养基和培养条件

试验菌	培养基	温度/℃	培养时间
绿脓杆菌	TSA	30~35	18 h~24 h
金黄色葡萄球菌	TSA	30~35	18 h~24 h
大肠杆菌	TSA	30~35	18 h~24 h
白色念珠菌	SDA	20~25	42 h~48 h
		或 30~35	18 h~24 h
黑曲霉	SDA	20~25	7 d~10 d

用无菌的 DPBST 或合适的稀释液收集每种培养菌,冲洗培养基表面生长菌,转移至合适的试管内并漩涡混合均匀。采用无菌玻璃棉、粗滤布或纱布过滤芽孢混悬液,除去菌丝碎片。

收集培养菌后,可用离心法洗涤培养菌。细菌混悬液可用过滤(如 3 μm~5 μm 孔径)制得单菌分散液。然后用 DPBST 或其他合适的稀释液将所有试验菌混悬液的浓度调节至 1.0×10^7 CFU/mL~ 1.0×10^8 CFU/mL。用浊度法或分光光度法测定混悬液来估算每种菌液的近似浓度。试验时,如用平板计数法来测定每种菌液的实际浓度即每毫升菌落数(CFU/mL)。

若使用离心法,离心操作应在 20 ℃~25 ℃进行,在相当于 4 000g 或更小转速下离心不超过

10 min。

细菌和酵母菌混悬液应在制备当天使用。

注 1: 离心时间延长要求转速更低。

注 2: 在冷藏(2℃~8℃)条件下储存孢子混悬液可使用至制备后 7 d。

5.4 接种试验程序

5.4.1 对每批样品、每种试验菌,准备一个或多个可加入至少 10 mL 试验溶液的试管。

注: 用试管而不用镜片盒,以便试验的有效技术操作。由于样品溶液成分和试管材料之间可能存在不相容性,宜考虑使用与溶液成分相容的试管。

将试验菌接入样品管,使其菌液浓度在 1.0×10^5 CFU/mL~ 1.0×10^6 CFU/mL 之间。保证接种菌的体积不超过样品体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。

5.4.2 在 20℃~25℃ 存放接种样品。监测存放温度并作记录。

若产品对光敏感,试验过程宜避光操作。

5.4.3 在 7 d 和 14 d 时,取 1.0 mL 接种样品测定活菌数。

5.4.4 14 d 取样后,按 5.4.1 步骤,对每个样品进行再接种,使菌液浓度为 1.0×10^4 CFU/mL~ 1.0×10^5 CFU/mL。

5.4.5 在 21 d 和 28 d 时,取 1.0 mL 接种样品测定活菌数。

5.4.6 在规定的时间内,吸取 1.0 mL 样品,移入经验证的中和培养基中进行系列 10 倍稀释。用漩涡方式使混悬液充分混匀,然后静置使中和完全。中和条件基于恢复生长培养基对照试验(见 5.5.2)。

若样品中的抗微生物剂未充分失效或被中和,则用经验证的膜过滤法除去(见附录 A)。

5.4.7 对合适的稀释液,用恢复生长培养基(如细菌用 TSA,霉菌和酵母菌用 SDA)制备的平板来测定活菌数,重复 3 次(除另有规定)。

如果用膜过滤法除去或中和抗微生物剂,将滤膜放置在相应的培养基上进行培养。

如果用倾倒平板的方法,保持倾倒前的琼脂低于 50℃。

注: 必要时,用于测定活菌数的琼脂培养基也可含有抗菌失效剂或中和剂。

5.4.8 在 30℃~35℃ 培养细菌恢复生长平板;在 20℃~25℃ 或 30℃~35℃ 培养酵母菌恢复生长平板;在 20℃~25℃ 培养霉菌恢复生长平板。细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的培养时间应确定。最短培养时间基于恢复生长培养基对照试验(见 5.5.2)。记录在平板上观察到的活菌数(CFU)。

培养期间应定时地观察平板以防出现由于过度生长而无法计数的现象。

5.4.9 确定可计数平板上的平均菌落数。计算在规定时间点的微生物减少值。

注: 可计数平板指细菌和酵母菌为 30 CFU/皿~300 CFU/皿,霉菌为 8 CFU/皿~80 CFU/皿,仅在 100 或 10^{-1} 的稀释级平板上观察到的除外。

5.4.10 在某一试验时间点,当所有样品稀释级的平板上没有菌落生长时,如用“0”或“NR”(没有恢复生长)来记录微生物没有生长。

5.4.11 计算每个时间点存活菌的浓度。14 d 再接种后的活菌浓度为再接入的菌浓度和 14 d 时存活菌浓度之和。

5.5 对照试验

5.5.1 接种菌对照

通过将等量的接种菌接入如 5.4.1 所用的相同体积的适当的稀释液中,使菌液浓度达到:初次接种时为 1.0×10^5 CFU/mL~ 1.0×10^6 CFU/mL,再接种时为 1.0×10^4 CFU/mL~ 1.0×10^5 CFU/mL,来计算初次和再接种时接种菌浓度。接种菌的体积不超过溶液体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。在试验开始时估算对照溶液的每毫升菌落数(CFU/mL)为了证明用于试验菌生长的培养基的适用性,并用来推算初始接种菌浓度。从每个试管中吸取适量涂布在恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

