ICS 11.080.040
C 31

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0681.14—2018

无菌医疗器械包装试验方法
第 14 部分:透气包装材料湿性和干性微生物屏障试验

Test methods for sterile medical device package—Part 14:Testing the microbial barrier for porous packaging materials under moist conditions and with passage of air

2018-11-07 发布　　2019-11-01 实施

国家药品监督管理局　发布

前　言

YY/T 0681《无菌医疗器械包装材料试验方法》分为以下几个部分：

——第 1 部分：加速老化试验指南；

——第 2 部分：软性屏障材料的密封强度；

——第 3 部分：无约束包装抗内压破坏；

——第 4 部分：染色液穿透法测定透气包装的密封泄漏；

——第 5 部分：内压法检测粗大泄漏(气泡法)；

——第 6 部分：软包装材料上印墨和涂层抗化学性评价；

——第 7 部分：用胶带评价软包装材料上墨迹或涂层附着性；

——第 8 部分：涂胶层重量的测定；

——第 9 部分：约束板内部气压法软包装密封胀破试验；

——第 10 部分：透气包装材料微生物屏障分等试验；

——第 11 部分：目力检测医用包装密封完整性；

——第 12 部分：软性屏障膜抗揉搓性；

——第 13 部分：软性屏障膜和复合膜抗慢速戳穿性；

——第 14 部分：透气包装材料湿性和干性微生物屏障试验。

本部分为 YY/T 0681 的第 14 部分。

本部分按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本部分由国家药品监督管理局提出。

本部分由全国医用输液器具标准化技术委员会(SAC/TC 106)归口。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、杜邦(中国)研发管理有限公司、司递卫贸易(上海)有限公司。

本部分主要起草人：王文庆、钱军、刘世梁、郝建新。

引　言

用于医疗器械灭菌的透气包装材料常提供给医疗机构和医疗器械制造商。由于两种情况下诸如灭菌方式、运输条件、贮存条件和贮存期限等的差异，对其微生物屏障特性的要求也有所不同。

YY/T 0681 的本部分在技术上等同于 DIN 58953-6:2010。卫生部门发布的《消毒产品卫生安全评价规定》中规定，带有灭菌标识的灭菌物品包装物需进行微生物屏障试验，《消毒技术规范》给出了相应的试验方法。本标准规定的试验方法与《消毒技术规范》(2002 年版)给出的方法原理一致。

医疗器械制造商需按照 GB/T 19633.1 的要求对透气包装材料的微生物屏障特性进行综合评价。YY/T 0681 的本部分给出的方法试验条件要求相对较低，便于推广。但是，医疗器械制造商在评价一种透气材料的微生物屏障特性是否满足要求而使用 YY/T 0681 的本部分时，须慎重考虑以下方面：

——所给出的试验方法的重复性和再现性结果不十分理想(参见附录 A)；

——所给出的接受准则在行业内尚存有一定程度的争议。

无菌医疗器械包装试验方法
第 14 部分:透气包装材料湿性和干性微生物屏障试验

1 范围

本部分规定了湿性条件和干性条件微生物屏障试验的试验方法。

本部分给出的试验方法适用于最终灭菌医疗器械的包装材料。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB/T 450—2008 纸和纸板 试样的采取及试样纵横向、正反面的测定

中华人民共和国药典(2015 年版)

