

1101 无菌检查法

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
1.	无菌检查法系用于检查药典要求无菌的药品、生物制品、医疗器具、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法。	无菌检查法系用于检查药典要求无菌的药品、生物制品、医疗器械具、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法。	
2.	单向流空气区、工作台面及环境应定期按医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法的现行国家标准进行洁净度确认。隔离系统应定期按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。日常检验还需对试验环境进行监控。	单向流空气区、工作台面及受控环境应定期按医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法的现行国家标准进行洁净度确认。隔离系统应定期按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。日常检验还需对试验环境进行监控。	
3.	培养基可按以下处方制备，亦可使用按该处方生产的符合规定的脱水培养基或成品培养基。配制后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。 制备好的培养基应保存在 2~25℃、避光的环境，若保存于非密闭容器中，一般在 3 周内使用；若保存于密闭容器中，一般可在一年内使用。	培养基可按以下处方制备，亦可使用按该处方生产的符合规定的脱水培养基或成品商品化的预制培养基。配制后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。 制备好的培养基应保存在 2~25℃、避光的环境，若保存于非密闭容器中，一般在 3 周内使用；若保存于密闭容器中，一般可在一年内使用若不即时使用，应置于无菌密闭容器中，在 2~25℃、 避光的环境下保存， 并在经验证的保存期内使用。	
4.	硫乙醇酸盐流体培养基的处方： 无水葡萄糖 5.0g 在供试品接种前，培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的 1/5，否则，须经 100℃水浴加热至粉红色消失（不超过 20 分钟），迅速冷却，只限加热一次，并防止被污染。	硫乙醇酸盐流体培养基的处方： 葡萄糖/无水葡萄糖 5.5g/5.0g 在供试品接种前，培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的 1/53，否则，须经 100℃水浴加热至粉红色消失（不超过 20 分钟），迅速冷却，只限加热一次，并防止被污染。	
5.	中和或灭活用培养基 按上述硫乙醇酸盐流体培养基或胰酪大豆胨液体培养基的处方及制法，在培养基灭菌或使用前加入适宜的中和剂、灭活剂或表面活性剂，其用量同方法适用性试验。	中和或灭活用培养基 按上述硫乙醇酸盐流体培养基或胰酪大豆胨液体培养基的处方及制法，在培养基灭菌前或使用前加入适宜的中和剂、灭活剂或表面活性剂，其用量同方法适用性试验。	
6.	N/A	马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA） 新增该培养基的处方及制备方法	
7.	培养基的适用性检查： 无菌性检查：每批培养基随机取不少于 5 支（瓶），置各培养基规定的温度培养 14 天，应无菌生长。	培养基的适用性检查： 无菌性检查：每批培养基一般随机取不少于 5 支（瓶），置各培养基规定的温度培养 14 天，应无菌生长。	
8.	菌种：培养基灵敏度检查所用的菌株传代次数不得超过 5 代（从菌种保存中心获得的干燥菌种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌	菌种：培养基灵敏度检查所用的菌株传代次数不得超过 5 代（从菌种保存中心获得的干燥菌种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，和确认，以保	

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
	株的生物学特性。	证试验菌株的生物学特性。	
9.	菌液制备： 接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中或沙氏葡萄糖琼脂培养基上， 20～25℃培养 24～48 小时 ，上述培养物用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液制成 每 1ml 含菌数小于 100cfu（菌落形成单位） 的菌悬液。	菌液制备： 接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基中或沙氏葡萄糖琼脂培养基上， 20～25℃培养 2～3 天 24～48 小时 ，上述培养物用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液制成 每 1ml 含菌数小于 100cfu（菌落形成单位） 的 适宜浓度 菌悬液。	
