

前 言

本标准依照国内外《药品生产管理规范》(GMP)的要求,非等效采用美国国家航空及宇宙航行局 NASA 标准 NHB5340-2《关于洁净室和洁净工作台微生物的控制标准》,并参考 JGJ 71—90《洁净室施工验收规范》制定的。

悬浮粒子和微生物的测试是评价医药工业洁净室和洁净区空气洁净度的主要指标。本标准用浮游菌评价洁净室和洁净区空气中的微生物。

医药工业洁净室(区)浮游菌的测试应采用本标准的规定。

本标准的附录 A、附录 B、附录 C 都是标准的附录。

本标准的附录 D 是提示的附录。

本标准由国家医药管理局提出并归口。

本标准起草单位:中美上海施贵宝制药有限公司、上海医药局药品测试所、上海四药股份有限公司。

本标准主要起草人:顾锋、钱周、步伯荪、唐小珍。

中华人民共和国国家标准

医药工业洁净室(区)浮游菌的 测试方法

GB/T 16293—1996

Test method for airborne microbe in clean
room(area) of the pharmaceutical industry

1 范围

本标准规定了医药工业洁净室和洁净区中浮游菌测试条件、测试方法。

本标准适用于医药工业洁净室和洁净区,无菌室或无菌区域(包括洁净工作台)的浮游菌的测定和环境的验证。

2 引用标准

下列标准包含的条文,通过在本标准中引用而构成为本标准的条文。本标准出版时,所示版本均为有效。所有标准都会被修订,使用本标准的各方应探讨使用下列标准最新版本的可能性。

YY/T 0188.6—1995 药品检验操作规程 第6部分:药品生物测定法

3 定义

本标准采用下列定义。

3.1 洁净室(区) clean room(area)

对尘粒及微生物污染规定需进行环境控制的房间或区域。其建筑结构、装备及其使用均具有减少对该区域内污染源的介入、产生和滞留的功能。

3.2 洁净工作台 cleaning work station

一种工作台或者与之类似的一个封闭围挡工作区。其特点是自身能够供给经过过滤的空气或气体,如垂直层流罩、水平层流罩、垂直层流洁净工作台、水平层流洁净工作台、自净器等。

3.3 菌落 colony forming units

细菌培养后,由一个或几个细菌繁殖而形成的一细菌集落,简称 CFU。通常用个数表示。

3.4 浮游菌 airborne microbe

用本标准提及的方法收集悬浮在空气中的活微生物粒子,通过专门的培养基,在适宜的生长条件下繁殖到可见的菌落数。

3.5 浮游菌浓度 airborne microbe concentration

单位体积空气含浮游菌菌落数的多少,以计数浓度表示,单位是个/ m^3 或个/L。

3.6 悬浮粒子 airborne particles

可悬浮在空气中的尺寸一般在 $0.001\ \mu\text{m}$ ~ $1\ 000\ \mu\text{m}$ 之间的固体、液体或两者的混合物质,包括生物性粒子和非生物性粒子。

3.7 洁净度 cleanliness

洁净环境内单位体积空气含大于或等于某一粒径的悬浮粒子的允许统计数。

3.8 单向流 unidirectional air flow(曾称为层流 laminar flow)

沿着平行流线,以单一通路以一定流速向单一方向流动的气流。

3.9 非单向流 nonunidirectional air flow(曾称为乱流 turbulent flow)

具有多个通路循环特性或气流方向不平行的,不满足单向流定义的气流。

3.10 静态测试 at-rest test

洁净室(区)净化空气调节系统已处于正常运行状态,工艺设备已安装,洁净室(区)内没有生产人员的情况下进行的测试。

3.11 动态测试 operational test

洁净室(区)已处于正常生产状态下进行的测试。

4 测试方法

4.1 方法提要

本方法采用计数浓度法,即通过收集悬游在空气中的生物性粒子于专门的培养基,经若干时间,在适宜的生长条件下让其繁殖到可见的菌落进行计数,从而判定洁净环境内单位体积空气中的活微生物数,以此来评定洁净室(区)的洁净度。