3 湿性条件微生物屏障试验

3.1 方法概要

将微生物液滴滴加到试验样品上。液滴干燥后,进行试验以测定是否有微生物穿透到试验样品的另一面。

3.2 取样

按 GB/T 450—2008 取样。

3.3 样品制备及数量

从待测包装材料上剪切边长约为 50 mm 的正方形用于试验。宜根据制造商或者客户的说明对试验样品进行灭菌。

在温度为(23±1)℃及相对大气湿度为(50±2)%的环境中对样品进行状态调节至少 24 h。

注:湿的包装材料可能产生虚假结果。

每批包装材料宜使用 5 个试验样品进行试验,见 3.7。

3.4 培养基

3.4.1 总则

使用新近制备的蒸馏水制备培养基。不能使用去离子水。若没有新近制备的蒸馏水,也可以使用注射用水。

所需试剂的质量参见《中华人民共和国药典》(2015 年版)的相关规定。

注：3.4.2～3.4.4 中列出的培养基可以使用具有相同成分的成品培养基[1)]。

3.4.2 酪蛋白胨-大豆蛋白胨肉汤

表 1 所列固体成分宜分散于 1 L 蒸馏水中，搅拌使其溶解和混合，若需要可加热。

表 1 酪蛋白胨-大豆蛋白胨肉汤成分

成分	数量
胰蛋白酶消化酪蛋白胨/g	17
木瓜蛋白酶消化豆粉/g	3
葡萄糖/g	2.5
氯化钠/g	5
磷酸氢二钾/g	2.5
蒸馏水/mL	1 000

该肉汤宜在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 15 min。灭菌后，在(22±3)℃时，pH 应为 7.3±0.2。

3.4.3 营养琼脂平板

表 2 所列固体成分宜分散于 1 L 蒸馏水，搅拌使其溶解和混合，若需要可加热，然后在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 15 min。灭菌后，在(22±3)℃时，pH 应为 7.4±0.2。

表 2 营养琼脂基础成分

成分	数量
肉浸出物/g	1
酵母浸出物/g	2
蛋白胨/g	5
氯化钠/g	5
琼脂/g	15
蒸馏水/mL	1 000

3.4.4 血琼脂平板

该培养基宜按 3.4.3 所述进行溶解，并在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 15 min，然后冷却至 45 ℃并与 10% 的去纤维蛋白原绵羊血混合。每个无菌培养皿中宜倒入 20 mL 该营养液，然后使其在室温下凝固。灭菌后，在(22±3)℃时的 pH 应为 7.4±0.2。表 3 列出了血琼脂基础成分。

---

1) 来源可参阅 www.mpbio.com、www.bd.com、www.vwr.com、www.oxoid.com、www.siqma-aldrich.com 等。给出本信息是为了方便本部分的使用者，并不表示对该产品的认可。

表 3　血琼脂基础成分

成分	数量
肉浸出物/g	10
蛋白胨/g	10
氯化钠/g	5
琼脂/g	15
蒸馏水/mL	1 000

3.5　试验微生物制备

金黄色葡萄球菌金黄色亚种(Staphylococcus aureus subsp. Aureus)[2),3)]接种于 6 mL 酪蛋白胨-大豆蛋白胨肉汤(3.4.2)中,并在 37 ℃下培养 24 h。

为检查微生物悬液,宜用蒸馏水对肉汤培养基进行系列稀释至 1∶10^8。取 1∶10^6,1∶10^7 及 1∶10^8 稀释物各 1 mL 放入无菌培养皿中,并与 10 mL 溶化的营养琼脂混合(3.4.3)。做为选择,也可取各稀释物 100 μL 在血琼脂平板(3.4.4)表面上进行涂布。

用于试验的微生物悬液中的微生物数量应为每毫升 10^7 个～10^8 个。

3.6　试验施行

3.6.1　总则

将每个经 3.3 处理的包装材料的试验样品置于一个灭菌过的底物上,例如放在一个培养皿中或其盖子上,实际使用中可能经受污染的一面朝上。

如果没有包装材料受污染面的指示,则应使用同等数量的试验样品对两面进行试验。

从肉汤系列稀释物的 1∶100 稀释物(3.5)中,取 5 滴,每滴 0.1 mL,滴加到每个试验样品的上表面,每滴应不相互接触,并且宜间隔相等。

应在无菌条件下放置 6 h～16 h 使液滴完全干燥。此阶段的温度应保持在(22±3)℃。

每个试样宜放置在一个血琼脂平板(3.4.4)的表面上,接种面向上,以使整个试验表面都与琼脂接触(用涂布棒轻轻地抹平)。5 s～6 s 后除去试验样品。平板宜在 37 ℃下培养 16 h～24 h。

3.6.2　阳性检查

为检查所用试验微生物的生长,一个额外经 3.3 处理的包装材料试验样品同样按 3.6.1 的描述进行接种和干燥。试验样品的接种面与血琼脂平板进行表面接触做为阳性检查。经过培养(3.6.1)后,平板上试验微生物应明显生长。

