



中华人民共和国国家标准

GB/T 16293—2010
代替 GB/T 16293—1996

医药工业洁净室(区) 浮游菌的测试方法

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

2010-09-02 发布

2011-02-01 实施

中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局 发布
中国国家标准化管理委员会

目 次

前言	Ⅲ
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 测试方法	1
5 测试规则	3
附录 A (规范性附录) 洁净室(区)采样点布置	6
附录 B (规范性附录) 培养基的灭菌及准备	7
附录 C (资料性附录) 洁净室(区)浮游菌技术要求	10

前 言

本标准参考了 ISO 14698-1《洁净室以及相关环境控制 第1部分:微生物控制》、ISO/TS 11133-1:2000(英文版)《食品和动物饲料的微生物学 培养基制备和生产指南 第1部分:实验室培养基制备的质量保证通用指南》、JGJ 71—1990《洁净室施工及验收规范》而制定。

本标准代替 GB/T 16293—1996《医药工业洁净室(区)浮游菌的测试方法》。

本标准与 GB/T 16293—1996 的主要区别为:

- 增加了“纠偏限度 action levels”和“警戒限度 alert levels”等术语;
- 根据 ISO/TS 11133-1:2000(英文版)标准,采用培养基平皿存放规则。
- 增加了确定最少采样点数目的方法。
- 本标准修改了 4.8.3.2,改为“4.10.2 采用大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)配制的培养皿经采样后,在 30℃~35℃培养箱中培养,时间不少于 2 d;采用沙氏培养基(SDA)配制的培养皿经采样后,在 20℃~25℃培养箱中培养,时间不少于 5 d。”
- 增加了 5.8“日常监控”的内容,增加了洁净室(区)空气微生物浓度控制的纠偏限度和警戒限度的设立和确定取样频次的方法。

本标准的附录 A、附录 B 是规范性附录。

本标准的附录 C 是资料性附录。

本标准由国家食品药品监督管理局提出并归口。

本标准起草单位:上海市食品药品监督管理局测试所,中国食品药品检定研究院医疗器械检验中心。

本标准主要起草人:梁炜、徐敏凤、冯晓明、潘杰青。

本标准所代替标准的历次版本发布情况为:GB/T 16293—1996。

医药工业洁净室(区) 浮游菌的测试方法

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,无菌室或局部空气净化区域(包括洁净工作台)的浮游菌的测试和环境的验证。

2 规范性引用文件

下列文件中的条款通过本标准的引用而成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件,其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版均不适用于本标准,然而,鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件,其最新版本适用于本标准。

GB/T 16292—2010

JGJ 71—1990 洁净室施工及验收规范

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

菌落 colony forming units

微生物培养后,由一个或几个微生物繁殖而形成的微生物集落,简称 CFU。通常用个数表示。

3.2

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。

3.3

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/m³ 或个/L。

3.4

纠偏限度 action levels

对于受控的洁净室(区),由使用者自行设定微生物含量等级。当检测结果超过该等级时,应启动监测程序对该区域的微生物污染情况立即进行跟踪。

3.5

警戒限度 alert levels

对于受控的洁净室(区),由使用者自行设定一个微生物含量等级,从而给定了一个与正常状态相比最早警戒的偏差值。当超过该最早警戒的偏差值时,应启动保证工艺或环境不受影响的程序及相关措施。

4 测试方法

4.1 方法提要

本标准采用的方法是计数浓度法。即通过收集悬游在空气中的生物性粒子于专门的培养基(选择

能证实它能够支持微生物生长的培养基),经若干时间和适宜的生长条件让其繁殖到可见的菌落计数,以判定该洁净室的微生物浓度。

4.2 人员的职责及培训

洁净室(区)的测试人员应进行本专业的培训并获得相应资格后才能履行对洁净室(区)测试的职责,其中包含涉及的卫生知识和基本微生物知识。

洁净室(区)的测试人员应选择与生产操作的空气洁净度级别要求相适应的穿戴方式,外面的衣服不能带进 100 000 级以上的区域。

4.3 仪器、辅助设备和培养基

选择合适的浮游菌采样器,包括采用无油的抽气泵,较低的气流流速和较大的采样流量,以保证培养基表面的水分不被吹干。

本测试需要具备仪器、辅助设备和培养基如下:

- a) 浮游菌采样器;
- b) 培养皿;
- c) 培养基(见本标准附录 B);
- d) 恒温培养箱;
- e) 高压蒸汽灭菌器。

4.4 浮游菌采样器原理

浮游菌采样器一般采用撞击法机理,可分为狭缝式采样器、离心式或针孔式采样器。狭缝式采样器由内部风机将气流吸入,通过采样器的狭缝式平板,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。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圆形培养条上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落。针孔式采样器是气流通过一个金属盖吸入,盖子上是密集的经过机械加工的特制小孔,通过风机将收集到的细小的空气流直接撞击到平板培养基表面上,附着的活微生物粒子经培养后形成菌落。

4.5 测试要点

4.5.1 必须按照测试仪器的检定周期,定期对仪器作检定。使用校验合格,且在使用有效期内的仪器。

4.5.2 测试仪器在未进入被测区域时,若必需,则先清洁表面,或在相应的洁净室内准备和存放(用保护罩或其他适当地外罩保护仪器)。

4.5.3 在 100 级洁净室内用纸时,上面应蒙上一张透明不沾尘的覆盖物,在 100 级洁净室内不能用铅笔和橡皮。

4.5.4 使用测试仪器时应严格按照仪器说明书操作。

4.5.4.1 仪器开机,预热至稳定后,方可按仪器说明书的规定对仪器进行校正,同时检查采样流量,并根据采样量设定采样时间。

4.5.4.2 采样口必须用便于消毒及化学性能稳定的材料制造。

4.5.4.3 采样管严禁渗漏,内壁应光滑。

4.5.4.4 采样管的长度应根据测点的高度定,尽量减少弯曲。

4.6 培养皿

4.6.1 一般采用 $\phi 90\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ 规格的培养皿。可根据所选用采样器选择合适的培养皿。

4.6.2 离心式采样器采用专用的圆形培养条。

4.7 培养基

大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)或沙氏培养基(SDA)或其他用户认可并经验证了的培养基。其配制方法见附录 B。

4.8 恒温培养箱

必须定期对恒温培养箱进行校验。

4.9 测试步骤

4.9.1 测试前仪器、培养皿表面必须严格消毒。

4.9.1.1 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预先放在被测房间内。

4.9.1.2 用消毒剂擦净培养皿的外表面。

4.9.1.3 采样前,先用消毒剂清洗采样器的顶盖、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。

4.9.1.4 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。

4.9.1.5 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,双手用消毒剂消毒或戴无菌手套操作。

4.9.1.6 采样仪器经消毒后先不放入培养皿,开启浮游菌采样器,使仪器中的残余消毒剂蒸发,时间不少于5 min,并检查流量并根据采样量调整设定采样时间。

4.9.1.7 关闭浮游菌采样器,放入培养皿,盖上盖子。

4.9.1.8 置采样口于采样点后,开启浮游菌采样器进行采样。

4.10 培养

4.10.1 全部采样结束后,将培养皿倒置于恒温培养箱中培养。

4.10.2 采用大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)配制的培养皿经采样后,在30℃~35℃培养箱中培养,时间不少于2 d;采用沙氏培养基(SDA)配制的培养皿经采样后,在20℃~25℃培养箱中培养,时间不少于5 d。

4.10.3 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。

4.11 菌落计数

4.11.1 用肉眼对培养皿上所有的菌落直接计数、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。

4.11.2 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。

4.12 注意事项

4.12.1 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。

4.12.2 对培养基、培养条件及其他参数作详细的记录。

4.12.3 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 测试条件

在测试之前,要对洁净室(区)相关参数进行预先测试,这类测试将会提供测试悬浮粒子的环境条件,例如:这种预先测试或可包括:

- a) 温度和相对湿度的测试。洁净室(区)的温度和相对湿度应与其生产及工艺要求相适应(无特殊要求时,温度在18℃~26℃,相对湿度在45%~65%为宜),同时应满足测试仪器的使用范围;
- b) 室内送风量或风速的测试,或压差的测试;
- c) 高效过滤器的泄漏测试。

