

按中华人民共和国药典2020年版 四部 1101 中5的规定执行。

注：胰蛋白胨大豆琼脂培养基也称为胰酪大豆胨琼脂培养基。

6.7 沙氏葡萄糖琼脂培养基

按中华人民共和国药典 2020年版 四部 1101 中7的规定执行。

6.8 无菌分析滤膜

无菌分析滤膜标称孔径为 0.45 μm ；微生物回收率应符合 HG/T XXXX—XXXX 《微生物分析用格栅膜》（与本文件同时发布）中 5.3 的规定，无菌分析滤膜直径选择参见表 2。

表 2 无菌分析滤膜直径选择

| 有效膜面积 cm^2 | 无菌分析滤膜直径 mm |
|------------------------|-------------------------|
| ≤ 1000 | 47、50 |
| > 1000 | 142 |

6.9 截留试验微生物悬液

截留试验微生物悬液应按附录A的规定执行，活菌浓度测定应按附录B的规定执行，菌落形态应符合附录C.1的要求，显微观察应符合C.2的要求，微生物生化特征应符合C.3的要求。

7 操作环境

微生物截留试验应在符合YY 0033中规定的环境洁净度级别为10 000级的生物安全柜中进行。其他试验应在符合YY 0033中规定的环境洁净度级别不低于10 000级的环境中进行。

8 试验步骤

8.1 样品和设备准备

操作步骤如下：

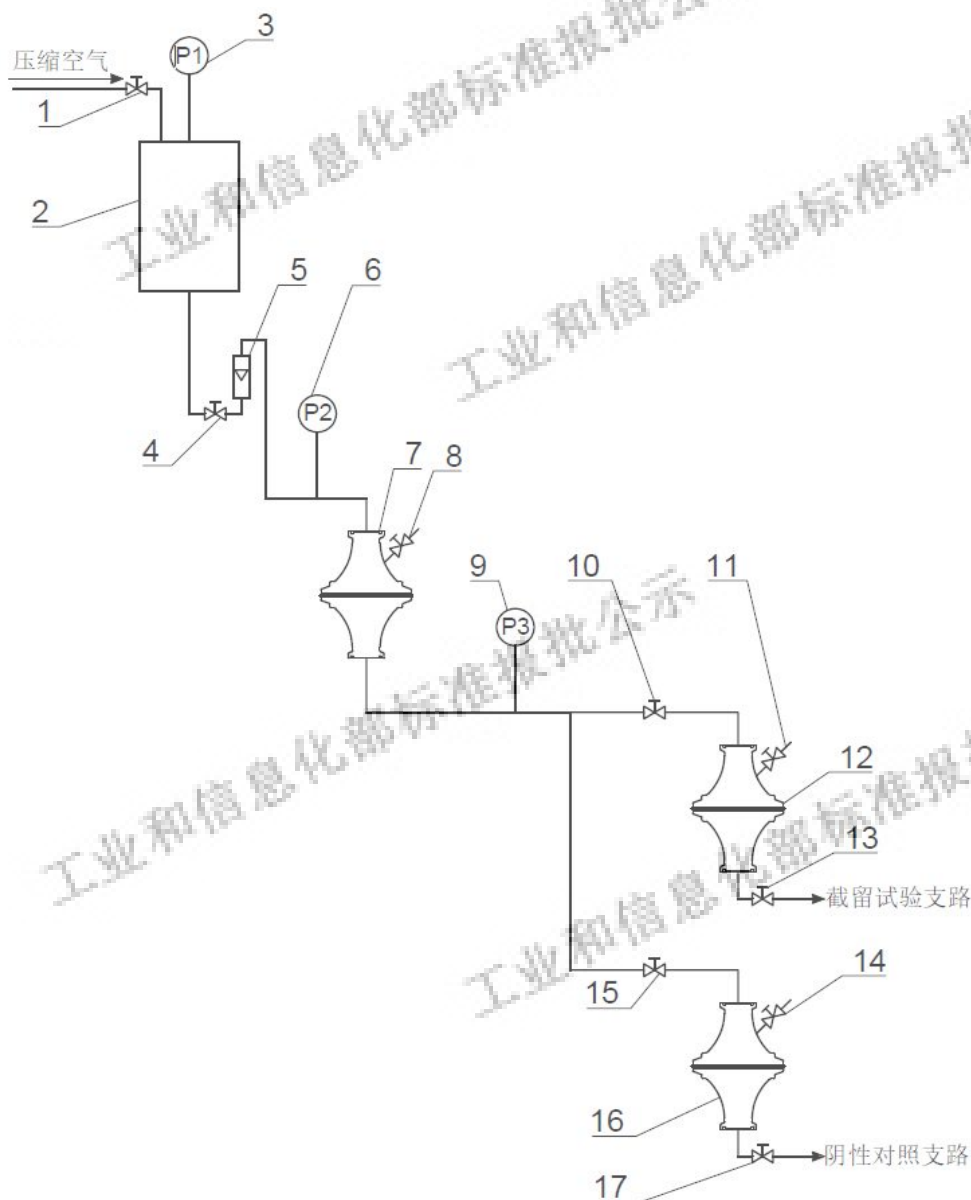
- a) 按图 1 准备各个部件，部件之间未连接；
- b) 试验过滤膜裁切成合适大小的圆片，用符合 6.3 的试验用水浸泡 5 min~10 min，取出后放入图 1 中所示的试验过滤膜夹具（7）中。将平板过滤膜夹具或过滤器（7）所有进口和出口均保持开启状态，并分别用灭菌纸将其包裹，放入压力蒸汽灭菌器中， $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 30 min 或按照制造商说明书进行灭菌。已灭菌的平板过滤膜夹具或过滤器（7）进行试验，不必再次进行灭菌，直接取成品试验；
- c) 压力容器（2）和上游管路依次用符合 6.3 的试验用水清洗、用 5%次氯酸钠溶液或 75%医用乙醇溶液消毒后晾干，并再次用符合 6.3 的试验用水冲洗；
- d) 将图 1 中所示的截留试验分析滤膜夹具（12）、阴性对照试验分析滤膜夹具（16）进口和出口处各接一段管路，用灭菌纸包裹进口和出口处管路，放入压力蒸汽灭菌器中， $121\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$