3.6.3　阴性检查

做为阴性检查,一个与接种的试验样品平行的额外试验样品宜按 3.6.1 的描述进行处理,但不接种微生物悬液。在培养结束时,血琼脂平板上应无菌落生长。

---

2)　DSM 799,DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH,Braunschweig,Germany.给出本信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的认可。

3)　ATCC 6538,American Type Culture Collection,10801 University Boulevard,Manassas (VA),20110-2209 USA.给出本信息是为了方便本部分的使用者,并不表示对该产品的认可。

3.7 试验评价

3.7.1 总则

本试验被设计为“合格/不合格”型试验。因此原则上不报告测定值精密度。如果通过 3.6.2 和 3.6.3 的阳性检查和阴性检查即可证明方法的灵敏度是充分可信的。

3.7.2 零生长

若所有的 5 个平板都是零生长，则认为包装材料可以提供充分的微生物屏障。

3.7.3 有生长

若平板上有生长，但所有的 5 个平板菌落数总和不大于 5 个，则另取 20 个试验样品进行复测。20 个平板的菌落数总和应不超过 5 个。

3.8 试验报告

试验报告宜包括：

a) 试验样品类型；
b) 取样地点和日期；
c) 菌落数(单个平板菌落数和所有平板总菌落数)；
d) 肉汤中微生物数量；
e) 阴性和阳性检查结果。

4 干性条件微生物屏障试验

4.1 方法概要

通过对用待测包装材料密封的微生物屏障装置中的空气进行冷却，空气流(受到抽吸)将进入试验瓶中。如果冷却前包装材料上有微生物培养物覆盖，空气流可能会使携带微生物的颗粒穿过包装材料。用微生物学技术记录通过包装材料的任何微生物并进行评价。

4.2 取样

按 GB/T 450—2008 取样。

4.3 样品制备及数量

从包装材料上剪切或冲压直径为(40±2)mm 的圆形试验样品。

每次试验宜制备 10 个试验样品。宜在温度为(23±1)℃及相对大气湿度为(50±2)%的环境中对样品进行状态调节至少 24 h。

对实际使用中包装材料可能经受污染的一面进行试验。如果对两面进行试验，制备的试验样品的数量宜增加一倍。这也适用于试验者不知道哪一面是受污染面的情况。

4.4 器具和耗材

4.4.1 总则

所有与培养基接触的器具和消耗品宜在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 15 min。

4.4.2 器具

4.4.2.1 10 套微生物屏障试验组件，包括：

——1 个标称体积为 250 mL 的螺纹口试验瓶；

——1 个可耐受灭菌的螺纹瓶盖，盖上具有 34 mm 直径的洞口。应确保螺纹瓶盖在灭菌过程中不会释放任何可能影响试验中包装材料或微生物的物质。

4.4.2.2 20 个可耐受灭菌的内径为 34 mm 的密封圈，材质为聚四氟乙烯(PTFE)或者具有 PTFE 涂层。这些密封圈不能释放任何可能影响试验中包装材料或微生物的物质。

4.4.2.3 蒸汽灭菌器。

4.4.2.4 冰箱。

4.4.2.5 培养箱。

4.4.2.6 铝箔。

4.4.2.7 滤纸。

4.4.2.8 实验室温度计。

4.4.2.9 剪切或冲压样品的工具。

4.4.2.10 量筒。

4.5 培养基

为了培养微生物，宜使用表 4 所列成分的微生物计数琼脂。

表 4 微生物计数琼脂成分

成分	质量
肉浸出物/g	1
酵母浸出物/g	2
胰蛋白酶消化肉蛋白胨/g	5
氯化钠/g	5
琼脂/g	15

将表 4 所列质量的物质放入玻璃烧杯，然后加入 1 L 新近制备的蒸馏水。该悬液宜煮沸直至物质完全溶解。为了促进微生物的生长，宜在该培养基中加入 10 mg 的硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$)。

在温度 (22±3)℃下测量，培养基的 pH 宜为 7.4±0.4。

注：可以使用具有相同成分的成品培养基[4]。

4.6 石英粉

试验宜使用粒径为 0.04 mm～0.15 mm 的粉状石英。

使用前，粉状石英应在 134 ℃下进行蒸汽灭菌。

然后向 100 g 粉状石英中混入 100 mL 萎缩芽孢杆菌(Bacillus atrophaeus)[5],[6] 酒精(96%)悬液，悬液的微生物数量约为每毫升 10^6，在 50 ℃下干燥 16 h。