10.	菌液制备： 接种黑曲霉的 新鲜培养物 至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基上， 20～25℃培养 5～7 天， 加入 3～5ml 含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液制成 每 1ml 含孢子数小于 100cfu 的孢子悬液。	菌液制备： 接种黑曲霉的 新鲜培养物 至沙氏葡萄糖琼脂斜面培养基 或马铃薯葡萄糖琼脂培养基 上， 20～25℃培养 5～7 天， 或直到获得丰富的孢子 ， 加入 适量 3～5ml 含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 或含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液 ，将孢子洗脱。然后，采用适宜的方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 或含 0.05%（ml/ml）聚山梨酯 80 的 0.9%无菌氯化钠溶液 制成 每 1ml 含孢子数小于 100cfu 适宜浓度的孢子悬液。	
11.	菌液制备： 菌悬液若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2～8℃可在 24 小时内使用。黑曲霉孢子悬液可保存在 2～8℃，在验证过的贮存期内使用。	菌液制备： 菌悬液若在室温下放置， 一般 应在 2 小时内使用；若保存在 2～8℃可在 24 小时内使用。黑曲霉孢子悬液可保存在 2～8℃，在验证过的贮存期内使用。	
12.	培养基接种：取 每管装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 7 支，分别接种 小于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照， 培养 3 天 ；取 每管装量为 9ml 的胰酪大豆胨液体培养基 7 支，分别接种 小于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照， 培养 5 天。逐日观察结果。	培养基接种：取 每管适宜装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 7 支，分别接种 小于不大于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照， 培养 3 天 ；取 每管适宜装量为 9ml 的胰酪大豆胨液体培养基 7 支，分别接种 小于不大于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 支，另 1 支不接种作为空白对照， 培养 5 天。逐日观察结果。 接种细菌的培养管培养时间不超过 3 天，接种真菌的培养管培养时间不得超过 5 天。	
13.	0.1%无菌蛋白胨水溶液取蛋白胨 1.0g，加水 1000ml，微温溶解， 滤清 ，调节 pH 值至 7.1±0.2，分装，灭菌。	0.1%无菌蛋白胨水溶液取蛋白胨 1.0g，加水 1000ml，微温溶解， 必要时滤过使澄清滤清 ，调节 pH 值至 7.1±0.2，分装，灭菌。	
14.	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液取磷酸二氢钾 3.56g，无水磷酸氢二钠 5.77g，氯化钠 4.30g，蛋白胨 1.00g，加水 1000ml，微温溶解， 滤清 ，分装，灭菌。	pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液取磷酸二氢钾 3.56g，无水磷酸氢二钠 5.77g，氯化钠 4.30g，蛋白胨 1.00g，加水 1000ml，微温溶解， 必要时滤过使澄清滤清 ，分装，灭菌。	
15.	根据供试品的特性，可选用其他经验证 过 的 适宜 的溶液作为稀释液、冲洗液(如	根据供试品的特性，可选用其他经验证 过 的 适宜 的溶液作为稀释液、 或 冲洗液(如	

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
	0.9%无菌氯化钠溶液)。	0.9%无菌氯化钠溶液)。	
