

# 初始污染菌实验方法验证方案

产品名称： 一次性包皮环切缝合器

编制： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_

审核： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_

批准： \_\_\_\_\_ 日期： \_\_\_\_\_

.....医疗器械股份有限公司

# 目录

## 初始污染菌实验方法验证方案

1. 概述
2. 验证目的
3. 职责与验证申请
4. 验证依据
5. 验证计划
6. 验证内容

# 初始污染菌实验方法验证方案

1. 概述：

初始污染菌的数量可以反映出车间环境卫生的清洁度，与产品灭菌工艺、成品热原及内毒素有直接关系，故而要对其检测方法进行验证，确认其有效性及检测准确性，从而优化产品灭菌工艺及控制产品热原及内毒素，确保产品的安全性。

2. 目的：

通过实验验证检测方法的适用性及计数用培养基的适用性。

3. 职责与验证申请：

- 3.1 质量管理部提供检测项目方案、接收标准、评价等级及相关实验。
- 3.2 生产技术部负责按验证方案生产相关样品

初始污染菌实验方法验证申请表

|                                              |    |         |                 |
|----------------------------------------------|----|---------|-----------------|
| 验证组                                          | 姓名 | 职务      | 单位              |
| 黄燕                                           | 组长 | 质量管理部经理 | .....医疗器械股份有限公司 |
| 龙章宏                                          | 组员 | 化验员     |                 |
| 苏俊                                           | 组员 | 化验员     |                 |
| 胡梓鹏                                          | 组员 | 化验员     |                 |
| 批 准                                          |    |         |                 |
| 经研究：同意以上成员组成验证小组，按照此方案对本公司的产品的初始污染菌实验方法进行验证。 |    |         |                 |
| 批准人：                                         |    | 年 月 日   |                 |

4. 依据：

《中国药典》2015 版

5. 验证计划：

- 5.1 实验操作人员确认；
- 5.2 实验室实验设备及器材的确认；
- 5.3 产品取样及方法确认。

6. 验证内容：

- 6.1 菌种和菌液制备

### 6.1.1 菌种

试验用菌株的传代次数不得超过5代(从菌种保藏中心获得的干燥菌种为第0代),并采用适宜的菌种保藏技术进行保存,以保证试验菌株的生物学特性。

### 6.1.2 菌液制备

接种金色葡萄球菌、铜绿假胞菌、枯草芽孢杆菌的培养物至胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大豆胨琼脂培养基上,30~35℃培养18~24小时;接种白色念珠菌的培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中或沙氏葡萄糖琼脂培养基上,20~25℃培养2-3天,上述培养后的新鲜培养物用PH7.0无菌化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌化钠溶液制成每1ml菌数小于100cfu(菌落形成)的菌悬液。接种黑曲霉的培养物至沙氏葡萄糖琼脂面培养基上,20~25℃培养5~7天,加入3~5ml 0.05%(ml/ml)聚山梨酯80的pH7.0无菌化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液,将孢子洗脱。然后,采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内,用0.05%(ml/ml)聚山梨酯80的pH7.0无菌化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液制成每1ml孢子数量小于100cfu的孢子悬液。

菌悬液若在室温下放置,应在2小时内使用;若保存在2~8℃在24h内使用。黑曲霉孢子悬液存在2~8℃,在验证过的贮存期内用。

## 6.2 计数培养基适用性检查

### 6.2.1 需氧菌的计数

分别取1ml的金色葡萄球菌、铜绿假胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各菌悬液,接种至胰酪大豆胨液体培养基管或胰酪大豆胨琼脂培养基平板。金色葡萄球菌、铜绿假胞菌、枯草芽孢杆菌在30-35℃,培养不超过3天;白色念珠菌、黑曲霉在20-25℃,培养不超过5天。每一试验菌株平行制备2管或2个平皿。同时,用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

