



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1477.1—2016

接触性创面敷料性能评价用标准试验模型 第 1 部分：评价抗菌活性的体外创面模型

Standard test models for primary wound dressing performance evaluation—
Part 1: In vitro wound model for antimicrobial activity evaluation

2016-01-26 发布

2017-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本部分为 YY/T 1477《接触性创面敷料性能评价用标准试验模型》的第 1 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。

本部分由国家食品药品监督管理总局提出。

本部分由国家食品药品监督管理局济南医疗器械质量监督检验中心归口。

本部分起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、山东恒信检测技术开发中心。

本部分起草人：王文庆、国宪虎、吴世福、于兆琴、郝树彬。

引 言

创面是微生物生长繁殖的理想环境,为微生物提供了生长表面以及充足的营养供给。在临床上,创面感染控制一直是医院感染控制的主要内容。抗菌创面敷料中的抗菌成分具有抑制微生物繁殖的功能,可减少临床创面感染的机会。目前,抗菌创面敷料已经在临床上得到了广泛应用,其在创面感染控制方面,尤其是慢性创面感染控制方面的表现也得到了广泛认可。

抗菌创面敷料中的抗菌成分,如 Ag 离子,其本身的抗菌功能已经得到了一致认同。但是,含抗菌成分创面敷料的抗菌活性尚没有公认的评价方法。虽然目前国内外已经有一些抗菌创面敷料抗菌活性的相关研究报道,但是这些研究基本都没有考虑创面微生物的动态生长状态。本部分提供了一个体外创面模型,可以对微生物持续供给新鲜的营养物,从而模拟临床创面微生物的实际生长状态,在此基础上对抗菌创面敷料的抗菌活性进行体外评价。

本部分主要对体外创面模型的构建进行了描述,并没有规定具体的评价方法。当采用本模型建立评价方法时,需根据产品特性和具体应用对评价方法进行确认。本模型也可用于比较同一敷料不同时间点的抗菌活性,也可用于比较不同敷料抗菌活性的优劣。

