纯化水微生物限度检查法验证报告

文件编号:

版 本 号:

实施部门：.....部

审核:

批准:

验证时间：.....年.....月.....日～.....年.....月.....日

验证小组名称：　　纯化水微生物限度检查法验证方案验证小组			
组　长	质量部经理	负责组织、实施	
组　员			
1	QC 主管	负责验证方案的起草 负责检测数据的复核 负责出具检验报告	
2	QA 主管	负责验证方案的确认 负责方法评价	
3	微生物限度检验员	负责测试操作和操作原始记录	

目录

1. 验证目的

2. 验证人员职责

3. 参照标准

4. 验证项目内容

5. 评价合格标准

6. 验证试验材料

7. **验证实施计划**

8. 菌液制备

9. 供试液制备

10. 计数方法验证

11. 控制菌检查方法验证

12. 验证结论和评价

纯化水微生物限度检查法验证报告

1. 验证目的：

纯化水微生物限度试验采用薄膜过滤法检查。确认该方法适合于纯化水细菌、霉菌及酵母菌数测定，控制菌的测定。

2．验证人员职责

2.1 验证领导小组：

2、1、1 负责验证方案及报告的批准

2、1、2 组织协调验证工作

2、1、3 签发验证证书。

2.2.项目验证小组长

2.2.1.负责验证方案的起草

2.2.2.负责验证的协调工作，以保证本验证方案的顺利实施。

2.2.3.负责验证报告的起草。

2.2.4.负责再验证周期的确认。

2． 3. 质量部

2． 3.1.负责验证方案审核

2． 3.2.负责取样及对样品的检验

2.3.3.负责收集验证记录，并加以分析后，协助项目验证小组长起草验证报告。

2． 3.4.负责验证数据及结果的审核

3. 参照标准：

2010 版中国药典一部附录 XIII 微生物限度检查法。

4. 验证项目内容：

细菌、霉菌及酵母菌计数方法的验证，控制菌检查方法验证。

5. 评价合格标准：

试验组的菌回收率和稀释剂对照组的菌回收率均不得低于 70%。

6. 验证试验材料：

6.1. 被验证产品：

品名 纯化水 取样点：（1）4T/h 纯水系统二级反渗透装置进纯水箱口;(2) 4T/h 纯水系统液体制剂二楼洁具间用水点；(3) 4T/h 纯水系统三楼固

体制剂纯水箱总回水口。

检验量 5ml /次

6.2. 仪器设备：

6.2.1. YX.400A 电热蒸汽压力消毒器

6.2.2 YS－840 净化工作台

6.2.3. 101 型电热干燥箱

6.2.4. SPX-250B 型生化培养箱

6.2.5.PYX-DUS-X 型隔水式电热恒温培养箱

6.2.6 303A-4 型电热培养箱

6.2.7 天平

6.3. 稀释剂：PH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液；0.9%的无菌氯化钠溶液

6.4. 验证用培养基

名称	批号	生产厂家
营养琼脂培养基		
营养肉汤培养基		
玫瑰红钠琼脂培养基		
改良马丁培养基		
改良马丁琼脂培养基		

6.5. 验证用菌株：

验证菌株	代号（代数）	来源	培养基	培养温度	培养时间（小时）
大肠埃希菌			营养肉汤	30—35℃	
金黄色葡萄球菌			营养肉汤	30—35℃	
枯草芽孢杆菌			营养肉汤	30—35℃	
白色念珠			改良马丁培养	23—28℃	

菌			基		
黑曲霉菌			改良马丁琼脂培养基	23—28℃	

7、验证设施计划

序号	项目确认名称	实施负责人	起始和完成日期
1	细菌、霉菌及酵母菌计数方法验证		
2	验证结果评定、验证周期确认、验证报告和发放验证证书		

8. 菌液制备

8.1.大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌菌悬液的制备

①取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜斜面培养物 1 白金耳接种至 10ml 营养肉汤培养基中，35℃培养 18~24 小时。

