



医疗器械无菌和初始污染菌检验

国家食品药品监督管理局
北京医疗器械质量监督检验中心

什么是无菌检查法？

用于检查要求无菌的医疗器械是否无菌的一种方法。若供试品符合无菌检查法的规定，仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染。

无菌试验的目的：将医疗器械或其浸提液接种于培养基内，以检验供试品是否有细菌和真菌污染。

医疗器械无菌检验标准

**GB/T 14233.2-2019 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**

2019年版《中国药典》无菌检查法

医疗器械无菌试验检查要点指南 (2019版)

无菌检验是无菌医疗器械产品生产控制过程中的一项重要内容。其检验方法、检验结果判定及检验人员业务能力等因素直接影响产品的质量与安全。作为无菌医疗器械生产企业，其无菌检验工作应由本企业独立完成。并要求企业的检验人员能当场操作或口述无菌检验的过程。

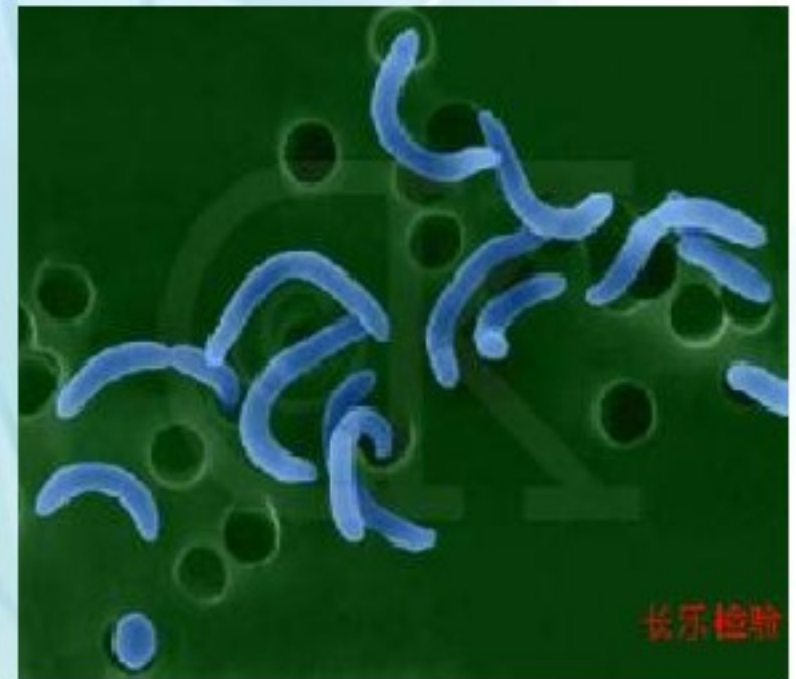
培养基：是人工配制的生物营养物质，即用人工的方法将多种物质按各种微生物生长繁殖的需要配成的一种混合营养物。

