



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0618—2017
代替 YY/T 0618—2007

医疗器械细菌内毒素试验方法 常规监控与跳批检验

Test methods for bacterial endotoxins of medical devices—
Routine monitoring and alternatives to batch testing

2017-02-28 发布

2018-01-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准代替 YY/T 0618—2007《细菌内毒素试验方法 常规监控与跳批检验》，与 YY/T 0618—2007 的主要区别如下：

- 标准名称修改为：医疗器械细菌内毒素试验方法 常规监控与跳批检验；
- 修改了范围；
- 增加了术语，内毒素工作标准品(见 3.4)；几何平均终点(见 3.11)；调查试验(见 3.14)；超限值(见 3.21)；
- 修改了“附录 B 试验方法、常规监视和跳批试验指南”；
- 增加了“附录 C 超限值(OOS)和失败调查指南”。

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。

本标准由国家食品药品监督管理总局提出。

本标准由全国医疗器械生物学评价标准化技术委员会(SAC/TC 248)归口。

本标准起草单位：山东省医疗器械产品质量检验中心、国家食品药品监督管理局天津医疗器械质量监督检验中心、上海松力生物科技有限公司。

本标准主要起草人：孙令骁、王昕、朱丽丽、姜华、何红兵、吴旭君。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为：

- YY/T 0618—2007。

引 言

热原是可以引起发热的物质。许多医疗产品的放行需要进行热原试验。热原可分为两类：微生物热原(如,细菌、真菌、病毒)和非微生物热原(如,药物、器械材料、类固醇、血浆制品)。已发现的热原大多数为革兰氏阴性细菌的内毒素。虽然革兰氏阳性细菌、真菌和病毒可能是致热原,但它们的致热机理不同(全身作用)并且作用程度低于革兰氏阴性细菌。本标准只包括革兰氏阴性细菌内毒素试验。

内毒素是革兰氏阴性细菌细胞外壁的高分子量脂多糖(LPS)成分,如污染人体血液或组织,内毒素可导致发热、脑膜炎和血压迅速降低。当革兰氏阴性细菌分解或裂解时,主要由蛋白、磷脂和 LPS 组成的细胞外壁成分就不断释放入环境中。内毒素污染难以预防,因为其广泛存在于自然界中,性质稳定,体积较小可通过常规的除菌滤膜。

可通过下列措施使医疗产品具有无热原性:

- 1) 采用预防或控制内毒素聚集的生产技术;
- 2) 通过内毒素灭活(如干热法)或物理去除方法(如清洗、蒸馏、超滤)去热原。

本标准主要关注无需将去热原步骤作为生产过程一部分的条件下生产的产品。

本标准的目的是提出细菌内毒素试验的要求和指南。包括供试验产品单元的选择,试验技术的选择和确认,常规试验技术的使用以及试验结果的解释。本标准还包括了用于支持选择跳批试验的生产运行确认要求。

附录 A、附录 B 和附录 C 中分别包含以下信息:

- 内毒素试验的背景和历史(参见附录 A);
- 内毒素试验方法指南(参见附录 B);
- 跳批试验和生产过程确认指南(参见附录 B);
- 超标结果试验结果和调查指南(参见附录 C)。

医疗器械细菌内毒素试验方法

常规监控与跳批检验

1 范围

本标准规定了适用于测定医疗器械、组件或原材料的细菌内毒素试验方法的基本准则。

注：虽然本标准的范围限定为医疗器械，但本标准规定的要求和给出的指南可能也适用于其他医疗产品。

本标准不适用于细菌内毒素以外热原的评价。

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。

中华人民共和国药典 2015 年版

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

细菌内毒素试验 bacterial endotoxins test; BET

通过将液体试验样品与鲎试剂混合来测定活性细菌内毒素的检验，通过目测、浊度、显色或其他确认过的检验方法测量成正比例反应的结果。

3.2

批 batch

规定的原材料、中间体或成品的数量，预期或声称其在规定的生产循环中生产的特性与质量均一。

3.3

显色技术 chromogenic technique

基于测量的显色反应正比于鲎试剂与内毒素之间反应的原理，定量或检测内毒素的 BET 方法。

3.4

内毒素工作标准品 control standard endotoxin; CSE

以国家标准品为基准标定的内毒素制剂。

3.5

除热原 depyrogenation

确认过的去除或灭活内毒素的过程。

3.6

内毒素或细菌内毒素 endotoxin or bacterial endotoxin

与革兰氏阴性菌细胞壁有关的高分子量复合物，有人体致热性并与鲎试剂有特异性反应。

3.7

内毒素单位 endotoxin unit

EU

内毒素活性的标准测定单位。

YY/T 0618—2017

3.8

终点(凝胶) endpoint (gel clot)

