

质量管理验证文件

产品和原材料初始污染菌计数法验证方案

编制：

审核：

批准：

发布日期：年月日

2222222222 有限公司

目录

1 基本情况

2 验证目的

3 验证方案编制依据

4 验证小组

5 验证方案

6 验证记录和报告

附件：验证相关表单一览表

1 基本情况

初始污染菌数量表示医疗器械产品最终灭菌前的生物负载，用以检验医疗器械产品生产过程初始污染菌控制效果以及最终产品组成部分的相关外购件（如：初包装等）微生物总数，证明灭菌前产品微生物水平是否在确认的保证产品无菌的环氧乙烷灭菌工艺可控制接受范围内，保证医疗器械产品的热原和细菌内毒素生物指标满足产品技术要求，所以确定医疗器械产品初始污染菌洗脱培养计数检验方法的适宜性和准确性尤为重要。

基于 YY/T 0287-2017《医疗器械 质量管理体系用于法规的要求》“6.4.2 污染控制”、“7.5.2 产品的清洁”对医疗器械生产、储存、灭菌前过程产品清洁或污染控制要求，以及《医疗器械生产质量管理规范附录无菌医疗器械》第“2.5.3”和“2.7.4”条规定的医疗器械和原材料初始污染菌控制要求，必须对医疗器械产品原材料、待灭菌产品的初始污染菌进行检验和管控，为保证一次性使用输液器（带针）、一次性使用袋式输液器（带针）、一次性使用精密过滤输液器（带针）、一次性使用自动截流输液器（带针）、一次性使用无菌注射器（带针）、一次性使用无菌溶药注射器（带针）、一次性使用静脉输液针、一次性使用无菌注射针、一次性使用静脉采血针、一次性使用无菌阴道扩张器、一次性使用预引式气管导管异型套件、三腔胃管产品及产品原材料（包含产品初包装、橡胶活塞、注射针、输液针、针管、精密药液过滤器、乳胶帽、硅胶垫）的初始污染菌洗脱检验方法的正确适宜性和微生物培养计数准确性，确定用于补偿无法从医疗器械产品和原材料中完全采集培养计数微生物数值的修正系数，现制定产品和原材料初始污染菌计数法验证方案。

2 验证目的

将确定数量微生物接种到经灭菌处理的原材料、医疗器械产品外表面和（或）内腔，形成人工生物负载，依据原材料和医疗器械产品的结构特点，在袋蠕动、震摇、冲洗、搅拌、碎裂等微生物采集方法中，选择能充分收集原材料和医疗器械产品外表面和（或）内腔微生物，且对原材料和医疗器械产品不产生降解、溶出等分解化学反应的适宜的采集方法，对接种于原材料、医疗器械产品外表面和（或）内腔的微生物进行采集，通过采集液薄膜过滤，对滤膜进行培养，点计原材料、医疗器械产品外表面和（或）内腔收集的微生物数量，同时分别对原材料、医疗器械产品的微生物采集、微生物培养、微生物计数法完整检验方法的适宜性和准确性进行验证，汇总验证过程记录数据计算并确定原材料、医疗器械产品外表面和（或）内腔初始污染菌回收修正系数，为制定原材料、医疗器械产品初始污染菌采集培养计数方法提供正确依据。

3 验证方案编制依据

《医疗器械生产质量管理规范附录无菌医疗器械（2014年）》
YY 0033-2000《无菌医疗器械生产管理规范》
YY/T 0287-2017《医疗器械 质量管理体系用于法规的要求》
GB/T 16294-2010《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法》
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》
GB/T 19973.1-2015《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》
GB/T 16886.1-2011《医疗器械生物学评价 第1部分：风险管理过程中的评价与试验》
《中国药典》2015版第三部微生物检查法
WWW/JYGF-HJ-2015《工艺环境检验规范》
WWWTY-BJT-37-2016《洁净生物检验区级别分布图》
WWWTY-BJT-40-2016《洁净生物检验区温湿度压差计分布图》
WWWTY-BJT-41-2016《洁净生物检验区悬浮粒子沉降菌测试布点图》
WWW/JYGF-CPWJ-2017《成品无菌检验规范》
WWW/JYGF-JH-2018《进货物料检验规范》

4 验证小组

4.1 验证小组组成

验证小组由小组负责人、组长及技术部、质管部、生产部相关验证人员组成。

4.2 验证人员资质要求

- 4.2.1 参加验证人员要有从事医疗器械生产、质量检验、产品研发2年以上工作经历；能独立完成所负责验证的工作，准确判断验证结果，并对验证结果负责。
- 4.2.2 负责人和组长应熟悉医疗器械质量管理体系法规要求，熟悉微生物检验室洁净环境要求、监测方法和操作步骤，了解无菌检验方法、操作要求、结果评价，了解标准要求限定的医疗器械初始污染菌单位含量，了解医疗器械产品标准要求的微生物检验方法、操作要求、结果评价，熟悉医疗器械环氧乙烷灭菌过程工艺及常规控制方面知识，熟悉医疗器械微生物回收修正系数的计算和结果评价，有3年以上医疗器械生产企业工作经历，具有一定的组织、协调和沟通能力，能正确指导小组成员完成实施验证工作；
- 4.2.3 验证人员应熟悉微生物检验室洁净环境要求、医疗器械初始污染菌要求、医疗器械微生物检验方法和操作要求方面知识；
- 4.2.4 微生物检验人员应取得省级以上医疗器械检验机构培训合格证书，具备微生物学或无菌