接触性创面敷料性能评价用标准试验模型

第 1 部分：评价抗菌活性的体外创面模型

1 范围

本部分描述的体外创面模型用于在体外对含抗菌成分的接触性创面敷料的抗菌活性进行评价。本模型的应用需要操作微生物，宜由经过培训的人员在生物安全实验室中进行。

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。

YY 0331 脱脂棉纱布、脱脂棉粘胶混纺纱布的性能要求和试验方法

YY 0854.2 全棉非织造布外科敷料性能要求 第 2 部分：成品敷料

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

抗菌活性 antimicrobial activity

含抗菌成分的接触性创面敷料对微生物的抑制或杀灭能力。

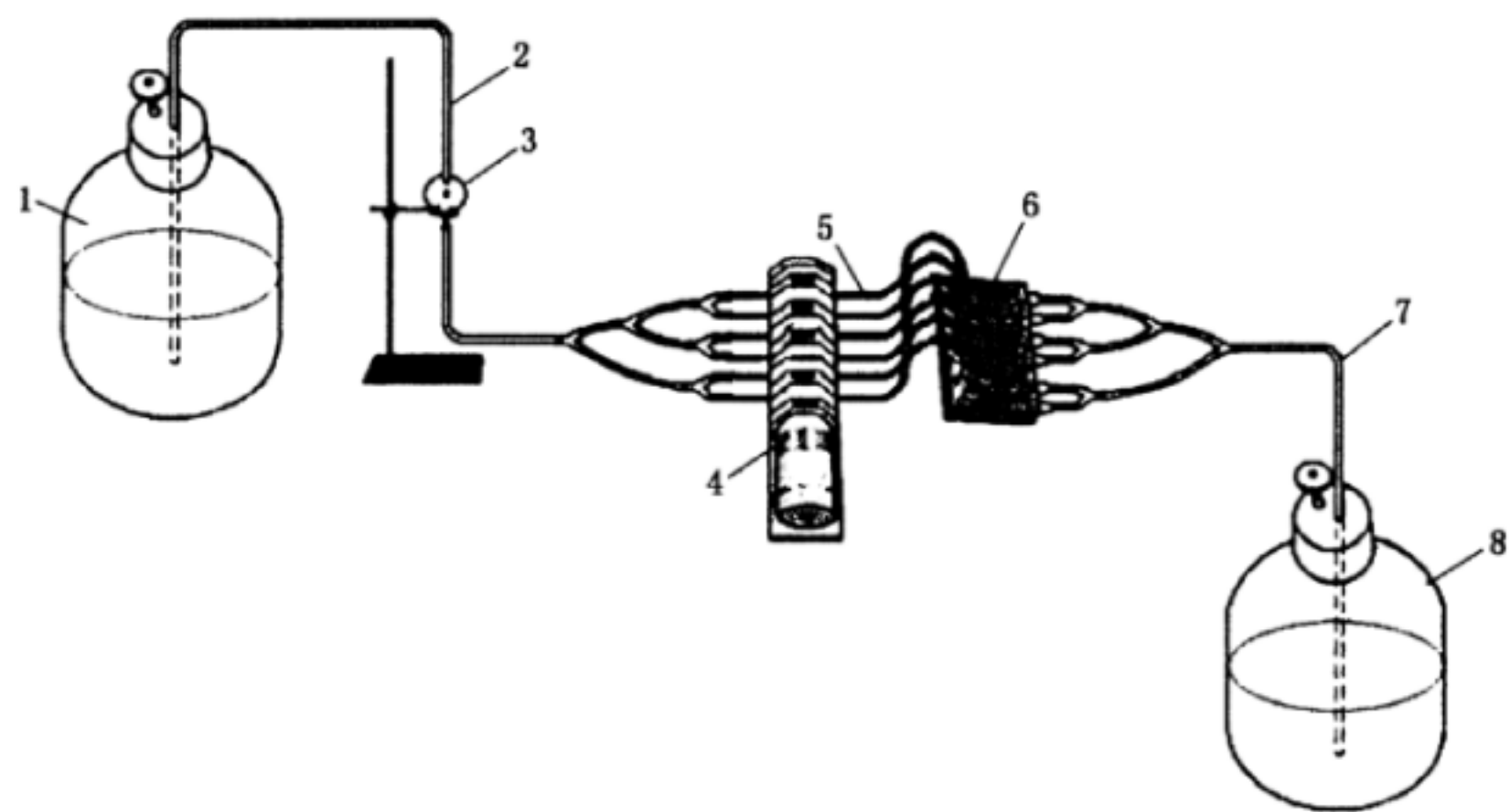
3.2

体外创面模型 in vitro wound model

一个能够对微生物持续供给新鲜营养物，从而模拟创面微生物实际生长状态的试验装置，该装置为抗菌敷料的抗菌活性评价提供了试验平台。

4 概述

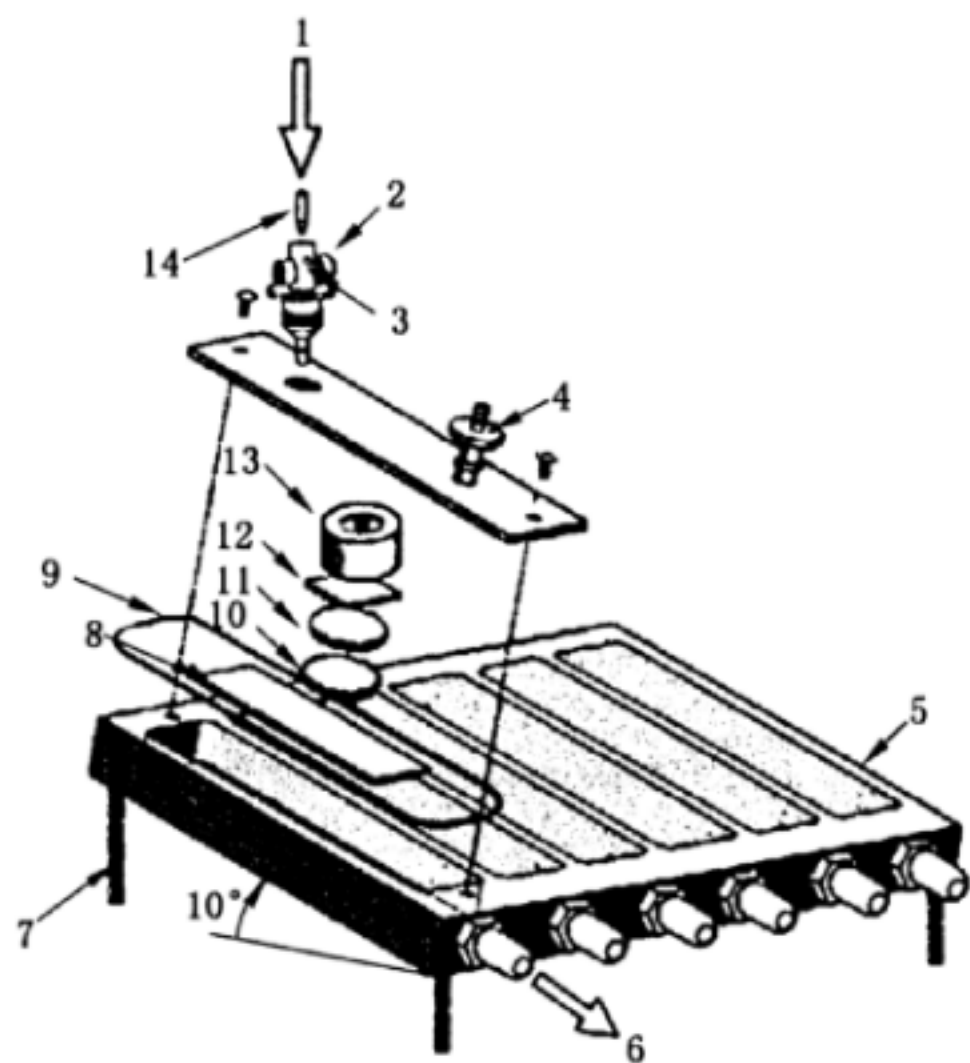
试验装置主要由蠕动泵及泵管、反应器、试剂瓶及连接管路等组成，示意图见图 1。在蠕动泵的作用下，试剂瓶中的模拟创面渗出液到达反应器。在反应器内，试验样片或对照样片与微生物发生作用。随后，反应器内的废液从反应器流入到收集废液的试剂瓶中。



- 说明：
- | | |
|-------------------------------|--------------------------|
| 1——试剂瓶(盛放模拟创面渗出液),进气口配有空气过滤器; | 5——泵管; |
