

xxx 有限公司
xxx 无菌方法验证方案

编制： 日期：

审核： 日期：

批准： 日期：

1、验证目的

确认样品的 xx 样品的抑菌活性，证明所采用的的方法适用于其无菌检查。

2、验证依据

《中国药典》xx 版四部

3、试验所采用的试剂设备

3.1 培养基

0.9%氯化钠溶液 批号： 生产厂家：

胰酪大豆胨液体培养基 批号： 生产厂家：

硫乙醇酸盐流体培养基 批号： 生产厂家：

3.2 菌种

金黄色葡萄球菌[cmcc (B) 26003] 批号： 生产厂家：

大肠埃希菌[cmcc (B) 44102] 批号： 生产厂家：

生孢梭菌[cmcc (B) 64941] 批号： 生产厂家：

枯草芽孢杆菌[cmcc (B) 63501] 批号： 生产厂家：

白色念珠菌[cmcc (F) 98001] 批号： 生产厂家：

黑曲霉[cmcc (F) 98003] 批号： 生产厂家：

3.2 设备

生物安全柜 编号： 型号：

生化培养箱 编号： 型号：

霉菌培养箱 编号： 型号：

4、实验方法

4.1 采用直接接种法进行无菌检查方法验证。

4.2 试验组

取 x 件包装样品以无菌操作方式打开，将样品分别投入能完全浸没样品的硫乙醇酸盐流体培养基 3 管和胰酪大豆胨液体培养基 3 管，其中硫乙醇酸盐流体培养基分别接入不大于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌，胰酪大豆胨液体培养基分别接入不大于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉。其中硫乙醇酸盐流体培养基 30-35℃培养箱培养，胰酪大豆胨液体培养基置 20-25℃培养箱培养，培养时间不得超过 5 天，逐日观察，结果见表一。

4.3 阳性对照组

取硫乙醇酸盐流体培养基分别接入不大于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌，胰酪大豆胨液体培养基分别接入不大于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉。其中接种枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌和生孢梭菌置 30-35℃培养箱培养，枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉置 20-25℃培养箱培养，培养时间不得超过 5 天，逐日观察，结果见表一。

4.4 阴性对照组

不采集样品，不加菌，同试验组方法，即空白硫乙醇酸盐流体培养基和胰酪大豆胨液体培养基。培养 14 天，逐日观察，结果见表二。

4.5 样品组

取样品，同试验组操作，分别加硫乙醇酸盐流体培养基管和胰酪大豆胨液体培养基管中，其中硫乙醇酸盐流体培养基 30-35℃培养箱培养，胰酪大豆胨液体培养基置 20-25℃培养箱培养，培养 14 天，逐日观察，结果见表二。

5、结果

表一 试验组和阳性对照组培养结果

组别	试验菌	培养时间（天）				
		1	2	3	4	5
试验组	金黄色葡萄球菌					
	大肠埃希菌					
	生孢梭菌					
	枯草芽孢杆菌					
	白色念珠菌					
	黑曲霉					
阳性对照组	金黄色葡萄球菌					
	大肠埃希菌					
	生孢梭菌					
	枯草芽孢杆菌					
	白色念珠菌					
	黑曲霉					

表二 样品组和阴性对照组培养结果

组别	培养基	培养结果（天）													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
阴性对照组	硫乙醇酸盐流体培养基														
	胰酪大豆胨液体培养基														
样品组	硫乙醇酸盐流体培养基														
	胰酪大豆胨液体培养基														

注：表中“+”表示有菌生长，表中“-表示无菌生长”

6、结论

通过表一和表二可以看出，采用直接接种法，与阳性菌相比，加入的 6 种菌均可以正常生长，因此可以使用此方法作为 xx 的无菌检查方法，其中，阳性对照菌为金黄色葡萄球菌。

注：如抑制某种菌，则按照药典选择相应的相应的对照菌种。