微生物：必须用光学显微镜或电子显微镜才能观察到的微小生物。微生物具有一定的形态与结构,并能在适宜的环境中迅速地生长和繁殖,如细菌、病毒、真菌等。

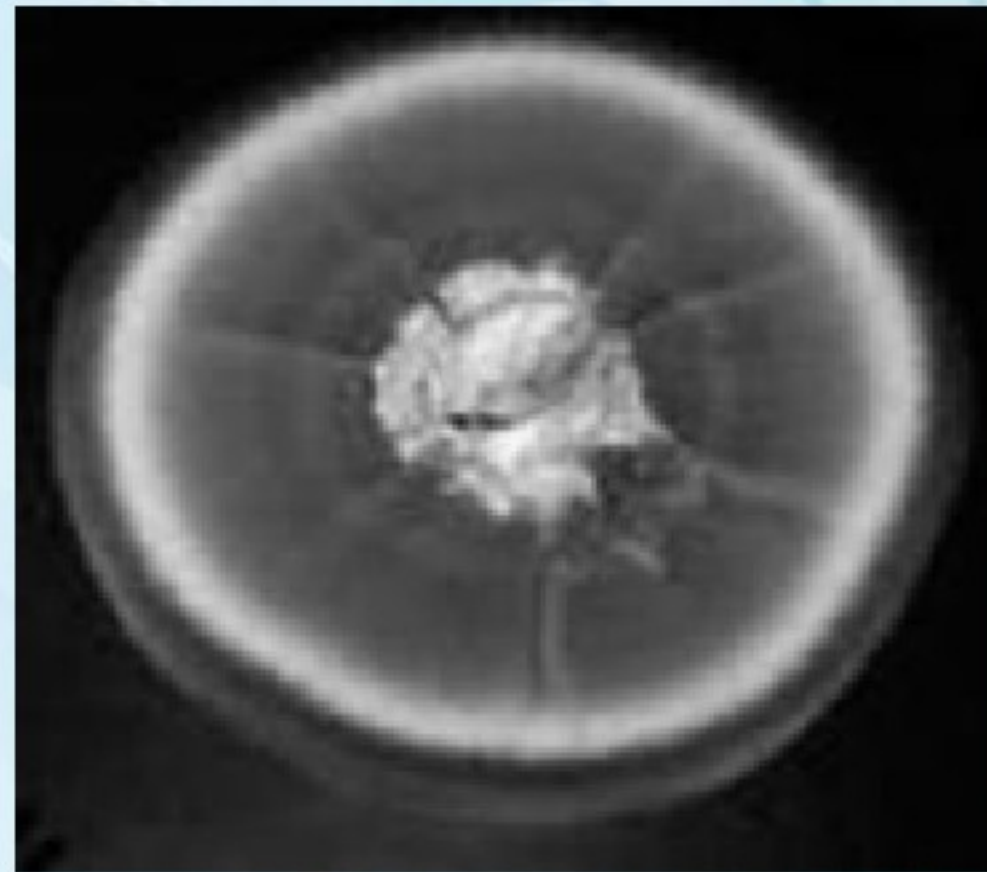
无菌：是指某一物体或某一环境中不含有活的微生物。

凡能杀灭物体中所有活的微生物的作用称为**灭菌**。

细菌：为单细胞微生物,其细胞分化不完善，无完整细胞核及核膜、核仁，直径一般为 $1\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ 。



真菌：为多细胞或单细胞微生物，其细胞分化完善，有细胞核和各种细胞器，故易在体外生长繁殖，直径一般为 $10\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 。



医疗器械无菌检验所需设备

超净工作台



医疗器械无菌检验所需设备

恒温培养箱（至少2台）



医疗器械无菌检验所需设备

压力蒸汽灭菌器



医疗器械无菌检验所需设备

电热干燥箱



医疗器械无菌检验所需设备

集菌仪



医疗器械无菌检验所需设备

生物安全柜：（从试验安全性考虑，建议阳性对照试验使用生物安全柜）



医疗器械无菌检验所需设备

电子天平



医疗器械无菌检验所需设备

光学显微镜



医疗器械无菌检验所需设备

过滤装置（无油真空泵、滤杯、滤头、滤瓶、微孔滤膜、夹子）



环境及人员要求

无菌检查应在环境洁净度10 000级下的局部洁净度100级的单向流空气区域内或隔离系统中进行，其全过程必须严格遵守无菌操作，防止微生物污染，防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。单向流空气区、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证。隔离系统按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。

无菌检查人员必须具备微生物专业知识，并经过无菌技术的培训。还应该具有高度的责任心和严谨细致的工作作风。

无菌检查法 环境要求



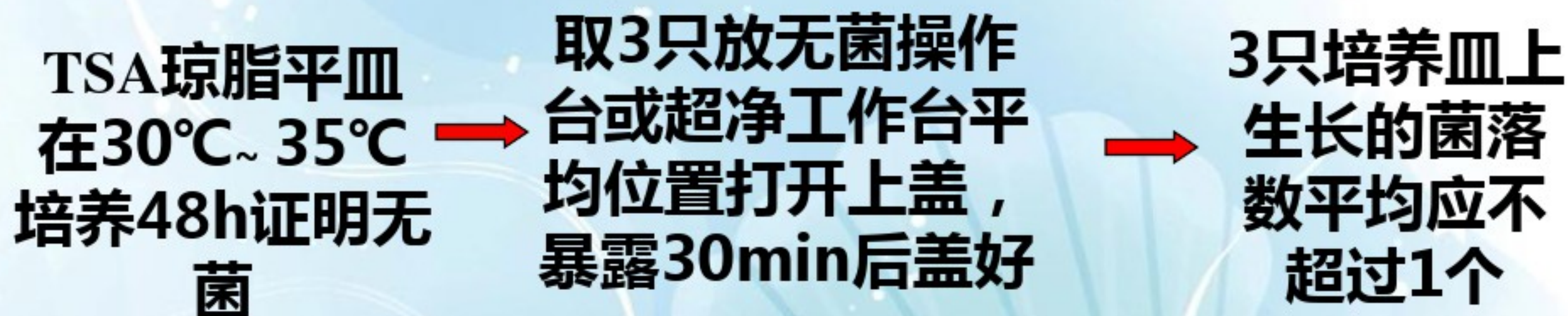
无菌检查法 环境要求

隔离系统



无菌检查法 环境要求

无菌室在消毒处理完毕后，应检查空气中的菌落数。



无菌试验过程中也应检查空气中的菌落数，方法要求同上



无菌检查法 试验前准备

器具灭菌：与供试液接触的所有器具应采用可靠方法灭菌，置压力蒸汽灭菌器内 121°C 30min，或置电热干燥箱内 160°C 2h。

培养基：可按药典中的处方制备培养基，亦可使用按该处方生产的符合规定的脱水培养基。应采用验证合格的灭菌程序灭菌。制备好的培养基应保存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$ ，一般在3周内使用。