| 2——硅橡胶管路; | 6——反应器; |
| 3——玻璃滴斗; | 7——硅橡胶管路; |
| 4——蠕动泵; | 8——试剂瓶(收集废液),出气口配有空气过滤器。 |

图 1 试验装置示意图

其中,反应器是整个试验装置的核心部件,示意图见图 2。在蠕动泵的作用下,模拟创面渗出液以一定的流速滴到反应器每一个隔室中的检查片上,被粘附在检查片上的吸收垫吸收,从而对位于吸收垫上方的载菌滤膜上的微生物供应营养。在不断供给微生物以新鲜的营养物的条件下,位于载菌滤膜上方的试验样片或对照样片与载菌滤膜上的微生物发生作用。预期作用时间结束后,通过对试验样片或对照样片上的存活微生物进行分析,对抗菌敷料的抗菌活性进行评价。



- 说明：
- | | | |
|------------------|------------|----------------|
| 1 —— 流入液; | 6 —— 流出液; | 11——分析滤膜; |
| 2 —— Mininert 阀; | 7 —— 调节支架; | 12——试验样片或对照样片; |
| 3 —— 隔片; | 8 —— 检查片; | 13——柱状重物; |
| 4 —— 细菌过滤器; | 9 —— O 形圈; | 14——针。 |
| 5 —— 基座; | 10——吸收垫; | |

图 2 反应器示意图

5 模型构成

5.1 反应器¹⁾

5.1.1 基座,材质为聚砷,有6个3.05 cm×10.16 cm的通道,每个通道都有一个流出孔和两个用于放置检查片的支架。整个基座底面装有4个可调节的支架,用以提供10°的倾角。

5.1.2 顶盖,共有6个,材质为聚碳酸酯,装有O形圈。每个顶盖具有两个螺纹孔,通过尼龙螺丝钉扣紧到反应器基座上。每个顶盖还有两个孔,一个用于安装Mininert阀,另一个用于安装细菌过滤器。

