

一次性使用无菌医疗器械无菌试验 方法验证方案

编制：_____日期：_____

审核：_____日期：_____

批准：_____日期：_____

1.验证目的

通过实验验证检测方法的适用性及培养基的适用性、无菌性、灵敏度。

2.样品信息

3.实验设备及器材

3.1 使用仪器及器具：大试管、灭菌锅、洁净工作台、生物安全柜、电子天平、电热恒温培养箱、霉菌培养箱。

3.2 使用材料及菌种：硫乙醇酸盐液体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、金黄色葡萄球菌、黑曲霉菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、大肠埃希菌。

4.验证组成员及职责

姓名	部门	职责
	品质部	组长：负责验证方案的审核、核准并负责验证报告的核准
	品质部	负责验证方案、验证报告的起草并组织实施
	品质部	负责验证过程中现场的监控及验证实施和试验过程的操作

5.验证依据

《中国药典》2015 版和 GB/14233.2-2005

6.验证步骤

6.1 检测设备计量有效性验证

确认以下设备经过校量并在有效期内

设备名称	是否校验	是否在有效期内	备注
灭菌锅			
洁净工作台			
生物安全柜			
电子天平			

6.2.2 灵敏度检查

6.2.2.1 菌液制备方法描述

接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌新鲜培养物至胰酪大豆胨液体或者胰酪大豆胨琼脂培养基上，接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中，30℃-35℃培养 18-24 小时，接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基或者沙氏葡萄糖琼脂培养基上，20℃-25℃培养 24-48 小时。上述培养物用 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数为小于 100cfu 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上，20℃-25℃培养 5-7 天，加入 3-5ml 含 0.5%（ml/ml）聚山梨酯 80 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含孢子数小于 100cfu 的孢子悬液。

菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2℃-8℃，可在 24 小时内使用。

6.2.2.2 培养基接种

取每管将量为 12ml 的硫乙醇酸盐液体培养基 7 支，分别接种小于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 3 天；取每管装量为 9ml 的胰酪大豆胨液体培养基 7 支，分别接种小于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照，培养 5 天。逐日观察结果。

6.2.2.3 结果判断，空白对照应无菌生长，若加菌的培养基管均生长良好，判该批培养基的灵敏度检查符合规定。

6.2.2.4 试验结果见表 2

表 2

培养基	试验液	是否长菌	菌生长情况	培养条件	判定
硫乙醇酸盐 流体培养基	金黄色葡萄球菌 1ml	1.		30℃-35℃培 养 3 天	
		2.			
	铜绿假单胞菌 1ml	1.			
		2.			
	生孢杆菌 1ml	1.			
		2.			
	空白对照				
胰酪大豆胨	枯草芽孢杆菌	1.		20℃-25℃培	

液体培养基	1ml	2.		养 5 天	
	白色念珠菌	1.			
		2.			
	1ml	1.			
		2.			
	黑曲霉 1ml	1.			
2.					
空白对照					
备注：有菌生长打“+”，无菌生长打“-”					
结论					
实验人/日期：			审核人/日期：		

6.3 无菌方法适用性试验

6.3.1 供试液的制备

浸提液用 0.9%的灭菌生理盐水，供试液制备在 10000 级环境中进行。

供试品的制备：取规定量，剪成 1-2cm 左右的小段，来回振荡 2 分钟，每个小包装用 100ml，收集冲洗液于无菌容器中。

6.3.2 薄膜过滤法方法验证

取每种培养基规定接种的供试品总量按薄膜过滤法过滤，冲洗，在最后一次的冲洗液中加入小于 100cfu 的试验菌，过滤。加硫乙醇酸盐流体培养基或胰酪大豆胨液体培养基至滤筒内。另取一装有同体积培养基的容器，加入等量试验菌，作为对照。至规定温度培养，培养时间不得超过 5 天，各试验菌同法操作。