5.2 测试状态

静态和动态两种状态均可进行测试。

静态测试时,室内测试人员不得多于2人。

浮游菌测试前,被测洁净室(区)由用户决定是否预先消毒。

测试报告中应标明测试时所采用的状态和室内测试人员数。

5.3 测试时间

5.3.1 在空态或静态 a 测试时,对单向流洁净室(区)而言,测试宜在净化空气调节系统正常运行时间不少于 10 min 后开始。对非单向流洁净室(区),测试宜在净化空气调节系统正常运行时间不少于 30 min 后开始。在静态 b 测试时,对单向流洁净室(区),测试宜在生产操作人员撤离现场并经过 10 min 自净后开始;对非单向流洁净室(区),测试宜在生产操作人员撤离现场并经过 20 min 自净后开始。

5.3.2 在动态测试时,则须记录生产开始的时间以及测试时间。

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可参照 GB/T 16292—2010。

5.4.1.2 采样点的位置

浮游菌的采样点位置可参照 GB/T 16292—2010。

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 A。

5.4.2 最小采样量

浮游菌每次最小采样量见表 1。

表 1 最小采样量

洁净度级别	采样量 L/次
100 级	1 000
10 000 级	500
100 000 级	100
300 000 级	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 对于单向流洁净室(区)或送风口,采样器采样口朝向应正对气流方向;对于非单向流洁净室(区),采样口向上。

5.4.4.2 布置采样点时,至少应尽量避开尘粒较集中的回风口。

5.4.4.3 采样时,测试人员应站在采样口的下风侧,并尽量少走动。

5.4.4.4 应采取一切措施防止采样过程的污染和其他可能对样本的污染。

5.4.4.5 培养皿在用于检测时,为避免培养皿运输或搬动过程造成的影响,宜同时进行阴性对照试验,每次或每个区域取 1 个对照皿,与采样皿同法操作但不需暴露采样,然后与采样后的培养皿(TSA 或 SDA)一起放入培养箱内培养,结果应无菌落生长。

5.5 记录

测试报告应包含以下内容:

- a) 测试者的名称和地址,测试日期;
- b) 测试依据;
- c) 被测洁净室(区)的平面位置(必要时标注相邻区域的平面位置);
- d) 有关测试仪器及其测试方法的描述:包括测试环境条件,采样点数目以及布置图,测试次数,采样流量,或可能存在的测试方法的变更,测试仪器的检定证书等;若为动态测试,则还应记录现场操作人员数量及位置,现场运转设备和数量和位置;
- e) 测试结果;包括所有统计计算资料。

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)。

$$\text{浮游菌平均浓度(个/m}^3\text{)} = \frac{\text{菌落数}}{\text{采样量}} \dots\dots\dots(1)$$

示例 1:某测点采样量为 400 L,菌落数为 1,则:

$$\text{浮游菌平均浓度} = \frac{1}{0.4} = 2.5 \text{ 个/m}^3$$

示例 2:某测点采样量为 2 m³,菌落数为 3,则:

$$\text{浮游菌平均浓度} = \frac{3}{2} = 1.5 \text{ 个/m}^3$$

5.7 结果评定

5.7.1 每个测点的浮游菌平均浓度必须低于所选定评定标准中的界限。

5.7.2 在静态测试时,若某测点的浮游菌平均浓度超过评定标准,则应重新采样两次,两次测试结果均合格才能判为符合。

5.8 日常监控

对于浮游菌的监控,宜设定纠偏限度和警戒限度沿单一方向呈平行流线并且与气流方向垂直的断面上风速均匀的气流,以保证洁净室(区)的微生物浓度受到控制。应定期检测以检查微生物负荷以及消毒剂的效力,并作倾向分析。静态和动态的监控都可以采用该方法。

对于浮游菌的取样频次,如果出现下列情况应考虑修改,在评估以下情况后,也应确定其他项目的检测频次:

- 连续超过纠偏限度和警戒限度;
- 停工时间比预计延长;
- 关键区域内发现有污染存在;
- 在生产期间,空气净化系统进行任何重大的维修;
- 日常操作记录反映出倾向性的数据;
- 消毒规程的改变;
- 引起生物污染的事故等;
- 当生产设备有重大维修或增加设备时;
- 当洁净室(区)结构或区域分布有重大变动时。