5.1.3 Mininert阀,安装到每一个顶盖上,用以连接模拟创面渗出液输送管路。

5.1.4 针,长度约为25 mm,外径0.8 mm(21G),插入Mininert阀。

5.1.5 检查片,新的矩形玻璃显微镜载玻片(或其他相似形状的材料),上表面积为18.75 cm²(25 mm×75 mm)。

5.1.6 吸收垫,直径25 mm。

5.1.7 滤膜,标称孔径0.22 μm,直径25 mm。

5.1.8 柱状重物,直径为24 mm的不锈钢圆柱体,质量为(33±2)g。

5.2 蠕动泵及泵管

蠕动泵至少能使6个通道以拟定流量同时运行。泵管能够耐受压力蒸汽灭菌过程。

5.3 管路及连接件

包括模拟创面渗出液输送管路和废液流出管路。所有管路及连接件均须能耐受压力蒸汽灭菌过程。

5.4 玻璃滴斗

连接模拟创面渗出液输送管路,用于观察模拟创面渗出液的流动情况。能耐受压力蒸汽灭菌过程。

5.5 试剂瓶

共两个,分别用以盛放模拟创面渗出液和收集废液。瓶盖分别具有一个适合连接相应管路的接口和一个适合于安装细菌过滤器的接口。能耐受压力蒸汽灭菌过程。

5.6 细菌过滤器

分别安装到两个试剂瓶以及每个反应器通道顶盖。能耐受压力蒸汽灭菌过程。

6 模型应用

在临床上,不同的创面类型以及创面愈合的不同时期,其创面渗出液的成分及渗出量的多少、创面温度、创面感染的微生物类型及感染程度等都是不同的。相应地,用于创面治疗的抗菌敷料的抗菌成分类型及其释放动力学等也会存在较大差异。显然,如果用相同评价方法(包括试验方法和试验参数)对不同敷料的抗菌活性进行评价存在一定不合理性。研究者应根据抗菌敷料的具体设计及预期用途等设

1) 可参考 BioSurface Technologies Corporation 生产的滴流生物膜反应器(Drip Flow Biofilm Reactor)。给出这一信息是为了方便本部分的使用者,并不意味着对该产品的认可。

计一套适宜的评价方法,充分模拟创面微生物的实际存在状态,以得出科学的评价结果。

本模型尤其适宜于评价片状敷料的抗菌活性。

注:附录 A 推荐了一种适合于该模型的试验方法,但没有给出具体的试验参数;附录 B 则给出了试验参数的选择指南。研究者在设计敷料的抗菌活性评价方法时可参考附录 A 和附录 B。

附 录 A
(资料性附录)
模型应用举例

A.1 主要仪器设备

- A.1.1 生物安全柜;
- A.1.2 恒温培养箱;
- A.1.3 拍打式匀浆仪;
- A.1.4 薄膜过滤装置;
- A.1.5 压力蒸汽灭菌器。

A.2 主要试剂材料

- A.2.1 胰蛋白酶大豆肉汤(TSB);
- A.2.2 胰蛋白酶大豆琼脂培养基(TSA);
- A.2.3 沙氏葡萄糖肉汤培养基(SDB);
- A.2.4 沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA);
- A.2.5 磷酸盐缓冲液(PBS)。

A.3 接种悬液制备

应根据选用菌株的具体特性选择适宜的培养基种类及培养条件对选用菌株进行活化和增菌培养以制备接种悬液。用无菌磷酸盐缓冲液调整接种悬液至需要的浓度,并用标准微生物学程序(平板划线或倾注、微生物过滤或螺旋接种)对接种悬液进行精确计数。最终接种悬液在加到试验材料之前应被充分混合。

A.4 样品制备

A.4.1 试验样片

以无菌操作的方式从已灭菌的试验样品上随机切取 2.5 cm×2.5 cm 的样片,作为试验样片。对于每一种试验菌株,分别需要 3 个试验样片用于试验。在试验前,可将试验样片贮存在无菌培养皿内或其他适宜的无菌容器内,以保持其无菌状态。

A.4.2 对照样片

以无菌操作的方式从已灭菌的与试验样品相同但不含抗菌成分的材料上随机切取 2.5 cm×2.5 cm 的样片,作为对照样片。对于每一种试验菌株,分别需要 3 个对照样片用于试验。在试验前,可将对照样片贮存在无菌培养皿内或其他适宜的无菌容器内,以保持其无菌状态。