4) 来源可参阅 www.mpbio.com、www.bd.com、www.vwr.com、www.oxoid.com、www.siqma-aldrich.com 等。给出本信息是为了方便本部分的使用者，并不表示对该产品的认可。

5) DSM 675，DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH，Braunschweig，Germany.给出本信息是为了方便本部分的使用者，并不表示对该产品的认可。

6) ATCC 9372，American Type Culture Collection，10801 University Boulevard，Manassas (VA)，20110-2209 USA.给出本信息是为了方便本部分的使用者，并不表示对该产品的认可。

注：可以使用等同的成品染菌石英粉[7]。

4.7 试验施行

4.7.1 试验瓶准备

向各洁净的试验瓶中倒入按 4.5 制备的培养基 20 mL，冷却至凝固。灌装时培养基温度至少应为 50 ℃。

4.7.2 装入试验样品

每个试验样品宜放在两个位于试验瓶顶部瓶口上的密封圈之间，然后用螺纹瓶盖固定，使试验样品和密封圈牢固地紧压在试验瓶顶部瓶口上。如果使用的密封圈只有一面涂层，则涂层面应面向试验样品。

4.7.3 灭菌

按 4.7.1 和 4.7.2 准备的微生物屏障试验组件宜在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 20 min。灭菌前，宜用铝箔覆盖螺纹瓶盖。

4.7.4 空气流产生

灭菌并将微生物屏障试验组件冷却至室温之后，每个试验样品用 0.25 g 粉状石英覆盖。为避免实验室交叉污染，宜用滤纸覆盖螺纹瓶盖。

然后将各微生物屏障试验组件放入培养箱中，加热至(50±3)℃。此后，将微生物屏障试验组件放入温度设置为(10±3)℃的冰箱。此加热到冷却(由 50 ℃～10 ℃)的过程宜总共进行 5 次。

为便于操作，建议在试验开始前事先测定加热时间和冷却时间。每个周期宜不少于 40 min。

试验过程中宜尽可能不摇动试验组件。

4.7.5 培养

将微生物屏障试验组件在 37 ℃下培养 24 h。

4.7.6 试验评价

本试验被设计为“合格/不合格”型试验。因此原则上不报告测定值精密度。如果通过 4.9 的阳性检查和阴性检查即可证明方法的灵敏度是充分可信的。

培养后，宜从培养箱中取出微生物屏障试验组件，对培养基上形成的菌落进行计数。

如果全部 10 个试验样品生长的菌落数不超过 15 个，且任何 1 个试验样品生长的菌落数不超过 5 个，则认为包装材料足以作为无菌屏障。

4.7.7 试验报告

试验报告宜包括：

a) 试验样品类型；

b) 取样地点和日期；

c) 菌落数(单个试样菌落数和所有试样总菌落数)；

建议在试验报告中报告冷却时间和加热时间。

---

7) 中国工业微生物菌种保藏管理中心。给出本信息是为了方便本部分的使用者，并不表示对该产品的认可。

4.8 试验施行——备选方法

4.8.1 总则

在此为试验样品按制造商或客户说明单独灭菌后装入已单独灭菌的容器的情况提供了一个额外方法。

4.8.2 试验样品制备

此备选方法的样品制备按 4.3 所述。但试验样品宜按制造商或客户说明进行灭菌。

4.8.3 试验瓶准备和灭菌

分别向各洁净的试验瓶中倒入按 4.5 制备的培养基 20 mL。每个瓶子宜拧上一个带孔的螺纹瓶盖和密封圈(涂层面面向瓶口),并用铝箔覆盖。装有培养基的瓶子宜在 121 ℃的蒸汽灭菌器中灭菌 15 min。每个瓶子还需要第二个密封圈,用于固定试验样品。这些密封圈也宜在 121 ℃下灭菌 15 min。