附录 A
(规范性附录)
洁净室(区)采样点布置

A.1 洁净室(区)采样点布置宜力求均匀,避免采样点在局部区域过于稀疏。下列多点采样的采样点布置图示可作参考(见图 A.1)。

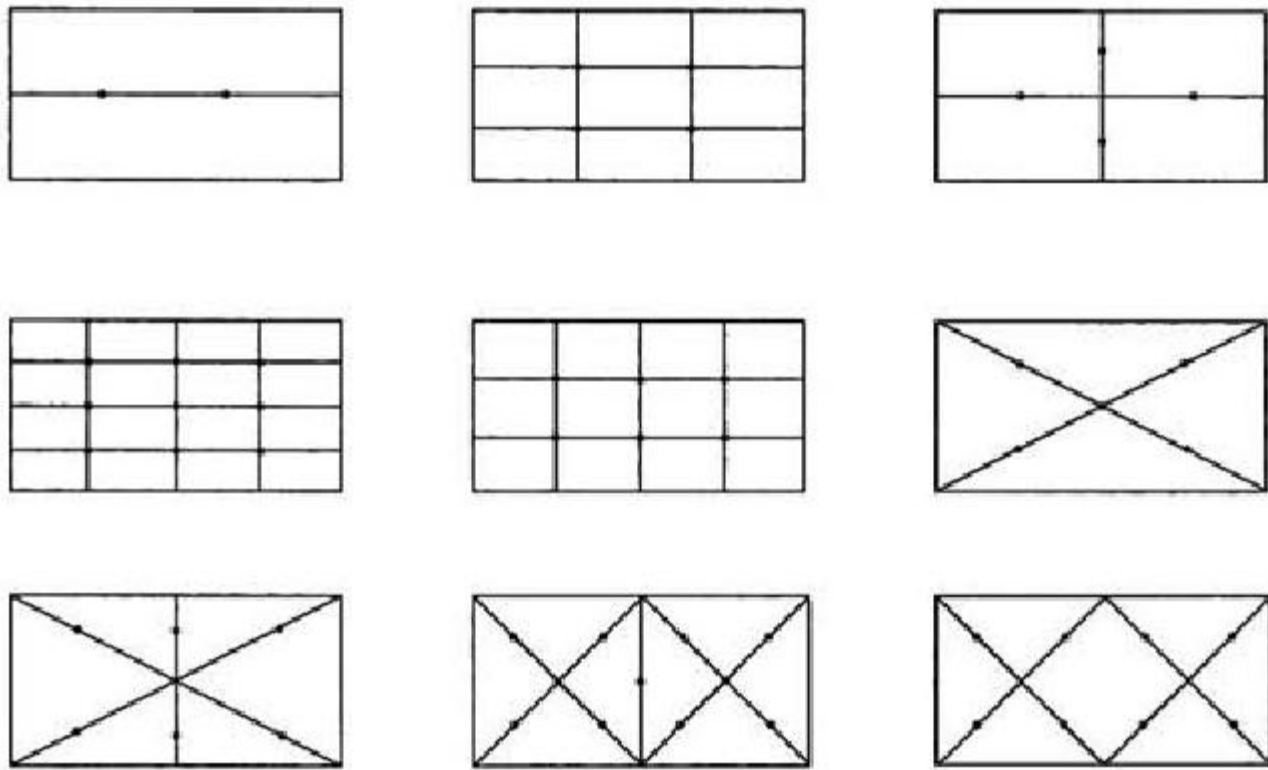


图 A.1 平面采样点布置图

A.2 100级单向流区域,洁净工作台或局部空气净化设施的采样点宜布置在正对气流方向的工作面上,气流形式可参考图 A.2、图 A.3。

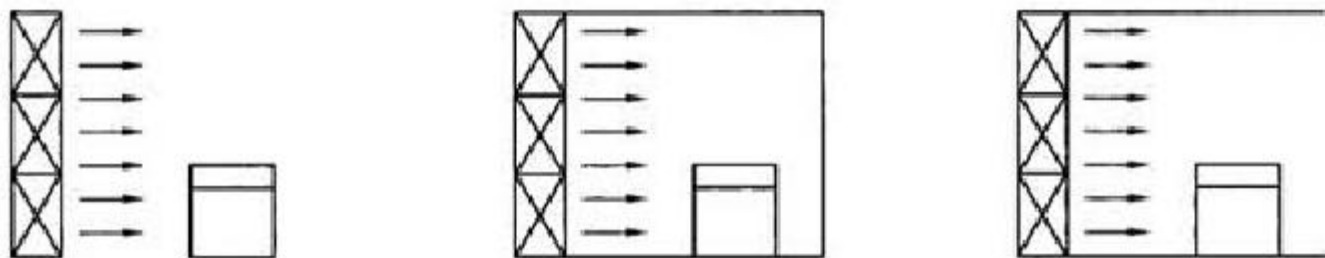


图 A.2 水平单向流的气流形式

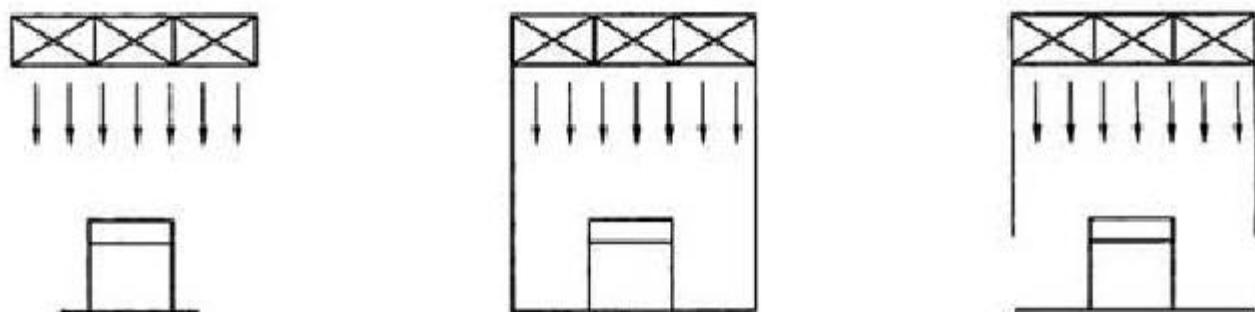


图 A.3 垂直单向流的气流形式

附录 B
(规范性附录)
培养基的灭菌及准备

B.1 大豆酪蛋白琼脂培养基(TSA)培养基的灭菌及准备

B.1.1 培养基采用大豆酪蛋白琼脂培养基,可以按以下处方制备,也可使用按该处方生产的符合要求的脱水培养基。配制后按培养基规定的经验证合格的灭菌程序灭菌。

B.1.2 大豆酪蛋白琼脂培养基配方

酪蛋白胰酶消化物	15 g
大豆粉木瓜蛋白酶消化物	5 g
氯化钠	5 g
琼脂	15 g
纯化水	1 000 mL

取上述成分除琼脂,混合,微热溶解,调节 pH 值使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ,加入琼脂,加热融化后,分装,灭菌,冷却至约 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,在无菌操作要求下倾注约 20 mL 至无菌平皿($\phi 90\text{ mm}^{1)}$)中。加盖后在室温放至凝固。

B.2 沙氏琼脂培养基(SDA)培养基的灭菌及准备