检验技术相近专业的教育背景；熟练掌握医疗器械产品微生物检验设备操作、微生物检验方法等技术，如无菌检验操作、微生物采集、培养基制备、消毒、灭菌、注平板、菌落计数、菌种的转种、传代和保藏、微生物检查等操作方法和鉴定基本技术。

4.2.5 微生物检验室环境监测人员应明确微生物检验室万级洁净环境、百级无菌操作台环境要求，应熟练掌握微生物检验室洁净环境监测操作方法。

4.2.6 医疗器械环氧乙烷灭菌操作人员应熟悉灭菌程序、灭菌工艺、灭菌过程常规控制、灭菌操作和注意事项。

4.3 验证小组成员职责

4.3.1 验证小组负责人

负责验证方案审批，验证过程监控，验证报告的审批。

4.3.2 验证小组组长

组织起草、审核验证方案，组织实施相关培训，组织实施验证方案，完成验证报告。

4.3.3 技术部

制定医疗器械产品和原材料初始污染菌计数法验证计划和验证方案，明确验证项目、验证方法、确认依据和要求，对验证工作提供技术性指导，收集验证资料，会签验证报告。依据验证结论起草编制医疗器械产品和原材料微生物的采集、培养、计数的操作指导性文件，制定医疗器械产品和原材料的微生物回收修正系数、计算方法。

4.3.4 质管部

参与验证方案制定，对医疗器械产品和原材料微生物采集、培养、计数等检验仪器设备校准或检定有效性进行确认，负责产品和原材料微生物采集、培养、计数用仪器设备消毒或灭菌，监测微生物检验室洁净环境、组织微生物检验操作人员按照验证计划和验证方案规定方法实施验证，负责标准生物指示物培养、传代接种、计数评价，负责产品和原材料微生物采集、培养、检验、计数和最终评价，审核医疗器械产品和原材料微生物检验数据、检验结果，出具检验报告。

4.3.5 生产部

参与验证方案制定，组织和指导环氧乙烷灭菌操作人员实施验证，并做好验证记录。

5 验证方案

5.1 验证小组成员资格确认

- 1、确认目的：确保参与产品和原材料初始污染菌计数法验证工作的人员资格满足规定要求。
- 2、确认要求：医疗器械产品和原材料初始污染菌计数法验证小组组成、验证人员的资格和验证职责应能满足验证方案第4章验证小组规定要求，所有参与验证人员的工作履历、

资质、培训、考核内容和结果均应记录归档。

3、确认依据：产品和原材料初始污染菌计数法验证方案。

4、确认项目：验证小组及成员应熟悉：

①医疗器械质量管理体系法规，②医疗器械生产质量管理规范，③《中国药典》规定的微生物检验方法、操作要求、结果评价，④微生物检验室洁净环境要求、检测方法、操作步骤，⑤医疗器械产品和原材料初始污染菌数量限定要求，⑥医疗器械微生物检验方法、操作要求、结果评价，⑦医疗器械环氧乙烷灭菌过程工艺及常规控制，⑧产品和原材料初始污染菌回收修正系数计算、结果评价。

5、确认方法：核对验证人员工作所属部门，收集验证小组成员的培训记录、资质证明、工作经历等证明资料，审核验证人员是否熟悉确认项目内容，是否熟练掌握确认项目规定的检验方法或操作技术，依据收集资料、审核记录数据判定验证小组成员是否能够满足验证方案第 5 章验证小组详细规定要求。

6、验证实施：验证小组成员资格验证由技术部、质管部相关验证人员对验证小组成员的培训记录、资质证明、工作经历等相关证明资料进行收集或记录，汇总验证过程收集资料和记录数据，判定验证小组成员能否满足验证方案第 4 章验证小组规定资质和职责要求。

5.2 检验仪器设备确认

1、确认目的：确保产品和原材料初始污染菌计数法验证过程数据和结果的准确性。

2、确认要求：用于医疗器械产品和原材料微生物检验的仪器设备类型、量程和精度等级应满足验证方案编制依据的相关标准检验方法规定要求，用于无菌检验环境监测的检验仪器设备类型、量程和精度等级应满足验证方案编制依据的相关环境监测标准检验方法规定要求，所有用于医疗器械产品和原材料微生物检验过程和无菌检验环境计量监测使用的仪器设备应经过检定或校准，并在有效使用期内。

3、确认依据：GB/T 16294-2010 《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法》，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》，GB/T 19973.1-2015《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》，《中国药典》2015 版第三部微生物检查法，WWW/JYGF-CPWJ-2017 《成品无菌检验规范》，检验仪器设备检定或校准证明文件。