16.	方法适用性试验： 菌种及菌液制备： 除大肠埃希菌（Escherichia coli）[CMCC(B) 44102] 外， 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉的菌株及菌液制备同培养基灵敏度检查。大肠埃希菌的菌液制备同金黄色葡萄球菌。	方法适用性试验： 菌种及菌液制备： 除大肠埃希菌（Escherichia coli）[CMCC(B) 44102] 外， 金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌、白色念珠菌、黑曲霉的菌株及菌液制备同培养基灵敏度检查。大肠埃希菌（Escherichia coli）[CMCC(B) 44102] 的菌液制备同金黄色葡萄球菌。	
17.	薄膜过滤法取每种培养基规定接种的供试品总量， 按 薄膜过滤法过滤，冲洗，在最后一轮的冲洗液中加入小于 100cfu 的试验菌，过滤。加 硫乙醇酸盐流体培养基或胰酪大豆胨液体培养基至滤筒内。 另取一装有同体积培养基的容器，加入等量试验菌，作为对照。置规定温度培养，培养时间不得超过 5 天， 各试验菌同法操作。	薄膜过滤法 按供试品的无菌检查要求 取每种培养基规定接种的供试品总量， 按采 用薄膜过滤法过滤，冲洗，在最后一轮的冲洗液中加入 小于 不大于 100cfu 的试验菌，过滤。加 硫乙醇酸盐流体培养基或胰酪大豆胨液体培养基至滤筒内。 ， 接 种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌的滤筒内加 硫乙醇酸盐流体培养基； 接 种枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的滤筒内加胰酪大豆胨液体培养基。 另取一装有同体积培养基的容器，加入等量试验菌，作为对照。置规定温度培养，培养时间不得超过 5 天， 各试验菌同法操作。	
18.	直接接种法：取符合直接接种法培养基用量要求的硫乙醇酸盐流体培养基 6 管，分别接入小于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌各 2 管，取符合直接接种法培养基用量要求的胰酪大豆胨液体培养基 6 管，分别接入小于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 管。其中 1 管接入每支培养基规定的供试品接种量，另 1 管作为对照，置规定的温度培养，培养时间不得超过 5 天。	直接接种法：取符合直接接种法培养基用量要求的硫乙醇酸盐流体培养基 6 管，分别接入 小于 不大于 100cfu 的金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌各 2 管， ； 取符合直接接种法培养基用量要求的胰酪大豆胨液体培养基 6 管，分别接入 小于 不大于 100cfu 的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各 2 管。其中 1 管 按供试品的无菌检查要求 接入每支培养基规定的供试品接种量，另 1 管作为对照，置规定的温度培养，培养时间不得超过 5 天。	
19.	检验量：是指供试品每个最小包装接种至每份培养基的最小量（g 或 ml）。	检验量：是指供试品每个最小包装接种至每份培养基的最小量 （g 或 ml）。	
20.	检验量：采用薄膜过滤法时，只要供试品特性允许，应将所有容器内的全部内容物过滤。	检验量：采用薄膜过滤法时，只要供试品特性允许，应将所有容器内的全部内容物 全部 过滤。	
21.	阳性对照：阳性对照试验的菌液制备同方法适用性试验，加菌量小于 100cfu，供试品用量同供试品无菌检查时每份培养基接种的样品量。阳性对照管培养 72 小时内应生长良好。	阳性对照：阳性对照试验的菌液制备同方法适用性试验，加菌量 小于 不大于 100cfu，供试品用量同供试品无菌检查时每份培养基接种的样品量。阳性对照管培养 不超过 72 小时内 5 天， 应生长良好。	
22.	供试品处理及接种培养基：操作时，用适宜的消毒液对供试品容器表面进行彻底消毒，如果供试品容器内有一定的真空度，可用适宜的无菌器材（如带有除菌过滤器的针头）向容器内导入无菌空气，再按无菌操作启开容器取出内容物。	供试品处理及接种培养基：操作时，用适宜的 消毒液 方法对供试品容器表面进行彻底消毒，如果供试品容器内有一定的真空度，可用适宜的无菌器材（如带有除菌过滤器的针头）向容器内导入无菌空气，再按无菌操作启开容器取出内容物。	
23.	薄膜过滤法：薄膜过滤法一般应采用封闭式薄膜过滤器。无菌检查用的滤膜孔径	薄膜过滤法：薄膜过滤法一般应采用封闭式薄膜过滤器， 根据供试品及其溶剂的	

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
	应不大于 0.45 μ m。直径约为 50mm。根据供试品及其溶剂的特性选择滤膜材质。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。	特性选择滤膜材质。无菌检查用的滤膜孔径应不大于 0.45 μ m。 直径约为 50mm。根据供试品及其溶剂的特性选择滤膜材质。 滤膜直径约为 50mm，若使用其他尺寸的滤膜，应对稀释液和冲洗液体积进行调整，并重新验证。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。	