一个试验溶液的系列稀释或系列浓度或对照溶液中观察到一个细菌内毒素阳性反应的最后一个点。

3.9

增强 enhancement

非内毒素相关因素(通常由试验样品的特性所致)导致的细菌内毒素试验异常现象,使试验反应高于实际存在的内毒素总量。

3.10

凝胶技术 gel-clot technique

量化或检测内毒素的 BET 法,基于产生的凝胶反应是鲎试剂与内毒素呈正比反应的原理。

3.11

几何平均终点 geometric mean endpoint

从重复系列稀释度中得到的已转换为以 10 为底的终点对数值的平均值,用于从某一试验溶液确定集中趋势或均值。

3.12

抑制 inhibition

非内毒素相关因素(通常由试验样品的特性所致)导致的细菌内毒素试验异常现象,使试验反应低于实际存在的内毒素总量。

3.13

抑制/增强试验 inhibition/enhancement test

用于确定某一特定细菌内毒素试验样品是否含有减小试验准确性的因素,即是否对试验系统产生抑制或增强作用的试验。

3.14

调查试验 investigation test

重新分析某一样品浸提液或制备液以验证原试验结果。

3.15

鲎试剂反应材料 LAL reactive material; LAL-RM

任何激活鲎试剂并引起增强的非内毒素成分。

3.16

内毒素检查用水 LAL reagent water; LRW

纯化水或其他经鉴定的可用于 BET 中的溶剂、稀释剂和/或浸提液,在所用方法中应无反应和无干扰。

3.17

灵敏度 lambda

λ

鲎试剂凝胶试剂的标称灵敏度,以 EU/mL 表示。或,对于显色法和浊度法,参照标准曲线的最低点(内毒素浓度)。

3.18

鲎试剂 limulus amoebocyte lysate; LAL

从鲎(horseshoe crab)[美洲鲎(*Limulus polyphemus*)或中华鲎(*Tachypleus tridentatus*)]的循环

血变形细胞中提取的试剂,与内毒素相互反应产生凝胶,用于细菌内毒素试验测定细菌内毒素水平。

3.19

脂多糖 lipopolysaccharide; LPS

革兰氏阴性细菌细胞壁成分,典型的由脂质 A、核心多糖和 O-侧链组成。

3.20

最大有效稀释倍数 maximum valid dilution; MVD

与 BET 的灵敏度相关的能够检出规定的试验内毒素限值的样品最大稀释量。

3.21

超限值 out of specification; OOS

样品有效 BET 试验结果超出产品内毒素限值的规范。

注:术语 OOS 只适用于本文件,与其他涉及 OOS 结果的法规指南有所不同,如美国食品药品监督管理局(FDA)的《药品生产 OOS 试验结果的研究》。

3.22

无热原性 non-pyrogenic

医疗产品不会引起发热反应。

注:也可用于描述和标示医疗产品的内毒素水平低于规定的限值。

3.23

产品内毒素限值 product endotoxin limit

规定的某一产品内毒素的最大可接受水平。

3.24

产品实现 product realization

开发、生产和成品交付符合质量管理体系要求的全过程。

3.25

热原 pyrogen

任何能产生发热的物质。

3.26

热原的 pyrogenic

医疗产品能够引起发热反应。

注:可用于描述医疗产品内毒素水平超过规定的限值。

3.27

内毒素国家标准品 reference standard endotoxin; RSE

中华人民共和国药典中规定的从大肠杆菌提取精制而成的内毒素制剂。

3.28

再试验 retest

对先前的供试批的追加样品进行试验。

3.29

标准对照系列 standard control series

用于验证有效的内毒素灵敏度的 RSE 或 CSE 系列稀释液。

3.30

试验内毒素限值 test endotoxin limit

浸提液中所允许的最大内毒素浓度。该确定的限值用于计算样品浸提(混合或一个单元)的最大有效稀释倍数。

YY/T 0618—2017

注：该限值由产品内毒素限值除以每单位样品浸提液的所用 LRW 的体积来确定。

3.31

浊度技术 turbidimetric technique

定量或测定内毒素的 BET 方法，基于测量的显色反应是鲎试剂与内毒素呈正比反应的原理。

3.32

确认 validation

建立获取、记录、解释结果的文件化程序从而保证产品符合预定规范的结果。

4 质量管理体系原理

4.1 文件形成

4.1.1 应详细说明细菌内毒素试验步骤。

4.1.2 本标准中要求的文件和记录应经过指定人员的评审和批准(见 4.2.1)，并且应在规定的质量管理体系要求的控制下。

4.1.3 质量管理体系要求中应规定保留原始数据、计算和衍生数据以及最终数据记录。记录中应包括参与样品制备和检验的人员的信息。

所使用的检验技术步骤和说明是获得批准的，应具备所有使用和操作的相关设备。

4.1.4 计算和数据传递应被适当控制。如采用电子数据，所使用的软件应进行确认并保存确认记录。

4.2 管理职责

4.2.1 应详细说明完成和进行本文件中所描述的步骤的责任和权利。责任应赋予符合质量管理体系要求的人群。

4.2.2 如果具有单独质量管理体系的组织承担了本标准的要求，应详细说明每一人员的责任和权利。

4.3 产品实现

应详细说明采购的步骤。这些步骤应与质量管理体系要求一致。

4.4 人员

4.4.1 质量管理体系要求中应规定指派进行细菌内毒素试验人员的职责。

4.4.2 应按形成文件的程序进行培训，应保留技术人员的相关认定、培训和经历的记录。

4.4.3 分析人员在从事细菌内毒素试验之前应对其进行认定(见 8.3.2)。

4.5 设备

4.5.1 应具备正确进行规定试验所需的所有设备，并按形成文件的程序进行经策划的维护和校准。应保留维护和校准记录。

4.5.2 所有设备应按规定准则的文件进行操作。

4.6 试剂和材料

4.6.1 应规定细菌内毒素试验中所用的材料制备方法，包括相应的鉴定试验。

注：相应的鉴定试验包括鲎试剂灵敏度的认定。

4.6.2 试验中使用的所有鲎试剂应是经过许可的。

4.6.3 细菌内毒素试验所用玻璃器皿和其他设备的除热原方法应得到建立、确认并形成文件。

4.6.4 细菌内毒素试验所用材料如未经除热原处理,应证实无可检出内毒素。证实的方法例如,通过检验购买的材料样品或通过查验售方的合格证明确认无热原。

注:制样、贮存或稀释的容器宜无干扰因素。

4.7 测量、分析和改进

程序中应规定不正常、非预期或超限值结果的处置要求,包括纠正和预防措施。这些程序应符合质量管理体系要求。超限值和失败调查的指南参见附录 C。

5 无热原标签

5.1 直接或间接与血管内、淋巴内或鞘内接触的产品,或是可能与类似全身接触的产品(如输液器、转移器、导管、植入物和输液组件)、或是眼内使用的眼科产品(如硅油、黏弹性产品、眼内透镜)应评价内毒素。

5.2 满足内毒素限值要求的产品可给出声称无热原的标签。

注:产品通常不标示无热原,因为无热原意味着绝对不含细菌内毒素。而所有 BET 方法的固有检出限都无法使试验证实绝对不含有细菌内毒素。

5.3 任何采用标识声称无热原的产品应具有确切的证明,这些证明可包括:

- 由经认定的人员采用确认过的细菌内毒素试验直接检验产品;
- 生产过程生产出无热原的产品的形成文件的确认;或
- 符合某一适用标准和/或要求的其他证据。

5.4 试验过程中应包括声称无热原的产品的所有组件。豁免包装内任一产品件都宜形成文件(如某一把手或束带)。声称“无热原的液路”应通过对所用液路的相关组件和表面的适当评价来予以支持。

5.5 对于多组件的套装类产品,其标签和声称应与包中与循环、淋巴或脑脊液系统接触组件的形成文件的评价相一致。这一标签宜与包及其组件的预期临床应用相一致。

5.6 应依据适宜的法规要求测定产品内毒素限值。

注:GB/T 14233.2—2005 中推荐给出了医用输液(血)、注射器具的内毒素限值。

6 产品单位选择

6.1 细菌内毒素试验中产品单位选择的抽样准则是以生产过程受控并且符合质量管理体系要求为前提。

6.2 试验产品单位的选择应基于抽样方案中规定的准则,这一准则可基于法规的要求、已公布的统计学方案或指南,或生产运行的确认。

6.3 抽样母体(group)一般规定为生产批。如有数据支持不同的选择基数或选用跳批检验,样本选择可基于抽样母体不是一个生产批。如选用跳批检验,见第 10 章、B.6~B.8 和 B.10。

注:抽样母体不是一个生产批的抽样规范中宜包括风险评定,以评价用于建立抽样母体准则的适宜性(参见附录 B)。

6.4 检验样本宜在成品中选取,这包括了所有可能影响或提高内毒素水平的因素(例如,包装)。

注:用于内毒素检验的样品可从被其他生产质量项目中拒收的产品中抽选,前提是该拒收样本能代表非拒收产品。

6.5 样本可包括灭菌前和灭菌后产品。灭菌后的样本包含了所有可能影响产品或内毒素试验的因素。如选择灭菌前的样品检验,样本代表最终产品内毒素水平的可接受性应形成文件。所开展的检验程序宜持续反映灭菌前或灭菌后的样本。等同性确认指南参见 B.6.5。

注：对于促微生物生长的产品，选择灭菌前的样品可能不合适。

6.6 在多组件套装类产品(程序包)或成套产品检验中，依据该产品的使用情况的不同，有时可对每一组件单独评价，有时则可将所有内装物视为一个整体器械评价。标准试验程序宜适用于每一组件的情况。将成套产品或套装作为一个独立单元时，应在不改变方法的前提下考虑样品制备和适用的产品内毒素限值。更多指南参见 B.6.6。

7 技术的选择

7.1 检验实验室当前有三种细菌内毒素检验技术可供选择。每一技术的选择宜建立在实验室技能、经验、样品量要求、数据处置要求和试验样品性质之上的充分评定。当前技术和方法包括：

- a) 凝胶技术：限值试验和测定方法；
- b) 显色技术：动力学和终点方法；
- c) 浊度技术：动力学和终点方法。

三种方法的信息参见附录 B。

7.2 所选方法应按第 8 章进行确认。如改变试验方法或技术，应进行确认/验证(见 8.6)。

8 方法学确认

8.1 试验内毒素限值鉴定

8.1.1 试验内毒素限值定义为某一产品浸提液中可能存在的内毒素最大允许浓度，它与产品内毒素限值相关。参见附录 B，确定产品内毒素限值。

8.1.2 一旦确定了产品内毒素限值，试验内毒素限值可按式(1)计算：

$$\text{医疗器械试验内毒素限值(EU/mL)} = \frac{KN}{V} \dots\dots\dots(1)$$

式中：

- K —— 每一器械内毒素允许量(产品内毒素限值)；
- N —— 供试器械数量；
- V —— 样品组合中的浸提液总量，单位为毫升(mL)。

8.2 最大有效稀释倍数(MVD)

8.2.1 产品有时可能干扰细菌内毒素试验(抑制/增强)。通常采用内毒素检查用水(LRW)或其他适宜稀释剂稀释产品浸提液的方法减轻干扰。因为稀释也会对可能存在的内毒素稀释，因此要有一个允许稀释限度。最大有效稀释倍数按式(2)计算：

$$\text{MVD} = \frac{\text{试验内毒素限值}}{\lambda} \dots\dots\dots(2)$$

式中：

- 试验内毒素限值，见式(1)；
- λ —— 经认定的鲎试剂标示灵敏度(凝胶法)或用于绘制参照标准曲线(显色和浊度)的最低内毒素浓度。

该 MVD 值表示了基于鲎试剂灵敏度的克服抑制/增强作用所能进行的稀释倍数。如 MVD 为 4，即按不大于 4 倍的比例稀释样品浸提液不影响检测产品内毒素限值的能力。

如可行，宜在低于最大有效稀释的稀释度下对产品进行确认。

8.2.2 如某一产品按 MVD 进行试验,宜将该内毒素试验视为定性试验。结果表述为通过/不通过。

阳性结果表明产品的内毒素含量超出了规定的内毒素限值。阴性结果则表明通过该试验。

8.2.3 当一产品在低于 MVD 的稀释度进行试验时,可能需要进行附加稀释以确定阳性结果是否满足试验要求。可采用稀释来获得某一有效的试验结果。附加稀释可能不需要确认。除水以外的稀释剂在使用时可产生干扰作用,宜进行再确认。

8.3 试剂和分析人员资质认定

8.3.1 预试验(标示值的认定/线性的证实)

8.3.1.1 凝胶技术用预试验

应通过检验对每批试剂的标示灵敏度(λ)进行验证。该试验应在 4 个 2 倍稀释系列(例如:2 λ 、 λ 、0.5 λ 、0.25 λ 的稀释度)和一个阴性对照中进行。该稀释系列的几何平均终点应在 0.5 λ ~2 λ 的范围内。一旦被认定,标示灵敏度用于所有计算。标示灵敏度的几何平均值按式(3)计算:

$$\text{几何平均值} = \text{antilg}(\sum e/F) \quad \dots\dots\dots(3)$$

式中:

$\sum e$ ——各稀释度内毒素反应终点浓度的对数值之和;

F ——重复数。

8.3.1.2 显色/浊度技术用预试验

验证需证实线形标准曲线跨越常规分析中所用的内毒素稀释范围。应至少用 3 个不同的内毒素浓度建立标准曲线。如标准曲线范围大于 2 个 lg,宜在曲线范围内每增加 1 个 lg,增加一个标准。各内毒素浓度宜进行 3 个平行试验。在初次质量控制试验中,不宜取各点的均值来计算线性,线性要求与试剂生产商标示的内毒素浓度范围的相关系数的绝对值 $|r| \geq 0.980$ 。

如标准曲线范围小于 2 个 lg,建议用 2 倍稀释建立标准曲线。如果标准曲线大于 2 个 lg,宜用 10 倍稀释建立标准曲线,且在该标准曲线范围内每增加 1 个 lg 插入一个标准。标准曲线不宜超过 4 个 lg,因为大于 5 个 lg 或以上的曲线是不合适的,会产生假阴性结果。

在试剂鉴定中确定的该标准曲线范围,将用于常规检验。

8.3.2 分析人员资质认定

每个从事细菌内毒素试验的分析人员应进行能力确认,分析人员的能力确认程序与 8.3.1 预试验所规定的程序相同。

8.4 产品鉴定/确认

8.4.1 总则

每一产品或产品母体(参见 B.6.3)应经过鉴定/确认,以充分证实试验样品自身对细菌内毒素试验系统不会产生抑制、增强,否则会对 BET 的准确度和灵敏度有干扰作用。样品干扰信息见 8.5。