②取经 35～36℃培养 18~24 小时的大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、与枯草芽孢杆菌营养肉汤新鲜培养物 1ml 加入到 9ml0.9%无菌氯化钠溶液中，10 倍稀释至 10^{-6}~10^{-7} 约为 50~100cfu / ml 的菌悬液备用。

8.2 白色念珠菌、黑曲霉菌悬液的制备

①取白色念珠菌的新鲜斜面培养物 1 白金耳接种至 10ml 改良马丁培养基中，25℃培养 24~48 小时。取培养物 1ml，加入 9%灭菌生理盐水 9ml，混匀，10 倍稀释至 10^{-5}~10^{-6} 细菌数约 50~100cfu / ml 的菌悬液备用。

②接种黑曲霉的新鲜培养物于改良马丁琼脂斜面培养基上，25℃培养 5~7 天至大量孢子产生。加 0.9%无菌氯化钠溶液 10ml 将孢子洗脱。然后吸出孢子悬液，加入蒙有灭菌纱布的无菌试管中。取此孢子悬液 1ml 加到 9ml0.9%无菌氯化钠溶液中，逐管 10 倍稀释至 10^{-5} 约为 50~100cfu / ml 的菌悬液备用。

9.供试品制备　供试品名称及取样点：纯化水 取样点（1）4T/h 纯水系统二级反渗透装置进纯水箱口;(2) 4T/h 纯水系统液体制剂二楼洁具间用水点；(3) 4T/h 纯水系统三楼固体制剂纯水箱总回水口。

方法建立：2010 版中国药典规定纯化水微生物限度试验采用薄膜过滤法检查。但没规定取样量,由于所使用的滤膜孔径不大于 0.45um ，直径为 50mm, 规

定每片滤膜上的菌落数应不超过 100 个。如果取样量过大,样品含菌量较多,就会造成细菌不宜分散, 点计困难; 如果取样量过少,不能有效反映样品染菌量。为此采用每张滤膜取样品 5ml。

10.计数方法验证

10.1 试验组 取纯化水 5ml，以无菌操作加入过滤器内，用 PH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜 3 次，每次 100ml，在最后一次的冲洗液中分别加入上述的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液（50～100cfu/ml）各 1ml，平行两张滤膜，过滤后，取滤膜，将其菌面朝上贴于相应培养基上培养。

10.2 菌液组 大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌与枯草芽孢杆菌分别取 1ml 面液分别注入平皿中，并立即倾注营养琼脂培养基，每个面液分别制备二个平皿，置 35～36℃培养 24 小时；白色念珠菌、黑曲霉分别取 1ml 面液分别注入平皿中，并立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基，每个面液分别制备二个平皿，置 24～25℃培养 48 小时。菌落计数结果（2 个平皿计数取平均值）见下表

菌落计数结果（cfu／ml）

试验次数	10^{-5} 稀释		10^{-6} 稀释		10^{-7} 稀释	
	1	2	1	2	2	
大肠埃希菌						
金黄色葡萄球菌						
枯草芽孢杆菌						
白色念珠菌						
黑曲霉						

10.3 供试品对照组 取纯化水 5ml，以无菌操作加入过滤器内，用 0.9%无菌氯化钠溶液冲洗滤膜 3 次，每次 100ml，平行两张滤膜，过滤后，取出滤膜，菌面朝上贴于琼脂培养基平板上培养。细菌、霉菌及酵母菌各制备 2 个平皿，测定供试品本底菌数。

10.4. 稀释剂试验组 取 0.9%无菌氯化钠溶液 300ml，以无菌操作加入过滤器

内，每次 100ml，在最后一次的冲洗液中分别加入上述的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液（50～100cfu/ml）各 1ml，平行两张滤膜，过滤后，取滤膜，将其菌面朝上贴于相应培养基上培养。

10.5.稀释剂对照组 取 0.9%无菌氯化钠溶液 300ml，以无菌操作加入过滤器内，平行两张滤膜，减压抽干后,取出滤膜，菌面朝上贴于琼脂培养基平板上培养，平行制备 2 个平皿，置适宜温度培养 48～72h，观察结果，测定菌数。

