

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0929.3—20XX

输液用药液过滤器 第3部分：标称孔径
0.22 μm 药液过滤器液体细菌截留试验方
法

Liquid filters for medical infusion equipment Part 3: Test method for determining
liquid bacterial retention of 0.22 μm filter

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

征求意见稿

建议本标准自发布之日起12个月实施

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

20XX - XX - XX 发布

20XX - XX - XX 实施

国家药品监督管理局 发布

目 次

前 言	II
引 言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 概述	1
5 试验仪器	1
图 1: 挑战实验设备示意图	2
6 试剂和材料	2
6.1 盐水乳糖肉汤培养基 (SLB)	2
6.2 营养琼脂或胰蛋白大豆琼脂 (NA 或 TSA)	3
6.3 营养肉汤或胰蛋白大豆肉汤 (NB 或 TSB)	3
6.4 蛋白胨水 (1 g/L)	3
6.5 无菌氯化钠溶液	3
6.6 缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146)	3
6.7 分析滤膜	3
7 挑战原液和挑战菌悬液制备	3
7.1 挑战原液制备	3
7.2 挑战菌悬液的制备	3
8 挑战试验	3
8.1 试验样品组	3
8.2 阳性对照组	4
8.3 空白对照组	4
8.4 阴性对照组	4
9 试验有效性确认	4
10 结果表征及判定	4
参 考 文 献	8

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

YY/T 0929的总标题为输液用药液过滤器，由以下部分组成：

- 第1部分：除菌级过滤器完整性试验方法
- 第2部分：标称孔径 1.2 μm 药液过滤器白色念珠菌截留试验方法
- 第3部分：标称孔径 0.22 μm 药液过滤器液体细菌截留试验方法

本部分为YY/T 0929的第3部分。

本文件代替YY/T 0918-2014 药液过滤膜、药液过滤器细菌截留试验方法，与YY/T 0918-2014相比，除结构调整和编辑性改动以外，主要技术变化如下：

- a) 根据临床使用情况对挑战体积、挑战压力和挑战时间等进行重新设计。
- b) 优化了挑战原液和挑战悬液的制备方法。
- c) 增加了试验空白对照组。
- d) 删除了制备缺陷短波单胞菌冷冻菌糊及用其制备挑战原液的试验方法。
- e) 删除了附录A 循环试验方案。

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。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用输液器具标准化技术委员会（SAC/TC106）归口。

本文件起草单位：山东省医疗器械和药品包装检验研究院、

本文件主要起草人：

引 言

尽管临床用大输液和输液器具都已经过最终灭菌，但有时因输液环境较差、人为操作不当、输液器具质量参差不齐等因素，微生物仍有进入输液系统的风险。同时某些输注液（如全营养混合液）本身就有利于微生物的存活或快速增殖，输液器具一旦被污染极易导致一系列输液并发症。药液过滤器及空气过滤器在输液器具上的应用可以有效滤除药液及输液环境中污染的微生物，降低输液感染风险。

当前，输液器具配用较为广泛的药液过滤器是滤膜标称孔径 $2\mu\text{m}$ 以上（常见滤膜标称孔径 $2\mu\text{m}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ 等）。近年来，随着医疗水平和输液危害认知能力的提升，临床上使用滤膜标称孔径 $2\mu\text{m}$ 以下（常见滤膜标称孔径 $0.22\mu\text{m}$ 、 $1.2\mu\text{m}$ 等）药液过滤器日益增多，尤其滤膜标称孔径 $0.22\mu\text{m}$ 的药液过滤器是目前公认的除菌级药液过滤器，可以滤除所有输液感染常见微生物。对于此类药液过滤器，其微生物截留能力无疑是其最为关键的性能。本部分给出了测定除菌级药液过滤器液体细菌截留试验方法，除菌级过滤膜可参照本方法进行试验。通常，只有通过本试验的药液过滤器才可将滤膜孔径标称为 $0.22\mu\text{m}$ 。

模式细菌评价除菌级药液过滤器液体细菌截留能力，不同于使用其他标准物质。细菌是有生物活性的个体，用此对滤膜进行截留能力评价，可得到更加真实、可靠的试验结果。但其局限性在于方法较复杂，不适合在药液过滤器、药液过滤膜生产过程中进行常规控制。常规控制中可以参考YY/T0929.1中规定的药液过滤器完整性试验，前提是规定的泡点压下限值已与本文件建立了关联。

输液用药液过滤器 第3部分：标称孔径 0.22 μm 药液过滤器液体细菌截留试验方法

1 范围

本文件规定了评价标称孔径0.22 μm 输液用药液过滤器液体细菌截留能力的试验方法。

本文件适用于标称滤膜孔径0.22 μm 输液用药液过滤器液体细菌截留能力的评价，输液用药液过滤膜材液体细菌截留能力的评价可参考本文件。

本文件不适用于药液过滤器对特定种类药品细菌截留能力的验证。该验证宜采用特定药液或替代溶液在实际临床输液参数下进行。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；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 6682 分析实验室用水规格和试验方法