葡萄糖	40 g
酪蛋白胰酶消化物、动物组织的胃酶消化物等量混合	10 g
琼脂	15 g
纯化水	1 000 mL

取上述成分除琼脂,混合,微热溶解,调节 pH 值使灭菌后为 5.6 ± 0.2 ,加入琼脂,加热融化后,分装,灭菌,冷却至约 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$,在无菌操作要求下倾注约 20 mL 至无菌平皿($\phi 90\text{ mm}^{1)}$)中。加盖后在室温放至凝固。

B.3 培养基平皿培养及保存

制备好的培养基平皿宜在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存,一般以一周为宜或按厂商提供的标准执行。采用适宜方法在平皿上做好培养基的名称、制备日期记录的标记。

1) 如采用其他规格的平皿,可适当增减培养基的量,使之在平皿中形成至少 2 mm 厚的琼脂层。

附录 C

(资料性附录)

洁净室(区)浮游菌技术要求

各国医药行业不同洁净度级别对浮游菌的技术要求如表 C.1。

表 C.1 洁净室(间)对浮游菌的技术要求

洁净度级别	澳大利亚 TGA CGMP (2002 年 8 月 16 日)		欧盟 EU CGMP 附录 1 (2008 年 2 月)		美国 FDA CGMP (2004 年 9 月)	药品生产质量 管理规范 (1998 修订)
	CFU/m ³		CFU/m ³		CFU/m ³	浮游菌/m ³
100	A 级	<1	A 级	<1	<1	≤5
—	B 级	≤10	B 级	≤10	≤7(1 000 级)	—
10 000	C 级	≤100	C 级	≤100	≤10	≤100
100 000	D 级	≤200	D 级	≤200	≤100	≤500