### 6.2.2 霉菌和酵母菌的计数

分别取1ml的白色念珠菌、黑曲霉各菌悬液,接种至沙氏葡萄糖琼脂培养基。在20-25℃,培养不超过5天。每一试验菌株平行制备2管或2个平皿。同时,用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

### 6.2.2 结果判定

被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在0.5-2范围内,且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致;被检液体培养基管与对照培养基管比较,试验菌应生长良好。

### 6.2.3 试验结果见表1

## 6.3 计数方法验证

### 6.3.1 供试液的制备:

洗脱液用0.9%的灭菌生理盐水,检品液制备在10000级环境中进行。

### 6.3.2 接种和稀释

按下列要求进行供试液的接种和稀释, 制备微生物回收试验用供试液。所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%。为确认供试品中的微生物能被充分检出, 首先应选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。

(1) 试验组 取上述制备好的供试液, 加入试验菌液, 混匀, 使每 1ml 供试液或每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于 100cfu。

(2) 供试品对照组 取制备好的供试液, 以稀释液代替菌液同试验组操作。

(3) 菌液对照组 取不含中和剂及灭活剂的相应稀释液替代供试液, 按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

若因供试品抗菌活性或溶解性较差的原因导致无法选择最低稀释级的供试液进行方法适用性试验时, 应采用适宜的方法对供试液进行进一步的处理。如果供试品对微生物生长的抑制作用无法以其他方法消除, 供试液可经过中和、稀释或薄膜过滤处理后再加入试验菌悬液进行方法适应性试验。

### 6.3.3 抗菌活性的去除或灭活

供试液接种后, 按下列“微生物回收”规定的方法进行微生物计数。若试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值小于菌液对照组菌数值的 50%, 可采用下述方法消除供试品的抑菌活性。

(1) 增加稀释液或培养基体积。

(2) 加入适宜的中和剂或灭活剂。

### 6.3.4 微生物的回收

按照 6.2 的计数培养基所用的试验菌逐一进行微生物回收试验, 回收试验采用平皿法和薄膜过滤法。

#### 6.3.4.1 平皿法—倾注法

取 6 个直径 90mm 的无菌平皿。2 个分别注入照上述“试验组”制备的供试液 1ml; 2 个分别注入照上述“供试品对照组”制备的供试液 1ml; 2 个分别注入照上述“菌液对照组”制备的供试液 1ml。每个平皿注入 15~20ml 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。

#### 6.3.4.2 平皿法试验结果见表 2

#### 6.3.4.3 薄膜过滤法

薄膜过滤法所采用的滤膜孔径应不大于 0.45 μm, 直径一般为 50mm, 若采用其他直径的滤膜, 冲洗量应进行相应的调整。选择滤膜材质时应保证供试品及其溶剂不影响微生物的充分被截留。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时, 应保证滤膜在过滤前后的完整性。供试液经薄膜过滤后, 若需要用冲洗液冲洗滤膜, 每张滤膜每次冲洗量一般为 100ml。总冲洗量不得超过 1000ml, 以避免滤膜上的微生物受损伤。

取照上述“试验组”、“供试品对照组”和“菌液对照组”制备的供试液适量(一

般取相当于 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 的供试品，若供试品中所含的菌数较多时，供试液可酌情减量)，加至适量的稀释液中，混匀，过滤。用适量的冲洗液冲洗滤膜。每株试验菌每种培养基至少制备一张滤膜。

若测定需氧菌总数，转移滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上；若测定霉菌和酵母总数，转移滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上。