4、确认项目：检验仪器设备适用性，检验仪器设备数量正确性，检验仪器设备类型、量程和精度，检验仪器设备有效使用期。

5、确认方法：收集并记录医疗器械产品和原材料微生物制备、培养、负载、采集、计数等检验

操作需要使用的仪器设备名称、用途类型、数量、量程和精度等级等数据，收集并记录无菌检验环境监测使用的收集、核对和记录检验仪器设备的检定或校准、使用有效期等证明资料，依据医疗器械微生物检验项目、检验方法相关标准规定要求判定仪器设备是否适用，测量范围或精度是否满足微生物检验要求，数量是否满足检验要求，是否经过检定或校准，是否符合使用有效期内。

6、验证实施：由技术部、质管部相关验证人员按照规定的确认方法对医疗器械产品和原材料微生物检验需要使用的仪器设备适用性、数量正确性、性能及精确度、有效使用期进行验证，收集仪器设备规格型号、测量范围或精度、检定或校准、使用有效期等相关证明资料，记录仪器设备名称、类型、数量、测量范围和精确度等级等指标，汇总验证过程记录数据、证明资料，判定是否满足验证方案规定的确认要求。

5.3 产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件确认

1、确认目的：确保本次产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据的文件正确适用、完整、有效。

2、确认要求：产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件应能够为编制验证方法、试验方法、检验方法、确认要求作出正确指导，应能够为产品和原材料初始污染菌计数法验证结果提供正确的判定依据，文件资料应完整正确、现行有效。

3、确认依据：产品和原材料初始污染菌计数法验证方案。

4、确认项目：产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件正确适用性、完整性、有效性。

5、确认方法：收集和记录产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件名称和版本号，检查记录文件外观是否完整，核对和记录文件是否能够为产品和原材料初始污染菌计数法验证方法、检验方法、确认要求作出正确指导，能否适用于产品和原材料初始污染菌计数法验证结果的正确判定依据，文件内容是否正确完整，版本是否现行有效，依据验证方案规定的确认要求对产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件正确适用性、完整性、有效性作出判定。

6、验证实施：由技术部、质管部相关验证人员按照规定的确认方法对产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件资料的正确适用性、完整性、有效性进行验证，收集和记录文件名称、版本号，检查文件外观，核对文件内容，汇总验证过程记录数据，判定是否满足验证方案规定的确认要求。

5.4 微生物培养基适用性确认

- 1、确认目的：确保用于产品和原材料微生物回收计数培养基的无菌性和灵敏度满足规定要求。
- 2、确认要求：用于产品和原材料微生物回收计数的培养基应无菌生长，①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；②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。

备注：本检查可在供试品的无菌检查前或与供试品的无菌检查同时进行。

- 3、确认依据：《中国药典》2015 版第三部微生物检查法，GB 19973.1-2015《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》。
- 4、确认项目：产品和原材料微生物回收计数培养基的无菌性和灵敏度。
- 5、确认方法：形成产品和原材料的人工生物负载选择耐受高温、对环境要求不高、易生长的金黄色葡萄球菌，计数培养基为胰酪大豆胨液体培养基和胰酪大豆胨琼脂培养基。

(一)按照胰酪大豆胨培养基使用说明和要求制备培养基，并进行无菌性能检查：

按照培养基使用说明的规定用量称取每批次的胰酪大豆胨培养基，加入蒸馏水，搅拌加热煮沸至完全溶解，分装至玻璃试管或三角烧瓶中，每支装量 30ml，根据培养基使用要求规定的灭菌方法进行培养基灭菌，用 1N 盐酸或 1N 的 NaOH 调节培养基 25℃pH 值至 7.3 ± 0.2 ，随机抽取 6 支，于 20℃~25℃环境下培养 14 天，应无菌生长；

(二)按照以下方法操作，接种金黄色葡萄球菌至培养基，进行培养基适用性检查。

(1)菌悬液制备：

①取冻干菌种管，在无菌操作下打开，以毛细吸管加入适量胰酪大豆胨液体培养基，轻柔吹吸数次，使金黄色葡萄球菌融化分散。取含 5.0ml~10.0ml 胰酪大豆胨液体培养基试管，滴入少许菌种悬液，置 30℃~35℃培养 18h~24h。用接种环取第 1 代培养的菌悬液，划线接种于营养琼脂培养基平板上，于 30℃~35℃培养 18h~24h。挑取上述第 2 代培养物中典型菌落，接种于营养琼脂斜面，于 30℃~35℃培养 18h~24h，即为第 3 代培养物。

②取菌种第 3 代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物，用 5.0ml 吸管吸取 3.0ml~5.0ml 0.9%NaCl 稀释液加入斜面试管内，反复吹吸，洗下菌苔。随后，用 5.0ml 吸管将洗液移至另一无菌试管中，用电动混合器混合（振荡）20s，使细菌悬浮均匀。