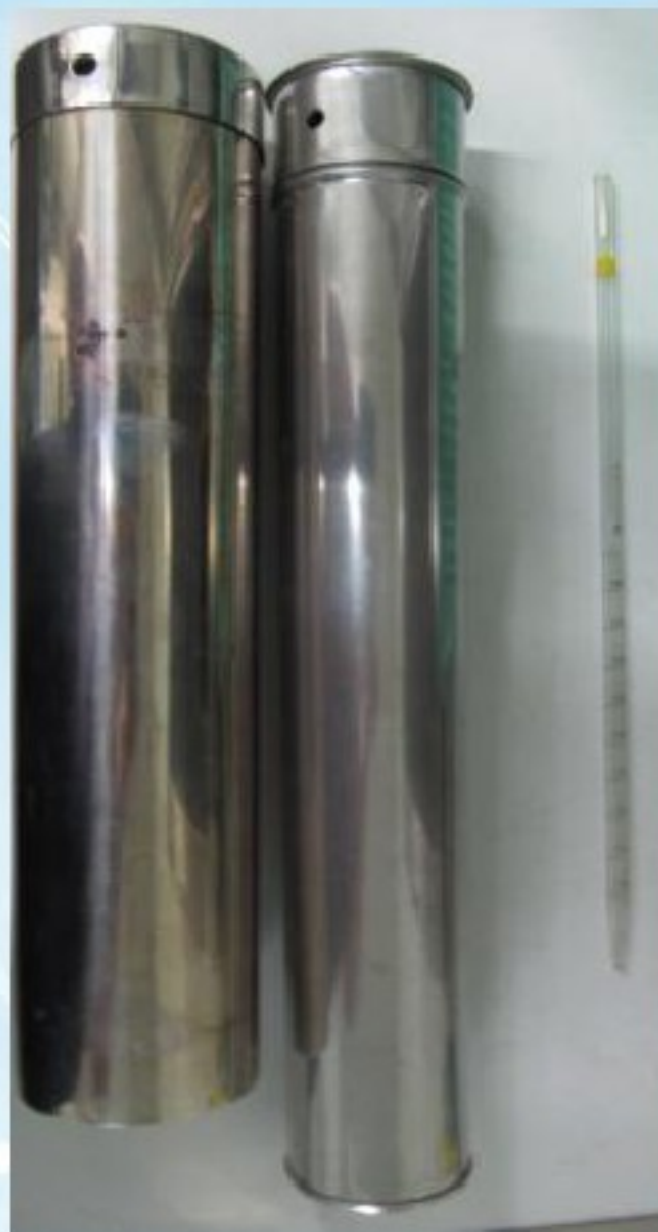
无菌检查法 试验前准备

配制培养基所需器具:



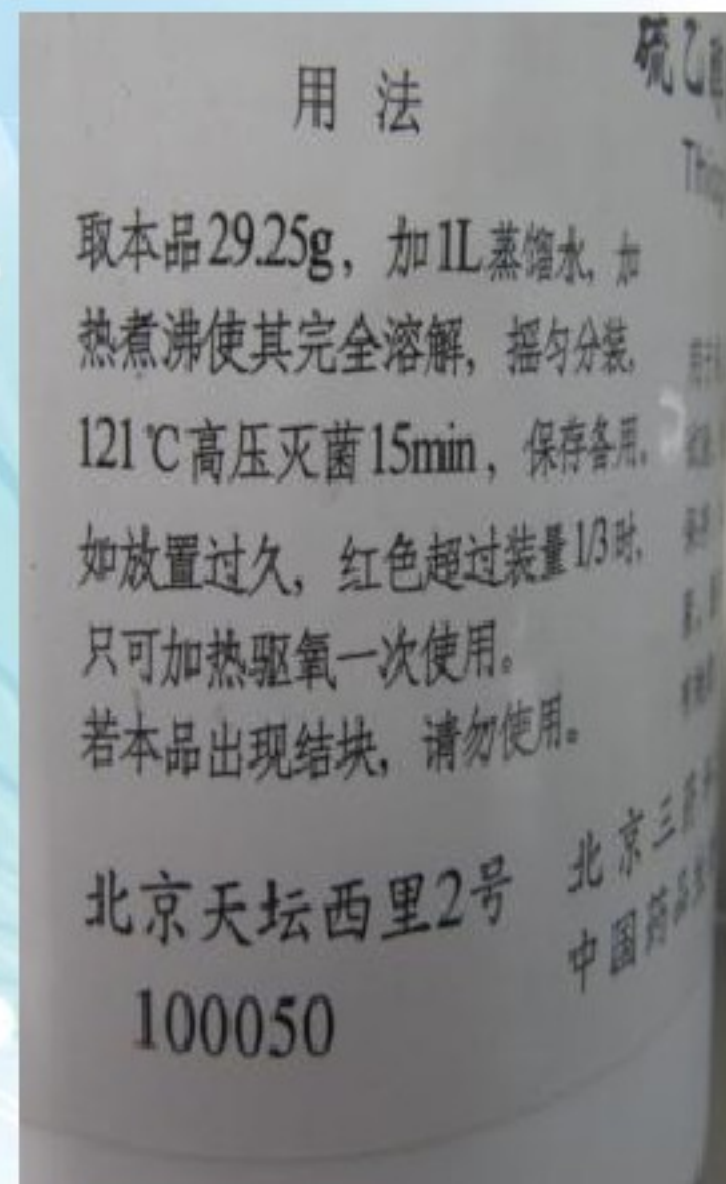
无菌检查法 试验前准备

常用器具与稀释液:



无菌检查法 试验前准备

培养基:

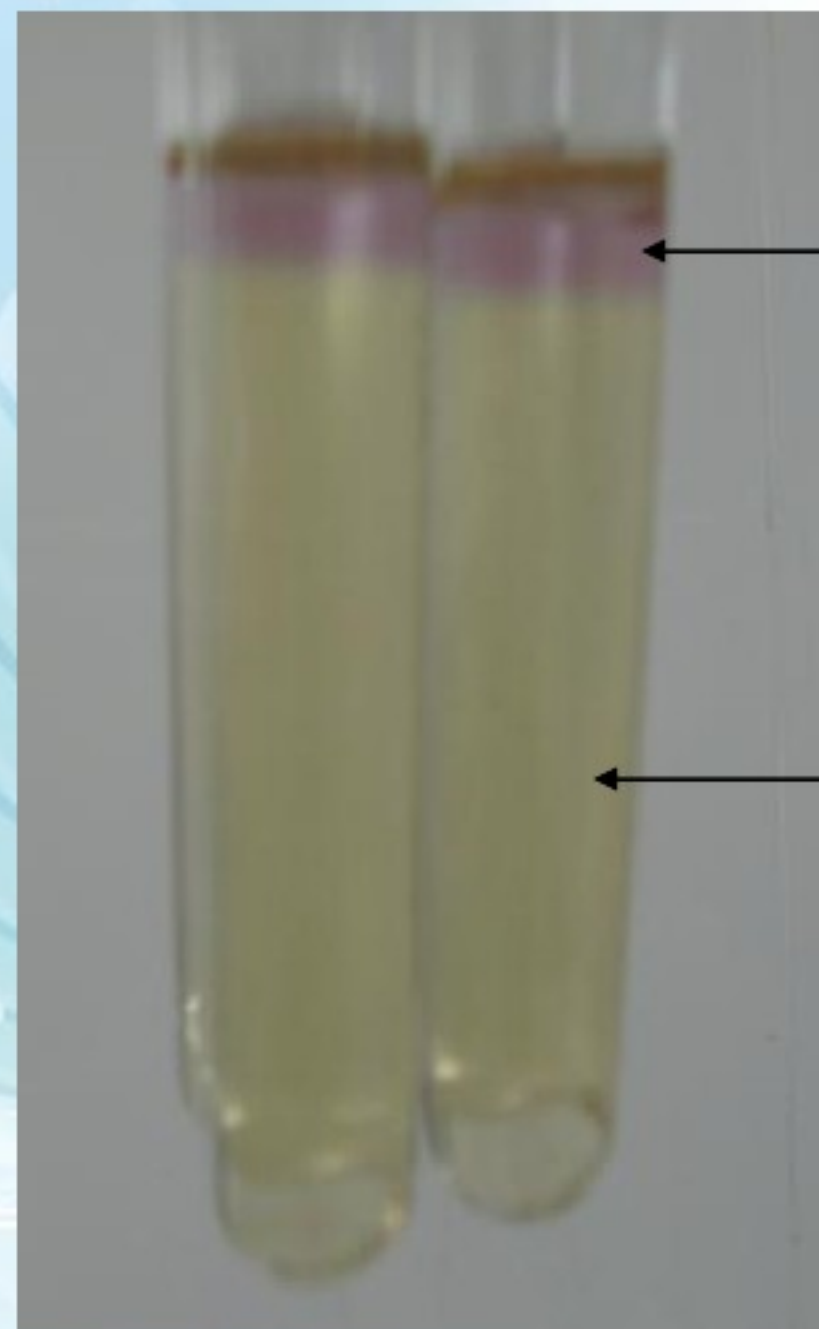


无菌检查法

试验前准备

硫乙醇酸盐流体培养基:

在供试品接种前, 培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的 $\frac{1}{5}$, 否则, 须经 100°C 水浴加热至粉红色消失 (不超过20分钟) 迅速冷却, 只限加热一次, 并应防止被污染。其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层 (粉红色) 不超过培养基深度的 $\frac{1}{2}$ 。 $30^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养14天。