保持 30 min 或按照制造商说明书进行灭菌，灭菌完毕后转入生物安全柜内冷却。将无菌分析滤膜分别装入截留试验分析滤膜夹具（12）和阴性对照试验分析滤膜夹具（16）中；

- e) 在无菌条件下，按图 1 组装，关闭流量调节阀（10）；
- f) 调节压缩空气调节阀（1），使压力表 P1（3）压力不超过 100 kPa，将 50 mL~100 mL 润湿液通过平板过滤膜夹具或过滤器（7）。

注：过滤膜、过滤器为亲水性材质时，可用无菌生理盐水作为润湿液进行润湿；过滤膜、过滤器为疏水性材质时，试验前按 YY/T 1551.3—2017 中附录 A.1.1 选择润湿液进行润湿。

- g) 关闭压缩空气调节阀（1），压力容器（2）上游连接完整性自动测试仪，用完整性自动测试仪对润湿后的平板过滤膜夹具或过滤器（7）进行完整性检测，通过完整性检测后的过滤膜或过滤器，可进行 8.2 阴性对照试验和 8.3 截留试验；不能耐受完整性检测的过滤膜、过滤器，可不进行完整性检测，可直接进行 8.2 阴性对照试验和 8.3 截留试验。



标引序号说明：

- 1 ——压缩空气调节阀；
 2 ——压力容器：能耐受400 kPa压力；
 3, 6, 9 ——压力表；
 4, 10, 13, 15, 17——流量调节阀；
 5 ——流量计；
 7 ——平板过滤膜夹具或过滤器；
 8, 11, 14 ——排气阀；
 12 ——截留试验分析滤膜夹具；
 16 ——阴性对照试验分析滤膜夹具。

