

JJF xxxx—xxxx



中华人民共和国国家计量技术规范

JJF xxxx—xxxx

无菌过滤检测仪校准规范

Calibration Specification for Aseptic Filter Detectors

(征求意见稿)

202x—xx—xx 发布

202x—xx—xx 实施

国家市场监督管理总局发布

无菌过滤检测仪校准规范
Calibration Specification for Aseptic Filter

JJF ××××—××××

Detectors

归口单位：全国生物计量技术委员会

主要起草单位：中国计量科学研究院

参加起草单位：江苏省计量科学研究院

南京市计量监督检测院

本规范委托全国生物计量技术委员会负责解释

本规范主要起草人:

李曼莉 (中国计量科学研究院)

傅博强 (中国计量科学研究院)

参加起草人:

崔宏恩 (江苏省计量科学研究院)

林婧 (南京市计量监督检测院)

张玲 (中国计量科学研究院)

全国生物计量技术委员会

目 录

引 言	1
1 范围	1
2 引用文件	1
3 术语和计量单位	1
4 概述	1
5 计量特性	2
5.1 液体流量重复性	2
5.2 分配均匀性	2
5.3 无菌性	2
5.4 微生物恢复生长性能	2
5.5 微生物挑战性	2
6 校准条件	2
6.1 环境条件	2
6.2 标准物质及试剂、仪器	2
7 校准项目和校准方法	2
7.1 液体流量重复性	2
7.2 分配均匀性	3
7.3 无菌性	4
7.4 微生物恢复生长检测	4
7.5 微生物挑战性检测	4
8 校准结果表达	5
9 复校时间间隔	5
附录 A	6
附录 B	9
附录 C	10
附录 D	12

引 言

JJF 1071《国家计量校准规范编写规则》、JJF 1001《通用计量术语及定义》和JJF 1059.1《测量不确定度评定与表示》共同构成支撑本规范制定工作的基础性系列规范。校准方法及计量特性等主要参考了参考《中华人民共和国药典》2020年版 第四部。

本规范为首次发布。

全国生物计量技术委员会

无菌过滤检测仪校准规范

1 范围

本规范适用于无菌过滤检测仪的校准。

2 引用文件

本规范引用了下列文件：

国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].四部.北京:中国医药科技出版社,2020。

JB/T 20195—2020 集菌仪

凡是注日期的引用文件,仅注日期的版本适用于本规范,凡是不注日期的引用文件,其最新版本(包括所有的修订单)适用于本规范。

3 术语和计量单位

3.1 菌落计数单位 colony forming unit; CFU

指在活菌培养计数时,由单个菌体或聚集成团的多个菌体在固体培养基上生长繁殖所形成的集落,称为菌落形成单位,以其表达活菌的数量。

3.2 过滤器联数 filter paralleling

过滤器并联的杯体数量。

4 概述

无菌过滤检测仪主要由过滤装置和一次性使用全封闭式培养器组成。将供试品通过进样管道连续注入过滤器中,利用过滤器内形成的下压,通过0.45 μm或者0.22 μm孔径的滤膜过滤,供试品中可能存在的微生物被截留收集在滤膜上,通过冲洗滤膜除去供试品的抑菌成分,然后把所需的培养基通过进样管道直接注入过滤器中,放置规定的温度培养。根据过滤器内的培养基浑浊程度,推测供试品内是否含有细菌或者真菌,进而对供试品内的微生物进行检测。

5 计量特性

- 5.1 液体流量重复性
- 5.2 分配均匀性
- 5.3 无菌性
- 5.4 微生物恢复生长性能
- 5.5 微生物挑战性

6 校准条件

6.1 环境条件

6.1.1 环境温度：（15~25）℃。

6.1.2 相对湿度：≤80%。

6.2 标准物质及试剂、仪器

6.2.1 金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和白色念珠菌国家有证标准物质，菌落数量值< 100 CFU。

6.2.2 硫乙醇酸盐流体培养基

6.2.3 胰酪大豆胨液体培养基

6.2.4 0.1%蛋白胨水溶液

6.2.5 磷酸盐蛋白胨水溶液（pH 7.0）

6.2.3 高压灭菌水或注射用水：要求无菌。

6.2.4 移液器：（10~100）μL，（100~1000）μL各1支，经检定合格。

6.2.5 电子天平：分度值0.1 mg，经检定合格。

6.2.6 离心管：15 mL，无菌。

6.2.7 秒表：最大允许误差 ±0.5 s/d。

6.2.8 生物安全柜。

6.2.9 培养箱：温度偏差 ±1.0℃。

6.2.10 高压蒸汽灭菌锅。

7 校准项目和校准方法

7.1 液体流量重复性

打开无菌泵电源，放置好配套的过滤器，设置仪器的流量参数。准备一个装有足量高压灭菌水的瓶子，密封后将瓶子倒置，将过滤器导管针头插入瓶中，同时启动秒表

和无菌泵，采集抽取灭菌水 1 min。待抽取完毕后，用天平称量过滤水的重量，记为 M_i 。重复测量 3 次，按照公式 (1)、(2)、(3) 计算得到液体流量重复性 S_r ，重复性以单次测量的相对实验标准偏差表示。

$$V_i = \frac{M_i}{\rho} \quad (1)$$

$$Q_i = \frac{V_i}{t} \quad (2)$$

$$s_r = \frac{1}{\bar{Q}} \times \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (Q_i - \bar{Q})^2}{(n-1)}} \times 100\% \quad (3)$$