4.8.4 装入试验样品

在无菌台上操作,将一个无菌试验样品放入螺纹瓶盖(待测面面向螺纹瓶盖的开孔),然后用第二个密封圈固定(密封圈涂层面面向试验样品)。然后,小心将螺纹瓶盖放在瓶子上并拧紧,使试验样品固定。按照 4.7.4 和 4.7.5 对试验样品接种和培养。

4.9 检查

按 4.7 和 4.8 额外分别制备两个试验样品。

其中的一个试验样品不加入石英粉。该检查是阴性检查,用以检查培养基中无微生物。

第二个样品用作阳性检查。在加入石英粉前,用空心针(直径 0.7 mm)刺穿(大约进行 10 次刺穿)试验样品的表面。然后按照 4.7.4 和 4.7.5 进行空气流产生和培养。

5 精密度和偏倚

本试验的精密度和偏倚参见附录 A。

附 录 A
（资料性附录）
精密度和偏倚

A.1 概述

2013 年，由 Sterile Barrier Association (SBA)组织进行了实验室协同试验，对试验方法的精密度(重复性和再现性)进行评价。

共有 5 家德国实验室参加了本次测试，其中 1 家实验室由两组试验人员独立进行试验，这样总共得到 6 组测试数据。

本次测试采用的试验样品包括各种不同材质的材料，既包括预期能够阻止微生物穿透的材料，也包括预期能够穿透微生物的材料。用于湿性条件微生物屏障试验的样品有 3 种，编号为 F1～F3。用于干性微生物屏障试验的样品有 4 种，编号为 L1～L4。

所有样品在 121 ℃下灭菌 15 min。按照标准规定的试验方法分别进行测试。唯一的偏离是，在湿性条件微生物屏障试验中不再另取 20 个试验样品进行复测。

A.2 结果

由于试验方法设计为“合格/不合格”型试验，统计的总均值和实验室内和实验室间精密度数据无实际意义，仅用于提供信息。

试验样品同时进行“合格/不合格”判定。

如果单个平板或试样菌落数超过 100 CFU，则计为 100 CFU 用于结果评价。

按照 DIN ISO 5725-1ff 进行统计评估。

Mandel’s h-statistics test 用于离群值检验。

被认为是离群值的实验室的相应结果不参加统计评估。

本次测试获得的精密度结果见表 A.1。

表 A.1 方法精密度

样品	试验类型	总均值 CFU/板	参加实验室数	有效结果实验室数	实验室内		实验室间		样品判定		一致性 %
					重复性限 CFU/板	变异系数 %	再现性限 CFU/板	变异系数 %	合格数	不合格数	
F1(灭菌纸，光面)	湿性	91.0	6	5	50.0	19.6	55.5	21.8	0	5	100
F2(灭菌纸卷，单面光)	湿性	0.00	6	5	0	0	0	0	5	0	100
F3(皱纹纸)	湿性	30.1	6	6	48.2	57.1	86.5	103	1	5	83
L1(灭菌纸卷，单面光)	干性	0.09	6	6	0.91	357	0.93	366	6	0	100
L2(非织造灭菌包裹，试样用针扎数次)	干性	0.73	6	6	3.07	151	3.32	163	5	1	83

表 A.1（续）

样品	试验类型	总均值 CFU/板	参加实验室数	有效结果实验室数	实验室内		实验室间		样品判定		一致性 %
					重复性限 CFU/板	变异系数 %	再现性限 CFU/板	变异系数 %	合格数	不合格数	
L3(灭菌纸,单面光取灭菌包装纸袋)	干性	0.36	6	6	2.79	274	2.98	293	6	0	100
L4(非织造灭菌包裹,追加样品)	干性	35.1	6	6	52.7	53.7	119	122	1	5	83

A.3 总结

7 个试验样品中,有 4 个试验样品的测试结果在参加实验室中是一致的(100%);其他 3 个试验样品的测试结果在 5 家实验室中是一致的(83%)。

值得注意的是,取得 100%一致性结果的 4 个试验样品都是灭菌纸(光面或单面光)。未取得 100%一致性结果的试验样品是皱纹纸和非织造布材料,全部是包裹材料。

参 考 文 献

[1] 《中华人民共和国药典》(2015 年版)

[2] DIN 58953-6:2010 Sterilization—Sterile supply—Part 6:Microbial barrier testing of packaging materials for medical devices which are to be sterilized