4.2 所用的仪器、设备和培养基

- a) 浮游菌采样器;
- b) 真空抽气泵;
- c) 培养皿;
- d) 培养基;
- e) 恒温培养箱。

4.3 浮游菌采样器

浮游菌采样器宜采用撞击法机理的采样器,一般采用狭缝式采样器或离心式采样器。

4.3.1 采用的浮游菌采样器必须要有流量计和定时器。

4.3.2 狭缝式采样器的原理

狭缝式采样器由附加的真空抽气泵抽气,通过采样器的缝隙式平板,将采集的空气喷射并撞击到缓慢旋转的平板培养基表面上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落,予以计数。

4.3.3 离心式采样器的原理

离心式采样器由于内部风机的高速旋转,气流从采样器前部吸入从后部流出,在离心力的作用下,空气中的活微生物粒子有足够的时间撞击到专用的固形培养条上,经培养后形成菌落,予以计数。

4.3.4 狭缝式采样器的使用要点

应严格按仪器说明书的要求进行操作。

4.3.4.1 校验

采样器必须按仪器的检定周期,定期对仪器作检定,以保证测试数据的可靠性。校验的项目有:定时器、转盘转速、流量计。

4.3.4.2 每次测试前应按说明书上的规定,先接通电源,启动真空抽气泵,然后调节流量计及定时器。

4.3.4.3 空气采样量根据需要选定。已知采样器的流量(L/min),设定采样时间(min),两者相乘即采样量(L)。

4.3.4.4 注意事项

4.3.4.4.1 采样口必须用便于消毒及化学性能稳定的材料制造。

4.3.4.4.2 采样管严禁渗漏,内壁应光滑。

4.3.4.4.3 采样管的长度应根据测点的高度定,尽量减少弯曲。

4.4 真空抽气泵

4.4.1 真空抽气泵的排气量应与采样器匹配。

4.4.2 宜采用无油真空抽气泵,必要时可在排气口安装气体过滤器。

4.4.3 真空抽气泵安装的位置必须适当,一般装在采样器下面。

4.5 培养皿

4.5.1 狭缝式采样器一般采用 $\phi 150\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ 、 $\phi 90\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ 、 $\phi 65\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ 三种规格的硼硅酸玻璃培养皿。可根据所选用采样器选择合适的培养皿。

4.5.2 离心式采样器采用专用的固形培养条。

4.6 培养基

普通肉汤琼脂培养基或其他药典认可的培养基。其配制方法见附录 A(标准的附录)。

4.7 恒温培养箱

必须定期对培养箱的温度计进行检定。

4.8 测试步骤

4.8.1 测试前仪器、培养皿表面必须严格消毒。

4.8.1.1 采样器进入被测房间前先用消毒房间的消毒剂灭菌,用于 100 级洁净室的采样器宜一直放在被测房间内。

4.8.1.2 用消毒剂擦净培养皿的外表面。

4.8.1.3 采样前,先用消毒剂消毒采样器的顶盖、转盘以及罩子的内外面,采样结束,再用消毒剂轻轻喷射罩子的内壁和转盘。

4.8.1.4 采样口及采样管,使用前必须高温灭菌。如用消毒剂对采样管的外壁及内壁进行消毒时,应将管中的残留液倒掉并晾干。

4.8.1.5 采样者应穿戴与被测洁净区域相应的工作服,在转盘上放入或调换培养皿前,双手用消毒剂消毒。

4.8.2 狭缝式采样器的采样程序

4.8.2.1 仪器经消毒后先不放入培养皿,开动真空泵抽气,使仪器中的残余消毒剂蒸发,时间不少于 5 min,并调好流量、转盘转速。

4.8.2.2 关闭真空泵,放入培养皿,盖上盖子后调节采样器缝隙高度。

4.8.2.3 置采样口于采样点后,依次开启采样器、真空泵,转动定时器,根据采样量设定采样时间。

4.8.3 培养

4.8.3.1 全部采样结束后,将培养皿倒置于恒温培养箱中培养。

4.8.3.2 在 $30^{\circ}\text{C} \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养,时间不少于 48 h。