每个产品或每一类产品至少应使用三批进行初次鉴定/验证研究。

8.4.2 和 8.4.3 给出了产品鉴定的方法。

8.4.2 凝胶技术

8.4.2.1 按表 1 制备溶液。样品溶液稀释度应小于或等于 MVD,且试验系统中不应含有任何可检出的

内毒素。试验各内毒素加入量的稀释系列和阴性对照。各内毒素加入量稀释系列的几何平均终点浓度应按 8.3.1 预试验所列公式测定[式(3)]。

表 1 抑制/增强试验用溶液的制备(凝胶技术)

| 溶液 | 稀释液 | 内毒素加入量 | 内毒素浓度 | 平行数 |
|---------------|------|---|---------------|-----|
| 产品阳性对照(PPC)系列 | 样品溶液 | 制备 2λ 溶液、然后最初的 2λ 制备液 2 倍系列稀释 | 2λ | 4 |
| | | | λ | 4 |
| | | | 0.5λ | 4 |
| | | | 0.25λ | 4 |
| 产品阴性对照 | 样品溶液 | 无 | NA | 2 |
| 标准对照系列 | LRW | 制备 2λ 溶液、然后最初的 2λ 制备液 2 倍系列稀释 | 2λ | 2 |
| | | | λ | 2 |
| | | | 0.5λ | 2 |
| | | | 0.25λ | 2 |
| 阴性对照 | LRW | 无 | NA | 2 |

8.4.2.2 如果是下列情况,样品不含有干扰因子:

- 产品阳性对照系列的鲎试剂灵敏度在 $0.5\lambda \sim 2\lambda$ 之间;
- 阴性对照显示无反应;且
- 标准对照系列的结果与鲎试剂标示灵敏度相符。

8.4.3 显色技术和浊度技术

8.4.3.1 在内毒素标准曲线上选择中值附近的内毒素浓度。按表 2 所列制备溶液,样品溶液的稀释度应小于或等于 MVD。

表 2 抑制/增强试验的溶液制备(显色技术和浊度技术)

| 溶液 | 稀释剂 | 内毒素加入量 | 最少平行管数 |
|-------------|------|------------|--------|
| 产品阳性对照(PPC) | 样品溶液 | 标准曲线中值浓度 | 2 |
| 样品溶液 | 样品溶液 | 无 | 2 |
| 标准对照系列 | LRW | 最少 3 个不同浓度 | 每浓度 2 |
| 阴性对照 | LRW | 无 | 2 |

8.4.3.2 从产品阳性对照中减去样品溶液的平均内毒素浓度,计算出加入的内毒素平均回收率。

8.4.3.3 如产品阳性对照测得浓度(减去样品溶液检出内毒素浓度后)在已知加入的内毒素浓度的 $50\% \sim 200\%$ 内,则认为样品或样品稀释液无干扰因子。

8.5 样品干扰

如细菌内毒素试验中出现干扰现象,可对样品浸提液采用稀释和/或适当处理来去除抑制或增强作用。

8.6 鉴定/确认的保持

8.6.1 采用三批确认的目的是测定产品引入的干扰因子的存在或其变异性。在下列情况下应取三批

重新进行确认：

- a) 产品发生可能影响试验的改变,包括引入新材料、加工工序或产品结构的变化;
- b) 浸提方法或超出规定浸提参数等方面(如增加处理,使用其他温度,使用其他溶剂等)的改变;
- c) 试验技术的改变(如凝胶技术改为显色技术);和
- d) 鲎试剂厂商或试剂配方改变。

注:为了简化起见,如果有科学的支持性理由,用一批进行验证也是可以接受的。

8.6.2 在下列情况下应取一批进行确认:

- a) BET 检验实验室改变;
- b) BET 材料、可能影响试验的设备的改变;和
- c) 鲎试剂灵敏度改变。

注:在某些情况下验证可用产品阳性对照(PPC)。PPC 可能会充分检测出发生了改变。

9 技术的使用

9.1 关键试验参数

9.1.1 温度

细菌内毒素试验方法通用的孵育温度为 $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。参见试剂生产商使用说明书选择适宜的参数。

9.1.2 时间

鲎试剂生产商的产品使用说明书给出了试剂加入和孵育时间长度,凝胶细菌内毒素试验方法通用孵育时间为 $(60 \pm 2)\text{min}$ 。

9.1.3 pH

鲎试剂生产商的使用说明书会给出内毒素反应的最佳 pH 范围。如试验中 pH 超出该范围可能会导致干扰作用。如在确认试验中产品阳性对照的 pH 可接受,以后可能就不需再进行 pH 测量。但是,如在确认中必须调整 pH,则在以后的常规试验中应测量 pH。

9.2 设备和试剂

9.2.1 由于细菌内毒素试验要求限定温度范围,用于凝胶试验孵育的加热箱或水浴宜记录孵育期间温度。机械移液管(包括固定式的、可调的和重复使用单元)应定期进行校准。如实验室采用显色或浊度技术,应按照生产商的使用说明和确认要求对硬件和软件进行鉴定。不是无热原的供应的材料(如微孔板)应在使用前进行仔细的评价(见 4.6.4),以确保不会干扰检验实验室的测定。

9.2.2 试验所用的全部鲎试剂应为有证产品。内毒素工作标准品的活性应用内毒素国家标准品进行标定,由检测实验室进行或由鲎试剂制造商提供给检测实验室标定文件。

9.2.3 鲎试剂生产商的产品标签会给出冷冻干燥和复原试剂的贮存要求。实验室的贮存条件如与生产商推荐的条件不同,则应对贮存条件进行确认。

9.3 样品制备

9.3.1 总则

9.3.1.1 用于试验的样品宜按照防止内毒素水平改变的方式采集和贮存。

9.3.1.2 常规细菌内毒素试验应采用确认时所用的样品制备/浸提方法。产品可经冲洗或浸泡来制备试验冲洗液或浸提液,所用的浸提方法视产品标示无热原的情况而定。

注:长期以来,细菌内毒素试验无公认的浸提方法。但已建立了带有一个确保患者安全的安全因子的内毒素限值(参见附录 A.8)。

9.3.2 医疗器械

9.3.2.1 通常将各器械集中在一起浸提进行常规内毒素试验。当试验测定单位器械内毒素水平或器械间变异性时,需分别对器械进行试验。参见附录 B 或相关法规中适宜取样数量的准则。

9.3.2.2 为了保证患者致热阈值的安全性,通常一个批次的内毒素限值是指最多 10 个器械汇集在一起的测得值。如果是对一个器械单元进行检验,可对该产品内毒素限值进行评价。B.8.1.1 中给出了附加信息。

9.3.2.3 通常将器械浸入到 LRW 中进行样品浸提,可使用除热原器具将器械分割或拆解后浸提。最短浸提时间在 37 °C~40 °C 温度下为 15 min,或在受控室温(一般为 18 °C~25 °C)下不少于 1 h,或其他证实过的同等条件。建议在浸提过程辅以搅动。

9.3.2.4 对标示“无热原的液路”的器械,将已加热至 37 °C±1 °C 的内毒素检查用水注入液路,使浸提液与液路接触,在受控室温(一般为 18 °C~25 °C)下不少于 1 h,或其他同等的条件。适宜时,将每一样品的浸提液混合获得汇集的样品试验液。

9.3.2.5 用于浸提器械的 LRW 的体积可视器械的大小情况而定。按 8.1 计算试验内毒素限值、或可用于汇集后浸提液的最大量。为了克服干扰,样品浸提液可进一步稀释至不超过计算出的 MVD 的水平,见 8.2。

9.3.3 液体/生物制品

9.3.3.1 只要产品鉴定表明不稀释状态下无干扰,液体医疗器械或液态生物学组分可不浸提而直接试验。为了克服干扰可能需要稀释,前提是不超过 MVD。

注:必要时,宜将粉末溶解、复原或浸提进行试验。

9.4 常规检验和监视

9.4.1 凝胶限度试验

按表 3 所列制备试验溶液。样品溶液和产品阳性对照宜用稀释不超过 MVD 的方式制备。

表 3 凝胶限值试验溶液的制备

| 溶液 | 稀释剂 | 内毒素加入量 | 平行管数 |
|-------------|------|--------|------|
| 样品溶液 | 样品溶液 | 无 | 2 |
| 产品阳性对照(PPC) | 样品溶液 | 2λ | 2 |
| 阳性对照 | LRW | 2λ | 2 |
| 阴性对照 | LRW | 无 | 2 |

9.4.2 凝胶测定(凝胶半定量试验)

按表 4 所列制备溶液。样品溶液的稀释系列用于将一种含内毒素的样品稀释至有利于确认的终点,没必要检验全部系列稀释液,除非样品原液出现阳性结果。只要测定试验终点,就没必要检验全部

系列稀释液。可能需要通过附加稀释对样品中的内毒素进行定量。

表 4 凝胶测定溶液的制备

| 试验液 | 稀释剂 | 内毒素加入量 | 稀释倍数 | 内毒素浓度 | 最少试管数 |
|--|------|-----------------------------------|----------------|-------|-------|
| 样品溶液 | 样品溶液 | 无 ^a | 1 | — | 2 |
| | LRW | | 2 ^a | — | 2 |
| | LRW | | 4 ^a | — | 2 |
| | LRW | | 8 ^a | — | 2 |
| 产品阳性对照 (PPC) | 样品溶液 | 2λ | 1 | 2λ | 2 |
| 标准对照系列 | LRW | 制备 2λ 溶液, 然后用最初的 2λ 制备液进行 2 倍系列稀释 | 1 | 2λ | 2 |
| | LRW | | 2 | λ | 2 |
| | LRW | | 4 | 0.5λ | 2 |
| | LRW | | 8 | 0.25λ | 2 |
| 阴性对照 | LRW | 无 | 1 | NA | 2 |
| ^a 仅在样品原液检出内毒素时进行检验, 在这种情况下预先制备 2 倍稀释液。需要时使用附加稀释度。 | | | | | |