24.	水溶性供试液过滤前应先将少量的冲洗液过滤，以润湿滤膜。 供试液经薄膜过滤后，若需要用冲洗液冲洗滤膜，每张滤膜每次冲洗量一般为 100ml，且总冲洗量不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。	水溶性供试液过滤前，一般应先将少量的冲洗液过滤，以润湿滤膜。 供试液经薄膜过滤后，若需要用冲洗液冲洗滤膜，每张滤膜每次冲洗量一般为 100ml，且总冲洗量一般不超过 500ml，最高不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。	
25.	水溶液供试品	水溶液水溶性液体供试品	
26.	水溶性固体供试品取规定量，加适宜的稀释液溶解或按标签说明复溶，然后照水溶液供试品项下的方法操作。	水溶性固体和半固体供试品取规定量，加适宜的稀释液溶解或按标签说明复溶，然后照水溶液水溶性液体供试品项下的方法操作。	
27.	非水溶性供试品：接种培养基照水溶液供试品项下的方法操作。	非水溶性供试品：接种培养基照水溶液水溶性液体供试品项下的方法操作。	
28.	可溶于十四烷酸异丙酯的膏剂和黏性油剂供试品：取规定量，混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯①中，剧烈振摇，使供试品充分溶解，如果需要可适当加热，但温度不得超过 44℃，趁热迅速过滤。对仍然无法过滤的供试品，于含有适量的无菌十四烷酸异丙酯中的供试液中加入不少于 100ml 的稀释液，充分振摇萃取，静置，取下层水相作为供试液过滤。	可溶于十四烷酸异丙酯的膏剂和黏性油剂供试品：取规定量，混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯①中，剧烈振摇，使供试品充分溶解，如果需要可适当加热，加热但温度不得一般不超过 44℃，最高不得超过 44℃，趁热迅速过滤。对仍然无法过滤的供试品，于含有适量的无菌十四烷酸异丙酯中的供试液中加入不少于 100ml 的适宜稀释液，充分振摇萃取，静置，取下层水相作为供试液过滤。	
29.	无菌气（喷）雾剂供试品：取规定量，将各容器置-20℃或其他适宜温度冷冻约 1 小时，取出，以无菌操作迅速在容器上端钻一小孔，释放抛射剂后再无菌开启容器，并将供试液转移至无菌容器中混合，供试品亦可采用其它适宜的方法取出。然后照水溶液供试品或非水溶性供试品项下的方法操作。	无菌气（ 喷 ）雾剂供试品：取规定量，采用专用设备将供试品转移至封闭式薄膜过滤器中。或将各容器置-20℃或其他适宜温度冷冻约 1 小时，取出，迅速消毒供试品开启部位或阀门。正置容器，用无菌钢锥或针样设备以无菌操作迅速在与容器阀门结构相匹配的适宜位置容器上端钻一小孔，不同容器钻孔大小和深度应保持基本一致，钻孔后应无明显抛射剂抛出。轻轻转动容器，使抛射剂缓缓释出。释放抛射剂后再无菌开启容器，并将供试液转移至无菌容器中混合，必要时用冲洗液冲洗容器内壁。供试品亦可采用其它适宜的方法取出。然后照水溶液水溶性液体供试品或非水溶性供试品项下的方法操作。	
30.	装有药物的注射器供试品：取规定量，将注射器中的内容物（若需要可吸入稀释液或标签所示的溶剂溶解）直接过滤，或混合至含适宜稀释液的无菌容器中，然后照水溶液或非水溶性供试品项下方法操作。同时应采用适宜的方法进行包装中所配带的无菌针头的无菌检查。	装有药物的注射器供试品：取规定量，将注射器中的内容物（若需要可吸入稀释液或标签所示的溶剂溶解）直接过滤，或混合至含适宜稀释液的无菌容器中，然后照水溶液水溶性液体或非水溶性供试品项下方法操作。同时应采用适宜的方法进行对包装中所配带的无菌针头等要求无菌的部件的进行无菌检查。	

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
31.	具有导管的医疗器具(输血、输液袋等)供试品：取规定量，每个最小包装用 50～100ml 冲洗液分别冲洗内壁，收集冲洗液于无菌容器中，然后照水溶液供试品项下方法操作。同时应采用直接接种法进行包装中所配带的针头的无菌检查。	具有导管的医疗器具(输血、输液袋等)供试品：除另有规定外，取规定量，每个最小包装用适量的（通常 50～100ml） 50～100ml 冲洗液分别冲洗内壁，收集冲洗液于无菌容器中，然后照水溶液水溶性液体供试品项下方法操作。同时应采用直接接种法适宜的方法进行对包装中所配带的针头等要求无菌的部件进行的无菌检查。	
32.	注：①无菌十四烷酸异丙酯的制备采用薄膜过滤法过滤除菌, 选用孔径为 0.22 μm 的适宜滤膜。	注：①无菌十四烷酸异丙酯的制备可采用薄膜过滤法过滤除菌, 选用孔径为 0.22 μm 的适宜滤膜，或其他适宜的灭菌方法。	
33.	混悬液等非澄清水溶液供试品取规定量，等量接种至各管培养基中。	混悬液等非澄清水溶液水溶性液体供试品取规定量，等量接种至各管培养基中。	
34.	固体供试品：取规定量，直接等量接种至各管培养基中。或加入适宜的溶剂溶解，或按标签说明复溶后，取规定量等量接种至各管培养基中	固体供试品：取规定量，直接等量接种至各管培养基中 。 ，或加入适宜的溶剂溶解，或按标签说明复溶后，取规定量等量接种至各管培养基中	