6.3.4.4 薄膜过滤法计数方法验证实验结果见表 3

# 初始污染菌实验方法验证报告

报告编号: \_\_\_\_\_

报告时间: \_\_\_\_\_

# 目录

## 初始污染菌实验方法验证报告

- 1、目的
- 2、概述
- 3、测试方法与试验结果
- 4、结论
- 5、重新验证条件



### 1. 目的:

参照《中国药典》2015 版,通过实验验证检测方法的适用性及计数用培养基的适用性,从而验证现在使用初始污染菌实验方法是否准确合格。

### 2. 概述:

产品型号为 26 型:批号为:20150101

### 3. 测试方法及检验结果:

#### 3.1 实验设备及器材:

该实验使用仪器及器具主要有:灭菌移液管及移液枪吸嘴、无菌小泵管、培养皿、小型蠕动泵、薄膜过滤器、灭菌锅、百级工作台、生物安全柜、电子天平、电热恒温培养箱、霉菌培养箱。

| 设备名称    | 是否校量 | 是否在有效期内 | 结论   |
|---------|------|---------|------|
| 灭菌锅     | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 百级工作台   | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 生物安全柜   | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 电子天平    | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 电热恒温培养箱 | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 霉菌培养箱   | 已校量  | 在有效期内   | 符合要求 |
| 确认人/日期: |      | 审核/日期:  |      |

3.2 使用材料及菌种:胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基、沙氏葡萄糖液体培养基、沙氏葡萄糖琼脂培养基、胰酪大豆胨琼脂培对照培养基、沙氏葡萄糖琼脂对照培养基、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉(菌种购买单位均为微生物种质资源库)。

#### 3.3 菌液制备:

接种金色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的培养物至胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大豆胨琼脂培养基上,30~35℃培养 18~24 小时;接种白色念珠菌的培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中或沙氏葡萄糖琼脂培养基上,20~25℃培养 2-3 天,上述培养后的新鲜培养物用 PH7.0 无菌化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌化钠溶液制成每 1ml 菌数小于 100cfu(菌落形成)的菌悬液。接种黑曲霉的培养物至沙氏葡萄糖琼脂面培养基

上，20~25℃培养 5~7 天，加入 3~5 ml 0.05%(ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 孢子数量小于 100cfu 的孢子悬液。

菌悬液若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃在 24h 内使用。黑曲霉孢子悬液存在 2~8℃，在验证过的贮存期内用。

### 3.4 培养基适用性检查

#### 3.4.1 需氧菌的计数

分别取 1ml 的金色葡萄球菌、铜绿假胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各菌悬液，接种至胰酪大豆胨液体培养基管或胰酪大豆胨琼脂培养基平板。金色葡萄球菌、铜绿假胞菌、枯草芽孢杆菌在 30-35℃，培养不超过 3 天；白色念珠菌、黑曲霉在 20-25℃，培养不超过 5 天。每一试验菌株平行制备 2 管或 2 个平皿。同时，用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

#### 3.4.2 霉菌和酵母菌的计数

分别取 1ml 的白色念珠菌、黑曲霉各菌悬液，接种至沙氏葡萄糖琼脂培养基。在 20-25℃，培养不超过 5 天。每一试验菌株平行制备 2 管或 2 个平皿。同时，用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

#### 3.4.3 结果判定

被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值应在 0.5-2 范围内，且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致；被检液体培养基管与对照培养基管比较，试验菌应生长良好。

#### 3.4.4 试验结果见表 1

表 1

| 加入菌种                                          | 培养条件       | 培养基菌落数 cfu |  |              |  | 结论                      |
|-----------------------------------------------|------------|------------|--|--------------|--|-------------------------|
|                                               |            | 胰酪大豆胨琼脂培养基 |  | 胰酪大豆胨琼脂对照培养基 |  | 胰酪大豆胨琼脂培养基/胰酪大豆胨琼脂对照培养基 |
| 铜绿假单胞菌                                        | 33℃, 48 小时 |            |  |              |  | 菌落形态大小于对照培养基上的菌落一致      |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 金黄色葡萄球菌                                       |            |            |  |              |  |                         |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 枯草芽孢杆菌                                        |            |            |  |              |  |                         |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 白色念珠菌                                         | 23℃, 72 小时 |            |  |              |  |                         |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 黑曲霉                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 加入菌种                                          | 培养条件       | 培养基菌落数 cfu |  |              |  | 结论                      |
|                                               |            | 沙氏葡萄糖琼脂培养基 |  | 沙氏葡萄糖琼脂对照培养基 |  |                         |
| 白色念珠菌                                         | 23℃, 72 小时 |            |  |              |  | 菌落形态大小于对照培养基上的菌落一致      |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 黑曲霉                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 平均值                                           |            |            |  |              |  |                         |
| 结论：从以上检测结果可知，上述批号的培养基适用性检查符合要求，可用于日常产品检测中的计数。 |            |            |  |              |  |                         |
| 验证人/日期：                                       |            |            |  | 审核/日期：       |  |                         |