10.6. 结果见附表

11、控制菌检查方法验证（常规法）

11.1 **试验组** 取纯化水 5ml，以无菌操作加入过滤器内，用 PH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液，冲洗滤膜 3 次，每次 100ml，在最后一次的冲洗液中分别加入上述的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉菌菌液（50～100cfu/ml）各 1ml，平行两张滤膜，过滤后，取滤膜，接入胆盐乳糖培养基 100ml 中，按相应控制菌检查法进行检查。

试验结果：上述试验组检出试验菌，按此控制菌检查法进行供试品的该控制菌检查。故可按常规法进行控制菌检查。

12 验证结论和评价

根据验证试验结果，纯化水微生物限度检查按照 2010 版中国药典二部附录 XIII 微生物限度检查法检验，细菌、霉菌及酵母菌计数可采用薄膜过滤法检查。

附表 1： 独立试验一 ：各试验组菌落计数（回收率%）

取样点 ：_____

试验时间_____年_____月____日　　完成时间____年____月____日

验证菌株	平皿号	菌液组菌落数(cfu)	供试品对照组菌落数(cfu)	试验组菌落数(cfu)	稀释剂对照组菌落数(cfu)	试验组菌回收率(%)	稀释剂对照组菌回收率(%)
大肠埃希菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
金黄色葡萄球菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
枯草芽孢杆菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
白色念珠菌(培养 72 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
黑曲霉(培养 72 小时计数)	1						
	2						
	平均值						

结论：

本次试验各试验组的菌回收率和各稀释剂对照组的菌回收率均不低于 70%, 按标准规定, 本次试验结果符合规定。

复核人(签名)：_____　　试验人(签名)：_____

附表 2：独立试验二 ：各试验组菌落计数（回收率%）

取样点：_____

试验时间__年___月 日 完成时间___年月 日

验证菌株	平皿号	菌液组菌落数(cfu)	供试品对照组菌落数(cfu)	试验组菌落数(cfu)	稀释剂对照组菌落数(cfu)	试验组菌回收率(%)	稀释剂对照组菌回收率(%)
大肠埃希菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
金黄色葡萄球菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
枯草芽孢杆菌(培养 48 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
白色念珠菌(培养 72 小时计数)	1						
	2						
	平均值						
黑曲霉(培养 72 小时计数)	1						
	2						
	平均值						

结论：

本次试验各试验组的菌回收率和各稀释剂对照组的菌回收率均不低于 70%, 按标准规定, 本次试验结果符合规定。

复核人(签名)：_____ 试验人(签名)：_____

附表 3：独立试验三 ： 各试验组菌落计数（回收率%）

取样点：_____

试验时间___年____月 日 完成时间__年 月 日

验证菌株	平皿号	菌液组菌落数(cfu)	供试品对照组菌落数(cfu)	试验组菌落数(cfu)	稀释剂对照组菌落数(cfu)	试验组菌回收率(%)	稀释剂对照组菌回收率(%)
大肠埃希菌(培养48小时计数)	1						
	2						
	平均值						
金黄色葡萄球菌(培养48小时计数)	1						
	2						
	平均值						
枯草芽孢杆菌(培养48小时计数)	1						
	2						
	平均值						
白色念珠菌(培养72小时计数)	1						
	2						
	平均值						
黑曲霉(培养72小时计数)	1						
	2						
	平均值						

结论：

通过三次独立试验,证明所采用的供试液制备方法及薄膜过滤法适合于纯化水细菌、霉菌及酵母菌数测定。

复核人 _____

医课汇 公众号 专业医疗器械资讯平台 WECHAT OF HLONGMED
hlongmed.com 医疗器械咨询服务 MEDICAL DEVICE CONSULTING SERVICES
医课培训平台 医疗器械任职培训 WEB TRAINING CENTER
医械宝 医疗器械知识平台 KNOWLEDG ECENTEROF MEDICAL DEVICE
MDCPP.COM 医械云专业平台 KNOWLEDG ECENTEROF MEDICAL DEVICE