③初步制成的菌悬液，先用浊度计粗测其含菌浓度，然后用稀释液稀释至含菌量约为 50cfu/ml~100cfu/ml 的浓度，菌悬液制备操作方法如下：

a、从冰箱取第 3 代菌种的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物（18h~24h）至无

菌超净工作台，点燃酒精灯，左手握住菌种管和装有 10ml 无菌 0.9%NaCl 溶液接种管斜面，将管口靠近火焰上旋转烧灼后，右手用无名指、小指及掌部夹住管塞，再轻轻拔出管塞，将接种管 5ml~6ml 无菌氯化钠溶液倒入菌种管内，将管口和管塞底部靠近火焰上旋转烧灼后，将管塞堵住菌种管和接种管。

- b、右手拿接种棒后端，将接种环烧红待冷却，随后将接种棒金属部分在火焰上烧烤，往返通过 3 次，右手用无名指、小指及掌部夹住菌种管和接种管塞，左手将管口在火焰上旋转烧灼，右手再轻轻拔开管塞，将接种环伸入管内，先在近壁的琼脂斜面上靠一下，稍冷却再移至菌苔上，刮取少量菌苔，随即取出接种棒，并将菌种管口移至火焰旁，堵住管塞，左手轻摇菌种管，使刮下的菌苔摇晃均匀。
- c、将菌种管和接种管口靠近火焰上旋转烧灼后，右手用无名指、小指及掌部夹住管塞，再轻轻拔出管塞，将菌种管内的菌苔氯化钠溶液全部倒入接种管内，将管口和管塞底部靠近火焰上旋转烧灼后，将管塞堵住菌种管和接种管，初步制成菌悬母液。
- d、将试管按需要数量分组排列于试管架上，每管加入 9ml 无菌 0.9%NaCl 溶液。由左向右，逐管标注 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} …… 10^{-10} 。
- e、再将菌悬母液样本用电动混合器混合（振荡）20s，吸取 1ml 菌悬母液加至 10^{-1} 试管内；将 10^{-1} 管依前法用电动混合器混合（振荡）20s，吸取 1ml 稀释度 10^{-1} 菌悬液加入 10^{-2} 试管内；如此类推，直至最后一管。
- f、用无菌 1ml 吸管吸取其中一个或两个稀释度混合均匀的菌悬液 1ml 至无菌平皿中，每个稀释度做 5 个平皿菌悬液浓度检验，汇总菌悬液含菌量，计算菌悬液浓度。

④进行阴性对照试验应无菌生长，确保试验条件符合要求。

⑤细菌悬液应保存在 $2^{\circ}\text{C}\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱内 24h 内使用。

⑥怀疑有污染时，应以菌落形态、革兰染色与生化试验等法进行鉴定。

(2)培养基接种、培养：

接种 1ml 小于 100cfu/ml 的金黄色葡萄球菌悬液至 9ml 胰酪大豆胨液体培养基管、15ml 胰酪大豆胨琼脂培养基平皿，平行制备 5 管、5 个平皿，放置温度 $30^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养时间 72h，同时用对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

(3)菌落计数：

对胰酪大豆胨琼脂培养基和对照培养基上的金黄色葡萄球菌落数计数，并

计算被检培养基菌落平均值与对照培养基菌落平均数的比值，检查被检液体培养基管与对照培养基管金黄色葡萄球菌生长情况。

6、试验注意事项：

- ①严格按照无菌要求操作，防止污染。
- ②菌悬液分布在产品上，宜包括最难取下的自然污染物的部位。
- ③认真检查试验器材有无破损（要特别注意试管底的裂痕和破洞），以防丢失样本和污染环境。
- ④注意菌液的均匀分散。
- ⑤稀释或取液时要准确，尽量减少吸管使用中产生的误差。
- ⑥每吸取一个稀释度样液，必须更换一支吸管，以减少误差。
- ⑦样液接种于平皿后应尽快倾注营养琼脂培养基，避免样液干燥于平皿上，影响结果准确性。
- ⑧倾注琼脂培养基温度不得 $>45^{\circ}\text{C}$ ，以防损伤细菌。倾注和摇动时，动作应尽量平稳，以利细菌分散均匀，便于计数菌落。勿使培养基外溢，以免影响结果的准确性和造成环境污染。
- ⑨为提高试验成功率，先用浊度计对原菌液含菌量做出估计，尽可能在首次试验时所取的有限稀释范围内，即有长菌在 $50\text{cfu}\sim 100\text{cfu}$ 之间的平板。
- ⑩结果计算时，必须弄清供试液稀释倍数，以免计算错误。

7、验证实施：由技术部、质管部相关验证人员按照规定的确认方法对微生物培养基适用性进行验证，记录微生物检验数据，收集汇总验证过程记录数据，判定微生物培养基无菌性和灵敏度是否满足验证方案规定的确认要求。