YY/T 0929.1-2014 输液用除菌级过滤器 第1部分：药液过滤器完整性试验

中华人民共和国药典 2020年版 四部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

对数降低值 log reduction value; LRV

挑战微生物的数量与滤出液微生物数量比值以10为底的对数值。

4 概述

使规定挑战水平的缺陷短波单胞菌挑战悬液在规定的挑战流量下对供试药液过滤器进行挑战，收集滤出液并进行微生物分析，以此评价供试药液过滤器的微生物截留能力。

5 试验仪器

5.1 仪器组装

在无菌条件下按下图1对实验仪器进行组装。阴性对照可先行试验，然后再向不锈钢压力容器中加入挑战菌，使阳性对照支路、空白对照支路、样品挑战支路同步进行，根据测试需要，可同时组装多路测试样品平行进行。

5.2 主要仪器

5.2.1 气源或空压机：可以为挑战试验提供稳定压力

5.2.2 不锈钢压力容器：体积应不小于12L,可以耐受0~350kPa压力，易于彻底清洗消毒，使用前宜用70%乙醇消毒，晾干，并用无菌水彻底冲洗后将挑战悬液置于其中

5.2.3 管路：耐高压蒸汽灭菌，能承受350kPa压力

5.2.4 阀门：耐高压蒸汽灭菌，以软管相连

5.2.5 压力表：可以显示0~350kPa压力

5.2.6 流量计：可以测量0~200mL/min的流量，精度±5%

5.2.7 滤出液收集装置：用于收集挑战试验后的滤出液

5.2.8 可调阀门：可实现0.1mL精度的微调

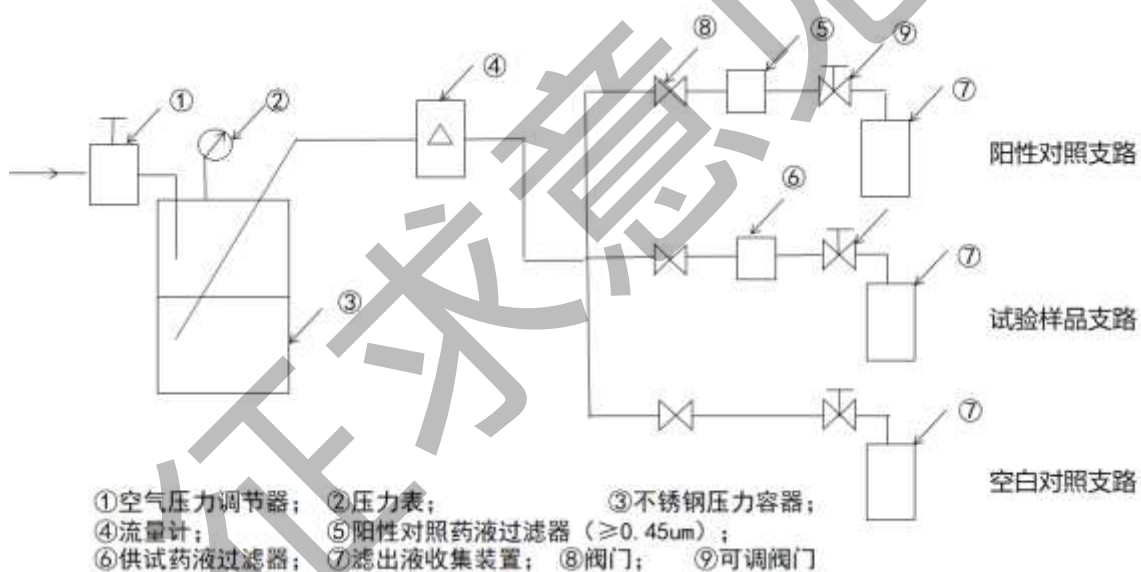


图 1：挑战实验设备示意图

6 试剂和材料

6.1 盐水乳糖肉汤培养基（SLB）

6.1.1 乳糖肉汤：将 1.3 g 脱水乳糖肉汤培养基溶于 100 mL 水中。

6.1.2 氯化钠溶液：将 7.6 g 氯化钠溶于盛有 970 mL 水的 2 L 具塞烧瓶中。

6.1.3 取 30 mL 乳糖肉汤加入到 970 mL 氯化钠溶液中，混匀，121 °C 灭菌 15 min。

6.2 营养琼脂或胰蛋白大豆琼脂 (NA 或 TSA)