式中：

V_i ——第 i 次测量，仪器过滤水的体积，mL；

M_i ——第 i 次测量，仪器过滤水的重量，g；

ρ ——试验温度下水的密度；

Q_i ——第 i 次测量，仪器液体流量的测量值，mL/min；

\bar{Q} ——被校仪器液体流量 3 次测量值的平均值，mL/min；

S_r ——被校仪器液体流量重复性，%。

n ——被校仪器的测量次数。

7.2 分配均匀性

打开无菌泵电源，放置好配套的过滤器，设置仪器的流量参数，二联过滤器过滤 200 mL 体积的高压灭菌水，三联过滤器过滤 300 mL 体积的高压灭菌水。过滤结束后，收集过滤器内的液体，采用重量法，使用天平称取每个过滤器内液体的重量 m_n 。按照公式 (4) 计算分配差异系数 C_N 。重复测量三次，取三次分配差异系数的平均值作为待校仪器的分配差异系数。

$$C_N = \left| 1 - \frac{m_n}{\bar{m}} \right| \times 100\% \quad (4)$$

式中：

C_N ——单次的分配差异系数，%；

m_n ——单个过滤器内的液体重量，g；

\bar{m} ——二个或三个过滤器内的液体重量的平均值，g。

7.3 无菌性

在生物安全柜中，打开无菌泵电源，放置好配套的过滤器，采用薄膜过滤法，使用二联过滤器，启动无菌泵 5 s 后，对 200 mL 体积的灭菌水进行过滤，待抽滤完毕，其中一瓶加 100 mL 硫乙醇酸盐流体培养基，另一瓶加 100 mL 胰酪大豆胨液体培养基，放置于培养箱内进行培养 14 天。每日观察培养瓶内的浑浊程度并记录。

7.4 微生物恢复生长检测

待测标准物质菌株包括金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉和白色念珠菌。每种菌株设置 10 CFU/mL 和 50 CFU/mL 两种浓度，每个浓度设置 3 个平行组。

采用薄膜过滤法，使用三联过滤器进行实验。在生物安全柜中，打开无菌泵电源，放置好配套的过滤器，取 3 mL 的待测标准物质，启动无菌泵 5 s 后，对其进行过滤，待抽滤完毕，用 100 mL 的冲洗液冲洗，待排空软管内液体后，接种金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌的每个过滤器内加 100 mL 的硫乙醇酸盐流体培养基；接种枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉的过滤器内加 100 mL 的胰酪大豆胨液体培养基。放置于培养箱内进行培养 14 天。阴性对照组参照 7.3 进行。培养过程中每日观察培养瓶内的浑浊程度并记录。

7.5 微生物挑战性检测

将 1 mL 的 (10^6 - 10^7) CFU/mL 粘质沙雷氏菌（针对标称孔径 0.45 μm 级别的滤膜）或者缺陷假单胞菌（针对标称孔径 0.22 μm 级别的滤膜）悬液，使用 PBS 溶液进行梯度稀释，将适宜浓度的菌液过滤到滤膜（20 CFU-60 CFU 为宜）上，用已灭菌的镊子将滤膜放到营养琼脂上进行 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。设置 3 个平行组。对 3 个平行组滤膜上的菌落进行计数，计算平均值，利用稀释倍数计算菌悬液初始菌落数 R_1 。阴性对照组使用 100 mL 的灭菌水，使用抽滤设备过滤到滤膜上，用已灭菌的镊子将滤膜放到营养琼脂上进行 (37 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h。

在生物安全柜中，打开无菌泵电源，放置好配套的过滤器，采用薄膜过滤法，取 1mL 的 (10^6 - 10^7) CFU/mL 粘质沙雷氏菌或者缺陷假单胞菌悬液进行过滤，并用 100 mL 的冲洗液冲洗，待排空软管内液体后，将所有的滤液收集到无菌离心管中，采用滤膜法，将所有滤液过滤到滤膜上，用已灭菌的镊子将滤膜放到营养琼脂上进行 (37 ± 1) °C 培养 24 h。设置 3 个平行组。对 3 个平行组滤膜上的菌落进行计数，计算平均值 R_2 。在阴性对照组无菌生长的前提下，利用公式 (5) 计算截留效率。

$$R = (R_1 - R_2) / R_1 \quad (5)$$

式中：

R——截留效率；

R_1 ——菌悬液初始菌落数，CFU；

R_2 ——滤膜上的菌落数，CFU。

校准原始记录格式见附录 C。

8 校准结果表达

经校准的无菌过滤检测仪，出具校准证书，校准证书应符合 JJF 1071—2010《国家计量校准规范编写规则》中 5.12 的要求，推荐的校准证书（内页）格式内容见附录 D。