5.5.2 恢复生长培养基对照

将防腐产品以 1/10 比例稀释至验证过的中和肉汤中混匀(1 mL 防腐产品加入 9 mL 中和肉汤中)。将混合液静置,使中和作用完全。准备第二支对照管,加入 10 mL 适合的稀释液(如 DPBST)。将适量试验菌接入上述试管中使每个平板接种菌为 10 CFU~100 CFU。在环境温度下培养适当时间。从每个试管中吸取适量溶液涂布至恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。确定细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的最短培养时间。

检查中和肉汤中的恢复生长菌数至少是第二支对照管恢复生长菌数的 50%。对每种试验菌均应进行此对照试验。

如果中和作用所需的稀释比例大于 1/10,则应使用膜过滤法。

试验开始和必要时,用每种试验菌验证样品的中和作用。

5.6 性能标准

5.6.1 概要

产品在其标示的有效期和抛弃日期内应能符合该标准。

符合 5.6.2 和 5.6.3 标准的产品,证明其开封后使用 28 d 是有效的(抛弃日期)。

注:若抛弃日期超过 28 d,参考附录 B、附录 C、附录 D 和附录 E 建议的方法。

5.6.2 细菌

在 14 d,每种试验菌每毫升恢复生长菌数平均减少值不少于 3.0logs。14 d 再接种后,在 28 d,每种试验菌的浓度应再减少,平均减少值至少 3.0logs。

5.6.3 霉菌和酵母菌

在 14 天,每种试验菌每毫升恢复生长菌数应保持或低于其初始浓度(实验误差在±0.5logs 内);在 28 天,每种试验菌的浓度应保持或低于再接种后各试验菌的浓度(实验误差在±0.5logs 内)。

5.7 试验报告

试验报告应包括:

- a) 标准名称;
- b) 产品信息,包括:
 - 产品名称;
 - 批号;
 - 有效期;
 - 制造商;
 - 储存条件;
 - 活性物质及其浓度(若可用的);
- c) 操作者姓名;
- d) 试验方案的偏离;
- e) 培养日期和时间;
- f) 接种样品的存放时间;
- g) 试验结果,包括每个试验时间点微生物恢复生长数。

附 录 A
(资料性附录)
膜过滤法操作程序实例

A.1 材料和试剂**A.1.1 培养基和试剂**

A.1.1.1 稀释液,含或不含中和剂。

A.1.1.2 胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)或其他适合培养基。

A.1.1.3 不含氯化钙和氯化镁的杜尔贝科(Dulbecco)磷酸盐缓冲液(DPBS): 200 mg/L KCl, 200 mg/L KH_2PO_4 , 8 000 mg/L NaCl 和 2 160 mg/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 或合适的稀释液。