4.8.3.3 每批培养基应有对照试验,检验培养基本身是否污染。可每批选定 3 只培养皿作对照培养。

4.8.4 菌落计数

4.8.4.1 用肉眼直接计数、标记或在菌落计数器上点计,然后用 5~10 倍放大镜检查,有否遗漏。

4.8.4.2 若平板上有 2 个或 2 个以上的菌落重叠,可分辨时仍以 2 个或 2 个以上菌落计数。

4.8.5 注意事项

4.8.5.1 使用前应仔细检查每个培养皿的质量,培养基及培养皿有变质、破损或污染的不能使用。

4.8.5.2 采取一切措施防止采样管的污染和其他人为对样本的污染。

4.8.5.3 对培养基、培养条件及其他参数作详细的记录。

4.8.5.4 由于细菌种类繁多,差别甚大,计数时一般用透射光于培养皿背面或正面仔细观察,不要漏计培养皿边缘生长的菌落,并须注意细菌菌落或培养基沉淀物的区别,必要时用显微镜鉴别。

5 测试规则

5.1 测试状态

- 5.1.1 浮游菌测试前,被测试洁净室(或洁净区)温、湿度须达到规定的要求,静压差、换气次数、空气流速必须控制在规定值内。
- 5.1.2 浮游菌测试前,被测试洁净室(或洁净区)已经过消毒。
- 5.1.3 测试状态有静态和动态两种,测试状态的选择必须符合生产的要求,并在报告中注明测试状态。
- 5.2 测试人员
- 5.2.1 测试人员必须穿戴符合环境级别的工作服。
- 5.2.2 静态测试时,室内测试人员不得多于 2 人。
- 5.3 测试时间
- 5.3.1 对单向流,如 100 级净化房间及层流工作台,测试应在净化空调系统正常运行不少于 10 min 后开始。
- 5.3.2 对非单向流,如 10 000 级、100 000 级以上的净化房间,测试应在净化空调系统正常运行不少于 30 min 后开始。
- 5.4 浮游菌浓度计算
- 5.4.1 采样点数量及其布置
- 5.4.1.1 最少采样点数目

浮游菌测试的最少采样点数目分为日常监测及环境验证两种情况,见表 1。

表 1 最少采样点数目

面 积 m ²	洁 净 度 级 别					
	100		10 000		100 000	
	验 证	监 测	验 证	监 测	验 证	监 测
<10	2~3	1	2	1	2	—
≥10~<20	4	2	2	1	2	—
≥20~<40	8	3	2	1	2	—
≥40~<100	16	4	4	1	2	—
≥100~<200	40	—	10	—	3	—
≥200~<400	80	—	20	—	6	—
400	160	—	40	—	13	—

注: 1) 表 1 中的面积,对于 100 级的单向流洁净室(包括层流工作台),指的是送风口表面积;对于 10 000 级,100 000 级的非单向流洁净室,指的是房间面积。

2) 日常监测的采样点数目由生产工艺的关键操作点来确定。

- a) 对每个 100 级洁净操作区域(如层流罩、层流工作台),可在离药物敞开口处 30 cm 处设测点,每班一次。
- b) 对每个 10 000 级洁净工作区域(如药物开口工作区)可在工作面处设测点,每班一次。
- 5.4.1.2 采样点的位置
- 采样点位置可以同悬浮粒子测试点。
- a) 工作区测点位置离地 0.8 m~1.5 m 左右(略高于工作面)。
- b) 送风口测点位置离开送风面 30 cm 左右。
- c) 可在关键设备或关键工作活动范围处增加测点。
- 采样点布置的规则见附录 B(标准的附录)。