5.5 微生物检验室洁净环境确认

- 1、确认目的：保证产品和原材料微生物检验准确性的微生物检验室洁净环境符合规定要求。
- 2、确认要求：产品和原材料微生物检验操作过程中，对微生物检验室洁净环境进行实时监测，要求如下：
 - ①温度应控制在 $18^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 之间，湿度应控制在 $45\%\sim 65\%$ 之间；
 - ②洁净区与非洁净区之间压差不小于 10Pa ；不同级别洁净区之间的压差不小于 10Pa ；
 - ③沉降菌：百级洁净室每皿菌落数 ≤ 1 个，万级洁净室每皿菌落数 ≤ 3 个，十万级室每皿菌落数 ≤ 10 个，三十万级洁净室每皿菌落数 ≤ 15 个。
- 3、确认依据：YY 0033-2000《无菌医疗器械生产管理规范》，
GB/T 16294-2010《医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法》
WWW/JYGF-HJ-2015《工艺环境检验规范》，
WWWTY-BJT-37-2016《洁净生物检验区级别分布图》，

WWWTY-BJT-40-2016《洁净生物检验区温湿度压差计分布图》，

WWWTY-BJT-41-2016《洁净生物检验区悬浮粒子沉降菌测试布点图》。

4、确认项目：微生物检验室环境温度、微生物检验室环境湿度、微生物检验室不同级别洁净区之间压差、微生物检验室环境沉降菌。

5、确认方法：在对产品和原材料进行微生物检验操作过程中，洁净环境监测人员按照如下操作方法每间隔 30 分钟分别对微生物检验室环境温湿度、沉降菌、不同级别洁净区压差进行实时监测：

①温湿度：洁净室空调系统正常运行 30min 以上，按照测试布点图到各监测点，观察现场对悬挂的温湿度计，记录洁净室环境的温湿度。

②压差：洁净室空调系统正常运行 30min 以上，按照测试布点图到各监测点，观察现场对悬挂的压差计，记录不同级别洁净室之间的大气压差。

③沉降菌：按照洁净室沉降菌测试布点图指定放置点，放置约 20ml 胰蛋白胨大豆琼脂培养基的直径为 90mm 培养皿，打开培养皿盖，使培养基表面暴露 30min，再将培养皿盖盖上后倒置，全部采样结束后，将培养皿倒置于恒温培养箱中，在温度 30℃~35℃环境下培养 48h，取同批培养皿 3 只作阴性对照。胰蛋白胨大豆琼脂培养皿盖取下放置时应将凹面朝下。用矫正或正常视力标记计数，然后用 5~10 倍放大镜复查，有无遗漏，若培养皿上有 2 个或 2 个以上的可分辨的菌落重叠，仍以 2 个或 2 个以上的菌落计数，计数时一般用透射光于培养皿背面或正面仔细观察，不要漏计培养皿边缘生长的菌落，并必须注意细菌菌落和培养基沉淀物的区别，必要时用显微镜鉴别。记录和汇总洁净室沉降菌检验数据，按以下公式计算结果：

$$\text{洁净室平均菌落数 (个/皿)} = \frac{\text{洁净室培养皿内菌落总数 (个)}}{\text{培养皿总数 (皿)}}$$

洁净环境监测人员汇总以上环境监测项目检验结果，汇总记录数据，依据验证方案规定的确认要求，最终判定产品和原材微生物检验过程的微生物检验室洁净环境温湿度、不同级别洁净室之间大气压差、沉降菌是否合格。

6、验证实施：由质管部相关验证人员按照规定的确认方法对产品和原材料微生物检验过程的微生物检验室洁净环境温度、湿度、不同级别洁净室之间压差、沉降菌进行监测，收集微生物检验室洁净环境监测报告，汇总洁净环境监测数据，最终依据验证方案规定的确认要求对产品和原材料微生物检验过程的微生物检验室洁净环境各项监测项目作出判定。

5.6 产品和原材料无菌性能和环氧乙烷残留量确认

- 1、确认目的：保证经过灭菌的医疗器械产品和原材料环氧乙烷残留量不足以抑制接种微生物的生长，用于产品和原材料初始污染菌计数法验证需要使用的医疗器械产品和原材料经过灭菌的无菌性能和环氧乙烷残留量满足规定要求。
- 2、确认要求：将本次验证相关的医疗器械产品和原材料按照规定的环氧乙烷灭菌工艺灭菌后，经过微生物无菌检验，应保证无菌生长；每套输液器类和气管导管异型套件产品环氧乙烷残留量应不大于 0.5mg，注射器、扩张器和三腔胃管产品环氧乙烷残留量应不大于 10 μ g/g，每支静脉采血针环氧乙烷残留量应不大于 0.1mg，原材料环氧乙烷灭菌剂残留量应满足最终装配产品技术标准要求。
- 3、确认依据：GB 19973.1-2015《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》，WWW/JYGF-CPWJ-2017《成品无菌检验规范》，WWW/JYGF-JH-2018《进货物料检验规范》。
- 4、确认项目：一次性使用输液器（带针）、一次性使用袋式输液器（带针）、一次性使用精密过滤输液器（带针）、一次性使用自动截流输液器（带针）、一次性使用无菌注射器（带针）、一次性使用无菌溶药注射器（带针）、一次性使用静脉输液针、一次性使用无菌注射针、一次性使用静脉采血针、一次性使用无菌阴道扩张器、一次性使用预引式气管导管异型套件、三腔胃管产品及产品原材料（包含产品初包装、橡胶活塞、注射针、输液针、针管、精密药液过滤器、乳胶帽、硅胶垫）无菌性能和环氧乙烷残留量。
- 5、确认方法：采用确认的环氧乙烷灭菌工艺对医疗器械产品及原材料样品灭菌，经过解析后，按照 WWW/JYGF-CPWJ-2017《成品无菌检验规范》和 WWW/JYGF-JH-2018《进货物料检验规范》规定的微生物检验方法、环氧乙烷残留量气相色谱法检验灭菌后的医疗器械产品及原材料样品的微生物和环氧乙烷残留量，最终依据记录的检验数据判定医疗器械产品及原材料无菌性能和环氧乙烷残留量是否满足规定要求。
- 6、验证实施：由生产部、技术部、质管部相关验证人员按照规定的确认方法对医疗器械产品和原材料样品进行环氧乙烷灭菌、微生物无菌检验、环氧乙烷残留量检验，收集医疗器械产品和原材料微生物检验和环氧乙烷残留量检验报告，汇总检验数据和结果，判定医疗器械产品和原材料的无菌性能和环氧乙烷残留量是否满足规定要求。