9.4.3 显色和浊度技术

常规试验方法见 8.4.3。

9.4.4 试验频次

应按照形成文件的具有规定的抽样频次数和样本大小的抽样方案(见第 6 章)进行细菌内毒素试验。选择的抽样频次应适当, 以保证所有生产批的内毒素水平能符合规定的限值。成品试验频次的确定还可能受到过程和材料的控制程度、关键原材料的检验程序和/或过程监视的影响。对于不是每批进行的检验频次见第 10 章。

9.5 结果解释

9.5.1 一个有效的常规试验需要观察到以下的结果:

- 对于凝胶技术, 标准对照系列认定 λ 在 0.5λ ~ 2λ 范围内。对于显色和浊度技术, 标准曲线 |γ| 值最小为 0.980。
- 阴性对照无反应(全部方法)。对于显色和浊度试验, 阴性对照的平均值小于对照系列中最低标准的平均值。
- 对于凝胶技术, 产品阳性对照被回收(即为阳性结果)。对于显色和浊度技术, 产品阳性对照的回收范围在已知加入内毒素浓度的 50% ~ 200%。

9.5.2 对于凝胶限值试验, 供试品的各参数的有效性符合 9.5.1 并且样品溶液两支试管均为阴性结果时则是可接受的。

如任一样品管中出现阳性结果, 则参见附录 C。

9.5.3 对于凝胶测定, 通过计算各系列平行管终点浓度, 并将各终点的稀释倍数乘以 λ, 确定样品溶液中的内毒素浓度。样品的内毒素浓度为各平行管稀释系列的几何平均终点浓度。必要时, 可用样品溶液的内毒素浓度采用适当的数学因子(即: 样品/浸提液量、产品重量、样品与产品比例等)计算每单位产

品的总内毒素。

如试验采用稀释的样品溶液,用浸提原液乘以稀释倍数计算其内毒素浓度。

如测定的试验样品的内毒素水平小于产品的内毒素限值则是可接受的。

如测定试验样品的内毒素大于产品的限值,则参见附录 C。

9.5.4 显色法和浊度法中,在修正稀释度和浓度后如样品溶液各管的平均内毒素浓度小于产品内毒素限值,则试验制备符合试验。

9.5.5 如内毒素水平超过产品内毒素限值,则参见附录 C。

9.6 变更控制

保持产品鉴定/确认的规定要求见 8.6。

9.7 超限值和失败调查

当某一样品超过该产品内毒素限值时,应进行调查(参见附录 C)。

10 跳批检验

注:跳批检验的具体指南参见附录 B。

10.1 总则

通常采用对最终产品的放行批检验认定产品的无热原。如已经证实生产过程、过程输入(组件和设施)以及生产环境处于良好的控制,并能持续生产出内毒素水平符合规定的限值的产品,则可采用跳批检验。证实宜包括充分的批检验历史数据,生产过程控制和显示可接受内毒素水平的过程输入检验。

当有法规/规章要求对每批检验时,可能不允许采用跳批检验(参见 B.10.1)。

10.2 跳批检验的确定准则

10.2.1 过程风险管理计划和分析应识别内毒素污染的关键工序或控制点(见 10.3.1)。

注:宜意识到,采用跳批检验可能会导致生产过程中的非人为性改变的检出能力的降低,这种改变有可能导致产品的内毒素水平超限值。因此,在采用跳批检验前应对其降低检出非人为性改变的能力的相关风险进行评价。

10.2.2 跳批检验应由相应的生产运行设计(见 10.3.2)、鉴定/确认(见 10.3.1)和控制(见 10.3.3 和 10.4),以及必要时定期评审和鉴定(见 10.5)予以支持。

10.2.3 如采用跳批检验,应对进行跳批检验的理由形成文件,并应规定抽样方案,包含发生失败的抽样方案,以及必须返回到跳批检验或降低抽样方案的要求。

10.2.4 跳批检验可能包括多项选择,包括减少试验样品数量、减少试验频次或从系列产品中选择有代表性的产品或从成品中选择有代表性的部分。跳批检验举例参见附录 B.10,给出了跳批检验的失败模型及效应分析(FMEA)方法参见 A.11。

10.3 生产运行鉴定

注:生产运行评定方面的指南参见 B.10。

10.3.1 质量策划/确认

生产过程的质量策划应形成文件,并按 4.1 规定保留确认记录。某一确保无热原的产品的生产过

程的质量策划应至少包括下列要素：

- a) 过程风险评定。一份生产过程形成文件的分析,包括由风险评定方法工具(如 FMEA,危害分析和关键控制点,故障树分析等)识别出的关键过程要素。
- b) 过程鉴定/确认。一份适宜设计的安装鉴定、运行鉴定、性能鉴定的执行资质和/或相应的过程确认。

注：对一个已经生产和上市的产品所积累的已有生产、检验、控制和其他信息的全面评审和评定,可用于满足过程鉴定的某些要素。

- c) 人员培训。生产人员应按程序进行培训,以使生产过程引入细菌内毒素为最小。

10.3.2 设计

生产运行应被设计成将产品上的内毒素减低到最低。生产运行应使用已确立的运行规范充分表征。过程应在控制状态下运行,并对可能会导致内毒素污染的变化进行评定。生产运行应得到评价,识别有潜在内毒素污染的关键过程工序或控制点。在生产运行鉴定中宜包含这些关键过程工序。

10.3.3 控制

10.3.3.1 生产运行控制可能需要鉴定/确认,可能需要在关键控制点设置实时监视系统,以确保运行在受控状态下持续生产出无热原的产品。

10.3.3.2 应识别关键过程工序或控制点。

应为每个规定控制点：

- a) 规定抽样方案；
- b) 规定控制限值；和
- c) 规定超限时所采取的措施。

10.3.3.3 如选用跳批检验,应评价超限值结果对未检批或最终产品的影响。

10.4 改变的控制

程序改变或偏离应得到评定,以确定对产品的内毒素水平和/或生产运行鉴定的影响。改变可包括改变产品设计、过程偏离、原材料改变、水供应源改变等。应对必要的鉴定程度进行测定。评定结果,包括决策的理由应形成文件。

注：根据改变的大小考虑运行鉴定的程度。

10.5 风险确定的保持

应在确定评定风险的持续有效性基础上定期对生产行动风险评定进行评审和评价。当运行改变可能影响最终产品内毒素水平时,还应对风险评定进行再评审和再评价,相应地也应进行再鉴定。

附录 A

(资料性附录)

细菌内毒素试验的背景信息

A.1 兔热原试验在二战前被提出用于防止致热性物资进入医疗系统。鲎试剂试验在 1971 年被提出作为兔热原试验的替代方法。胃肠外药品行业和美国食品药品监督管理局均同意 1987 年提出的指南,用鲎试剂内毒素试验替代热原试验,因为该体外试验具有较高的灵敏性、特异性、准确性和经济性。在美国,1993 年,随着一次对 BET 的修订和产品内毒素限值的提出,鲎试剂试验成为大部分胃肠外产品的官方替代方法。该 BET 的修订版包括了美国药典(USP)650 多种产品的内毒素限值。虽然 BET 和鲎试剂法都被广泛用作这些方法的缩略词,但现在 BET 是更适合的该试验的缩略词。

A.2 在新试验被接受之前,首先要澄清其等同性、安全性、内毒素允许限值和管理控制。由于鲎试剂用作人体诊断试验和兔热原试验的替代试验,FDA 的生物制品局(现在的生物学评价和研究中心)被授权将鲎试剂作为体外生物制品进行管理。鲎试剂首次上市在 1977 年,但仅限用于胃肠外产品过程检验。在卫生行业生产商协会(HIMA)的支持下,由多家医疗器械生产商和 FDA 的实验室开展了一项合作性研究,建立了 0.1 ng/mL 作为器械浸提液的产品内毒素限值,并得到了 FDA 的认可。HIMA 的一项研究进一步验证了 Difco 内毒素(E.coli 055-B.5)的兔极限致热性剂量约为 1 ng/kg。

A.3 由于缺乏统一的标准品,无法进行实验室间的内毒素数据比对。直到美国药典和 FDA 合作生产出了内毒素国家标准品(RSE)从 E.coli 0113 提取并纯化的 LPS 后,才解除不能进行实验室间比对的问题。鲎试剂生产商和生物制品局的一项合作研究确立了该 RSE 的生物活性,以内毒素单位(EU)为单位。现在实验室可以用标准化的方法并以生物活性为单位测定内毒素含量。1996 年,国际参照标准品生效,成为唯一的全球性内毒素标准品。

A.4 由于内毒素广泛存在于自然界中,有必要对医疗产品提出一个代表安全水平的内毒素允许限值。产品内毒素限值首次出现在“FDA 关于鲎变形细胞试验用作人用和兽用胃肠外药品、生物制品和医疗器械成品的内毒素试验确认指南”的附录 E 中,该指南根据 K/M 公式规定了产品内毒素限值,其中, K 是指内毒素允许限值, M 是每千克体重每小时的成人剂量,人平均体重指定为 70 kg¹⁾。人体研究支持 5 EU/kg 的剂量为适宜的允许限值, K/M 公式中的 M 说明产品内毒素反应与剂量相关。对于大输液(LVP)和器械浸提液,10 mL/kg 的兔热原试验剂量(这通常已超出了人用剂量)被用于计算产品内毒素限值。一份大输液内毒素含量应不超过 0.5 EU/mL[(5 EU/kg)/(10 mL/kg)=0.5 EU/mL],用于向鞘内注射或输注的产品内毒素限值有一更低一些的限值,因为鞘内接触比血管内接触更易致热。