按制造商说明书制备。

6.3 营养肉汤或胰蛋白大豆肉汤 (NB 或 TSB)

按制造商说明书制备。

6.4 蛋白胨水 (1 g/L)

将蛋白胨溶入水中, 以合适体积分装于螺口瓶中, 以便于制备十倍稀释液, 121 °C 灭菌 15 min。

6.5 无菌氯化钠溶液

0.9% 无菌氯化钠溶液。

6.6 缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146)

按制造商说明书进行活化、使用、储存及销毁。

6.7 分析滤膜

直径 47 mm, 孔径 0.22 μm。

7 挑战原液和挑战菌悬液制备

7.1 挑战原液制备

7.1.1 从缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146) 工作菌株新鲜培养物上挑取菌落接种于 10 mL NB 或 TSB 中, 30°C ± 2°C 培养 24 h。

7.1.2 将 10 mL 培养液移入 1 L SLB 中, 混匀, 30°C ± 2°C 培养 24 h, 即得到挑战原液。临用前, 可以在 4°C 保存, 但不得超过 8 h。

7.1.3 从挑战原液中取样, 用 1 g/L 蛋白胨水进行稀释, 按照《中华人民共和国药典》规定的薄膜过滤法或平板涂布法, 30°C ± 2°C 条件下培养 48 h, 测定挑战原液的活菌浓度。

7.2 挑战菌悬液的制备

7.2.1 根据测试药液过滤器有效过滤面积计算挑战所需的活菌数量。

7.2.2 取一定体积 7.1.2 中培养的挑战原液, 加入 0.9% 无菌氯化钠溶液, 充分混匀, 使每平方厘米测试滤膜至少经受 10^7 cfu 挑战水平微生物的挑战, 制得挑战悬液。

8 挑战试验

8.1 试验样品组

8.1.1 将试验仪器的各部分进行灭菌。在无菌条件下按图 1 对实验仪器进行组装, 将供试药液过滤器接入实验仪器。

8.1.2 在不锈钢压力容器中加入挑战菌悬液后, 加压到 200 ± 10 kPa。调节挑战流量为每平方厘米滤膜 2 mL/min ~ 4 mL/min。使供试药液过滤器经受挑战菌悬液的挑战, 收集滤出液。

8.1.3 每个样品需经受 1500 mL 菌悬液挑战后停止挑战，将全部滤出液，参照《中华人民共和国药典》四部 1105 “非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法”中的薄膜过滤法进行计数。

8.1.4 无菌操作将滤膜转移至 NA 或 TSA 平板上， $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 培养，在第 2 d、3 d 和第 7 d 记录菌落数。

8.2 阳性对照组

8.2.1 将试验仪器的各部分进行灭菌。在无菌条件下按图 1 对实验仪器进行组装，用标称孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 及以上的药液过滤器代替供试药液过滤器，按照 8.1.1、8.1.2、8.1.3 进行操作。

8.2.2 挑战之后的结果培养按照 8.1.4 进行培养。

8.3 空白对照组

8.3.1 将试验仪器的各部分进行灭菌。在无菌条件下按图 1 对实验仪器进行组装，此组不安装任何供试药液过滤器，按照 8.1.1、8.1.2、8.1.3 进行操作。

8.3.2 挑战之后，取收集液用 1 g/L 蛋白胍水进行稀释，按照《中华人民共和国药典》规定的薄膜过滤法或平板涂布法， $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 48 h，测定挑战试验过程中挑战悬液的实际挑战活菌浓度。

8.4 阴性对照组

8.4.1 将试验仪器的各部分进行灭菌。在无菌条件下按图 1 对实验仪器进行组装，此组不安装任何供试药液过滤器，同时使用 0.9% 无菌氯化钠溶液代替挑战悬液，按照 8.1.1、8.1.2、8.1.3 进行操作。

8.4.2 挑战之后的结果培养按照 8.1.4 进行培养。

9 试验有效性确认

9.1 挑战菌尺寸应为 $(0.3 \mu\text{m} \sim 0.4 \mu\text{m}) \times (0.6 \mu\text{m} \sim 1.0 \mu\text{m})$ 的短小杆状菌，且主要以单细胞形式存在，活菌数应不小于总菌数的 25%，每平方厘米测试滤膜至少经受 10^7 cfu 挑战水平活微生物的挑战。具体鉴定方法可参见资料性附录 A。