A.1.1.4 杜尔贝科(Dulbecco)磷酸盐缓冲液,加 0.05% 聚山梨酯-80(DPBST)或合适的稀释液。

A.1.1.5 按要求经验证的中和剂、培养基,例如 Dey-Engley 中和肉汤(DEB)和 Lethen 肉汤。

A.1.2 试验器材

常用的实验室器材(如无菌移液管、培养皿和容器等)和下列装备。

A.1.2.1 无菌滤膜。

A.1.2.2 带无菌滤膜和过滤器的无菌装置。

A.1.2.3 相应的真空或压力装置,使接种试验溶液无菌地通过滤膜。

滤膜的孔径不大于 $0.45 \mu\text{m}$,滤膜直径至少 47 mm,且不含对微生物有毒的化学物质。

A.2 试验方法和结果

A.2.1 用无菌 DPBST(A.1.1.4)或合适的稀释液,将无菌过滤器装置(A.1.2.2)内的无菌滤膜(A.1.2.1)湿润。

A.2.2 无菌地将一定体积的接种试验溶液移入无菌 DPBST(A.1.1.4)或稀释液中。

A.2.3 将稀释液转移至滤器,借助真空或压力立即过滤。用 50 mL~100 mL 稀释液稀释滤膜上的样品,充分混匀确保样品在整个滤膜上均匀分布。

注:本步骤可减少多个菌落聚集在滤膜同一位置上的可能性。

A.2.4 用稀释液的数倍体积冲洗滤膜,必要时稀释液中可添加中和剂。对每种试验菌每个配方可凭经验决定实际体积。

注:通常,稀释液的三倍体积(每次 100 mL)对除去和(或)稀释抗微生物剂是足够的。

A.2.5 用合适的培养基培养滤膜,使菌落生长在滤膜表面。

注:从滤过装置上无菌地转移滤膜,并将滤膜放置在表面无明显液体的无菌琼脂平板上,或将滤膜封入琼脂层中。

或者,将无菌培养基添加到封闭的过滤器中的滤膜上,原位培养滤膜。试验时使用适合试验菌生长的培养基。

培养时间应确定。

A.2.6 测定可计数滤膜上的平均菌落数(细菌和酵母菌:3 CFU/47 mm~100 CFU/47 mm;霉菌:3 CFU/47 mm~10 CFU/47 mm)。计算并记录接种液的每毫升菌落数(CFU/mL)。

A.3 对照试验

将一定量未接种的试验溶液移入 50 mL~100 mL 的无菌稀释液中,试验溶液和稀释液之间的体积比与上述相同,来验证中和剂的有效性。用真空或压力对所有溶液进行过滤。用稀释液的数倍体积冲洗滤膜,稀释液的体积与上述试验步骤所用的相同。将 5 CFU~100 CFU 试验菌(每个滤膜一种菌)转入 100 mL 稀释液中并过滤。按试验步骤(见 A.2.5)用接触培养基的方法培养滤膜。

用不含试验溶液的稀释液重复该步骤。用合适的稀释液(例如 DPBST)代替试验溶液,用相同方法,比较其菌落数。用相应培养基来确定接种菌数,重复三次(除另有规定)。保证中和肉汤滤膜上恢复生长菌数至少为接种菌数的 50%。

附 录 B
(资料性附录)
抛弃日期操作程序 I

B.1 原理

B.1.1 本试验包括在试验开始(0 d)时用高浓度试验菌(约 10^6 CFU/mL)接种试验样品,之后用低浓度试验菌(大约 10^3 CFU/mL)再接种试验样品。

B.1.2 接种次数为:试验开始、2周、建议的抛弃日期的25%、50%、75%和100%。

B.1.3 取样次数包括:1周、2周、3周、4周,建议的抛弃日期的25%、50%、75%和100%,及建议的抛弃日期后的14 d。

B.1.4 在28 d,试验样品应符合多次量防腐接触镜护理产品的防腐有效性的试验标准。

B.1.5 再接种后出现生长停滞。

B.2 试验方法**B.2.1 材料和试剂****B.2.1.1 试验菌**

试验菌详见5.1.1。

B.2.1.2 试验培养基

试验培养基详见5.1.2。

B.2.1.3 实验室器材

实验室器材详见5.1.3。

B.2.1.4 试验样品

用三批上市的代表性的接触镜护理溶液进行试验,用以验证开封后的抛弃日期。

试验菌的维护详见5.2。

B.2.2 试验菌(接种菌)的制备

试验菌的培养和收集详见5.3。

B.2.3 接种试验程序

B.2.3.1 从单个样品中取样,准备一个体积大于250 mL的混合样。

B.2.3.2 每种试验菌分别准备50 mL样品,将样品移至250 mL的合适的容器中。

B.2.3.3 准备50 mL稀释液的容器用以细菌、酵母菌和霉菌的对照试验。

B.2.3.4 用0.5 mL浓度为 10^8 CFU/mL试验菌液接入样品和对照中,使菌液浓度达到约 10^6 CFU/mL。充分混合确保接种菌完全分散。

B.2.3.5 在20℃~25℃存放接种样品。监测存放温度并作记录。若产品对光敏感,试验过程宜避光操作。

B.2.3.6 分别在试验的1周、2周、3周、4周,抛弃日期的25%、50%、75%和100%及抛弃日期后的14 d,取1.0 mL接种样品来测定活菌数。

B.2.3.7 在试验的2周,抛弃日期的25%、50%、75%和100%,按0.05 mL/50 mL的比例,用浓度为 10^6 CFU/mL的试验菌液再接种样品,使菌液浓度大约为 10^3 CFU/mL。在每个试验时间点再接种前,测定活菌数。

B.2.3.8 在规定的时间,吸取1.0 mL样品,移入经验证的中和培养基中进行系列10倍稀释。用漩涡方式使混悬液充分混匀,然后静置使中和完全。

如果配方中的抗微生物剂未充分失效或被中和,则用经验证的膜过滤法除去(见附录 A)。

B. 2. 3. 9 对合适的稀释液,用恢复生长培养基(如细菌用 TSA,霉菌和酵母菌用 SDA)制备的平板来测定活菌数,重复三次(除另有规定)。

如果用膜过滤方法除去或中和抗微生物剂,将滤膜放置在相应的培养基上进行培养。

如果用倾平板的方法,保持倾倒前的琼脂低于 50 °C。

注:必要时,用于测定活菌数的琼脂培养基也可含有抗菌失效剂或中和剂。

B. 2. 3. 10 在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的培养时间应确定。最短培养时间基于恢复培养基对照试验(见 B. 2. 4. 2)。

B. 2. 3. 11 确定可计数平板上的平均菌落数。计算在规定时间点的微生物减少值。

注:可计数平板指细菌和酵母菌为 30 CFU/皿~300 CFU/皿,霉菌为 8CFU/皿~80 CFU/皿,仅在 10⁰ 或 10⁻¹ 的稀释级平板上观察到的除外。