A.5 非内毒素热原是制药行业主要关注的问题。1979 年,一家大输液制剂生产商报道了其采用鲎试剂替代热原试验的策略。这项研究论述了对静脉输液和医疗产品开展的 143 196 项鲎试验和 28 410 项兔试验结果,以下是被认定的数据:

- a) 液体和器械中的所有的热原均为内毒素;
- b) 未出现不可解释的假阴性鲎试剂结果;
- c) 由于鲎试剂的高灵敏性,用鲎试剂检出的大部分内毒素热原用兔法未检出;和
- d) 兔试验经常给出可疑结果,而在鲎试验中是可重复的。

A.6 该项研究的影响力巨大。出于对兔试验相对不灵敏性和不可靠性的考虑,FDA 批准了鲎试剂分析法。鲎试剂被证明具有高特异性;唯一的非特异性激活剂,即 1→3-β-D-葡聚糖已经被认为是一种鲎试剂-反应材料。

1) 《中华人民共和国药典》规定人均体重按 60 kg 计算。

A.7 除了 ASTM ST 72 外,美国还有两个主要用于鲎试剂检验的文件:USP BET 试验和 FDA 的鲎试剂试验指南,后者是由动力学试验临时指南(1991)修改而来。由于 FDA 试验指南介绍了全部的鲎试剂试验方法,因而被更多地引用。USP<161>中含有一个题为“输血和输液器具及其类似医疗器械”章节,规定了浸提程序。FDA 除了实施上述指南外,还在优良生产(质量管理体系)法规的实施程序中要求用 BET 确认其除热原循环,并对水、原材料和过程样品进行筛选。

A.8 药品溶液细菌内毒素试验通常要求与鲎试剂等比混合和试验样品的有效稀释倍数。一个(全身)剂量的药物成分的典型产品内毒素限值(全身剂量)通常为 350 EU,通过内毒素对照液的回收率来确保试验的有效性。

与药品不同,医疗器械必须先将内毒素浸提或冲洗下来,然后再将浸提液/冲洗液与鲎试剂混合。FDA 的研究人员进行的研究已证实,从加入内毒素的器械材料的浸提不能达到完全回收。考虑到浸提的潜在不充分性,因此提出了更严格的每件器械 20 EU 的产品内毒素限值。如采用这一假定,就不再要求对每一医疗器械的有效性检验。但是,药品溶液仍然应采用加入内毒素的对照来证实测定方法的有效性。

A.9 1995 年,一种新的全血热原试验在人体发热反应的基础上被开发。该全血试验不仅限于检验革兰氏阴性菌内毒素,还可以检测出来自于革兰氏阳性菌细胞壁和真菌的致热性成分。人全血用于进行热原试验的原理是,单核细胞对热诱导细胞因子(如白细胞介素-1)的形成所引起热原的反应。在 37 °C 孵育后,用 ELISA 法评价白细胞介素-1 的释放量,以此测量致热活性。欧洲药典中已为全血热原试验开发并实施了单核细胞激活试验(MAT)。

A.10 2004 年,美国医疗仪器促进协会(AAMI)成立工作组研究在标准中加入内毒素回收率的可行性。研究共分 4 个步骤:第一步是收集过去用于建立该方法学的历史信息或数据。第二步是对大量的已发表的关于医疗器械的回收率研究进行评审。第三步包括了有关内毒素低回收率带给医疗器械内毒素检测相关问题的法规文件的研究。第四步是向能为回收实验做出贡献的 AAMI 成员索取未出版数据,以进一步支持这一决策。最终,该工作组发现,FDA 和 USP 确立的内毒素限值具有一个建立在小于 100%回收率基础上的适宜的安全因子。研究表明,用高水平内毒素进行的回收率实验不能代表器械中自然形成的内毒素水平;临床上没有因浸提方法不完全造成伤害的历史证据,USP 和 FDA 中列出的内毒素方法将能确保医疗器械的无致热性。该工作组的结论是不建议在标准中对内毒素检验的浸提效率进行确认。

A.11 “Using FMEA to develop alternatives to batch testing”(2004)一文中推荐了风险分析的方法。该方法能让医疗器械生产商对医疗器械制造过程中使用或不使用潜在受污染的工艺用水所面临的细菌内毒素风险进行了成功的分析。FMEA 不是一个零风险系统,但设计用于将潜在危害的风险降低到最低水平。FMEA 为开发跳批检验提供了支持性文件。

A.12 发达国家的药典包含有细菌内毒素试验章节并附有要求。USP<85>的相关部分已经与欧洲药典和日本药典相协调。

附录 B

(资料性附录)

试验方法、常规监视和跳批试验指南

注 1: 本附录中给出了所规定要求的实施指南。但给出的指南并不详尽,只是有侧重地给出了应注意的方面。

注 2: 本附录不是评定符合要求的核查清单。

B.1 范围

无。

B.2 规范性引用文件

无。

B.3 术语和定义

无。

B.4 质量管理体系要素

为从 BET 中获取可靠和可重现的数据,重要的是试验应在受控条件下进行。试验所用的实验室无论是在医疗器械生产商的地点还是在异地,宜按照文件化的质量管理体系和批准的实验室方法进行管理和操作。

细菌内毒素试验如在医疗器械生产商直接管理下的实验室内进行,试验操作应纳入生产商的质量管理体系。如使用外部实验室,建议使用经过适宜的国家标准(如 GB/T 27025)认证的实验室。

任何实验室均宜承诺提供质量服务,并且这一承诺宜在其质量方针中形成文件。实验室组织内部的权限和职责范围宜正式建立并形成文件,应由熟知质量管理体系的人员负责建立实验室质量管理体系,并有充分的权限来确保体系的运行。

对实验室运行宜定期进行内部审核,审核的结果宜形成文件并由实验室管理层评审。

质量管理方面的进一步信息见 GB/T 19001,GB/T 27025 规定了实验室质量管理体系要求。对医疗器械生产质量管理体系的特殊要求见 YY 0287。

B.4.1 文件形成

B.4.1.1 无。

B.4.1.2 无。

B.4.1.3 无。

B.4.1.4 无。

B.4.2 管理职责

B.4.2.1 无。

B.4.2.2 无。

B.4.3 产品实现

B.4.3.1 无。

B.4.4 人员

B.4.4.1 无。

B.4.4.2 尽管细菌内毒素试验不需要在洁净间或 HEPA 过滤环境中进行(除非由于样品原因要保护检验人员,如在检验人血制品时),但重要的是检验人员要采用无菌操作以防止样品污染。对进行细菌内毒素试验的全部检验人员进行必要的培训宜形成文件。

B.4.4.3 无。

B.4.5 设备

B.4.5.1 细菌内毒素试验中所有测量和保持温度的设备的性能期望得到适宜的校准、鉴定并形成文件。用于贮存试剂的电冰箱和冷冻箱宜得到校准并定期维护。

B.4.5.2 用于试验器具除热原箱的时间和温度要求宜按常规方法予以确认。

B.4.6 试剂和材料

B.4.6.1 无。

B.4.6.2 无。

B.4.6.3 无。

B.4.6.4 无。

B.4.7 测量、分析和改进

无。

B.5 无热原标签

B.5.1 无。

B.5.2 无。

B.5.3 无。

B.5.4 无。

B.5.5 使用“无热原”术语意味着包装内的所有组分都已进行了内毒素评价。

标有“无热原”标签的器械套装内与循环、淋巴或脑脊液系统直接接触的所有组件都应进行内毒素评价。其他接触方式的组件,如包装、纱布、无菌手术单等可不进行内毒素评价。然而,宜对不检验这些组件的理由形成文件。否则,宜考虑这些组件不宜声称为“无热原”的。

B.5.6 无。

B.6 产品单位的选择

B.6.1 无。

B.6.2 根据 FDA1987 年的医疗器械成品检验指南,推荐根据以下检验批量的大小确定样品数量。样

品量参见表 B.1。

表 B.1 样品量选择

| 批量大小 | 样品量 |
|--------|----------------|
| <30 | 2 |
| 30~100 | 3 |
| ≥101 | 批量的 3%, 最多 10% |

USP<161>“输血、输液器具和类似医疗器械”选择不少于 3 套并不多于 10 套器械。

B.6.3 可在评价产品、过程、组件和材料的基础上建立 BET 的系列产品。对于系列产品的常规检验，从系列产品中选择一种产品是可以被接受的。内毒素相关的系列产品的确定准则不一定适合于识别其他目的(如灭菌的等同性或生物负载评定)的系列产品的确定准则。内毒素相关的系列产品可以适合于亦可以不适合于其他系列产品的分类。但生产商宜根据产品组成、生产过程和预期用途，对产品分类进行评价、分析并形成文件。

在确定内毒素检验抽样组 and 选择样本中，可考虑下列因素：

- 原材料或组件；
- 一个班次或规定周期(如 24 h)的产量；
- 特定设备生产的产品；
- 系列产品的组成；
- 其他合理的划分方法。

对于 BET 的鉴定/确认(见 8.4)，生产商可按照一般组成(化学配方)将器械合理划分为多个产品组，然后从每一组中确认有代表性的产品。理想地，从每组选择的产品宜是：

- 直接或间接(如液路)接触患者的表面积为最大的器械，能呈现出最大可浸提液；和/或
- 可能具有最大抑制作用(如 pH、二价离子)或增强作用(如葡聚糖)的化学配方。