5.7 产品和原材料微生物采集培养计数方法确认

- 1、确认目的：证实医疗器械产品和原材料（包含产品初包装、橡胶活塞、注射针、输液针、针管、精密药液过滤器、乳胶帽、硅胶垫）微生物检验结果满足微生物检验标准规

定要求的微生物采集培养计数方法。

2、确认要求：使用规定医疗器械产品和原材料微生物取样采集计数方法进行医疗器械产品和原材料内腔和（或）外表面的微生物收集、培养、点计，试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌悬液对照组菌落数的比值应在 0.5~2 范围内。

3、确认依据：《中国药典》2015 版第三部微生物检验方法，

GB/T 14233.2-2015《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》，

GB/T 19973.1-2015《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》。

4、确认项目：一次性使用输液器（带针）、一次性使用袋式输液器（带针）、一次性使用精密过滤输液器（带针）、一次性使用自动截流输液器（带针）、一次性使用无菌注射器（带针）、一次性使用无菌溶药注射器（带针）、一次性使用静脉输液针、一次性使用无菌注射针、一次性使用静脉采血针、一次性使用无菌阴道扩张器、一次性使用预引式气管导管异型套件、三腔胃管医疗器械产品及产品原材料（包含产品初包装、橡胶活塞、注射针、输液针、针管、精密药液过滤器、乳胶帽、硅胶垫）微生物采集培养计数方法适用性、微生物采集回收修正系数。

5、医疗器械人工生物负载位置和操作方法：

(1)根据医疗器械产品用途类型、产品结构、组成部件、材料类型，以及医疗器械产品与药液或人体接触部位，将医疗器械产品分为外部接触、管道内腔接触、非管道接触三类，规定医疗器械产品的人工微生物负载部位如下：

①输液器类：产品外部人工微生物负载部位为输液器组件表面，产品内腔人工微生物负载部位为输液器管道内腔。

②注射器类：产品外部人工微生物负载部位为注射器外套表面，产品内腔人工微生物负载部位为注射器外套内腔。

③静脉输液针和静脉采血针：产品外部人工微生物负载部位为静脉输液针和静脉采血针表面，产品内腔人工微生物负载部位为静脉输液针和静脉采血针药液流经软管的内腔。

④注射针/扩张器/气管导管异型套件/三腔胃管：人工生物负载部位为产品表面。

(2)在 100 级洁净环境下，将无菌性能、环氧乙烷残留量满足产品技术要求的医疗器械产品放置于无菌工作台内，接种 1ml 或 0.5ml 不小于 50cfu 的金黄色葡萄球菌悬液至规定人工负载位置，在 100 级洁净环境下自然干燥。

6、原材料人工生物负载位置和操作方法：

(1)根据产品原材料在医疗器械产品结构的位置，以及原材料的外表/内腔直接与产品、药液或人体接触的部位，规定原材料人工生物负载部位如下：

原材料名称	直接与药物或人体接触部位分析描述	人工生物负载部位
产品初包装	初包装内表面直接与医疗器械产品接触。	初包装内表面
橡胶活塞	橡胶活塞外表面直接与注射器药液接触。	活塞外表面
注射针	注射针直接与药液、人体接触。	注射针外表面
输液针	输液针直接与药液、人体接触。	输液针外表面
针管	针管直接与药液、人体接触。	针管外表面
精密药液过滤器	过滤器内腔直接与药液接触。	过滤器内腔
乳胶帽	乳胶帽内腔直接与输液器药液管路连接。	乳胶帽内腔
硅胶垫	硅胶垫外表面直接与输注药液接触。	硅胶垫外表面