如果无法得到上述对照样片,可用符合 YY 0331 要求的十二层 17 型无菌全棉纱布或符合 YY 0854.2 要求的四层无菌全棉非织造布代替对照样片。

A.5 试验程序

A.5.1 将直径 25 mm 的吸收垫用硅基玻璃胶粘附到检查片上,向每一个反应器通道中分别插入一个检查片,将通道顶盖安装到基座上,向每一个通道顶盖上放置一个细菌过滤器和一个 Mininert 阀。

A.5.2 在接近模拟创面渗出液瓶顶盖处将玻璃滴斗连接到模拟创面渗出液输送管路,将泵管连接到模拟创面渗出液输送管路,将废液流出管路连接到反应器流出孔上。

A.5.3 用铝箔包裹所有暴露的管路末端和开口,将组装好的反应器放置于一个灭菌托盘,用适宜的方法进行灭菌。

A.5.4 将 10 μ L 接种悬液接种到标称孔径为 0.22 μ m,直径为 25 mm 的滤膜上,静置 30 min 以使接种物干燥。对于每一种试验菌株,共制作 6 个载菌滤膜。

A.5.5 将冷却后的反应器放置于工作台面的水平位置。以无菌操作的方式打开各通道顶盖,先用 0.5 mL 模拟创面渗出液使吸收垫湿化,然后将载菌滤膜接种面朝上放置到吸收垫上。然后,将 3 个无菌试验样片和 3 个对照样片分别放置在载菌滤膜的上面,在每个试验样片和对照样片上各放一个无菌柱状重物²⁾,将通道顶盖安装到基座上。

A.5.6 调整反应器与水平面的倾角,使其为 10°。

A.5.7 以无菌操作的方式将模拟创面渗出液倒入无菌试剂瓶中,用模拟创面渗出液输送管路和废液流出管路连接试验装置各部件。

A.5.8 打开蠕动泵并设定拟定流速,让模拟创面渗出液缓慢滴到检查片上,模拟创面渗出液被吸收垫吸收,从而对分析滤膜上面的接种微生物供应营养。在拟定温度条件下,让试验/对照样片对接微生物作用至拟定时间。

A.5.9 打开顶盖,以无菌操作的方式用无菌镊子取下滤膜、样片和无菌柱状重物,放入 100 mL 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中。采用适宜的方式对微生物进行洗脱、培养、计数。计算每个样片/滤膜组合中的微生物数量。

注:可用扫描电镜或荧光显微镜对样片/滤膜上的微生物进行观察,以获得试验终点微生物状态的定性图片。

A.6 结果表征

用 Log 降低值(LRV)表示试验样品的抗菌活性,用式(A.1)计算 LRV。

$$\text{LRV} = \log_{10} N_1 - \log_{10} N_2 \quad \dots\dots\dots (\text{A.1})$$

式中:

N_1 ——对照样片上的平均微生物数量,cfu;

N_2 ——试验样片上的平均微生物数量,cfu。

A.7 报告

试验报告宜至少包括以下信息:

- a) 样品识别;
- b) 菌株种类;
- c) 起始接种量;

2) 某些样品在吸收模拟创面渗出液后会出现吸胀,导致样片与载菌滤膜脱离,从而影响试验结果。加柱状重物的目的是模拟敷料在使用中受到绷带或胶带的固定力,确保在试验过程中样片与载菌滤膜之间有良好的接触。

- d) 模拟创面渗出液类型；
- e) 模拟创面渗出液流速；
- f) 试验温度；
- g) 作用时间；
- h) 对照样片微生物数量；
- i) 试验样片微生物数量；
- j) LRV；
- k) 本标准编号；
- l) 任何偏离本标准的说明。

附 录 B
(资料性附录)
试验参数选择指南

B.1 需要选择的试验参数

需要选择的试验参数主要包括：

- a) 菌株种类；
- b) 起始接种量；
- c) 模拟创面渗出液类型；
- d) 模拟创面渗出液流速；
- e) 试验温度；
- f) 作用时间。

B.2 选择指南

B.2.1 菌株种类

一般情况下,抗菌敷料产品的设计和预期用途是对临床创面感染微生物具有广谱抗菌作用,而并非仅仅针对少数几种微生物具有抗菌作用,比如银离子敷料,银离子的广谱抗菌作用早已得到证实。目前已知的临床创面感染常见微生物包括金黄色葡萄球菌、大肠菌群、拟杆菌属某些种、消化链球菌属某些种、铜绿假单胞菌、肠球菌属某些种和化脓链球菌等,种类比较多。在进行试验菌株选择时,一般宜选择能够代表临床创面感染常见微生物的标准化菌株进行抗菌活性评价。