6.3.3 结果判定

与对照管比较，如含供试品各管中的试验菌均生长良好，则说明供试品的该检验量在该检验条件下无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计，照此检查方法和检查条件进行供试品的无菌检查。如含供试品的任一管中的试验菌生长微弱、缓慢或不生长，则说明供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用，应采用增加冲洗量、增加培养基用量、使用中和剂或灭活剂、更换滤膜品种等方法，消除供试品的抑菌作用，并重新进行方法验证试验。

6.3.4 试验结果见表 3

表 3

试验组	菌生长情况	培养基名称	培养条件	判定
-----	-------	-------	------	----

项目名称	1 天	2 天	3 天	4 天	5 天			
供试品+1ml 大肠埃希菌						硫 乙 醇 酸 盐 流体培养基	30 ℃ -35 ℃ 培养 3-5 天	
1ml 大肠埃希菌								
供试品+1ml 金黄色葡萄球菌								
1ml 金黄色葡萄球菌								
供试品+1ml 生孢梭菌								
1ml 生孢梭菌								
供试品+1ml 枯草芽孢杆菌						胰 酪 大 豆 胨 液体培养基	20 ℃ -25 ℃ 培养 3-5 天	
1ml 枯草芽孢杆菌								
供试品+1ml 白色念珠菌								
1ml 白色念珠菌								
供试品+1ml 黑曲霉								
1ml 黑曲霉								
备注：生长良好打“+”，抑制生长打“-”								
结论								
试验人/日期：					审核人/日期：			

6.4 供试品的无菌检查

6.4.1 供试液的制备

浸提液用 0.9%的灭菌生理盐水，供试液制备在 10000 级环境中进行。

供试液的制备：取规定量，剪成 1-2cm 左右的小段，来回振荡 2 分钟，每个小包装用 100ml，收集冲洗液于无菌容器中。

6.4.2 阳性对照菌液制备

接种金黄色葡萄球菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体或者胰酪大豆胨琼脂培养基上，30℃ -35℃培养 18-24 小时，上述培养物用 0.9%无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数为小于 100cfu 的菌悬液。

6.4.3 阴性对照

取相同体积的稀释剂按照样品处理的方法处理。

6.4.5 薄膜过滤法

供试液制备好后，立即过滤，1 份滤器中加入 100ml 硫乙醇酸盐液体培养基，1 份滤器中加入 100ml 胰酪大豆胨液体培养基。取 1ml 金黄色葡萄球菌试验菌液同法过滤，滤器中加入 100ml 胰酪大豆胨液体培养基。取 100ml 稀释剂同供试液一样过滤后，1 份滤器中加入 100ml 硫乙醇酸盐液体培养基，1 份滤器中加入 100ml 胰酪大豆胨液体培养基。胰酪大豆胨液体培养基在 20-25℃培养 14 天；硫乙醇酸盐液体培养基在 30-35℃培养 14 天。

6.4.6 试验结果

检测 结果 天数	菌总数测定					真菌数测定				
	硫乙醇酸盐液体培养基 30~35℃ 14 天					胰酪大豆胨液体培养基 20~25℃ 14 天				
	样品信息									
	1	2	3	阴性	阳性	1	2	3	阴性	备注
1 天										
2 天										
3 天										
4 天										
5 天										
6 天										
7 天										
8 天										
9 天										
10 天										
11 天										
12 天										
13 天										
14 天										

结论	
备注：有菌生长打“+”，无菌生长打“-”	
试验人/日期：	审核人/日期：

7. 验证结论

- 7.1 培养基无菌性检查符合要求；
- 7.2 培养基灵敏度检查符合要求；
- 7.3 产品对薄膜过滤法无抑制作用，方法适用性试验符合要求；
- 7.4 产品无菌试验符合要求，产品检测时加入金黄色葡萄球菌作为阳性对照。

8. 再验证周期

- 8.1 当培养基批号改变时须对培养基进行适用性检查（无菌性检查、灵敏度检查）
- 8.2 产品生产环境或原料发生改变时须进行实验方法的验证
- 8.3 当检测环境发生改变时须重新验证



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