

国家计量技术规范规程制修订

《无菌过滤检测仪校准规范》

编制说明

(征求意见稿)

中国计量科学研究院

江苏省计量科学研究院

南京市计量监督检测院

2023年10月

目 录

一、任务来源	1
二、规范制订的必要性	1
三、《无菌过滤检测仪校准规范》制定过程	2
四、规范制定的主要技术依据及原则	2
(一) 依据	3
(二) 原则	3
五、规范制定说明	3
1、引言	4
2、范围	4
3、引用文件	4
4、术语和计量单位	4
5、概述	4
6、计量特性	4
7、校准条件	5
8、校准项目和校准方法	5
(1) 液体流量重复性	5
(2) 分配均匀性	6
(3) 无菌过滤检测仪的无菌性	7
(4) 微生物恢复生长检测	7
(5) 微生物挑战性检测	8
9、校准结果的表达和复校时间间隔	9
10、附录	9

《无菌过滤检测仪校准规范》

编制说明

(征求意见稿)

一、任务来源

根据国家质量监督检验检疫总局 2021 年国家计量技术法规计划立项（计划项目号***），由中国计量科学研究院承担《无菌过滤检测仪校准规范》的制定工作。

二、规范制订的必要性

针对生物制药领域要求无菌的药品、生物制品、医疗器具、原料、辅料等，国际药典规定注射到血液或进入人体皮下的药剂制品，需要完全达到无菌的状态。当前国内根据《中国药典》2020 年版，主要使用无菌检查法检测药剂制品是否无菌。该方法与美国药典、欧洲药典和日本药典内的无菌检查法是等效的，主要参数和步骤是一致的。

上世纪 70 年代，密理博（Millipore）公司在世界上率先提出了“封闭式无菌检测”的概念，结合检测过程中积累的经验，研制开发了无菌过滤检测仪。目前无菌过滤检测仪已广泛应用于无菌制剂的无菌检查。国外生产无菌过滤检测仪的公司以密理博和赛多利斯为主，国内维科生物和泰林生物等公司也自主研制了无菌过滤检测仪。无菌过滤检测仪由无菌检测泵配套培养器使用，其工作原理是通过无菌检测泵的定向蠕动加压作用，将供试品被过滤，然后在滤器内放入培养基进行培养，以检验供试品是否含菌。无菌过滤检测仪可以检测抗生素类及含有抑菌成分的制剂、无菌原料药、水针剂、灭菌医疗器具、灭菌注射用水等，亦可配合薄膜过滤器用于药品、食品、饮料等行业的微生物限度检查。

无菌检测的结果往往存在假阳性或者假阴性的情况。有时结果呈现阳性，并非产品中携带微生物，而是测试环境、方法或者人员操作等方面带来的污染。此时需要企业花费大量的人力、物力和财力进行长时间的调查，造成资源浪费。有时虽然结果呈现阴性，但产品本身是存在微生物污染的，由于微生物受到抑制或者伤害尚未恢复而最终培养基没有变为浑浊状态，这种情况下企业如果释放产

品，极可能导致微生物在合适的环境下大量繁殖，进而危害患者生命。所以无菌检测是无菌产品放行前极为重要的一步，假阳性或者假阴性的实验结果会对企业带来时间和金钱上的重大损失，更重要的是危害使用者的身体健康。

根据调研，目前药企对产品的无菌检测主要以《中国药典》2020年版第四部中1101无菌检查法为依据，开展相关的检测，但尚未有国家计量技术规范对检测用的无菌过滤检测仪进行校准，同时缺少相关的标准物质。随着新冠疫情的影响，当前疫苗受众群体数量巨大，更加急需相关校准技术规范对无菌过滤检测仪进行计量校准，提高无菌过滤检测仪检测结果的准确性，为评价无菌过滤检测仪的性能提供科学依据，保障人类的健康与社会经济的发展。

三、《无菌过滤检测仪校准规范》制定过程

1、2021年11月，全国生物计量技术委员会对《无菌过滤检测仪校准规范》进行立项，由中国计量科学研究院承担，江苏省计量科学研究院、南京市计量监督检测院参加起草，项目正式启动。

2、2021年12月-2022年3月，规范起草组通过电话和邮件的方式，就规范的架构设定、校准项目、具体指标等，与生产厂家、应用客户、省级计量机构等进行了沟通，对每个条目的合理性、科学性、适用性、严谨性等进行了详细的探讨，广泛听取了建议和意见。