B. 2. 3. 12 在某一试验时间点,当所有样品稀释级的平板上没有微生物生长时,应作记录。

B. 2. 3. 13 计算每个时间点存活菌的浓度。

B. 2. 4 对照试验

B. 2. 4. 1 接种菌对照

每次接种样品时,都要重新进行对照试验,用试验菌液接入盐溶液(对细菌和酵母菌)或盐/Tween[®] 80 溶液(对霉菌),与样品接种方法相同。用最近一次接种菌数和样品中存活菌数之和算出样品中的理论菌数。

B. 2. 4. 2 恢复生长培养基对照

将防腐产品以 1/10 比例稀释至验证过的中和肉汤中混匀(1 mL 防腐产品加入 9 mL 中和肉汤中)。将混合液静置,使中和作用完全。准备第二支对照管,加入 10 mL 适合的稀释液(如 DPBST)。将适量试验菌接入上述试管中使每个平板接种菌为 10 CFU~100 CFU。在环境温度下培养适当时间。从每个试管中吸取适量溶液涂布至恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。确定细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的最短培养时间。

检查中和肉汤中的恢复生长菌数至少是第二支对照管恢复生长菌数的 50%。对每种试验菌均应进行此对照试验。

如果中和作用所需的稀释比例大于 1/10,则应使用膜过滤法。

试验开始和定期地验证样品的中和作用。

B. 2. 5 性能标准

在 14 d,若细菌的存活数减少 3logs。14 d 之后的每个试验时间点,细菌和真菌的存活数不增加²⁾,则该产品的抛弃日期合格。

B. 2. 6 试验报告

试验报告详见 5.7。

1) Tween 是适用商品的例子,该信息为本标准使用者提供方便并不对该产品进行规定。

2) 在 ±0.5log 偏差范围内,试验样品中恢复生长的菌数不超过接种菌数与接种前存活菌数之和(即未出现微生物增殖)。

附 录 C
(资料性附录)
抛弃日期操作程序 II

C.1 原理

C.1.1 本试验包括用指定的微生物接入样品,在规定的温度存放接种样品,在规定的时间内取样并对其进行活菌计数。通过较长时期的活菌计数来确定产品抑制微生物再生长的能力。

C.1.2 本试验中所用的试验菌的量并不代表实际中可能的微生物量,而是提供可计数的量来估算微生物活性降低率和程度。

C.1.3 样品在开始时和经预期的抛弃日期模拟使用后应符合防腐接触镜护理产品的要求(性能标准见 C.2.7)。

C.1.4 在培养和计数存活菌的过程中,应采取合适的方法除去残留的抗微生物剂或使其失效,该方法的有效性应经过验证。试验时应进行相应的对照试验。

C.2 试验方法**C.2.1 材料和试剂****C.2.1.1 试验菌**

试验菌详见 5.1.1。

C.2.1.2 试验培养基

试验培养基详见 5.1.2。

C.2.1.3 实验室器材

实验室器材详见 5.1.3。

C.2.1.4 试验样品

取上市的具有代表性的三批样品,试验前从成品容器中直接取样。应取一定数量的样品确保模拟使用后有足够的样品用于接种试验(即:几个样品可以共用以提供足够的样品用于试验)。

试验菌的维护详见 5.2。

C.2.2 试验菌(接种菌)的制备

试验菌的培养和收集详见 5.3。

C.2.3 接种试验程序

C.2.3.1 对每种试验菌,准备一个可加入至少 10 mL 试验溶液的试管。将试验菌接入样品管,使其菌液浓度在 1.0×10^5 CFU/mL ~ 1.0×10^6 CFU/mL 之间。保证接种菌的体积不超过样品体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。

C.2.3.2 20 °C ~ 25 °C 存放接种样品。监测存放温度并作记录。

若产品对光敏感,试验过程宜避光操作。

C.2.3.3 在 7 d 和 14 d 时,取 1.0 mL 接种样品测定活菌数。

C.2.3.4 14 d 取样后,按 C.2.3.1 步骤,对每个样品进行再接种,使菌液浓度为 1.0×10^4 CFU/mL ~ 1.0×10^5 CFU/mL。