B.6.4 无指南。

B.6.5 当用灭菌前样品进行 BET 鉴定时，建议包括灭菌前产品和灭菌后产品以证实等同性。这就需要在必要时对灭过菌的批中再次进行抽样。

等同性确认宜至少包括下列已定义的准则：

- a) 待评价产品的批量；
- b) 样品浸提的时间点和说明从生产到灭菌期间内毒素变化的检验；和
- c) 证实等同性的可接受性准则。

B.6.6 多组件器械

B.6.6.1 成套器械

成套器械被定义为在一个初包装内多组件的集合。成套器械在使用地点装配成医疗产品。在这种情况下规定的内毒素限值是针对组装后器械的，而非各组件的内毒素限值(参见表 B.2)。当检验一个成套器械的分组件时，可以使用混合的浸提液，前提是要保留各成套器械浸提液的比例。比如，某一器械可能有 3 个组件，各组件所用的浸提液总体积应不超过稀释到 MVD 所需的体积。这可以用一份浸提液对所有 3 个组件浸提，也可将 3 个组件各用一部分液体分别浸提然后混合，还可将这两种方法组合起来。当对多个供试器械样品单元试验时，同样也要保持浸提液与器械的比例相同。

当组合后样品出现结果不确定时，就需要分别检验各组件，以研究各组件间的污染源。

B.6.6.2 器械套装

器械套装被定义为在一个初包装内或各种医疗器械过程中多个医疗产品的集合。各器械可以有各自的产品内毒素限值,且宜分别进行试验和评价(参见表 B.2)。

表 B.2 检验产品单元的选择

| 产品单元 | 检验项目 | 基于无热原声称 | 说明 |
|---|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| 初包装中独立的医疗器械 | 独立医疗器械 | 独立医疗器械 | 各医疗器械在临床应用中独立使用 |
| 初包装中成套组件 | 组件的组合 | 组件的组合 | 在临床应用中组件被装配成一套产品并一起使用 |
| 初包装中若干相同的医疗器械 | 取自初包装的单一医疗器械 | 取自初包装的单一医疗器械 | 在临床应用中各医疗器械独立使用 |
| 医疗过程相关的含多器械套装 | 声称无致热性的每种医疗器械,或所有项目在一起 ^a | 声称无致热性的每种医疗器械,或所有项目在一起 ^a | 在临床应用中每种医疗器械独立使用,可有不同的产品内毒素限值 |
| ^a 对于医疗过程相关的含多器械套装,可有两种选择。第一种选择是生产大量的将多样产品组合在一起的器械套装的公司常选用的方式,各器械与卖方提供的无热原认证一起包装到二次包装内,也可由随后的检验在二次包装内提供无热原认证。第二种选择是适合于包内的组件数量少和/或形成小数量的包,包内的所有项目可一起试验来提供一个单独的无热原声称。 | | | |

B.7 技术的选择

B.7.1 试验技术

B.7.1.1 凝胶技术——限值试验和分析方法

凝胶法无论是在所需进行确认分析的技术技能方面,还是在数据解释/分析方面,都是最简便 BET 技术。设备投资很小,仅需一台维护良好和性能合格的水浴箱或加热器(heating block)及附件。在凝胶试验中,将试验样品稀释至确认过的浓度,在 10 mm×75 mm 玻璃试管内与鲎试剂等体积混合。孵育后将各试管从孵育器中小心地取出,缓慢倒转 180°。倒转后凝胶坚实并保持完整者为阳性试验,不能保持完整者为阴性试验。

B.7.1.2 显色和浊度技术——终点方法

显色和浊度技术——终点法的原理是基于内毒素浓度和产色(显色)或浊度之间的线性关系,显色或浊度是通过给定波长(在相对小的标准系列稀释液范围内被评价)下测量光密度来测量。通过测定用 LRW 制备的内毒素标准系列稀释液的光密度,绘制出内毒素浓度标准曲线。进行线性回归分析,形成的“最适宜”的标准曲线覆盖约 1 个 lg 内毒素范围,一般为 1.0 EU/mL~0.1 EU/mL 或 0.1 EU/mL~0.01 EU/mL。相关系数 $|r|$ 是所观察的各点相对离开回归线的统计学测量,线性被定义为相关系数的绝对值 ≥ 0.980 。通过测定样品的光密度并插入标准曲线,计算出未知的内毒素水平。终点法一般使用酶标板,还需要一台加热器和一台经鉴定的酶标仪,酶标仪配有建立标准曲线和样品分析的统计学软件

包(线性回归分析)。显色和浊度方法与凝胶试验相比要更多地依赖于良好的分析技术,在分析和解释数据时要应用统计学知识。

B.7.1.3 显色和浊度技术——动力学方法

显色和浊度技术——动力学方法测定系列标准稀释液到达预先确定的光密度程度(动力学浊度)或显色程度(动力学显色)所耗用的时间量,有时称为启动 OD 或反应 OD。通过绘制启动或反应时间(即每一标准或样品达到启动 OD 所耗用的时间)的 lg 值与内毒素浓度的 lg 值有函数关系,建立标准曲线。该数据经 lg/lg 处理后建立了一条线性标准曲线。为动力学分析所建的曲线范围可高达 4 个 lg,而终点分析的所建曲线范围只有 1 个 lg,除非使用其他经批准回归分析方法(目前 FDA 授权的都是基于一家生产商的试剂),用横跨各观察点的线性回归分析来建立标准曲线,动力学方法最小线性要求为相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。与终点方法一样,可将样品的反应时间的对数值插入标准曲线来计算出未知的细菌内毒素含量。动力学方法可使用酶标板、玻璃管或其他确认过的技术。这些方法都需经确认的读取结果的设备并配备建立标准曲线和样品分析的统计学软件包(回归分析)。在这些方法专用电子表格或数据基础软件包的使用,可极大地便利数据的即时分析和走势分析。与终点方法一样,证实一个好的、恒定的实验室技术主要取决于分析人员,在分析和解释数据时还要用到基础统计学知识。

B.7.2 无

B.8 方法学确认

B.8.1 试验内毒素限值鉴定

B.8.1.1 USP<161>和 FDA 鲎试剂指南(1987)中规定的产品内毒素限值的解释,受样品浸提情况而定:混合或单一单元检验。

——USP<161>中规定的医疗器械的内毒素限值:

对于医疗器械而言,每件器械内毒素限值不超过 20.0EU。然而,与脑脊液接触器械的内毒素限值为每件器械不超过 2.15 EU。

——FDA 指南(1987)中规定的医疗器械的内毒素限值:

器械内毒素限值为 0.5 EU/mL,与脑脊液接触器械的内毒素限值为 0.06 EU/mL。

这些限值是建立在每件器械 40 mL 冲洗液的基础之上。对于与病人接触表面积特别小或大型器械,可使用一个调节因子来选择冲洗或浸提体积。内毒素限值可相应调整。

注: FDA 指南(1987)将会被其他 FDA 指南文件取代。

所有 BET 指南都允许将冲洗液/浸提液混合进行检验。混合的方法可将所有器械在一种常用浸提介质内一起浸提,也可将各器械分别浸提后全部或部分混合。内毒素限值按每毫升浸提液限值表示(按 USP<161>中公式计算),当供试物混合时,其值不变。

B.8.1.2 表 B.3 中给出了计算试验内毒素限值的工作示例。

表 B.3 试验内毒素限值的计算

| 术语 | 值 | 说明 |
|------|-------|-----------------------|
| 步骤 1 | | |
| K | 20 EU | 每件器械允许的内毒素的量(产品内毒素限值) |
| N | 10 | 供试器械样品的数量 |

表 B.3 (续)

| 术语 | 值 | 说明 |
|---------|-----------|--|
| V | 400 | 样本混合冲洗液的总量(mL) |
| 步骤 2 | | |
| 试验内毒素限值 | 0.5 EU/mL | 用式(1)计算总内毒素限值 $\text{试验内毒素限值} = \frac{KN}{V}$ $\text{试验内毒素限值} = \frac{(20 \text{ EU}) \times (10)}{400 \text{ mL}} = 0.5 \text{ EU/mL}$ |

B.8.2 最大有效稀释倍数(MVD)

B.8.2.1 表 B.4 中给出了计算 MVD 的工作示例。

表 B.4 最大有效稀释倍数的计算

| 术语 | 值 | 说明 |
|--------------|-------------|--|
| 步骤 1 | | |
| 试验内毒素限值 | 0.5 EU/mL | 用式(1)计算出的 |
| λ | 0.125 EU/mL | 认定过的鲎试剂标示的灵敏度或用于建立对照标准曲线的最低内毒素浓度(显色和浊度) |
| 步骤 2 | | |
| 最大有效稀释度(MVD) | 4 | 用式(2)计算 MVD $\text{MVD} = \frac{\text{试验内毒素限量}}{\lambda} = \frac{0.5}{\lambda} = 4$ MVD 的值表示在所使用鲎试剂灵敏度的前提下,可用于消除抑制的稀释倍数。例如,MVD 为 4 意味着可使用 4 倍稀释 |

B.8.2.2 无。

B.8.2.3 无。

B.8.3 试剂和分析人员认定

B.8.3.1 预试验(标示值的认定/线性的证实)