图 1 试验装置示意图

8.2 阴性对照试验

截留试验前应进行阴性对照试验，阴性对照试验分析滤膜与截留试验分析滤膜应同时进行微生物培养，操作步骤如下：

- a) 关闭流量调节阀（4）、（10）、（13）、（15）和（17）；
- b) 在图 1 压力容器（2）内加入不少于 100 mL 体积 6.5 的无菌生理盐水；
- c) 调节压缩空气调节阀（1），使压力表 P2（6）压力不小于 200 kPa；
- d) 缓慢打开流量调节阀（4），让 6.5 的无菌生理盐水充满平板过滤膜夹具或过滤器（7），在液体充满后，关闭排气阀（8）；
- e) 打开流量调节阀（15），在阴性对照试验分析滤膜夹具（16）中充满液体后，关闭排气阀（14）；
- f) 打开流量调节阀（17），调节流量调节阀（4）使平板过滤膜或试验过滤器（7）每平方米有效膜面积流量为 2 mL/min ~ 4 mL/min；
- g) 过滤不少于 100 mL 6.5 的无菌生理盐水后，关闭流量调节阀（4）、（15）、（17）；
- h) 关闭压缩空气调节阀（1）；
- i) 取下阴性对照试验分析滤膜夹具（16），从其下游使用真空泵抽真空 15 s 除去残留液体，无菌操作将分析滤膜从阴性对照试验分析滤膜夹具（16）中取出，放置于符合表 3 规定的培养基平板上，在生化培养箱中，按照表 3 规定的温度和时间培养并观察是否有微生物生长。

表 3 不同试验微生物培养条件

| 试验微生物 | 培养基 | 温度（℃） | 截留试验计数时间 |
|--|-------------|--------|------------------|
| 缺陷短波单胞菌 (<i>Brevundimonas diminuta</i>) | 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 | 30 ± 2 | 第（48~72）h 和第 7 d |
| 黏质沙雷菌 (<i>Serratia marcescens</i>) | 胰蛋白胨大豆琼脂培养基 | 30 ± 2 | 第（24~72）h 和第 7 d |
| 白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) | 沙氏葡萄糖琼脂培养基 | 25 ± 1 | 第（24~72）h 和第 7 d |

8.3 截留试验

操作步骤如下：

- a) 关闭流量调节阀（4）、（10）、（13）；
- b) 在图 1 压力容器（2）中加入制备好的 6.9 微生物悬液，根据 6.9 的截留试验微生物悬液浓度 C 和过滤膜、过滤器的有效膜面积，初步计算出满足平板过滤膜或过滤器每平方厘米有效膜面积承受不低于 10^7 CFU 要求的微生物悬液的体积 V_0 ；
- c) 同 8.2 c)；
- d) 缓慢打开流量调节阀（4），使符合 6.9 规定的微生物悬液充满平板过滤膜夹具或过滤器（7），待液体充满后，关闭排气阀（8）；
- e) 打开流量调节阀（10），在截留试验分析滤膜夹具（12）中充满微生物悬液后，关闭排气阀（11）；
- f) 打开流量调节阀（13），并调节流量调节阀（4）使平板过滤膜夹具或过滤器（7）每平方厘米有效膜面积流量 $2 \text{ mL/min} \sim 4 \text{ mL/min}$ ；
- g) 压力容器（2）的微生物悬液开始过滤，每平方厘米有效膜面积流量 $2 \text{ mL/min} \sim 4 \text{ mL/min}$ ，过滤体积 V 不应小于 V_0 ，关闭流量调节阀（4）、（10）、（13），记录过滤体积 V；
- h) 同 8.2 h)；
- i) 取下截留试验分析滤膜夹具（12），从其下游使用真空泵抽真空不少于 15 s 除去残留液体，无菌操作将分析滤膜从截留试验分析滤膜夹具（12）中取出，放置于符合表 3 规定的培养基平板上，在生化培养箱中，按照表 3 规定的温度和时间培养，根据微生物菌落选择方便计数的时间记录微生物数量 N；
- j) 分析滤膜出现微生物生长，应按照附录 C 鉴定各菌落是试验微生物还是非试验微生物。

9 结果计算

9.1 微生物数量

截留试验微生物悬液过滤前的微生物数量 N_0 按式（1）计算。

$$N_0 = V \times C \quad \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N_0 ——截留试验微生物悬液过滤前的微生物数量，单位为菌落形成单位（CFU）；