3.5 计数方法验证

3.5.1 供试液的制备：

洗脱液用 0.9%的灭菌生理盐水，检品液制备在 10000 级环境中进行。

3.5.2 接种和稀释

按下列要求进行供试液的接种和稀释, 制备微生物回收试验用供试液。所加菌液的体积应不超过供试液体积的 1%。为确认供试品中的微生物能被充分检出，首先应选择最低稀释级的供试液进行计数方法适用性试验。

（1）试验组 取上述制备好的供试液，加入试验菌液，混匀，使每 1ml 供试液或每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于 100cfu。

（2）供试品对照组 取制备好的供试液，以稀释液代替菌液同试验组操作。

（3）菌液对照组 取不含中和剂及灭活剂的相应稀释液替代供试液, 按试验组操作加入试验菌液并进行微生物回收试验。

若因供试品抗菌活性或溶解性较差的原因导致无法选择最低稀释级的供试液进行方法适用性试验时，应采用适宜的方法对供试液进行进一步的处理。如果供试品对微生物生长的抑制作用无法以其他方法消除，供试液可经过中和、稀释或薄膜过滤处理后再加入试验菌悬液进行方法适应性试验。

3. 5. 3 抗菌活性的去除或灭活

供试液接种后，按下列“微生物回收”规定的方法进行微生物计数。若试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值小于菌液对照组菌数值的 50%，可采用下述方法消除供试品的抑菌活性。

- (1) 增加稀释液或培养基体积。
- (2) 加入适宜的中和剂或灭活剂。

3. 5. 4 微生物的回收

按照 6. 2 的计数培养基所用的试验菌逐一进行微生物回收试验，回收试验采用平皿法和薄膜过滤法。

3. 5. 4. 1 平皿法--倾注法

取 6 个直径 90mm 的无菌平皿。2 个分别注入照上述“试验组”制备的供试液 1ml；2 个分别注入照上述“供试品对照组”制备的供试液 1ml；2 个分别注入照上述“菌液对照组”制备的供试液 1ml。每个平皿注入 15~20ml 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。

3. 5. 4. 2 平皿法试验结果见表 2

表 2

|                                                           | 一次性包皮环切缝合器<br>样品 1 | 一次性包皮环切缝合器<br>样品 1 | 一次性包皮环切缝合器<br>样品 1 |
|-----------------------------------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 冲洗一次                                                      | 26                 | 30                 | 25                 |
| 冲洗二次                                                      | 0                  | 4                  | 2                  |
| 冲洗三次                                                      | 0                  | 0                  | 0                  |
| 冲洗四次                                                      | 0                  | 0                  | 0                  |
| 回收率                                                       | 100%               | 88. 3%             | 92. 6%             |
| 平均回收率                                                     | 93. 7%             |                    |                    |
| 修正系数                                                      | 1. 07              |                    |                    |
| 结论：以上产品各做三套平均回收率达 80%以上，一次回收率达到要求。正常试验中可采用冲洗一次后*回收系数进行估算。 |                    |                    |                    |
| 试验人/日期：                                                   |                    | 审核/日期              |                    |