C.2.3.5 在 21 d 和 28 d 时,取 1.0 mL 接种样品测定活菌数。

C.2.3.6 规定的时间,吸取 1.0 mL 样品,移入经验证的中和培养基中进行系列 10 倍稀释。用漩涡方式使混悬液充分混匀,然后静置使中和完全。中和条件基于恢复生长培养基对照试验。

若样品中的抗微生物剂未充分失效或被中和,则用经验证的膜过滤法除去(见附录 A)。

C.2.3.7 对合适的稀释液,用恢复生长培养基(如细菌用 TSA,霉菌和酵母菌用 SDA)制备的平板来测定活菌数,重复三次(除另有规定)。

如果用膜过滤方法除去或中和抗微生物剂,将滤膜放置在相应的培养基上进行培养。

如果用倾倒平板的方法,保持倾倒前的琼脂低于 50 °C。

注:必要时,用于测定活菌数的琼脂培养基也可含有抗菌失效剂或中和剂。

C.2.3.8 在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的培养时间应确定。最短培养时间基于恢复培养基对照试验(见 C.2.6.2)。

C.2.3.9 确定可计数平板上的平均菌落数。计算在规定时间点的微生物减少值。

注:可计数平板指细菌和酵母菌为 30 CFU/皿~300 CFU/皿,霉菌为 8CFU/皿~80 CFU/皿,仅在 10^0 或 10^{-1} 的稀释级平板上观察到的除外。

C.2.3.10 在某一试验时间点,当所有样品稀释级的平板上没有微生物生长时,应作记录。

C.2.3.11 计算每个时间点存活菌的浓度。14 d 再接种后的活菌浓度为再接入的菌浓度和 14 d 时存活菌浓度之和。

C.2.4 模拟使用

使用在原容器中未接种的样品,在不少于目标抛弃日期的时间内,从样品容器中取出一定量的样品进行模拟使用(例如:对抛弃日期为 3 个月的产品,3 个月内每 3 d 取出 1 mL)。

取一定数量的样品确保模拟使用后有足够的样品用于接种试验(即:几个样品可以共用以提供足够的样品用于试验)。

C.2.5 模拟使用后的接种

在模拟使用期结束时,按 C.2.3 重复接种试验程序。

C.2.6 对照试验

C.2.6.1 接种菌对照

通过将等量的接种菌接入如 C.2.3.1 所用的相同体积的适当的稀释液中,使菌液浓度达到:初次接种时为 1.0×10^5 CFU/mL~ 1.0×10^6 CFU/mL,再接种时为 1.0×10^4 CFU/mL~ 1.0×10^5 CFU/mL,来计算初次和再接种时接种菌浓度。接种菌的体积不超过溶液体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。在试验开始时估算对照溶液的每毫升菌落数(CFU/mL)为了证明用于试验菌生长的培养基的适用性,并用来推算初始接种菌浓度。从每个试管中吸取适量涂布在恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

C.2.6.2 恢复生长培养基对照

将防腐产品以 1/10 比例稀释至验证过的中和肉汤中混匀(1 mL 防腐产品加入 9 mL 中和肉汤中)。将混合液静置,使中和作用完全。准备第二支对照管,加入 10 mL 适合的稀释液(如 DPBST)。将适量试验菌接入上述试管中使每个平板接种菌为 10 CFU~100 CFU。在环境温度下培养适当时间。从每个试管中吸取适量溶液涂布至恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。确定细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的最短培养时间。

检查中和肉汤中的恢复生长菌数至少是第二支对照管恢复生长菌数的 50%。对每种试验菌均应进行此对照试验。

如果中和作用所需的稀释比例大于 1/10,则应使用膜过滤法。

试验开始和定期地验证样品的中和作用。

C.2.7 性能标准

C.2.7.1 概要

模拟使用后,产品初次接种和最后接种后均应符合性能标准。

C.2.7.2 细菌

在 14 d,每毫升恢复生长菌数平均减少值不少于 3.0logs。14 d 再接种后,在 28 d,试验菌的浓度应再减少,平均减少值至少 3.0logs。

C.2.7.3 霉菌和酵母菌

在 14 d,每毫升恢复生长菌数应保持或低于其初始浓度(实验误差在 $\pm 0.5\text{logs}$ 内);在 28 d,霉菌和酵母菌的浓度应保持或低于再接种后各试验菌的浓度(实验误差在 $\pm 0.5\text{logs}$ 内)。

C.2.8 试验报告

试验报告详见 5.7。

附 录 D
(资料性附录)
抛弃日期操作程序Ⅲ

D.1 原理

D.1.1 本试验包括用指定的微生物接入样品,在规定的温度存放接种样品,在规定的时间内取样并对其进行活菌计数。通过较长时期的活菌计数来确定产品抑制微生物再生长的能力。