V——过滤体积，单位为毫升（mL）；

C——截留试验微生物悬液浓度，单位为每毫升菌落形成单位数量（CFU/mL）。

9.2 对数下降值

9.2.1 截留试验分析滤膜有试验微生物生长

截留试验分析滤膜有试验微生物生长，对数下降值 LRV 按式（2）计算。

$$LRV = \lg N_0 - \lg N \quad \dots\dots\dots (2)$$

式中：

LRV ——对数下降值；

N_0 ——截留试验微生物悬液过滤前的微生物数量，单位为菌落形成单位（CFU）；

N ——截留试验分析滤膜上的微生物数量，单位为菌落形成单位（CFU）。

9.2.2 截留试验分析滤膜无试验微生物生长

截留试验分析滤膜无试验微生物生长，对数下降值 LRV 按式（3）计算

$$LRV > \lg N_0 \quad \dots\dots\dots (3)$$

式中：

LRV ——对数下降值；

N_0 ——截留试验微生物悬液过滤前的微生物数量，单位为菌落形成单位（CFU）。

9.3 微生物挑战水平

9.3.1 截留试验分析滤膜有试验微生物生长

截留试验分析滤膜有试验微生物生长，微生物挑战水平 MCL 按式（4）计算。

$$MCL = LRV - \lg EMA \quad \dots\dots\dots (4)$$

式中：

MCL ——微生物挑战水平；

LRV ——对数下降值

EMA ——有效膜面积，单位为平方厘米（ cm^2 ）。

9.3.2 截留试验分析滤膜无试验微生物生长

截留试验分析滤膜无试验微生物生长，微生物挑战水平 MCL 按式（5）计算。

$$MCL > \lg N_0 - \lg EMA \quad \dots\dots\dots (5)$$

式中：

MCL ——微生物挑战水平；

N_0 ——截留试验微生物悬液过滤前的微生物数量，单位为菌落形成单位（CFU）；

EMA ——有效膜面积，单位为平方厘米（ cm^2 ）。

10 结果判断

10.1 阴性对照试验分析滤膜上有试验微生物生长，或截留试验分析滤膜上无非试验微生物生长，判定试验无效。

10.2 阴性对照试验分析滤膜上有试验微生物生长，截留试验分析滤膜上有试验微生物生长，判定该试验样品不满足截留性能要求。

10.3 阴性对照试验分析滤膜上无试验微生物生长，截留试验分析滤膜上无试验微生物生长，且 MCL 大于 7 时，判定该试验样品满足截留性能要求。

11 试验报告

试验报告内容应包括：

- a) 样品信息（数量、规格、型号、生产批号等）；
- b) 微生物悬液信息（菌种名称、活菌浓度等）；
- c) 操作参数（压差、温度、流量、体积等）；
- d) 各组试验结果；
- e) 结果判断；
- f) 测试日期、测试者；
- g) 检验依据。

12 废弃物处理和污染防治措施

试验过程中的废弃物，收集后进行压力蒸汽灭菌器中 $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持30 min并按医疗废弃物处理。

附录 A

(规范性)

截留试验微生物悬液制备

A.1 试剂

A.1.1 盐水乳糖肉汤培养基

称量1.3 g脱水乳糖肉汤培养基溶于100 mL 6.3的试验用水中，形成乳糖肉汤；称量7.6 g氯化钠溶于盛有970 mL 6.3的试验用水的2 L具塞锥形瓶中；称量30 mL乳糖肉汤溶于970 mL氯化钠溶液。放入压力蒸汽灭菌器中， $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持15 min。

A.1.2 胰蛋白胨大豆琼脂培养基

同6.6。

A.1.3 胰蛋白胨大豆液体培养基

按中华人民共和国药典 2020年版 四部 1101 中2的规定执行。

注：胰蛋白胨大豆液体培养基也称为胰酪大豆胨液体培养基。

A.1.4 沙氏葡萄糖琼脂培养基

同6.7。

A.1.5 沙氏葡萄糖液体培养基

按中华人民共和国药典 2020年版 四部 1101 中6的规定执行。

A.1.6 营养肉汤培养基

按中华人民共和国药典 2020年版 四部 1202 中3.4的规定执行。

A.1.7 无菌生理盐水

同6.5。

A.2 菌种分离

分别对缺陷短波单胞菌、黏质沙雷菌和白色念珠菌的原始0代菌株进行平板划线并按对应菌种说明进行培养以检查菌种纯度。检查菌落形态是否一致，并按附录C对单菌落进行菌种鉴定。