#### 3.5.4.3 薄膜过滤法

薄膜过滤法所采用的滤膜孔径应不大于  $0.45\ \mu\text{m}$ , 直径一般为 50mm, 若采用其他直径的滤膜, 冲洗量应进行相应的调整。选择滤膜材质时应保证供试品及其溶剂不影响微生物的充分被截留。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时, 应保证滤膜在过滤前后的完整性。供试液经薄膜过滤后, 若需要用冲洗液冲洗滤膜, 每张滤膜每次冲洗量一般为 100ml。总冲洗量不得超过 1000ml, 以避免滤膜上的微生物受损伤。

取照上述“试验组”、“供试品对照组”和“菌液对照组”制备的供试液适量(一般取相当于 1g、1ml 或 10cm<sup>2</sup> 的供试品, 若供试品中所含的菌数较多时, 供试液可酌情减量), 加至适量的稀释液中, 混匀, 过滤。用适量的冲洗液冲洗滤膜。每株试验菌每种培养基至少制备一张滤膜。

若测定需氧菌总数, 转移滤膜菌面朝上贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上; 若测定霉菌和酵母总数, 转移滤膜菌面朝上贴于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上。

#### 3.5.4.4 薄膜过滤法计数方法验证实验结果见表 3

### 4. 验证结论

从以上检测结果可知, 上述培养基适用性检测符合规定, 采用的薄膜过滤法计数方法符合规定, 产品初始污染菌一次冲洗回收率符合规定, 上述方法适用于产品的日常检测。

### 5. 再验证周期

5.1 当培养基批号改变时须对计数培养基进行适用性检查

5.2 产品生产环境或原料发生改变时须进行计数方法的验证

5.3 当检测环境发生改变时须重新验证

表 3

| 产品名称<br>实验组     | 一次性包皮环切缝合器 |    | 菌液组             | 菌数 |
|-----------------|------------|----|-----------------|----|
| 供试液+1ml 大肠埃希菌   | 69         |    | 1ml 大肠埃希菌       | 85 |
|                 | 72         |    |                 | 80 |
|                 | 65         |    |                 | 83 |
| 菌落回收率           | 81.85      |    |                 | /  |
| 供试液+1ml 金黄色葡萄球菌 | 72         |    | 1ml 金黄色葡萄<br>球菌 | 90 |
|                 | 76         |    |                 | 89 |
|                 | 73         |    |                 | 92 |
| 菌落回收率           | 80.44      |    |                 | /  |
| 供试液+1ml 枯草芽孢杆菌  | 75         |    | 1ml 枯草芽孢杆菌      | 90 |
|                 | 70         |    |                 | 82 |
|                 | 68         |    |                 | 79 |
| 菌落回收率           | 83.67      |    |                 | /  |
| 供试液+1ml 白色念珠菌   | 52         |    | 1ml 白色念珠菌       | 64 |
|                 | 56         |    |                 | 62 |
|                 | 58         |    |                 | 65 |
| 菌落回收率           | 86.39      |    |                 | /  |
| 供试液+1m 黑曲霉      | 73         |    | 1ml 黑曲霉         | 89 |
|                 | 72         |    |                 | 90 |
|                 | 75         |    |                 | 87 |
| 菌落回收率           | 82.33      |    |                 | /  |
| 供试品对照组菌落数       | 细菌         | 霉菌 | /               | /  |
|                 | 0          | 1  | /               | /  |
|                 | 2          | 0  | /               | /  |
|                 | 1          | 0  | /               | /  |

结论：由上表可知个供试品实验条件下各试验菌的回收率均 $>70\%$ ，此试验计数方法有效，可用于产品初始污染菌的检测。

实验人/日期

审核/日期



医课汇  
公众号  
专业医疗器械资讯平台  
WECHAT OF  
HLONGMED



hlongmed.com  
医疗器械咨询服务  
MEDICAL DEVICE  
CONSULTING  
SERVICES



医课培训平台  
医疗器械任职培训  
WEB TRAINING  
CENTER



医械宝  
医疗器械知识平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF  
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM  
医械云专业平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF MEDICAL  
DEVICE