D.1.2 本试验中所用的试验菌的量并不代表实际中可能的微生物量,而是提供可计数的量来估算微生物活性降低率和程度。

D.1.3 在整个预期的抛弃日期期间,样品应符合防腐接触镜护理产品的要求(性能标准见 D.2.5)。

D.1.4 在培养和计数存活菌的过程中,应采取合适的方法除去残留的抗微生物剂或使其失效,该方法的有效性应经过验证。试验时应进行相应的对照试验。

D.2 试验方法

D.2.1 材料和试剂

D.2.1.1 试验菌

试验菌详见 5.1.1。

D.2.1.2 试验培养基

试验培养基详见 5.1.2。

D.2.1.3 实验室器材

实验室器材详见 5.1.3。

D.2.1.4 试验样品

取上市的具有代表性的三批样品,试验在实际样品容器内进行。建议采用最大装量的样品。

试验菌的维护详见 5.2。

D.2.2 试验菌(接种菌)的制备

试验菌的培养和收集详见 5.3。

D.2.3 接种试验程序

D.2.3.1 在试验样品中接入一种试验菌,使其菌液浓度在 1.0×10^5 CFU/mL~ 1.0×10^6 CFU/mL 之间。保证接种菌的体积不超过样品体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。

D.2.3.2 20℃~25℃存放接种样品。监测存放温度并作记录。

若产品对光敏感,试验过程宜避光操作。

D.2.3.3 在试验的 7 d、14 d、21 d 和 28 d,取 1.0 mL 接种样品测定活菌数,并在每间隔 7 d 继续取样至容器内样品用完。

D.2.3.4 规定的时间,吸取 1.0 mL 样品,移入经验证的中和培养基中进行系列 10 倍稀释。用漩涡方式使混悬液充分混匀,然后静置使中和完全。

若样品中的抗微生物菌剂未充分失效或被中和,则用经验证的膜过滤法除去(见附录 A)。

D.2.3.5 对合适的稀释液,用恢复生长培养基(如细菌用 TSA,霉菌和酵母菌用 SDA)制备的平板来测定活菌数,重复三次(除另有规定)。

如果用膜过滤方法除去或中和抗微生物剂,将滤膜放置在相应的培养基上进行培养。

如果用倾倒平板的方法,保持倾倒前的琼脂低于 50℃。

注:必要时,用于测定活菌数的琼脂培养基也可含有抗菌失效剂或中和剂。

D.2.3.6 在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的培养时间应确定。最短培养时间基于恢复培养基对照试验(见 D.2.4.2)。

D.2.3.7 确定可计数平板上的平均菌落数。计算在规定时间点的微生物减少值。

注:可计数平板指细菌和酵母菌为 30 CFU/皿~300 CFU/皿,霉菌为 8 CFU/皿~80 CFU/皿,仅在 10⁰ 或 10⁻¹ 的稀释级平板上观察到的除外。

D.2.3.8 在某一试验时间点,当所有样品稀释级的平板上没有微生物生长时,应作记录。

D.2.3.9 计算每个时间点存活菌的浓度。

D.2.4 对照试验

D.2.4.1 接种菌对照

通过将等量的接种菌接入如 D.2.3.1 所用的相同体积的适当的稀释液中,使菌液浓度达到 1.0 × 10⁴ CFU/mL~1.0 × 10⁵ CFU/mL,来计算初始接种菌浓度。接种菌的体积不超过溶液体积的 1%。充分混合使接种菌完全分散。在试验开始时估算对照溶液的每毫升菌落数(CFU/mL)为了证明用于试验菌生长的培养基的适用性,并用来推算初始接种菌浓度。从每个试管中吸取适量涂布在恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

D.2.4.2 恢复生长培养基对照

将防腐产品以 1/10 比例稀释至验证过的中和肉汤中混匀(1 mL 防腐产品加入 9 mL 中和肉汤中)。将混合液静置,使中和作用完全。准备第二支对照管,加入 10 mL 适合的稀释液(如 DPBST)。将适量试验菌接入上述试管中使每个平板接种菌为 10 CFU~100 CFU。在环境温度下培养适当时间。从每个试管中吸取适量溶液涂布至恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。确定细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的最短培养时间。

检查中和肉汤中的恢复生长菌数至少是第二支对照管恢复生长菌数的 50%。对每种试验菌均应进行此对照试验。

如果中和作用所需的稀释比例大于 1/10,则应使用膜过滤法。

试验开始和定期地验证样品的中和作用。

D.2.5 性能标准

D.2.5.1 细菌、霉菌和酵母菌

每毫升恢复生长菌数应保持或低于其初始浓度。

D.2.5.2 抛弃日期的确定

产品抛弃日期指任一微生物出现增长的时间点之前的时段。

示例:

微生物	计数时间/d					
	0	7	14	21	28	35
大肠杆菌	10 ⁵	10 ¹	10 ²	10 ²	10 ³	10 ³
绿脓杆菌	10 ⁵	10 ³	10 ³	10 ²	10 ³	10 ⁴
金黄色葡萄球菌	10 ⁵	<10	<10	<10	<10	<10
白色念珠菌	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁴	10 ²	<10	<10
黑曲霉	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁵

微生物出现增长的时间点之前的时段：

大肠杆菌=7 d

绿脓杆菌=21 d

黑曲霉=14 d

则上述假设产品的抛弃日期为开封后 7 d。

D.2.6 试验报告

试验报告详见 5.7。

附 录 E
(资料性附录)
抛弃日期操作程序 IV

E.1 原理

E.1.1 本试验指用低浓度水平的试验菌接入试验样品瓶中,按试验时间表,用低浓度水平试验菌反复接入样品瓶中。

E.1.2 接种时间为试验开始、24 h、1周、2周、4周、6周、8周、12周、16周、18周、24周,以后每间隔6周,和(或)直到预期的或标示的抛弃日期的两倍时间。

E.1.3 取样时间始于24 h、每次再接种之前和试验结束时。

E.1.4 若所有取样点的菌数小于最近接入菌数和之前存活菌数之和,则样品通过试验。

E.1.5 抛弃日期试验作为多次量防腐接触镜护理产品防腐有效性试验的一个补充,用于验证产品标示的有效期。整个有效期产品应符合抛弃试验要求。

E.2 试验方法**E.2.1 材料和试剂****E.2.1.1 试验菌**

试验菌详见5.1.1。

E.2.1.2 试验培养基

试验培养基详见5.1.2。

E.2.1.3 实验室器材

实验室器材详见5.1.3。

E.2.1.4 试验样品

对样品容器进行接种试验。取上市的具有代表性的三批样品,每批样品至少二瓶用于每种试验菌的试验,按照为抛弃日期而定的稳定性试验时间表在每个时间间隔进行试验。

试验菌的维护详见5.2。

E.2.2 试验菌(接种菌)的制备

试验菌的培养和收集详见5.3。

E.2.3 接种试验程序

E.2.3.1 试验0 d,将试验菌接入一系列被测样品容器中,使样品的试验菌浓度为 1.0×10^3 CFU/mL~ 2.0×10^3 CFU/mL。每次接入试验菌的体积不超过样品体积的0.5%,以减少因重复再接种导致试验样品稀释的风险。充分混合使接种菌完全分散。

E.2.3.2 20℃~25℃存放接种样品。监测存放温度并作记录。

若产品对光敏感,试验过程宜避光操作。

E.2.3.3 在24 h,取1.0 mL接种样品测定活菌数。

E.2.3.4 按E.2.3.1中的浓度和体积,用新培养的同一种试验菌再接种,在20℃~25℃存放至7 d,重复测定活菌数、再接种和存放等步骤。在2周、4周、6周、8周、12周、18周、24周,和必要时每间隔6周,和(或)直到预期的或标示的抛弃日期的两倍时间,重复上述步骤。

E.2.3.5 规定的时间,吸取1.0 mL样品,移入经验证的中和培养基中进行系列10倍稀释。用漩涡方式使混悬液充分混匀,然后静置使中和完全。

若样品中的抗微生物剂未充分失效或被中和,则用经验证的膜过滤法除去(见附录A)。

E. 2. 3. 6 对合适的稀释液,用恢复生长培养基(如细菌用 TSA,霉菌和酵母菌用 SDA)制备的平板来测定活菌数,重复三次(除另有规定)。

如果用膜过滤方法除去或中和抗菌微生物剂,将滤膜放置在相应的培养基上进行培养。

如果用倾倒平板的方法,保持倾倒前的琼脂低于 50 °C。

注:必要时,用于测定活菌数的琼脂培养基也可含有抗菌失效剂或中和剂。

E. 2. 3. 7 在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的培养时间应确定。最短培养时间基于恢复培养基对照试验(见 E. 2. 4. 2)。

E. 2. 3. 8 确定可计数平板上的平均菌落数。计算在规定时间点的微生物减少值。

注:可计数平板指细菌和酵母菌为 30 CFU/皿~300 CFU/皿,霉菌为 8 CFU/皿~80 CFU/皿,仅在 10^0 或 10^{-1} 的稀释级平板上观察到的除外。

E. 2. 3. 9 在某一试验时间点,当所有样品稀释级的平板上没有微生物生长时,应作记录。

E. 2. 3. 10 计算每个时间点存活菌的浓度。

E. 2. 4 对照试验

E. 2. 4. 1 接种菌对照

在各试验时间点,在对试验样品进行接种菌浓度测定的同时,对相应的装有适当稀释液(如 DPBST)的对照容器进行接种。对照容器中的稀释液体积应与试验容器中剩余的样品体积接近。充分混合使接种菌完全分散。在试验开始时估算对照溶液的每毫升菌落数(CFU/mL)为了证明用于试验菌生长的培养基的适用性,并用来推算初始接种菌浓度。从每个试管中吸取适量涂布在恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