大多数感染创面会同时被多种微生物感染。本模型也可以用来进行多菌种感染创面的抗菌活性评价,但是菌种的加入引进了种间干扰,增加了模型的复杂度,这将更难对敷料的抗菌活性进行解释。因此,一般建议只针对单一菌种进行评价。

B.2.2 起始接种量

起始接种量反映的是临床创面的实际感染情况。临床上,如果每克创面组织的微生物数量超过 10^5 cfu,则认为创面已被感染;如果微生物数量超过 10^6 cfu,则需要进行治疗。因此,如果要模拟已感染创面,可以采用 10^5 cfu 的起始接种量,这种情况可以评价抗菌敷料对已感染创面的临床表现;如果要模拟未感染创面,可以采用 10^4 cfu 的起始接种量,这种情况可以评价抗菌敷料对未感染创面的临床表现。

B.2.3 模拟创面渗出液类型

建议选择 10% 的 TSB 培养基用于该模型下抗菌敷料的抗菌活性评价。TSB 是一个蛋白质营养培养基,能够供给多种微生物的生长所需。但是,该培养基缺失许多创面渗出液组分(比如纤维蛋白,细胞因子类和蛋白水解酶)。然而,当前在实验室研究领域中,尚没有标准化的创面渗出液营养培养基。而且,创面渗出液中的生化组分因个体、创面类型和创面愈合期而异。相比之下,选择标准微生物生长培养基是当前研究的一个很好的选择。

B.2.4 模拟创面渗出液流速

本模型设计模拟创面渗出液供给的目的有两个：一是期望通过模拟创面渗出液流速的控制模拟创面渗出液的渗出情况；二是为了持续供给微生物以新鲜的营养，在微生物动态生长的状态下评价抗菌敷料的抗菌活性。本试验参数的选择，需要评价者对不同创面渗出液的渗出情况做出充分的调研。

事实上，想要对创面渗出液的渗出情况做出精确模拟是非常困难的。比如，临床创面渗出液并不是以均一稳定的速率渗出的，一般情况下，随着伤口的不断愈合，渗出液的量会逐渐减少。在这种情况下，本模型中模拟创面渗出液的供给更多是为了维持微生物的动态生长。创面渗出液是创面微生物的主要营养来源，在营养物可以充分供给的情况下，营养物的供给方式似乎显得并不是特别重要。在本模型下，一般每个通道维持 5 mL/h 的流速会足以供给微生物以新鲜营养，同时又不会因为流速过大对敷料和微生物的作用过程造成影响。

B.2.5 试验温度

临床上，不同的创面类型以及创面愈合的不同时期，创面温度是不一样的，并非所有的创面温度都等同于反映人体体温的 37 °C 条件。据报道，创伤创面温度是 25.3 °C ~ 37.3 °C，而下肢慢性溃疡创面温度是 24 °C ~ 26 °C。

温度是维持微生物生长的重要条件，评价者应该根据敷料的预期用途对不同创面的创面温度进行充分调研，谨慎选择试验温度参数。在很多实验室，如果要精确控制在特定试验温度下进行试验会存在很多困难，大部分具有温控功能的实验室只是可以维持正常室温。一般情况下，临床创面微生物多是嗜中温微生物，在正常室温下都可以维持生长，在实验室条件不允许的情况下，可以允许在正常室温条件下进行抗菌活性评价，但是，试验温度条件必须记录在试验报告中。

B.2.6 作用时间

作用时间的选择宜模拟抗菌敷料的临床预期使用时间。另外，本模型也可以设计多个作用时间点，以评价抗菌敷料的持续抗菌活性。

参 考 文 献

- [1] ASTM E 2647. Standard Test Method for Quantification of a *Pseudomonas Aeruginosa* Bio-film Grown using a Drip Flow Biofilm Reactor with Low Shear and Continuous Flow
-