



中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1479—2016

98df88
2017.10.24

薄膜过滤器的无菌试验方法

Sterility test method for membrane filters

2016-07-29 发布

2017-06-01 实施

国家食品药品监督管理总局 发布

目次



前言 I

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 试验条件 1

5 无菌试验方法 2

6 培养和观察 4

7 结果判断 4

附录 A (资料性附录) 培养基制备及培养基的检测 5

前言

98df88

2017.10.24

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

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。

本标准由全国消毒技术与设备标准化技术委员会(SAC/TC 200)归口。

本标准起草单位:杭州泰林生物技术设备有限公司、国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心。

本标准主要起草人:赵振波、黄秀莲、高凯斐、夏信群、苗晓琳。

薄膜过滤器的无菌试验方法

1 范围

本标准规定了在医疗产品生产、检验或其他处理过程中使用的以及作为最终产品的无菌薄膜过滤器的无菌试验方法。

注：滤膜折叠扭曲的或部分体积过大的薄膜过滤器不适用本方法。

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。

GB/T 19973.2—2005 医用器械的灭菌 微生物学方法 第2部分：确认灭菌过程的无菌试验（ISO 11737-2:1995, IDT）

YY/T 0567.1—2013 医疗保健产品的无菌加工 第1部分：通用要求（ISO 13408-1:2008 IDT）
中华人民共和国药典

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

薄膜过滤器 **membrane filter**

用于液体除杂，除菌，微生物限度检查或无菌检查等用途的膜片，以及其他预装滤膜或可安装滤膜的过滤装置。

3.2

无菌试验 **sterility test**

在给定的培养条件下，用于确定产品单元上是否有存活微生物所进行的试验。

4 试验条件

4.1 水

如无特别说明，涉及到的水应符合《中华人民共和国药典》中纯化水的相关规定。

4.2 培养基

培养基的制备方法及培养基的检查参见附录A。

4.3 薄膜过滤器无菌试验的条件

无菌试验的条件应包括以下方面：

a) 在受控环境中进行试验；

例如：设置于B级洁净区的A级单向流空气区域内、无菌隔离系统等；YY/T 0567.1—2013 第

6 章给出了关于有受控环境的详细信息；

- b) 对试验中所使用的设备、材料进行灭菌；
- c) 将物品(含试验器具、培养基和供试品)在无菌条件下引进试验区,包括:
 - 1) 在将物品引入试验区之前对包装外部进行生物去污/净化；
 - 2) 对试验区内的环境进行生物去污/净化。
- d) 采取去除生物污染的措施不应影响待测产品中低污染水平微生物的被检出；
- e) 将试验所需的操作减至最少；
- f) 试验人员应进行关于无菌技术的培训,具有相应的资质。

5 无菌试验方法

5.1 取样量

薄膜过滤器生产者根据批产量每批随机抽检一定量的样品进行无菌试验。当批产量小于等于 100 件时,抽取批产量的 10%或者 4 件中的较多者;大于 100 件小于等于 500 件时,抽取 10 件;大于 500 抽取批产量的 2%或者 20 件中的较少者。

每套过滤器需接种两种培养基,如无法同时接种两种培养基,取样量需加倍。

注:薄膜过滤器使用者可参考上述取样量对每批进货产品进行抽样检查。

5.2 洗脱液及制备方法

可在下列两种溶液中任选一种作为洗脱液:

- a) pH 7.0 氯化钠蛋白胨缓冲液:取磷酸二氢钾 3.56 g,无水磷酸氢二钠 5.77 g,氯化钠 4.30 g,蛋白胨 1.00 g,加水 1 000 mL,微温溶解,滤清,分装,灭菌。
- b) 0.9%氯化钠溶液:取氯化钠 9 g,加水至 1 000 mL,搅拌溶解,分装后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

5.3 无菌试验方法的评价

薄膜过滤器的无菌试验方法评价,应避免产生假阳性或假阴性。GB/T 19973.2—2005 第 7 章适用。

5.4 试验方法的选择

根据薄膜过滤器的结构特征,进行无菌试验一般有两种方法:

- a) 直接接种法:将薄膜过滤器直接浸入培养基或在产品中加入培养基,然后进行培养;
- b) 洗脱法:从受测薄膜过滤器上洗脱微生物,洗脱液经另一套薄膜过滤器处理后将滤膜接种,然后进行培养。

使用者应优先选择直接接种法,在产品不适用直接接种法时可根据产品特点选择洗脱法或联合使用两种方法。

5.5 直接接种法

将滤膜或体积较小的薄膜过滤器直接接种至一个(或多个)盛有培养基的容器容中进行培养。对具有培养基容纳和培养功能的薄膜过滤器(如《中华人民共和国药典》中附录:无菌检查法收载的封闭式薄膜过滤器)将适量的培养基直接转移至薄膜过滤器中进行培养。应使用足够量的培养基以实现培养基与薄膜过滤器的充分接触。此外,应考虑以下方面:

- a) 薄膜过滤器结构特征应有利于和培养基充分接触,反之则应考虑在浸入培养基之前对薄膜过

滤器进行分解和/或其他操作,但相关操作应注意避免污染;

- b) 浸入培养基之后进行搅动或晃动以排除气泡等不利培养基接触的因素;
- c) 某些薄膜过滤器不利于培养基润湿(如:滤膜或滤杯表面具有憎水特性),可在培养基中加入已被证明没有抑微生物或杀微生物作用的表面活性剂以更好地润湿接触表面;
- d) 当薄膜过滤器中含有导致假阴性的抑制物质并进入培养基,优先采用培养基稀释法,也可采用中和剂法,如以上方法均无效,可采用洗脱法;
- e) 对含有管路的薄膜过滤器,其管路部分也应进行无菌试验,可使用培养基充满液路,并最终收集至容器中培养。

5.6 洗脱法

对于体积较大和/或结构复杂而无法使用直接接种法的薄膜过滤器或其组件,可使用洗脱法。每个滤器及其组件用 50 mL~100 mL 洗脱液分别冲洗容器内壁、滤膜、管路,至少一次。洗脱液收集于无菌容器中,通过膜过滤法处理。

如果薄膜过滤器中可能存在对微生物的促生长产生不良影响的条件,如其特殊的物理性质或释放化学物质,推荐使用洗脱法。将洗脱液过滤,富集洗脱液中的微生物,并对消除或降低(如果无法消除)其所产生的影响是一个有效的方法,但该方法应进行验证。

如果要采用洗脱法,需考虑的因素应包括:

- a) 适当洗脱液的选择;
- b) 洗脱技术获得薄膜过滤器及其组件中含有微生物的能力;
- c) 滤膜的过滤/阻隔作用对滤膜上下游污染微生物洗脱效果的影响;
- d) 洗脱技术对微生物活性的影响;
- e) 通过膜过滤方法将洗脱液中的微生物从洗脱液中富集,应额外选择一套有效的过滤系统;
- f) 过滤系统参考《中华人民共和国药典》要求,借助于真空或压力使洗脱液通过孔径不大于 0.45 μm 的封闭式无菌薄膜过滤器,使洗脱液通过薄膜过滤器。此后,封闭过滤器液体出口并将培养基在无菌条件下移入过滤装置。

5.7 阳性对照

薄膜过滤器无菌试验均应做阳性对照。平行制备一份装有硫乙醇酸盐流体培养基的培养容器,然后接种小于 100 CFU(菌落形成单位)的金黄色葡萄球菌至该容器中,菌液制备参见附录 A 中 A.2.2.2。

如采用洗脱法,可使用三联薄膜过滤器处理洗脱液,并在其中一张滤膜的培养容器内添加阳性对照菌,但取样量需相应增加至原来的 1.5 倍。

如联合使用两种方法,每种方法处理每个部件的培养容器均需独立做阳性对照。

阳性对照 30 $^{\circ}\text{C}$ ~35 $^{\circ}\text{C}$ 培养 48 h~72 h 应生长良好。

注:如薄膜过滤器含有可抑制特定微生物生长的成分,阳性对照菌和对应培养基需依据《中华人民共和国药典》的相关要求进行选择。

5.8 阴性对照

膜过滤器无菌试验均应做阴性对照,如采用直接接种法,每种培养基额外各制备一份不含薄膜过滤器或其组件的培养容器,并在试验后同法培养;如采用洗脱法,则用薄膜过滤法处理所使用的洗脱液并培养;如联合使用两种方法,每种处理方法均需按上述方法做阴性对照。

阴性对照培养 14 d 应无菌生长。

5.9 试验操作

在无菌试验过程中应采用无菌技术操作。

6 培养和观察

将上述接种薄膜过滤器后的硫乙醇酸盐流体培养基培养容器 30℃~35℃培养 14 d,胰酪大豆胨液体培养基培养容器 20℃~25℃培养 14 d;培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。如在培养过程中,培养基出现浑浊,培养 14 d,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 d,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。

7 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。若各培养容器均澄清,或虽显浑浊但经确证无菌生长,判薄膜过滤器符合规定;若培养容器中任何一份浑浊并确证有菌生长,判薄膜过滤器不符合规定,除非能充分证明试验结果无效,即生长的微生物非薄膜过滤器所含。当符合下列至少一个条件时方可判试验结果无效:

- a) 无菌试验所用的设备及环境的微生物监控结果不符合要求;
- b) 回顾无菌试验过程,发现有可能引起微生物污染的因素;
- c) 生长的微生物经鉴定后,确证是因实验中所使用的物品和(或)操作技术不当引起的。

试验若经确认无效,应重试。重试时,重新取同量薄膜过滤器,依法检查,若无菌生长,判薄膜过滤器符合规定;若有菌生长,判薄膜过滤器不符合规定。

判该培养基灵敏度检查符合规定。

附录 A

(资料性附录)

培养基制备及培养基的检测

A.1 培养基及制备方法

A.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基(FTM)

胰酪胨 15.0 g	酵母浸出粉 5.0 g
葡萄糖 5.0 g	氯化钠 2.5 g
L-胱氨酸 0.5 g	新配制的 0.1% 刃天青溶液 1.0 mL
硫乙醇酸钠 0.5 g	琼脂 0.75 g
(或硫乙醇酸)(0.3 mL)	纯化水 1 000 mL

除葡萄糖和刃天青溶液外,取上述成分混合,微温溶解,调节 pH 为弱碱性,煮沸,滤清,加入葡萄糖和刃天青溶液,摇匀,调节 pH,使灭菌后在 25 ℃ 的 pH 值为 7.1 ± 0.2 。分装至适宜的容器中,其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层(粉红色)不超过培养基深度的 1/2。灭菌。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,需经 100 ℃ 水浴加热至粉红色消失(不超过 20 min),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置 30 ℃~35 ℃ 培养。

A.1.2 胰酪大豆胨液体培养基(SCDM)

胰酪胨 17.0 g	氯化钠 5.0 g
大豆木瓜蛋白酶消化物 3.0 g	磷酸氢二钾 2.5 g
葡萄糖(一水合/无水)2.5 g (2.3 g)	纯化水 1 000 mL

除葡萄糖外,取上述成分,混合,微温溶解,滤过,调节 pH 值使灭菌后在 25 ℃ 的 pH 值为 7.3 ± 0.2 ,加入葡萄糖,分装,灭菌。

胰酪大豆胨液体培养基置 20 ℃~25 ℃ 培养。

A.2 培养基适用性检查

A.2.1 无菌性检查

每批培养基的质量检验应包含无菌性检查。

每批培养基随机抽取至少 5 支(瓶),按各培养基规定的温度培养 14 d,应无菌生长。

A.2.2 灵敏度检查

每批培养基的质量检验应包含灵敏度试验。

A.2.2.1 菌种

培养基灵敏度试验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冷冻干燥菌种为第 0 代),并采用适宜的菌种保存技术进行保存,以保证试验菌株的生物学特性。

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)[CMCC(B) 26 003]

铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)[CMCC(B) 10 104]

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)[CMCC(B) 63 501]

生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*)[CMCC(B) 64 941]

白色念珠菌(*Candida albicans*)[CMCC(F) 98 001]

黑曲霉(*Aspergillus niger*)[CMCC(F) 98 003]

A.2.2.2 菌液制备

接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大豆胨琼脂培养基上,接种生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中,30℃~35℃培养18 h~24 h;接种白色念珠菌的新鲜培养物至沙氏葡萄糖液体培养基或沙氏葡萄糖琼脂培养基上,20℃~25℃培养24 h~48 h,上述培养物用pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 mL含菌数小于100 CFU(菌落形成单位)的菌悬液。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 d~7 d,加入3 mL~5 mL含0.05%(体积分数)聚山梨酯80的pH 7.0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%(体积分数)聚山梨酯80的pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液制成每1 mL含孢子数小于100 CFU的孢子悬液。

菌悬液在室温下放置应在2 h内使用,若保存在2℃~8℃可在24 h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。

A.2.2.3 培养基接种

取每管装量为12 mL的硫乙醇酸盐流体培养基7支,分别接种小于100 CFU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 d;取每管装量为9 mL的胰酪大豆胨液体培养基7支,分别接种小于100 CFU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 d。逐日观察结果。

A.2.2.4 结果判定

空白对照管应无菌生长,若加菌的培养基管均生长良好,判该培养基灵敏度检查符合规定。

中 华 人 民 共 和 国 医 药
行 业 标 准
薄膜过滤器的无菌试验方法
YY/T 1479—2016

*

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.net.cn

总编室:(010)68533533 发行中心:(010)51780238

读者服务部:(010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销

*

开本 880×1230 1/16 印张 0.75 字数 16 千字
2017年4月第一版 2017年4月第一次印刷

*

书号: 155066·2-31475 定价 18.00 元



YY/T 1479-2016