(2)考虑到产品原材料类型差异，表面积大小不同，尤其是在对表面积小的原材料进行人工生物负载操作时，极易出现菌悬液溢流、微生物丢失现象，为保证原材料外表面或内腔人工生物负载完整性，规定在 100 级洁净环境下，将无菌性能、环氧乙烷残留量满足医疗器械产品技术要求的产品原材料置于无菌工作台内，按照原材料类型和表面积大小差异制定不同的人工生物负载操作方法如下：

- ①初包装、精密药液过滤器：接种 1ml 或 0.5ml 不小于 50cfu 金黄色葡萄球菌悬液至每个初包装、精密药液过滤器规定人工生物负载部位，在 100 级洁净环境下自然干燥。
- ②橡胶活塞、硅胶垫、乳胶帽：按照每组 5 个原材料数量单位接种 1ml 或 0.5ml 不小于 50cfu 金黄色葡萄球菌悬液至规定人工生物负载部位，在 100 级洁净环境下自然干燥。
- ③注射针、输液针、针管：按照每组 10 个原材料数量单位接种 1ml 或 0.5ml 不小于 50cfu 金黄色葡萄球菌悬液至规定人工生物负载部位，在 100 级洁净环境下自然干燥。

7、试验样品数量：按照医疗器械产品和原材料类型规定试验样品数量如下：

- (1)医疗器械产品：收集 10 个医疗器械产品人工生物负载样品进行微生物回收计数方法适用性平行试验。
- (2)原材料：
 - ①初包装、精密药液过滤器：分别收集 10 个初包装、精密药液过滤器人工生物负载样品进行微生物回收计数方法适用性平行试验。
 - ②橡胶活塞、硅胶垫、乳胶帽、注射针、输液针、针管：分别收集 10 组原材料人工生物负载样品进行微生物回收计数方法适用性平行试验。

8、供试液制备：洗脱液用 pH7.0 的无菌 0.9%NaCl，将接种菌悬液且自然干燥的医疗器械产品

和原材料按照下列规定冲洗、洗脱、搅拌方法操作，收集洗脱液作为供试液。供试液制备在 10000 级环境中进行。

①输液器：

- a、产品外表面：将产品管路终端用硫化硅橡胶封堵，装入无菌塑料包装袋或均质袋中，加入洗脱液 100ml 密封，放置于振荡器中正反面各振荡 1min，解封包装袋或均质袋，用无菌容器收集产品外表面洗脱液。
- b、产品内腔：先将产品的出液管路用夹具夹紧，按照 10ml/min 流速从产品的入液端口注入洗脱液 50ml，再夹紧输液器的进液管路，放置于振荡器中正反面各振荡 1min，最后取出输液器，松开出液管路夹具，用无菌容器收集产品内腔洗脱液。

②注射器：

- a、产品外表面：将产品装入无菌塑料包装袋或均质袋中，加入洗脱液 100ml 密封，放置于振荡器中正反各振荡 1min，解封包装袋或均质袋，用无菌容器收集产品外表面洗脱液。
- b、产品内腔：抽动注射器芯杆，向产品内腔注入注射器公称容量 1/2 的洗脱液后装入注射器芯杆至最大行程位置，放置于振荡器中正反各振荡 1min，用无菌容器收集产品内腔洗脱液。

③静脉输液针和静脉采血针：

- a、产品外表面：将产品装入无菌塑料包装袋或均质袋中，加入洗脱液 50ml 密封，放置于振荡器中正反各振荡 1min，解封包装袋或均质袋，用无菌容器收集产品外表面洗脱液。
- b、产品内腔：用无菌容器收集按照 10ml/min 流速向产品内腔连续注入的 20ml 洗脱液，用无菌容器收集产品内腔洗脱液。

④注射针/扩张器/气管导管异型套件/三腔胃管：

将产品装入无菌塑料包装袋或均质袋中，加入洗脱液 100ml 密封，放置于振荡器中正反各振荡 1min，解封包装袋或均质袋，用无菌容器收集洗脱液。

⑤原材料：

- a、产品初包装：加入洗脱液 10ml 密封，放置于振荡器中正反各振荡 1min，解封包装袋，用无菌容器收集洗脱液。
- b、精密药液过滤器：按照 10ml/min 流速向过滤器内腔注入 10ml 洗脱液，用无菌容器收集洗脱液。
- c、橡胶活塞、硅胶垫、乳胶帽、注射针、输液针、针管：将人工生物负载的每

组原材料试验样品放置于 250ml 的具塞三角瓶内，加洗脱液 100ml，放置于振荡器中振荡 1min。

9、试验组制备：试验组取上述制备好的供试液，加入供试液体积 1%（菌落数量 1ml 或 0.5ml 不小于 50cfu）的金黄色葡萄球菌悬液，混匀。

10、供试品对照组制备：取上述制备好的供试液，以 pH7.0 的无菌 0.9%NaCl 代替菌悬液同试验组操作。

11、菌液对照组制备：取 pH7.0 的无菌 0.9%NaCl 替代供试液，按照试验组操作加入金黄色葡萄球菌悬液进行微生物回收试验。

12、微生物回收培养计数：依据《中国药典》2015 版第三部微生物检验方法，按照以下薄膜过滤法进行微生物回收培养计数：

①滤膜要求：滤膜孔径应不大于 0.45 μm ，直径为 50mm，滤器及滤膜使用前应灭菌。使用过程中滤膜应完整。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 100ml。总冲洗量不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。