9.2 阳性对照组应有缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146) 生长。

9.3 空白对照组计数应满足每平方厘米测试滤膜至少经受 10^7 cfu 挑战水平活微生物的挑战。

9.4 阴性对照应无菌生长。

9.5 试验样品组、阳性对照组及空白对照组试验分析滤膜上应无缺陷短波单胞菌之外的微生物生长。

9.6 试验结果同时满足 9.1、9.2、9.3、9.4 及 9.5 的要求，确认试验有效，否则试验无效。

10 结果表征及判定

10.1 计算并报告对数降低值 (LRV)。

除菌级药液过滤器的细菌截留能力用对数降低值 (LRV) 表示，用公式 (1) 计算。

$$\text{LRV} = \lg N_0 - \lg N_1 \dots \dots \dots (1)$$

式中：

LRV——对数降低值

N_0 ——挑战悬液细菌总数，cfu；

N_1 ——滤出液细菌总数，cfu。

如果 $N_1 < 1$ ，则表述为 $LRV > \lg N_0$ 。

对标称滤膜孔径为 $0.22 \mu\text{m}$ 的药液过滤器，其滤出液通常要求无菌生长，即 $N_1 < 1$ ，也就是 $LRV > \lg N_0$ 。

10.2 结果判定

试验样品分析滤膜上未出现菌落判为满足除菌要求。

11 试验报告

11.1 过滤器的识别

宜报告供试过滤器制造商名称、标称孔径、有效过滤面积和其他相关数据。

11.2 挑战操作参数

宜报告挑战体积、挑战流量、菌种信息和其他相关参数。

11.3 菌落数

宜报告阳性对照、阴性对照、空白对照及试验样品分析滤膜上观察到的菌落数，必要时可进行菌种鉴定。

附录 A

(资料性)

缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146) 鉴定方法

A.1 概述

缺陷短波单胞菌 (ATCC 19146) 的鉴定, 可从菌落形态、显微观察、生化特性试验、细菌蛋白组学鉴定等几个维度进行。

A.2 菌落形态

缺陷短波单胞菌的菌落呈米黄色, 轻微凸起, 边缘完整。

A.3 显微观察

A.3.1 用装有经校准的目镜千分尺和良好分辨率油镜镜头的复合光学显微镜来观察经革兰氏染色制备的菌株。应为革兰氏阴性; 观察几个视场中微生物的大小和分布情况, 细菌应主要以单细胞形式存在不聚集, 尺寸为 $(0.3\mu\text{m}\sim 0.4\mu\text{m}) \times (0.6\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m})$ 的短小杆状菌。

A.3.2 进行鞭毛染色 (可选)。缺陷假单胞菌具有极生单鞭毛的特征。

A.3.3 若要区分细菌的死活, 可使用混合染料, 如EthD-III、DMAO、SYTO-9、碘化丙啶 (PI)、CFDA等, 配成一定浓度, 再与一定量的菌液混合, 以特定波长的荧光进行激发, 死菌和活菌会呈现出不同的颜色, 在荧光显微镜下或流式细胞仪观察计数, 可计算死活比。

A.4 生化特性试验

按表1进行生化特性试验, 缺陷假单胞菌的生化特性应符合表1规定。

表1 生化特性试验及要求

试验	缺陷假单胞菌 (ATCC 19146) 生化特性
芽孢形成	-
葡萄糖氧化发酵培养基, 开口	-
葡萄糖氧化发酵培养基, 封口	-
3%乙醇氧化发酵培养基, 开口	+
3%乙醇氧化发酵培养基, 封口	-
靛基质	-
甲基红	-
3-羟基-2-丁酮	-
明胶酶	-

需氧菌	+
过氧化氢酶	+
细胞色素（靛酚）氧化酶	+
在麦康凯琼脂上生长	+
脱氮	+
DNA酶（BBL DNA酶测试琼脂或类似物）	-
氨戊酰胺耐受	-

A.5 细菌蛋白组学鉴定技术

可使用近年来发展起来的一种新型软电离质谱技术—MALDI-TOF技术。基本原理是用激光照射微生物标本与基质形成的共结晶体，基质吸收激光能量并传递给微生物所含生物分子（主要是蛋白质），同时将H⁺（质子）转移到生物分子而发生电离。带电荷离子在电场的作用下离开微生物—基质表面进入一定长的真空管（TOF）。在真空管飞行过程没有外力作用，电离后的生物分子到达真空管顶端的离子检测器的时间与其质量有关，也就是质量越大、飞行速度越慢，到达检测器的时间越长，从而鉴别不同质量蛋白并获得微生物蛋白质量指纹图。在挑战试验过程中若出现阳性结果，可用此鉴定技术实现对缺陷短波单胞菌（ATCC 19146）或污染菌的快速鉴定。

参 考 文 献

- [1] YY 0770.1 医用输液器具用过滤材料 第一部分：药液过滤材料
 - [2] PDA TR40:2005 《气体过滤除菌》
 - [3] 《中华人民共和国药典》2020年版 四部
 - [4] ASTM F838-20 Standard Test Method for Determining Bacteria Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration Reinstated
-

征求意见稿

征求意见稿

征求意见稿