表 B.5 给出了计算几何平均的工作示例。

表 B.5 几何平均的计算 工作示例

| 术语 | 值 | 说明 |
|----------------------|-------------|--|
| 步骤 1 | | |
| Σe | -3 | 各系列终点 lg 值之和 系列 1 终点=0.125,lg0.125=-0.903 1 系列 2 终点=0.25,lg0.25=-0.602 1 系列 3 终点=0.25,lg0.25=-0.602 1 系列 4 终点=0.125,lg0.125=-0.903 1 (-0.903 1)+(-0.602 1)+(-0.602 1)+(-0.903 1)=-3.010 |
| F | 4 | 稀释的平行数量 |
| 步骤 2 | | |
| 几何均数 | 0.177 EU/mL | 用式(3)计算几何均数 几何均数 = $\text{antilg} \frac{\Sigma e}{F}$ 几何均数 = $\text{antilg} \frac{-3.010}{4} = 0.176 7$ |
| 步骤 3 | | |
| λ (鲎试剂标示灵敏度) | 0.125 EU/mL | 标示的鲎试剂灵敏度(λ)的认定 终点浓度的几何均数=0.177 EU/mL 标示的鲎试剂灵敏度(λ)=0.125 EU/mL 由于几何均数在±1 个对倍稀释(即 $0.5\lambda \sim 2\lambda$) 范围内(0.06 EU/mL~0.25 EU/mL),标示灵敏度(λ)被认定 |

B.8.3.2 CSE 标准化

CSE 的适宜范围为 2 EU/ng~50 EU/ng。

可从 CSE 供应商处获取到用 RSE 标定的标准化的分析证书。

B.8.3.3 分析人员认定

参见 B.4.4。

B.8.4 产品鉴定/确认

B.8.4.1 总则

无。

B.8.4.2 凝胶技术

B.8.4.2.1 无。

B.8.4.2.2 无。

B.8.4.3 显色和浊度技术**B.8.4.3.1** 无。**B.8.4.3.2** 无。**B.8.4.3.3** 无。**B.8.5 样品干扰**

样品处理的方法可包括稀释、加入试剂、加热变性等。如超出了 MVD, 使用超滤浓缩样本浸提液使之恢复可能是可行的, 前提是其方法学要被确认。在确认数据/报告中应规定所有的样品处理方法, 在常规检验中宜保持相同的操作过程。

选用不同鲎试剂厂商、不同鲎试剂灵敏度和不同 BET 技术可能会消除干扰。

可使用无热原的三羟甲基氨基甲烷(tris hydroxymethyl aminomethane, TRIS)缓冲液稀释样品, 或加入无热原 NaOH 或 HCl 溶液来中和样品浸提液的 pH。

样品在阳离子缓冲液($MgSO_4$ 或 $MgCl_2$)稀释可用以调节离子浓度。

注: 肝素是可引起离子干扰的物质的例子。

对于鲎试剂反应性材料(LAL-RM), 宜检验样品的增强作用。例如, 对于可疑是或已知是 LAL-RM 的样品, 宜使用有和无内毒素特异性的缓冲液进行试验, 以确定该 LAL-RM 是否影响检验。

注: 一些可能的 LAL-RM 来源包括: 酵母、霉菌的细胞壁和纤维素类材料。

当任何可能影响试验结果的试验条件发生改变时, 宜重复进行干扰因子试验。

稀释液也可能引起干扰(如盐溶液可能产生抑制性反应)。如使用的稀释液不是 LRW, 宜通过产品对稀释液进行鉴定/确认。

B.8.6 鉴定/确认的维持**B.8.6.1** 无。**B.8.6.2** 无。**B.9 技术的使用****B.9.1 关键试验参数****B.9.1.1 温度**

无。

B.9.1.2 时间

计时器宜得到适当的校准和鉴定。这包括与自动试验系统相关的软件。

B.9.1.3 pH

尽管所有鲎试剂都能有效地检测内毒素, 但各自的配方都受专利保护的, 其缓冲能力和二价阳离子水平都不尽相同。由于试剂的缓冲作用各异, 因此分析中宜采用适宜的 pH 试验系统对相同配比的鲎试剂与试验溶液混合液测量其 pH 值。

注: 通常情况下, 鲎试剂与试验溶液的配比为等体积配比。

B.9.2 设备和试剂

B.9.2.1 一般来说,定量测定中所使用的酶标板并非是只为内毒素检验而生产的,各孔(“热孔”)可能有随机性内毒素污染。因此,应抽取足够多的酶标板以证实其适用于内毒素检验。

B.9.2.2 无。

B.9.2.3 无。

B.9.2.4 鲎试剂试剂厂商提供的浓缩 CSE 制剂可依据产品说明书储存。但是,用 LRW 稀释后的内毒素储备液宜对其储存时间和温度、储存容器、所要储存特定内毒素稀释液以及被贮存的稀释液的体积等方面进行确认。

B.9.3 样品制备

B.9.3.1 总则

B.9.3.1.1 无。

B.9.3.1.2 无。

B.9.3.2 医疗器械

B.9.3.2.1 无。

B.9.3.2.2 无。

B.9.3.2.3 如果样品浸提过程和试验之间有一定的推后,溶液在试验前宜进行搅动。

B.9.3.2.4 无。

B.9.3.2.5 无。

B.9.3.3 液体/生物制品

B.9.3.3.1 无。

B.9.4 常规试验和监视

B.9.4.1 凝胶限值试验

无。

B.9.4.2 凝胶分析

无。

B.9.4.3 显色和浊度技术

无。

B.9.4.4 试验频次

无。

B.9.5 结果的解释

B.9.5.1 无。

B.9.5.2 无。

B.9.5.3 无。

B.9.5.4 无。

B.9.5.5 无。

B.9.6 变更控制

无。

B.9.7 超限值结果和失败调查

无。参见附录 C。

B.10 跳批检验

B.10.1 总则

跳批试验需要进行风险评定并有相应的数据证实生产过程能始终生产持续符合规定的内毒素限值的产品,数据可包括规定数量的批的检验、规定时间段的检验、代表性主产品的检验、原材料/组件和/或过程检验,生产运行控制尤其是水处理的验证等。图 B.1 列出了跳批试验的风险和其适宜性的关键问题。

特定法规可能要求跳批检验的产品有:

- a) 用于输液(血)的产品;
- b) 用于冲洗创面或组织的产品;
- c) 含有生物源材料/组件的产品;
- d) 含非注射用水或吸入剂的产品。

B.10.2 跳批检验的确定准则

B.10.2.1 低风险组件可能包括下列要素:

- a) 使产品中内毒素为最小的过程设计,包括:
 - 1) 加热(250 °C~300 °C加热 30 min~2 h);
 - 2) 酸性水解;
 - 3) 氧化;
 - 4) 蒸馏、超滤、反渗透;
 - 5) 其他减少内毒素的过程。
- b) 生产设备进行了充分的设计,并进行过安装鉴定、运行鉴定和性能鉴定和维护。
- c) 生产过程进行了充分的设计和鉴定。
- d) 加工过程中与内毒素风险的形成文件的评定。
- e) 设计成全过程中内毒素聚集为最小的生产程序。
- f) 适宜的人员培训。

B.10.2.2 无。

B.10.2.3 无。

B.10.2.4 跳批检验可包括下列一项或多项情况:

- a) 减少样品数量(如从每批 10 件样品减至每批 3 件样品);
- b) 减少检验频次(如从每批抽样减至每 n 批,或从每批减至每班次或每天);