A.3 菌种保藏

A.3.1 储用培养物

A.3.1.1 缺陷短波单胞菌

将A.2得到的缺陷短波单胞菌接种到A.1.2斜面，在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24 h ~ 48 h，随后用无菌液状石蜡覆盖斜面， $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

A.3.1.2 黏质沙雷菌

将A.2分离得到的黏质沙雷菌接种到A.1.2斜面，在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24 h ~ 48 h，随后用无菌液状石蜡覆盖斜面， $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

A. 3. 1. 3 白色念珠菌

将A.2分离得到的白色念珠菌接种到A.1.4斜面，在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下培养24 h ~ 48 h，随后用无菌液状石蜡覆盖斜面， $4\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

A. 3. 2 培养物长期存储

冻干或液氮保存。

A. 4 截留试验微生物原液准备

A. 4. 1 缺陷短波单胞菌

A. 4. 1. 1 在 10 mL A.1.3 中接种 A.3.1.1 缺陷短波单胞菌储用培养物， $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h ~ 48 h。

A. 4. 1. 2 将 A.4.1.1 培养液无菌操作转移入 1 L A.1.1 中，漩涡混合， $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 21 h ~ 27 h。

A. 4. 1. 3 按附录 B 测定活菌浓度。

A. 4. 2 黏质沙雷菌

A. 4. 2. 1 在 10 mL A.1.3 中接种 A.3.1.2 黏质沙雷菌储用培养物， $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h ~ 48 h。

A. 4. 2. 2 将 A.4.2.1 培养液无菌操作转移入 1 L A.1.6 中，漩涡混合， $30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 21 h ~ 27 h。

A. 4. 2. 3 按附录 B 测定活菌浓度。

A. 4. 3 白色念珠菌

A. 4. 3. 1 在 10 mL A.1.5 中接种 A.3.1.3 白色念珠菌储用培养物， $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 24 h ~ 48 h。

A. 4. 3. 2 将 A.4.3.1 培养液无菌操作转移入 1 L 的 A.1.5 中，漩涡混合， $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下培养 21 h ~ 27 h。

A. 4. 3. 3 按附录 B 测定活菌浓度。

A. 5 截留试验微生物原液显微镜观察

对原液进行革兰氏染色，并用相差显微镜进行观察，观察项目如下：

——检查细胞的纯度；

——检查单分散细胞比例，其占比不应小于70%；

——检查细胞形状和尺寸，应符合附录C中表C.2的要求。

A. 6 截留试验微生物悬液制备

A. 6.1 用无菌生理盐水稀释A4.1原液和A4.2原液以制备对应的截留试验微生物悬液，达到约 2×10^6 CFU/mL或以上活菌浓度；A4.3截留试验原液不进行稀释，直接作为截留试验微生物悬液，但浓度需达到不小于 2×10^6 CFU/mL活菌浓度。

A. 6.2 在无菌条件下从所制备的截留试验悬液中取样，按附录B测定活菌浓度。进行截留试验，应确保试验过滤膜每平方厘米有效膜面积至少应加入 10^7 CFU水平的微生物挑战。

示例 1:

用 13 cm^2 有效膜面积的试验过滤膜(或试验过滤器)过滤100 mL活菌浓度为 2×10^6 CFU/mL微生物截留试验悬液时，每平方厘米有效过滤面积承受 1.5×10^7 CFU微生物。

计算过程： $100 \text{ mL} \times 2 \times 10^6 \text{ CFU/mL} \div 13 \text{ cm}^2 = 1.5 \times 10^7 \text{ CFU/cm}^2$

附录 B
(规范性)
活菌浓度测定

B.1 测定前准备

将微生物限度检验仪（阀门保持打开状态）和连接管路用灭菌纸包裹好，放入压力蒸汽灭菌器灭菌中， $121\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 30 min 或按照制造商说明书进行灭菌。灭菌完毕转移至生物安全柜内冷却，将无菌分析滤膜装入夹具内。