E. 2. 4. 2 恢复生长培养基对照

将防腐产品以 1/10 比例稀释至验证过的中和肉汤中混匀(1 mL 防腐产品加入 9 mL 中和肉汤中)。将混合液静置,使中和作用完全。准备第二支对照管,加入 10 mL 适合的稀释液(如 DPBST)。将适量试验菌接入上述试管中使每个平板接种菌为 10 CFU~100 CFU。在环境温度下培养适当时间。从每个试管中吸取适量溶液涂布至恢复生长琼脂平板上,重复三次(除另有规定)。

在 30 °C~35 °C 培养细菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 或 30 °C~35 °C 培养酵母菌恢复生长平板;在 20 °C~25 °C 培养霉菌恢复生长平板。确定细菌、酵母菌和霉菌的最佳恢复生长的最短培养时间。

检查中和肉汤中的恢复生长菌数至少是第二支对照管恢复生长菌数的 50%。对每种试验菌均应进行此对照试验。

如果中和作用所需的稀释比例大于 1/10,则应使用膜过滤法。

试验开始和定期地验证样品的中和作用。

E. 2. 5 性能标准

E. 2. 5. 1 试验进行至预期的或标示的抛弃日期的两倍时间。

E. 2. 5. 2 在 $\pm 0.5 \log$ 偏差范围内,恢复生长菌数应不超过最近接入菌数和之前存活菌数之和(即未出现微生物增殖)。

E. 2. 5. 3 在整个标示的有效期内和在有效期结束开封后抛弃日期的附加时间内,产品应符合该标准。

E. 2. 6 试验报告

试验报告详见 5. 7。

附录 F

(资料性附录)

其他菌种保藏机构的试验菌

表 F.1 其他菌种保藏机构的试验菌

绿脓杆菌	MUAVCR 278 IFO 13275	CCM 1961 NCIMB 8626	CIP 82.118 NRRL B-800	DSM 1128	IAM 10374
金黄色葡萄球菌	CIP 4.83	DSM 799	IFO 13276	NCIB 9518	NCTC 10788
大肠杆菌	CIP 53.126	DSM 1576	NCDO 904	NCIB 8545	
白色念珠菌	CBS 6431 NCPF 3179	CCY 29-3-106 NCYC 1363	CIP 48.72 VTT C-85161	DSM 1386	IFO 1594
黑曲霉	CBS 733.88	DSM 1988	IMI 149007	IFO 9455	NCPF 2275
注：各菌种保藏机构的菌种等同于 ATCC 菌株。					

表 F.2 菌种保藏机构

ATCC	美国菌种保藏机构, Rockville, Md, 美国
MUAVCR	Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, 布拉格, 捷克共和国
CBS	荷兰真菌保藏机构, Baam, 荷兰
CCM	捷克微生物保藏机构, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, 捷克共和国
CCY	斯洛伐克酵母保藏机构, Chemický ústav SAV, Bratislava, 斯洛伐克
CIP	细菌保藏所, 巴黎, 法国
DSM	德国微生物保藏机构, Braunschweig, 德国
IAM	应用微生物研究所, 东京大学, 东京, 日本
IFO	日本大阪发酵研究所
IMI	国际真菌学研究所 (IMI), Kew, Surrey 英国
NCDO	国家乳品微生物保藏机构 Shinfield, Reading, 伯克郡, 英国
NCIB	国家工业细菌保藏机构, 阿伯丁, 苏格兰, 英国
NCIMB	国家工业和海洋细菌保藏机构, 阿伯丁, 苏格兰, 英国
NCPF	国家致病性真菌保藏机构, 真菌参照标准实验室, 公共卫生中心实验室, 伦敦, 英国
NCTC	国家菌种保藏机构, 公共卫生中心实验室, 伦敦, 英国
NCYC	国家酵母菌保藏机构, Nutfield, Surrey, 英国
NRRL	美国农业部北方研究中心, Peoria, 伊利诺斯州, 美国
VTT	芬兰技术研究中心, VTT 工业微生物保藏机构, Espoo, 芬兰

中华人民共和国医药
行业标准
眼科光学 接触镜护理产品
第4部分:抗微生物防腐有效性试验及
测定抛弃日期指南

YY 0719.4—2009/ISO 14730:2000

*

中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045

网址 www.spc.net.cn

电话:68523946 68517548

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 1.5 字数 33 千字
2009年11月第一版 2009年11月第一次印刷

*

书号:155066·2-19982 定价 24.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换
版权专有 侵权必究
举报电话:(010)68533533



YY 0719.4-2009