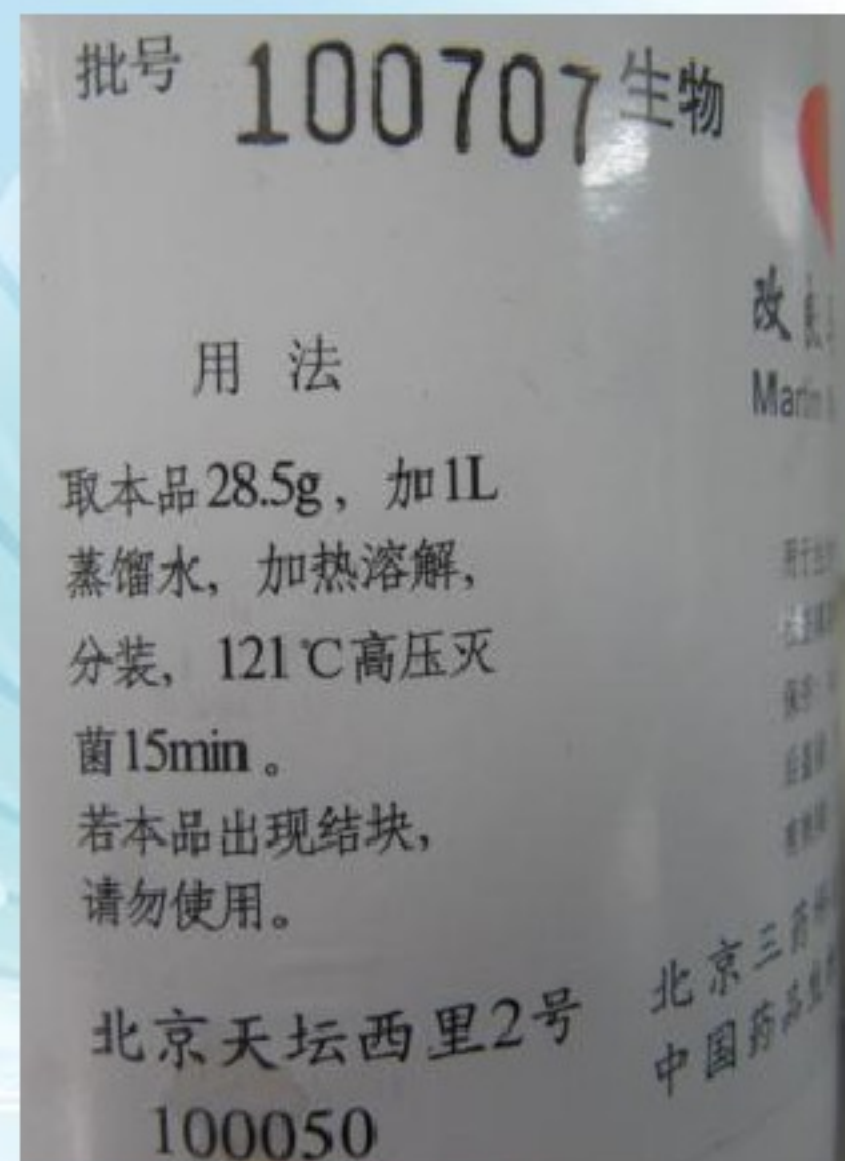


需氧菌生长

厌氧菌生长

无菌检查法 试验前准备

培养基:



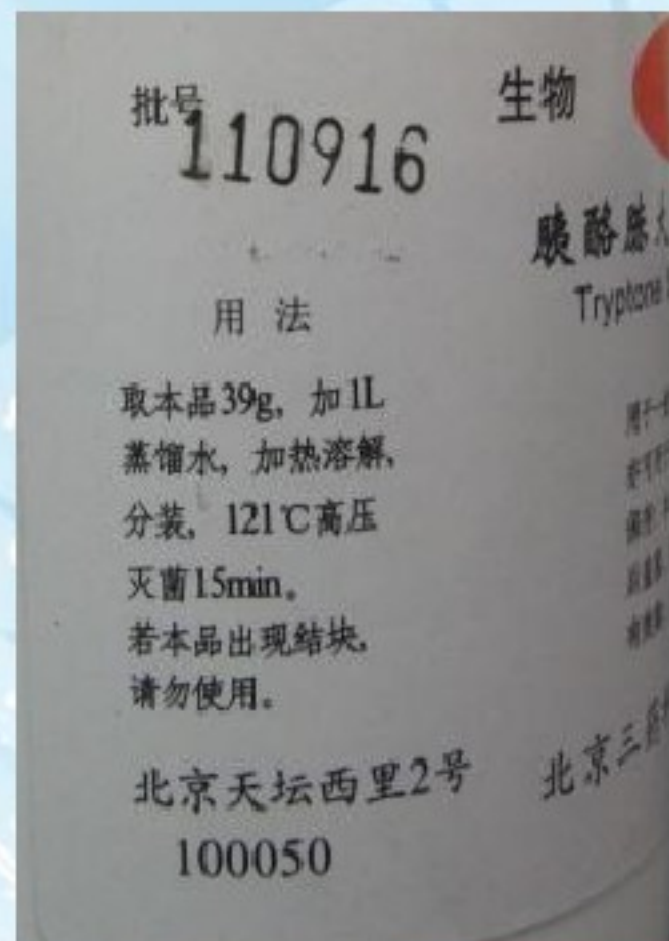
无菌检查法 试验前准备

- **改良马丁培养基：**
23℃ ~ 28℃培养14天



无菌检查法 试验前准备

培养基:



培养基的适用性检查

- 无菌检查用的硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基等应符合培养基的无菌性检查及灵敏度检查的要求。
- 无菌性检查 每批培养基随机不少于5支（瓶），培养14天，应无菌生长。