B.2 菌液稀释

在无菌条件下从目标菌液中取 1 mL 样品，用无菌生理盐水将菌液样品稀释至 10^{-7} 稀释度。

B.3 浓度测定

采用薄膜过滤法或平板涂布法测定两个平行活菌浓度。

B.3.1 薄膜过滤法

测试步骤如下：

- 分别取 1 mL 适宜稀释度的稀释液，稀释度如： 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 和 10^{-7} ；
- 在微生物限度检验仪滤杯中加入 50 mL 无菌水，再加入 1 mL 上述稀释液，混匀，过滤，再用 50 mL 无菌水冲洗滤杯内壁并过滤；
- 取下分析滤膜，置于符合表 3 规定的培养基平板上、温度和时间下进行培养；
- 取 20 CFU ~ 200 CFU 的平板进行计数；
- 计算两个平行试验的微生物浓度的算术平均值作为该目标菌液的微生物浓度。

B.3.2 直接涂布法

测试步骤如下：

- 分别取 0.1 mL 适宜稀释度的稀释液，如 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} ，置于符合表 3 规定的培养基平板上、温度和时间下进行培养；
- 取 30 CFU ~ 300 CFU 的平板进行菌落计数；
- 计算两个平行试验的微生物浓度的算术平均值作为该目标菌液的微生物浓度。

附录 C

(规范性)

菌种鉴定

C.1 菌落形态

试验微生物的菌落形态，见表C.1。

表 C.1 试验微生物菌落形态

| 项目 | 缺陷短波单胞菌 | 黏质沙雷菌 | 白色念珠菌 |
|----|--------------|--------------|------------|
| 外形 | 圆形、轻微凸起、完整透明 | 圆形、轻微凸起、完整透明 | 圆形、较大、表面光滑 |
| 颜色 | 黄色或米黄色 | 红色 | 乳白色，偶见淡黄色 |

C.2 显微观察

用相差显微镜对试验微生物的进行显微观察，见表C.2。

表 C.2 试验微生物显微观察

| 项目 | 缺陷短波单胞菌 | 黏质沙雷菌 | 白色念珠菌 |
|---------|--|--|---|
| 形状 | 短棒状 | 短棒状 | 圆形或卵圆形，有时有芽生细胞 |
| 尺寸 | $(0.3\ \mu\text{m} \sim 0.4\ \mu\text{m}) \times (0.6\ \mu\text{m} \sim 1.0\ \mu\text{m})$ | $(0.5\ \mu\text{m} \sim 0.8\ \mu\text{m}) \times (0.9\ \mu\text{m} \sim 2.0\ \mu\text{m})$ | 直径 $(3\ \mu\text{m} \sim 6\ \mu\text{m})$ |
| 可动性（活力） | 是 | 是 | 是 |
| 厚膜孢子形成 | 否 | 否 | 是 |
| 芽管形成 | 否 | 否 | 是 |
| 革兰氏染色 | 阴性 | 阴性 | 阳性 |

C.3 生化特征

试验微生物的生化特性，见表C.3。

表 C.3 试验微生物生化特征

| 试验 | 缺陷短波单胞菌 | 黏质沙雷菌 | 白色念珠菌 |
|-----|---------|-------|-------|
| 氧化酶 | + | - | / |
| 催化酶 | + | - | / |
| 吲哚 | - | + | / |

| | | | |
|-----------------------------|---|---|---|
| VP检测 | — | + | / |
| 凝胶液化 | — | + | / |
| 注：“+”表示阳性，“—”表示阴性，“/”表示不适用。 | | | |

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示

工业和信息化部标准报批公示

参 考 文 献

- [1] GB/T 20103—2006 膜分离技术 术语
- [2] SN/T 3970—2014 出口食品中白色念珠菌检测方法
- [3] YY/T 0918—2014 药液过滤膜、药液过滤器细菌截留试验方法
- [4] YY/T 0929.2—2018 输液用药液过滤器第二部分：标称孔径1.2 μm 药液过滤器白色念珠菌截留试验方法
- [5] YY/T 1551.2—2017 输液、输血器具用空气过滤器 第2部分：液体细菌截留试验方法
- [6] ASTM F838—20 Standard test method for determining bacterial retention of membrane filters utilized for liquid filtration
- [7] DIN 58355-3—2005 Membrane filters - Part 3: Bacteria challenge test for flat filters - Requirements and testing