5.4.2 最小采样量

采样量根据日常检测及环境验证定,每次最小采样量见表 2。

表 2 最小采样量

洁净度级别	采样量,L/次	
	日常监测	环境验证
100 级	600	1 000
10 000 级	400	500
100 000 级	50	100

5.4.3 采样次数

每个采样点一般采样一次。

5.4.4 采样注意事项

5.4.4.1 对于单向流或送风口,采样器采样管口朝向应正对气流方向;对于非单向流,采样管口向上。

5.4.4.2 布置采样点时,至少应离开尘粒较集中的回风口 1 m 以上。

5.4.4.3 采样时,测试人员应站在采样口的下风侧。

5.5 记录

测试报告中应记录房间温度、相对湿度、压差及测试状态。

测试报告的编写见附录 C(标准的附录)。

5.6 结果计算

5.6.1 用计数方法得出各个培养皿的菌落数。

5.6.2 每个测点的浮游菌平均浓度的计算,见式(1)。

平均浓度(个 /m³) = $\frac{\text{菌落数}}{\text{采样量}}$ (1)

例 1:某测点采样量为 400 L,菌落数为 1,则:

平均浓度 = $\frac{1}{0.4}$ = 2.5 个/m³

例 2:某测点采样量为 2 m³,菌落数为 3,则:

平均浓度 = $\frac{3}{2}$ = 1.5 个/m³

5.7 结果评定

用浮游菌平均浓度判断洁净室(区)空气中的微生物。

5.7.1 每个测点的浮游菌平均浓度必须低于所选定的评定标准中关于细菌浓度的界限。

5.7.2 若某测点的浮游菌平均浓度超过评定标准,则必须对此区域先行消毒,然后重新采样两次,两次测试结果必须合格。

附录 A
(标准的附录)
培养基的准备及灭菌

A1 培养基的准备

培养基可以外购或自行配制。自行配制方法见 YY/T 0188.6 第 6 章无菌检查部分中关于此类培养基的配备和操作步骤。其他符合药典灵敏度要求的培养基亦可以自行配制。