- c) 在产品分组(参见 B.6.3)基础上规定的产品组合;
- d) 原材料检验(如检验关键组件或清洗用水);和
- e) 其他合理选项。

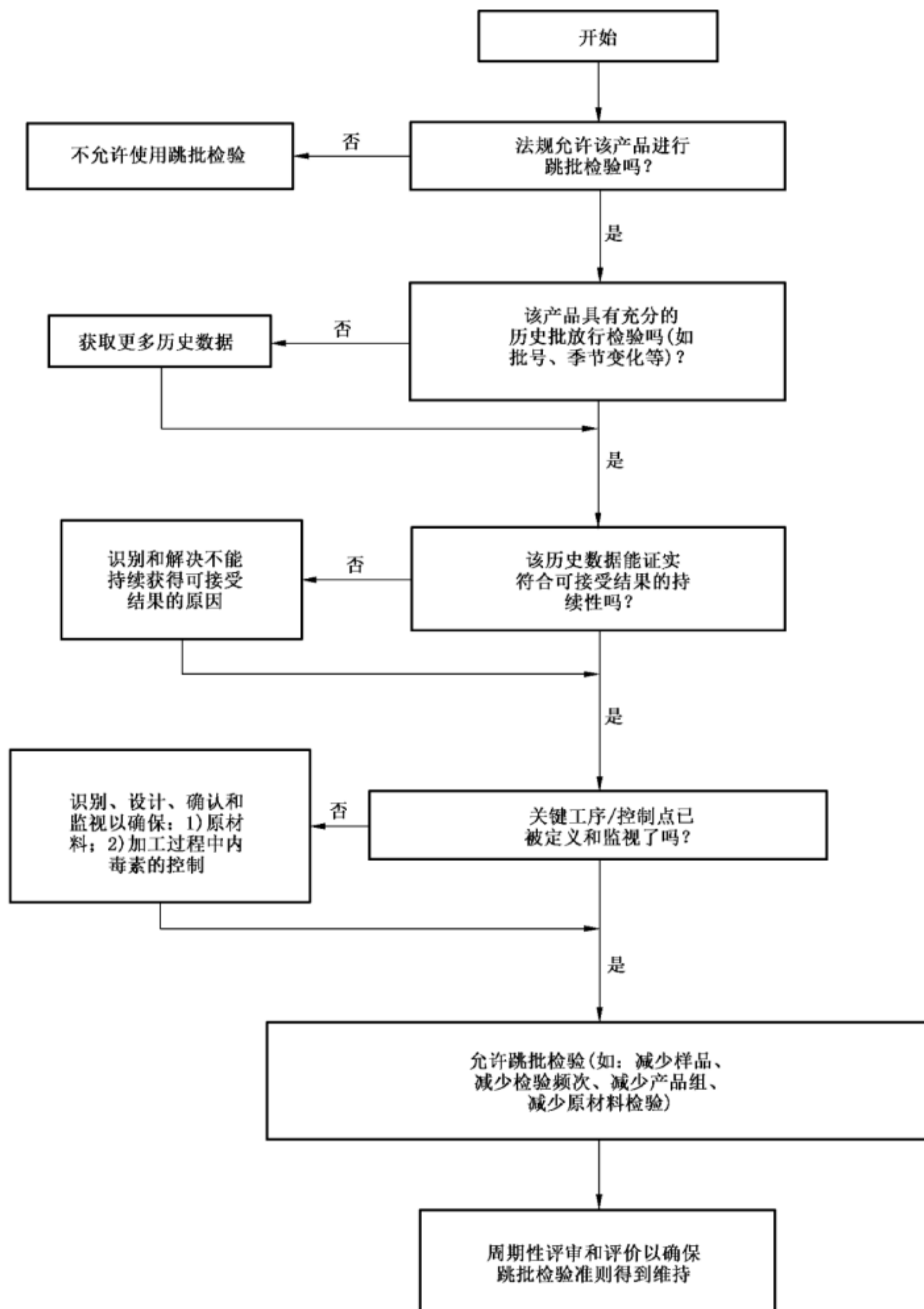


图 B.1 评价内毒素跳批检验适宜性和相关风险的关键问题

B.10.3 生产运行鉴定

B.10.3.1 质量策划/确认

宜对生产运行进行全面的過程风险评定以识别关键过程工序或控制点[如失效模式分析(FMEA)、

危险源(hazard)分析和关键控制点、故障树分析等]。对无热原产品,这包括任何可能影响产品内毒素水平的过程工序的改变,包括以下但不限于:

- a) 购进的原材料;
- b) 挤出运行;
- c) 水洗;
- d) 干燥或固化过程;
- e) 过程中水浸提或浸泡;
- f) 产品、组件的搬运;
- g) 手动与自动装配;和
- h) 产品或材料贮存。

注:支持微生物生长的产品或材料的灭菌前贮存尤其重要。

进行确认的产品宜选择最坏情况下的产品(即:内毒素含量可能最高的产品,以及最有可能产生抑制或增强作用的产品),这可以是接触患者(直接或间接)的表面积为最大或潜在内毒素含量最高(基于最可能产生内毒素的原材料、水处理和/或搬运操作)的产品。

控制内毒素的生产运行的确认宜包括以下所列步骤:

- a) 建立按规定条件生产操作时有能力生产出无热原产品的过程;
- b) 证实过程风险评定中所识别的关键过程要素处于控制中;
- c) 证实生产运行设备在指定参数范围内,设备和仪器能够控制、监视和/或测量内毒素;
- d) 对代表设备规定的运行范围的多个生产批进行检验,以证明产品持续满足非致热性要求;
- e) 通过对生产运行的定期监视(包括定期对产品的检验),维持鉴定/确认,以确保持续生产无热原产品;
- f) 对重新鉴定准则和频次形成文件。

B.10.3.2 设计

生产运行宜设计成使产品内毒素水平降至最低。运行设计宜考虑:

- a) 适宜材料和供应商的选择(包括了解内毒素污染源和潜在内毒素污染活性/风险的认定);
- b) 将可能对产品内毒素水平产生影响的材料和组件降至最少并加以控制(如天然材料或支持微生物生长的材料);
- c) 直接接触产品的工艺用水的控制;和
- d) 可能影响产品内毒素水平的控制过程(如,搬运)。

评价的关键因素可能包括但不限于:

- a) “湿”加工工序,在加工过程中使用水或其他水性材料(如,冲洗、浸泡等);和
- b) 干燥工艺(如热挤塑)或材料的装配(如,包组装机),全过程不可能与水或其他水加工接触。

在高温或受控环境下生产的干态制品一般不存在与湿加工(生产过程中使用水)制品相同的内毒素污染风险。

含有湿性成分的干性医疗产品(如喷雾瓶、含有抗凝剂的血袋)或含药器械宜根据药品取样要求进行试验和评价。

注:在医疗器械加工过程中水是最大的污染源。对加工过程中使用的水源、所有表面的清洁度、设备和贮存的控制是必需的。

B.10.3.3 控制

B.10.3.3.1 需根据不同的生产运行相关的风险,相应地定义鉴定/确认和实时监视程序。例如,对于某

一被认为具有低内毒素污染风险的过程,用跳批检验监视过程的输入和/或最终产品是可以接受的。而对于某一被认为具有高内毒素污染风险的过程,则可能需要用批检验对过程输入和最终产品进行监视。

B.10.3.3.2 宜对生产运行评定中识别出的关键工序或控制点进行监视,以确保最终产品是无热原的。

内毒素生产运行控制可包括:

- a) 供应商质量保证和/或对进厂材料、组件或部件的内毒素检验(如,供方内毒素认证或不接触水的规范要求);
- b) 对工艺用水或其他水处理溶液的监视和控制(如,可通过周期性监视氯残留水平、微生物数、水内毒素水平和/或组件内毒素水平来证实工艺用水的控制);
- c) 在规定的控制点对产品进行过程监视(如,干燥过程的时间、温度等);
- d) 定期维护和清洁设备,尤其是那些用于转运或接触加工材料的含水产品(如紫外线、适当的过滤等);
- e) 对环境和加工材料的抗微生物控制。

B.10.3.3.3 无。

B.10.4 变更的控制

无。

B.10.5 风险确定的保持

无。

附录 C

(资料性附录)

超限值(OOS)和失败调查指南

C.1 总则

超限值失败调查包括从实验室、原材料和/或生产过程方面开展调查。

注：建议在数据评审和评定之前，保留所有试验样品/浸提液。

C.2 实验室调查

C.2.1 考虑项目

实验室调查中需考虑的项目包括：

- a) 原始数据评审和计算方法的验证；
- b) 试验中使用的耗材和试剂(如，滴定管、稀释管、微孔板、水、鲎试剂等)以确定是否引入污染；
- c) 标准曲线参数(如，控制标准品和样品的起始时间、相关系数、Y轴截距和斜率)；
- d) 设备性能(如，滴定管、酶标仪等)；
- e) 输入分析数据用于识别异常情况(如，接触包装材料、胶带的评价等)；
- f) 样品的正确识别和贮存；
- g) 初始样品的验证试验评审。

注：可能包括如下改变：如加入缓冲液、改变鲎试剂配方或样品的处理。

C.2.2 附加的调查试验

C.2.2.1 可进行附加的调查试验来检查在首次细菌内毒素试验中发生外来污染的可能性。宜使用两倍的首次细菌内毒素试验中所用的初始样品浸提液平行管数进行调查试验。例如，在一项试验中首次进行的是一个多平行试验，调查试验就需要两个附加的多平行试验。

C.2.2.2 也可用法规指南允许的其他 BET 来分析样品。改变配方有助于识别干扰因素。

C.2.2.3 可用其他新产品样品进行再试验，以检查在首次样品浸提液制备中引入外来污染的可能性。

C.2.2.4 推荐产品样品的数量比首次试验有所增加。例如，再试验宜至少选用首次试验两倍的样品数量，以证明试验结果的重复性。

C.2.3 实验室调查的结果

C.2.3.1 如果实验室调查表明该试验结果因与产品内毒素无关而无效时，可认为首次使用是“无意义试验”，可重复进行细菌内毒素试验。

C.2.3.2 如果实验室调查表明样品不符合产品内毒素限值，再同时开展一项调查，识别原材料和/或加工过程中的污染源(参见 C.3)。

C.2.3.3 超限值结果调查的结果和结论宜形成文件。

C.2.3.4 当采用跳批检验并且出现一批超出产品内毒素限值时，宜对是否持续使用跳批验进行再评定。

C.3 原材料和生产过程

C.3.1 原材料和生产过程调查中要考虑的项目包括可能导致污染的关键过程步骤或控制点,如:

- a) 所用的原材料或组件;
- b) 挤出运行;
- c) 水洗;
- d) 干燥或固化过程;
- e) 过程中的水沥滤或浸泡;
- f) 产品/组分处理;
- g) 手动与自动装配;和
- h) 产品或材料贮存。

C.3.2 可以用单一产品单元检验来确定批中产品单元间的内毒素的分布情况。

参 考 文 献

- [1] GB/T 14233.2—2005 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
- [2] GB/T 27025—2008 检测和校准实验室能力的通用要求(ISO/IEC 17025:2005, IDT)
- [3] GB/T 19001—2016 质量管理体系 要求(ISO 9001:2015, IDT)
- [4] YY/T 0287—2003 医疗器械 质量管理体系 用于法规的要求(ISO 13485:2003, IDT)
- [5] Food and Drug Administration. Guideline on validation of the Limulus amoebocyte lysate test as an endproduct endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. DHHS, 1987
- [6] FDA. Interim guidance for human and veterinary drug products and biologicals. Kinetic LAL Techniques, 1991
- [7] The United States Pharmacopoeia (USP) <85>, United States Pharmacopoeial Convention (USP), Rockville MD
- [8] The United States Pharmacopoeia (USP) <161>, United States Pharmacopoeial Convention (USP), Rockville MD
- [9] Lee P, Plumlee B, Rymer T, Schwabe R, Hansen J. Using FMEA to develop alternatives to batch testing. MD&DI, 2004
-

中华人民共和国医药
行 业 标 准
医疗器械细菌内毒素试验方法
常规监控与跳批检验

YY/T 0618—2017

*

中国标准出版社出版发行
北京市朝阳区和平里西街甲2号(100029)
北京市西城区三里河北街16号(100045)

网址: www.spc.org.cn

服务热线: 400-168-0010

2017年11月第一版

*

书号: 155066·2-32516

版权专有 侵权必究



YY/T 0618-2017