②将试验组、供试品对照组、菌液对照组混匀后分别经滤膜过滤，将滤膜菌面朝上分别贴于胰酪大豆胨培养基平皿上，置 30 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72h。

③点计平皿细菌菌落数，菌落蔓延成片的平板不宜计数，报告总菌落数。

④误差要求：规定试验样品数量的医疗器械产品和原材料回收菌落数间的误差率不宜超过 10%。样品试验数量间误差率按以下公式计算。

$$\text{样品试验数量误差率} = \frac{\text{样品试验数量间菌落数平均差}}{\text{样品试验数量间菌落平均数}} \times 100\%$$

13、阴性对照及要求：将同批未进行接种胰蛋白胨大豆琼脂平板在 30 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 48h，作为阴性对照，阴性对照平皿应无菌生长。

14、试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌悬液对照组菌落数的比值计算公式如下：

$$\text{试验组菌落数减去供试品对照组菌落数的值与菌悬液对照组菌落数的比值} = \frac{\text{试验组菌落数} - \text{供试品对照组菌落数}}{\text{菌悬液对照组菌落数}}$$

15、在确认以上医疗器械产品和原材料微生物采集回收计数方法适用性验证结果满足验证方案规定要求后，按照以下微生物采集回收修正系数计算公式，分别计算一次性使用输液器（带针）、一次性使用袋式输液器（带针）、一次性使用精密过滤输液器（带针）、一次性使用自动截流输液器（带针）、一次性使用无菌注射器（带针）、一次性使用无菌溶药注射器（带针）、一次性使用静脉输液针、一次性使用无菌注射针、一次性使用静脉采血针、一次性使用无菌阴道扩张器、一次性使用预引式气管导管异型套件、三腔胃管医疗器械产品及产品

原材料（包含产品初包装、橡胶活塞、注射针、输液针、针管、精密药液过滤器、乳胶帽、硅胶垫）微生物采集回收修正系数：

$$\text{微生物采集回收修正系数} = \frac{\text{菌悬液对照组菌落数}}{\text{试验组菌落数} - \text{供试品对照组菌落数}}$$

16、试验注意事项：

- ①严格按照无菌要求操作，防止污染。
- ②菌悬液分布在产品上，宜包括最难取下的自然污染物的部位。
- ③认真检查试验器材有无破损（要特别注意试管底的裂痕和破洞），以防丢失样本和污染环境。
- ④注意菌液取液时要准确，菌液要均匀分散。
- ⑤琼脂培养基温度不得 $>45^{\circ}\text{C}$ ，以防损伤细菌。
- ⑥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。
- ⑦供试液接种后进行微生物计数。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%，可采用增加稀释液或培养基体积或者加入适宜的中和剂或灭活剂方法消除供试品的抑菌活性。

17、验证实施：由技术部、质管部相关验证人员按照规定的确认方法进行医疗器械产品和原材料微生物采集回收培养计数方法验证，记录医疗器械产品和原材料微生物检验数据，填写验证记录表单，汇总检验数据和结果，判定医疗器械产品和原材料微生物采集回收培养计数方法是否满足微生物检验规定要求，计算确认微生物采集回收培养计数方法适用性验证满足规定要求的医疗器械产品和原材料微生物采集回收修正系数。

6 验证记录和报告

所有验证由验证小组编制相关验证记录，验证记录应包括附件“验证相关记录一览表”中规定的记录项目。验证人员应按照审核批准的验证方案规定要求实施验证工作，提供真实准确的验证数据，并实时填写验证记录，必要时验证记录中应注明验证的实施方法、验证内容、判定要求和判定规则。本验证方案记录表单中需要附加的记录，验证后应将相关附加记录整理放置于对应的表单后，以保证验证过程记录数据的完整。若附加记录较多，可在相关表单中注明该附加记录的出处。

验证组长应审核验证记录，审批验证报告，验证记录和报告应有验证人员署名、有明确的验证结论，验证过程应提供完整的验证实施过程记录数据、表单、报告和相关验证资料。

验证完毕，验证组长应收集、整理所有验证实施过程记录数据、表单、报告和验证相关资料，并归档管理。

附件：验证相关表单一览表

编制： 日期：

审核： 日期：

批准： 日期：

附件：验证相关表单一览表

验证内容	表单编号
验证小组成员资格确认表	YZ. CSWRJJSF-01
检验仪器设备确认表	YZ. CSWRJJSF-02
产品和原材料初始污染菌计数法验证方案编制依据文件确认表	YZ. CSWRJJSF-03
微生物培养基适用性确认表	YZ. CSWRJJSF-04
微生物检验室洁净环境确认表	YZ. CSWRJJSF-05
产品和原材料无菌性能和环氧乙烷残留量确认表	YZ. CSWRJJSF-06
产品和原材料微生物采集培养计数方法确认表	YZ. CSWRJJSF-07



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