35.	灭菌医用器具供试品，取规定量，必要时应将其拆散或切成小片段，等量接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中	灭菌医用器械具供试品除另有规定外，取规定量，必要时应将其拆散或切成小片段，等量接种于各管足以浸没供试品的适量培养基中	
36.	培养及观察： 将上述接种供试品后的培养基容器分别按各培养基规定的温度培养 14 天；接种生物制品供试品的硫乙醇酸盐流体培养基的容器应分成两等份，一份置 30～35℃ 培养，一份置 20～25℃ 培养。培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。如在加入供试品后或在培养过程中，培养基出现浑浊，培养 14 天后，不能从外观上判断有无微生物生长，可取该培养液适量转种至同种新鲜培养基中，培养 3 天，观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。	培养及观察： 将上述接种供试品后的培养基容器分别按各培养基规定的温度培养不少于 14 天；接种生物制品供试品的硫乙醇酸盐流体培养基的容器应分成两等份，一份置 30～35℃ 培养，一份置 20～25℃ 培养。培养期间应逐日定期观察并记录是否有菌生长。如在加入供试品后或在培养过程中，培养基出现浑浊，培养 14 天后，不能从外观上判断有无微生物生长，可取该培养液不少于 1ml 适量转种至同种新鲜培养基中，将原始培养物和新接种的培养基继续培养不少于 3 4 天，观察接种的同种新鲜培养基是否再出现浑浊；或取培养液涂片，染色，镜检，判断是否有菌。	
37.	结果判断： 阳性对照管应生长良好，阴性对照管不得有菌生长。否则，试验无效。 若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，判供试品符合规定；若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，判供试品不符合规定，除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含。当符合下列至少一个条件时方可判试验结果无效： （3）供试品管中生长的微生物经鉴定后，确证是因无菌试验中所使用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的。 试验若经确认无效，应重试。重试时，重新取同量供试品，依法检查，若无菌生	结果判断： 阳性对照管应生长良好，阴性对照管不得有菌生长。否则，试验无效。 若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，判供试品符合规定；若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，判供试品不符合规定，除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含。 当只有 符合下列至少一个条件时方可认为判试验结果无效： （3）在阴性对照中观察到微生物生长。 （3）供试品管中生长的微生物经鉴定后，确证是因无菌试验中所使用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的。	

序号	2015 药典	2020 药典	对比说明
	长，判供试品符合规定；若有菌生长，判供试品不符合规定。	试验若经评估确认无效后，应重试。重试时，重新取同量供试品，依法检查，若无菌生长，判供试品符合规定；若有菌生长，判供试品不符合规定。	
38.	表 1、表 2、表 3 医疗器具	表 1、表 2、表 3 医疗器械具	
39.	表 3 液体制剂： $V \leq 1\text{ml}$ $1\text{ml} < V \leq 40\text{ml}$ $V > 100\text{ml}$ ；10%但不少于 20ml	表 3 液体制剂： $V \leq 1\text{ml}$ $1\text{ml} \leq V \leq 40\text{ml}$ $V > 100\text{ml}$ ；10% ，但不少于 20ml	
40.	表 3 固体制剂： $50\text{mg} \leq M < 300\text{mg}$ ；半量 $300\text{mg} \leq M < 300\text{mg}$ $M \geq 5\text{g}$	表 3 固体制剂： $50\text{mg} \leq M < 300\text{mg}$ ；半量，但不得少于 50mg $300\text{mg} \leq M \leq 300\text{mg}$ $M \geq 5\text{g}$	
41.	注：①如果医用器械体积过大，培养基用量可在 2000ml 以上，将其完全浸没。	注：①如果医疗器械体积过大，培养基用量可在 2000ml 以上，将其完全浸没。	



资料分享，技术交流请扫码加微信（标明单位，姓名）