

无菌试验

参考标准

- 中国药典2020年版四部通则1101
- GB/T19973.2-2018《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》
- GB/T14233.2-2005《医用输液、输血、注射器具检验方法 第2部分：生物试验方法》

设施和环境条件

若环境不可控，可能出现假阳性结果

- 中国药典2020年版四部通则9203：隔离器系统或B级背景下的A级单向流洁净区域
- GB/T14233.2-2005：洁净度100级单向流工作台

中国药典2020年版四部通则9205：实验室应进行日常监测和定期监测

- 日常监测：温度、相对湿度、压差等
- 定期监测：环境浮游菌和沉降菌、关键的检测台面、人员操作服表面及5指手套

监测频次参考中国药典2020年版四部通则9205表4

菌种

- 代数
 - 菌种传代次数不得超过5代，并采用适宜的菌种保藏技术进行保存和确认
- 菌液制备
 - 金黄色葡萄球菌 接种新鲜培养物至TSA或TSB，30~35℃培养18~24h
 - 铜绿假单胞菌 接种新鲜培养物至TSA或TSB，30~35℃培养18~24h
 - 枯草芽孢杆菌 接种新鲜培养物至TSA或TSB，30~35℃培养18~24h
 - 大肠埃希氏菌 接种新鲜培养物至TSA或TSB，30~35℃培养18~24h
 - 生孢梭菌 接种新鲜培养物至FTM，30~35℃培养18~24h
 - 白色念珠菌 接种新鲜培养物至SDB或SDA，20~25℃培养2~3天
 - 黑曲霉 接种新鲜培养物至SDA斜面，20~25℃培养5~7天，或直到获得丰富的孢子加入适量含0.05%聚山梨酯80的pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。
- 菌液保存
 - 室温，一般应在2小时内使用；若保存在2~8℃可在24小时内使用
 - 黑曲霉孢子悬液可保存在2~8℃，在验证过的贮存期内使用

传代次数越多，产生突变的几率就越大，菌种发生衰退的机会就越高

用pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液，制成适宜浓度的菌悬液

来源于中国药典2020年版四部通则1101

培养基

- 种类
 - 硫乙醇酸盐流体培养基（FTM） 主要用于培养厌氧菌，也可用于培养需氧菌
 - 胰酪大豆胨液体培养基（TSB） 用于培养真菌和需氧菌
 - 中和或灭活用培养基 在FTM或TSB灭菌或使用前加入
- 配制
 - 试验用水：一般满足中国药典纯化水要求
 - 灭菌：按标准要求或产品要求灭菌条件进行灭菌
 - pH值调节：一般灭菌后pH值不超过规定值±0.2
- 保存
 - 置于无菌密闭容器中，在2~25℃，避光的环境下保存，并在经验证的保存期内使用。琼脂平板最好现配现用，如置2~8℃，一般不超过1周，若延长保存期，需经验证
- 培养基适用性检查
 - 无菌性 不少于5支（瓶）/批，培养14天，应无菌生长
 - 灵敏度
 - FTM 7支（金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌*2+空白），30~35℃，≤3天
 - TSB 7支（枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉*2+空白），20~25℃，枯草芽孢杆菌≤3天，白色念珠菌、黑曲霉≤5天
 - 结果判定 空白无菌生长，其他生长良好

注：来货检验，可与供试品检查同步进行

接种菌菌量均≤100cfu

方法适用性

- 开展时机
 - 首次进行产品无菌检查时
 - 检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时
 - 带抑菌性的产品
 - 常见的有乳胶或橡胶类产品（如手套、避孕套等）、含油类产品、抗菌性敷料（含银离子、抗生素等）、部分植入性器械类（如含抗生素的丙烯酸树脂骨水泥）、抗菌性涂层产品
 - 检验量
 - 外科用敷料棉花及纱布 取100mg或1cm×3cm
 - 缝合线、一次性医用材料 整个材料
 - 带导管的一次性医疗器械（如输液袋） 二分之一内表面积
 - 其他医疗器械 整个器具切碎或拆散开
 - 直接接种法
 - FTM：6支，金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、生孢梭菌各2支
 - TSB：6支，枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各2支
 - 薄膜过滤法
 - 试验组 样品过滤，冲洗（最后一次冲洗液中加≤100cfu的菌液），过滤。试验菌种类同直接接种法采用封闭式薄膜过滤器，根据供试品及其溶剂的特性选择滤膜材质，滤膜孔径应≤0.45μm
 - 阳性对照组：取等量FTM或TSB培养基，加入等量试验菌，与试验组同法操作
 - 培养
 - FTM 30~35℃，TSB 20~25℃，时间不超过5天
 - 结果判断
 - 试验组和阳性对照组比较应生长良好，无抑菌作用或其抑菌作用可以忽略不计
 - 若有抑菌性，采取适当方法消除供试品的抑菌作用，并重新进行方法适用性试验
- 无菌试验方法适用性验证关键参数输出包括：检验量、样品处理方法、冲洗液种类及用量、培养基用量等

消除抑菌方法：
a. 增加冲洗量；
b. 增加培养基用量；
c. 用中和剂或灭活剂；
d. 更换滤膜品种。

产品无菌试验操作规程

- 检验数量
 - 参考中国药典2020年版四部通则1101：表1和表2，或其他适用标准的要求
- 阳性对照
 - 对照菌选择
 - 金黄色葡萄球菌：无抑菌性或抗革兰氏阳性菌为主的供试品
 - 大肠埃希氏菌：抗革兰氏阴性菌为主的供试品
 - 生孢梭菌：抗厌氧菌的供试品
 - 白色念珠菌：抗真菌的供试品
 - 菌液制备：同方法适用性试验，加菌量≤100cfu
 - 培养：不超过5天，应生长良好
- 阴性对照
 - 取相应溶剂和稀释液、冲洗液同法操作。阴性对照不得有菌生长
- 样品处理
 - 直接接种法 取规定量供试品处理后分别等量接种至FTM和TSB中，检验量、样品处理方法、培养基用量与经验证的方法适用性试验一致。
 - 薄膜过滤法 取规定量，用适量的冲洗液冲洗供试品，收集冲洗液于无菌容器后薄膜过滤，1份滤器中加入100mL FTM，1份滤器中加入100mL TSB。检验量、样品处理方法、冲洗液种类和用量、培养基用量与经验证的方法适用性试验一致。
- 培养
 - FTM：30~35℃，TSB：20~25℃，培养14天
- 结果判断
 - 供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，即判合格
 - 若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，即判不合格
 - 试验若经评估确认无效，应重新开展试验

作者：许遵洲、严淑茹、黄开根
审核：陈丽华、梁泽鑫

高清图扫描二维码