培养基的适用性检查

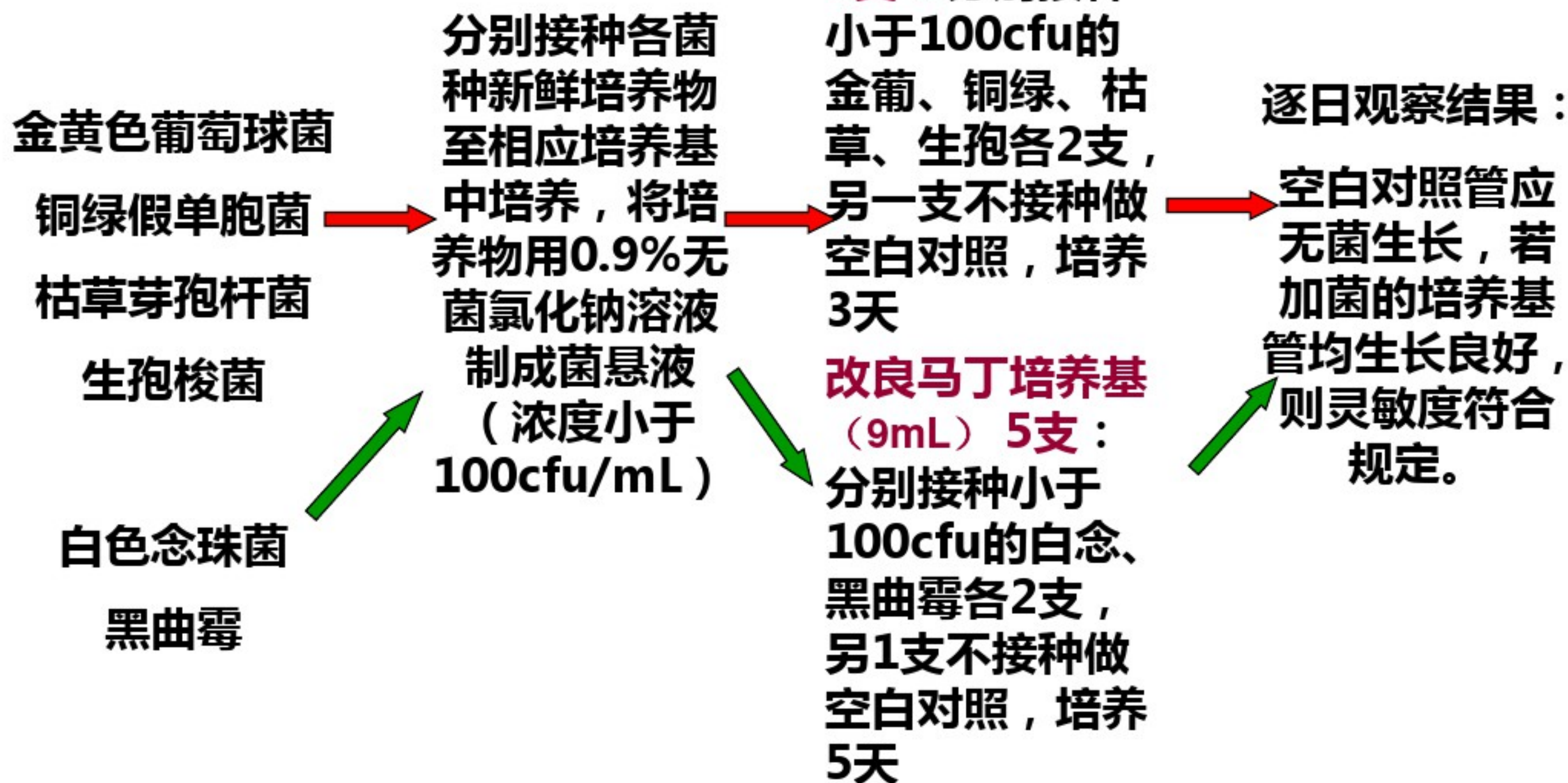
灵敏度检查：

菌种 培养基灵敏度检查所用的菌株传代次数不得超过5代（从菌种保存中心获得的冷冻干燥菌种为第0代），并采用适宜的菌种保藏技术，以保证试验菌株的生物学特性。

金黄色葡萄球菌	(<i>Staphylococcus aureus</i>)	[CMCC (B) 26 003]
铜绿假单胞菌	(<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	[CMCC (B) 10 104]
枯草芽孢杆菌	(<i>Bacillus subtilis</i>)	[CMCC (B) 63 501]
生孢梭菌	(<i>Clostridium sporogenes</i>)	[CMCC(B) 64 941]
白色念珠菌	(<i>Candida albicans</i>)	[CMCC(F) 98 001]
黑曲霉	(<i>Aspergillus niger</i>)	[CMCC(F) 98 003]

培养基应符合无菌性检查及**灵敏度检查**的要求。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。

灵敏度检查所用菌种
(药典2019版规定)