A2 培养基平皿的制备

A2.1 将培养皿置于 121℃ 湿热灭菌 20 min 或 180℃ 干热灭菌 2 h。

A2.2 将培养基加热熔化,冷却至 45℃ 时,在无菌操作要求下将培养基注入培养皿。

注入量: $\phi 65$ mm 培养皿	约 10 mL
$\phi 90$ mm 培养皿	约 20 mL
$\phi 150$ mm 培养皿	约 60 mL

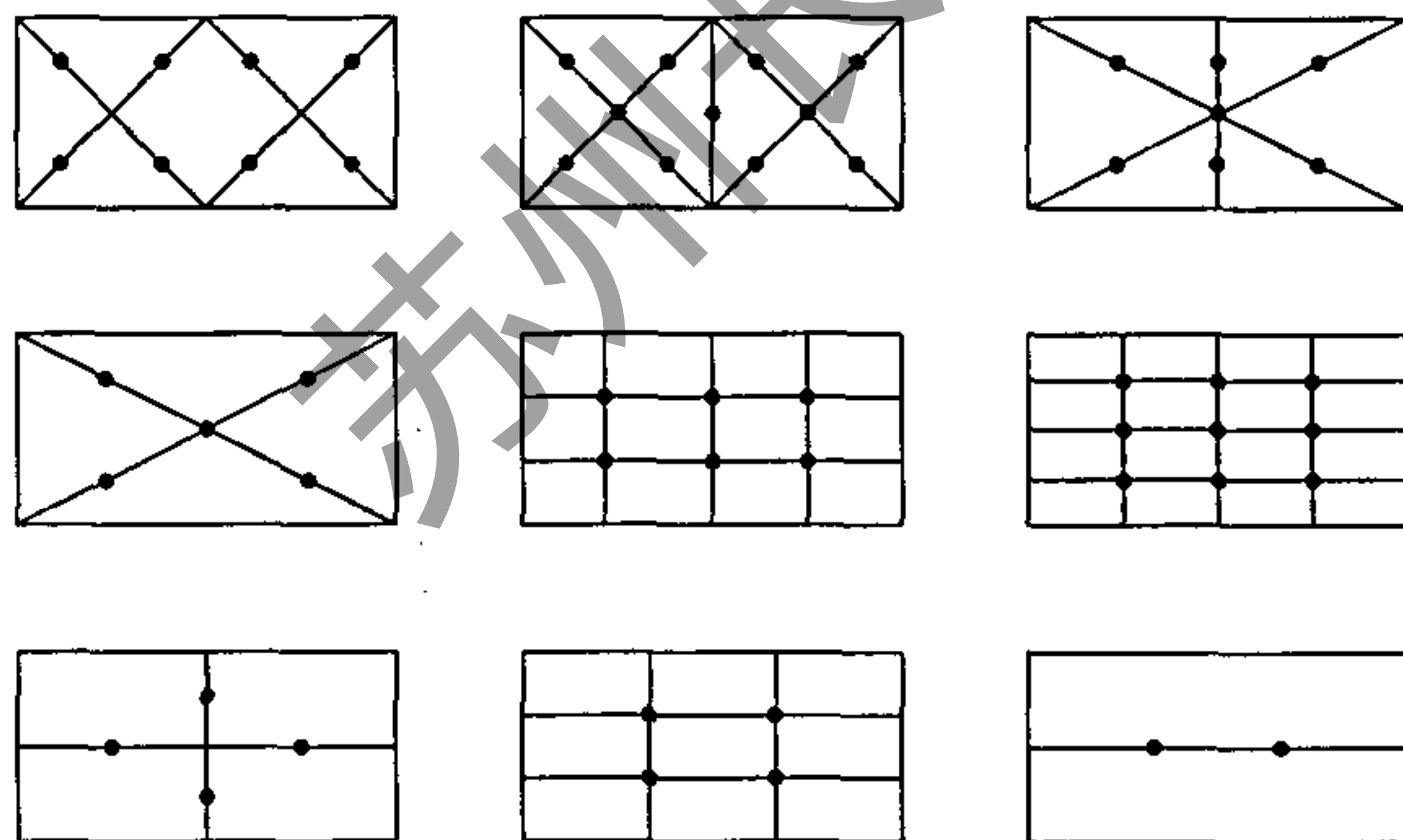
A3 细菌的培养

待琼脂凝固后,将培养基平皿倒置于 30℃~35℃ 的恒温培养箱中培养 48 h,若培养基平皿上确无菌落生长,即可供采样用。

注:培养基平皿宜在 2℃~8℃ 的环境中存放。

附录 B
(标准的附录)
采样点布置

洁净室和洁净区采样点的布置力求均匀,避免采样点在某局部区域过于集中,某局部区域过于稀疏。下列采样点布置的图示可作参考。



注: • 为采样点。

图 B1

附录 C
(标准的附录)
浮游菌测试报告

测试单位_____测试日期_____生产批号_____
测试依据_____测试区域(房间或层流工作台)_____
洁净度级别_____面积_____m² 测试状态_____
温度_____℃ 相对湿度_____ % 静压差_____ Pa
采样器名称_____型号_____培养基名称_____

	送 风 口			工 作 区			
采样点编号 No.							
采样速率,L/min							
采样量,m ³							
开始时间							
菌落数,CFU							
平均浓度,CFU/m ³							

最高浓度_____CFU/m³ 最低浓度_____CFU/m³
评定标准_____结论_____
测试人_____结果报告人_____批准人_____
日期_____日期_____日期_____

附录 D
(提示的附录)
国内外有关浮游菌测定的标准

表 D1

洁净度级别	美国 NASA 标准 NHB5340-2	世界卫生组织(WHO)GMP 及欧洲共同体(EC)GMP	中国卫生部 GMP (1992 年修订)
	生物性粒子最大允许数/m ³	微生物的最大允许数/m ³	活微生物数/m ³
100	3.5	5	≤5
10 000	17.6	100	≤100
100 000	88.4	500	≤500