9 复校时间间隔

由于复校时间间隔的长短是由仪器的使用情况、使用者、仪器本身质量等诸因素所决定的，因此，送校单位可根据实际使用情况自主决定复校时间间隔。复校时间间隔建议不超过 1 年。

附录 A

培养基的制备

A.1 硫乙醇酸盐流体培养基

胰酪胨	15.0 g
氯化钠	2.5 g
酵母浸出粉	5.0 g
新配制的0.1%刃天青溶液	1.0 mL
葡萄糖/无水葡萄糖	5.5 g/5.0 g
L-胱氨酸	0.5 g
琼脂	0.75 g
硫乙醇酸钠（或硫乙醇酸）	0.5 g（0.3 mL）
水	1000 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1/3，否则，须经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。

除另有规定外，硫乙醇酸盐流体培养基置（30~35）℃培养。

A.2 胰酪大豆胨液体培养基

胰酪胨	17.0 g
氯化钠	5.0 g
大豆木瓜蛋白酶水解物	3.0 g
磷酸氢二钾	2.5 g
葡萄糖/无水葡萄糖	2.5 g/2.3 g

水 1000 mL

除葡萄糖外，取上述成分，混合，微温溶解，滤过，调节pH使灭菌后在25 °C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）°C培养。

A.3 胰酪大豆胨琼脂培养基

胰酪胨	15.0 g
琼脂	15.0 g
大豆木瓜蛋白酶水解物	5.0 g
水	1000 mL
氯化钠	5.0 g

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节pH使灭菌后在25 °C的pH值为 7.3 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，摇匀，分装，灭菌。

A.4 沙氏葡萄糖液体培养基

动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物	10.0 g
葡萄糖	20.0 g
水	1000 mL

除葡萄糖外，取上述成分，混合，微温溶解，调节pH使灭菌后在25 °C的pH值为 5.6 ± 0.2 ，加入葡萄糖，摇匀，分装，灭菌。

A.5 沙氏葡萄糖琼脂培养基

动物组织胃蛋白酶水解物和胰酪胨等量混合物	10.0 g
琼脂	15.0 g
水	1000 mL
葡萄糖	40.0 g

除葡萄糖、琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节pH使灭菌后在25℃的pH值为 5.6 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，再加入葡萄糖，摇匀，分装，灭菌。

A.6 马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）

马铃薯（去皮）	200 g
琼脂	14.0 g
葡萄糖	20.0 g
水	1000 mL

取马铃薯，切成小块，加水1000 mL，煮沸（20~30）min，用6~8层纱布过滤，取滤液补水至1000 mL，调节pH使灭菌后在25℃的pH值为 5.6 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，再加入葡萄糖，摇匀，分装，灭菌。

A.7 0.1%无菌蛋白胨水溶液

取蛋白胨1.0 g，加水1000 mL，微温溶解，必要时滤过使澄清，调节pH值至 7.1 ± 0.2 ，分装，灭菌。

A.8 pH 7.0无菌氯化钠-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1000 mL，微温溶解，必要时滤过使澄清，分装，灭菌。

附录 B

菌液的制备

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（18~24）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中或沙氏葡萄糖琼脂培养基上，（20~25）℃培养（2~3）天，上述培养物用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度菌悬液。接种黑曲霉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pH 7.0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适宜浓度的孢子悬液。

菌悬液若在室温下放置，一般应在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。

附录 C

无菌过滤检测仪校准原始记录格式

(推荐性表格)

客户名称:

联络信息:

器具名称:

生产厂商:

型号/规格:

出厂编号:

委托单号:

证书编号:

校准地点:

校准日期: 年 月 日

环境温度: °C

相对湿度: %

表 D.1 液体流量重复性

流量参数			
组别	水重量M (g)	流量Q (mL/min)	流量重复性 (%)
1			
2			
3			

表 D.2 分配均匀性

过滤器联数				
流量参数				
组别	称量	过滤器1	过滤器2	分配系数
1	空瓶重量 (g)			
	空瓶+液体重量 (g)			
	液体重量 (g)			
2	空瓶重量 (g)			

	空瓶+液体重量 (g)			
	液体重量 (g)			
3	空瓶重量 (g)			
	空瓶+液体重量 (g)			
	液体重量 (g)			

表 D.3 微生物恢复生长检测

菌株	数量 (CFU)	
	10	50
金黄色葡萄球菌		
大肠埃希氏菌		
枯草芽孢杆菌		
生孢梭菌		
白色念珠菌		
黑曲霉		
阴性对照		

表 D.4 微生物挑战检测

菌株				
孔径				
阴性对照(CFU)				
组别	平行1	平行2	平行3	平均值
菌悬液初始菌落数(CFU)				
滤膜上的菌落数(CFU)				
截留效率				

校准员：_____ 核验员：_____

附录 D

校准证书（内页）格式

（推荐性表格）

序号	校准项目	测量值
1	液体流量重复性	
2	分配均匀性	
3	无菌性	
4	微生物恢复生长检测	
5	微生物挑战性检测	

校准员：_____ 核验员：_____