方法验证试验

- **无菌检验有两种方法：直接接种法、薄膜过滤法**
- **直接接种法:将供试品或其有代表性的各部分直接投放入培养基内培养。**
- **薄膜过滤法:含抗菌、抑菌成分的供试品会抑制某些微生物的生长繁殖,所以用常规方法检查会出现假阴性的结果,但并不等于产品中没有微生物甚至是致病性微生物。所以采用薄膜过滤法来去除供试品中可溶的抑菌性成分,把细菌等微生物截留在滤膜上,然后再经过处理培养使所含微生物生长繁殖,从而使微生物检出。**

方法验证试验

- **当建立产品的无菌检查法时，应进行方法的验证，以证明所采用的方法适合于该产品的无菌检查。若产品的组分或原检验条件发生改变时，检查方法应重新验证。**
- **验证时，按“供试品的无菌检查”的规定及下列要求进行操作。对每一试验菌应逐一进行验证。**

方法验证试验

菌种及菌液制备：**除大肠埃希菌**（*Escherichia coli*）[CMCC(B) 4 4102]外，金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉同培养基灵敏度检查。大肠埃希菌的菌液制备同金黄色葡萄球菌。

方法验证试验与灵敏度检验所有菌种区别：**大肠埃希菌代替**铜绿假单胞菌。

方法验证试验：薄膜过滤法

- 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，在最后一次冲洗液中加入小于100cfu的试验菌，过滤。取出滤膜接种至硫乙醇酸盐流体培养基或改良马丁培养基中，或将培养基加至滤筒内。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。按规定温度培养3天~5天。各试验菌同法操作。

方法验证试验：直接接种法

方法验证所用菌种 (药典2019版规定)

金黄色葡萄球菌
大肠埃希菌
枯草芽孢杆菌
生孢梭菌

白色念珠菌
黑曲霉

分别接种各菌种新鲜培养物至相应培养基中培养，将培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成菌悬液（浓度小于100cfu/mL）

硫乙醇酸盐流体培养基8支：分别接种小于100cfu的金葡、大肠、枯草、生孢各2支，其中1管接入每支培养基规定的供试品接种量，另1管作为对照，培养3天。

改良马丁培养基4支：分别接种小于100cfu的白念、黑曲霉各2支，其中1管接入每支培养基规定的供试品接种量，另1管作为对照，培养5天。

方法验证试验：结果判断

与对照管比较，如含供试品各容器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，照此检查法和检查条件进行供试品的无菌检查。如含供试品的任一容器中微生物生长微弱、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，可采用增加冲洗量，或增加培养基的用量，或使用中和剂或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。

方法验证试验也可与供试品的无菌检查同时进行。

供试品的无菌检查

供试品包装须完好无损，尤其是只有一层包装的样品。进入无菌检验室的样品若有两层（或两层以上）包装的，需将外包装在传递窗（或缓冲间）拆除后，传入实验室。

操作人员准备：带口罩、帽子、穿专用无菌服、鞋进入无菌室。

供试品的无菌检查

在100级超净台内，酒精灯火焰周围，以无菌操作法将规定量的供试品分别接种至含硫乙醇酸盐流体培养基（不少于15ml/管）和改良马丁培养基（不少于10ml/管）的容器中。

正确的无菌操作，既不能引入外来菌污染培养物造成假阳性，也要注意接触供试品的试验用具温度不可过高以免将可能存在的菌烫死。

供试品的无菌检查

阴性对照（目的是验证试验是否存在污染）：供试品无菌检查时，应取相应溶剂和稀释液同法操作，作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。

阳性对照（目的是验证试验可靠性，防止假阴性）：应根据供试品特性选择阳性对照菌；无抑菌作用供试品以金黄色葡萄球菌为阳性对照菌。阳性对照试验的菌液制备同方法验证试验，加菌量小于100cfu，供试品用量同供试品无菌检查每份培养基接种的样品量。阳性对照管培养48 ~ 72小时应生长良好。

无菌检查法-直接接种法

供试品数量：同一批号3个~11个单位供试品

优先采用将供试品或其有代表性的各部分直接投放入培养基内培养。

如：棉签、导尿管中的导尿管、注射器中的液体等



无菌检查法—薄膜过滤法

2019年版《中国药典》规定：
只要供试品性状允许，应采用薄膜过滤法。供试品无菌检查所采用的检查方法和检验条件应与验证的方法相同。

在蠕动泵的作用下，被测产品通过装有带空气过滤器的针头及无菌管路直接从样品容器中进入滤筒中，免去了通常膜转移过程中易产生的污染。

无菌检查法中薄膜过滤法所用的滤膜孔径应不大于 $0.45\mu\text{m}$ ，直径约为50mm。



无菌检查法-薄膜过滤法

水溶液供试品



取规定量的供试液，直接过滤，或混合至含适量稀释液的无菌容器内，混匀，立即过滤。



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为100ml，总冲洗量不得超过1000mL，以免滤膜上微生物受损伤。



冲洗后分别将100mL硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基加入相应的滤筒内，培养。

无菌检查法 培养及观察

上述含培养基的容器按规定的温度培养14天。培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。如在加入供试品后或在培养过程中，培养基出现浑浊，培养14天后，不能从外观上判断有无微生物生长，可取该培养液适量**转种至同种新鲜培养基中**，细菌培养2天、真菌培养3天，观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。

无菌检查法 结果判断

阳性对照管应生长良好，阴性对照不得有菌生长。否则，试验无效。

若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，判供试品符合规定；若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，判供试品不符合规定，除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含。

试验若经确认无效，应重试。重试时，重新取同量供试品，依法检查，若无菌生长，判供试品符合规定；若有菌生长，判供试品不符合规定。

无菌检查法 结果判断

当符合下列至少一个条件时，方可判试验结果无效：

（1）无菌检查试验所用的设备及环境的微生物监控结果不符合无菌检查法的要求；

（2）回顾无菌试验过程，发现有可能引起微生物污染的因素。

（3）供试品管中生长的微生物经鉴定后，确证是因无菌试验中所使用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的。

无菌检查法 结果判断

试验若经确认无效，应重试。重试时，重新取同量供试品，依法检查，若无菌生长，判供试品符合规定；若有菌生长，判供试品不符合规定。

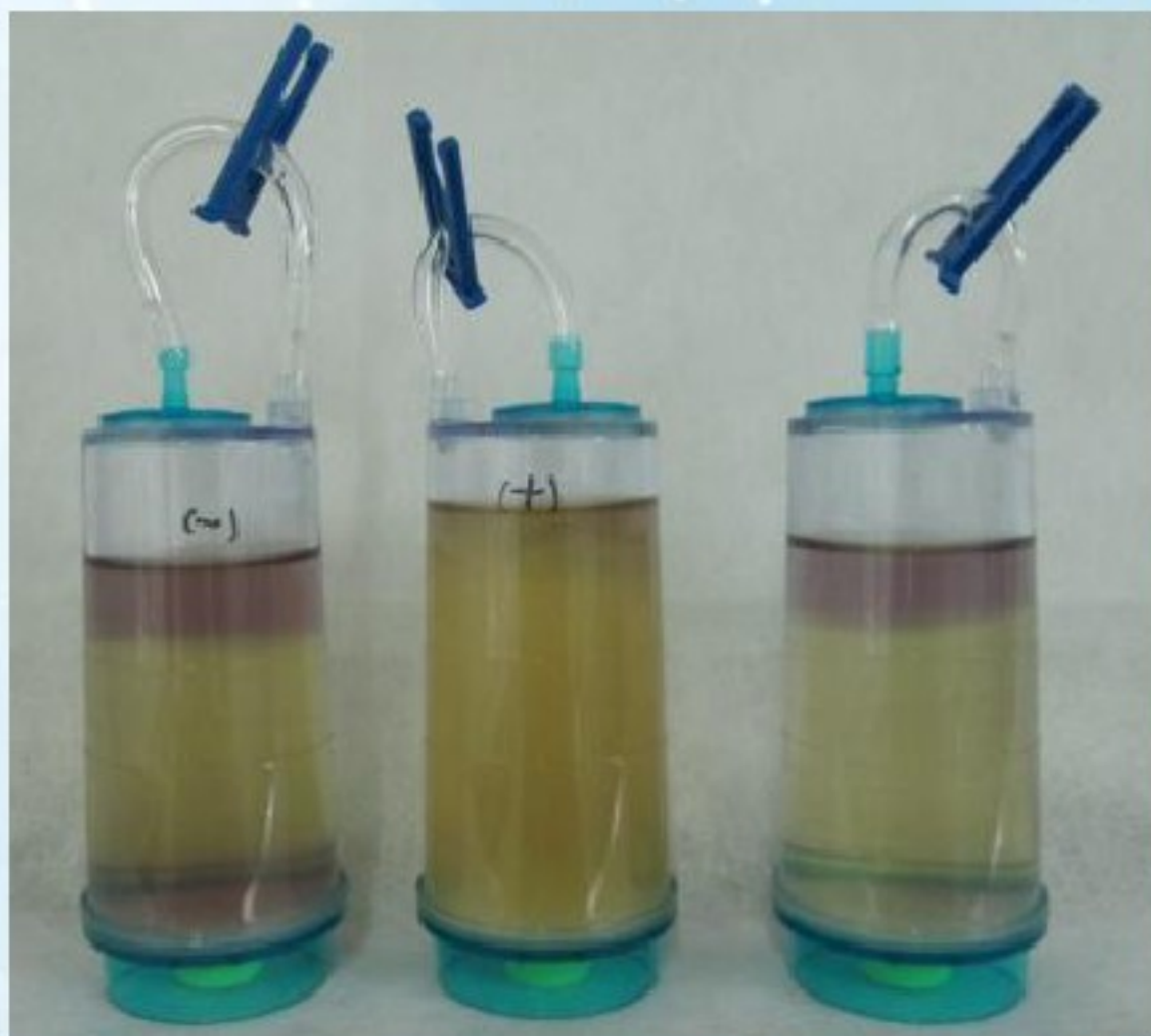
医疗器械无菌试验检查要点指南 (2019版)

由于无菌检验时间跨度较长，因此过程的记录应能够完整体现试验的全过程，对于在试验过程中出现的各种情况，均应在记录中客观反映。

直接接种法试验结果



薄膜过滤法试验结果



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