3、2022年4月-9月，规范起草组依据相关文件、行业标准、生产商出厂质检要求等，起草了《无菌过滤检测仪校准规范》（草稿），并向生产厂家、应用客户、省级计量机构等进一步征求意见。

4、2022年10月-2023年7月，根据《无菌过滤检测仪校准规范》（草稿）中的内容，研制标准物质，开展校准规范的验证实验。

5、2023年8月-10月，根据验证实验结果，继续对校准方法进行验证和完善，形成《无菌过滤检测仪校准规范》（征求意见稿）和编制说明。

四、规范制定的主要技术依据及原则

（一）依据

《无菌过滤检测仪校准规范》依据JJF 1071—2010《国家计量校准规范编写规则》等完成规范的制定。在本规范制定过程中，主要参考了2020版中华人民共和国药典。

（二）原则

1、架构

架构上按照范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准结果表达、复校时间间隔 9 个部分制定《无菌过滤检测仪校准规范》。

2、术语与计量单位的选择

术语和计量单位，选取了与本标准相关的关键术语。主要给出了仪器的重要参数过滤器联数和菌落计数单位（CFU）的定义。

3、计量特性确定原则

选取目前各药厂应用的不同型号、不同厂家生产的无菌过滤检测仪，根据无菌过滤检测仪在实际应用中的主要功能和性能指标，考虑其具体应用的要求，参考 2020 版中华人民共和国药典和 JB/T 20195—2020《集菌仪》中的要求，确定本规范的计量特性。

4、标准物质选则的原则

无菌过滤检测仪在实际应用中，需对药品药剂的无菌性和微生物恢复生长性能进行验证。参照 2020 版中华人民共和国药典中的验证方法，微生物的验证菌种包括金黄色葡萄球菌、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，且菌落数量值 <100 CFU。故本规范标准物质选择金黄色葡萄球菌、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标准物质，并使用平板计数法进行培养定值。

五、规范制定说明

《无菌过滤检测仪校准规范》包括封面、扉页、目录、引言、范围、引用文件、术语和计量单位、概述、计量特性、校准条件、校准项目和校准方法、校准

结果表达、复校时间间隔以及附录几个部分，根据《JJF 1071-2010 国家计量校准规范编写规则》撰写。

1、引言

《无菌过滤检测仪校准规范》依据 JJF 1071-2010 《国家计量校准规范编写规则》等完成规范的制定。在本规范制定过程中，主要参考了《中华人民共和国药典》2020 年版 第四部。

2、范围

确定了《无菌过滤检测仪校准规范》的适用范围，即适用于无菌过滤检测仪的校准，包括集菌仪。

3、引用文件

本规范引用了下列文件(1)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; (2) 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（包括所有的修改单）适用于本规范。

4、术语和计量单位

主要对菌落计数单位和过滤器联数 2 个重要名词进行了定义。

5、概述

在概述部分，主要对无菌过滤检测仪的用途、原理、仪器组成结构进行了介绍。

6、计量特性

在计量特性部分，主要针对无菌过滤检测仪的组成和性能，选择一定数量的、

不同型号的仪器进行试验测定和测试。通过分析一定数量、具有代表性的不同型号、不同厂家生产的无菌过滤检测仪得到的实验数据，综合无菌过滤检测仪在实际应用中的主要性能指标，考虑其具体应用的要求，形成本规范确定的计量参数，包括液体流量重复性、分配均匀性、无菌性、微生物恢复生长性能和微生物挑战性。根据《JJF 1071—2010 国家计量校准规范编写规则》的要求，计量特性指标中未给出各项计量特性指标的具体限定值。

7、校准条件

本部分主要规定了无菌过滤检测仪校准时需要满足的环境条件，以及使用的标准物质、试剂和仪器。

在环境条件中，要求校准时实验室温度应当控制在 $15\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 之间，相对湿度： $\leq 80\%$ 。

在校准过程中，所用到的标准物质有金黄色葡萄球菌、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标准物质，以及相关试剂包括硫乙醇酸盐流体培养基、胰酪大豆胨液体培养基、0.1%蛋白胨水溶液、磷酸盐蛋白胨水溶液（pH 7.0）和高压灭菌水或无菌注射用水。在标准物质部分，推荐校准时采用国家有证标准物质，标称值应溯源至平皿培养法的CFU值。

对测量标准及其它设备，要求使用移液器： $(10\sim 100)\text{ }\mu\text{L}$ ， $(100\sim 1000)\text{ }\mu\text{L}$ 各1支，经检定合格；电子天平：分度值 0.1 mg ，经检定合格；离心管： 15 mL ，无菌；秒表：最大允许误差 $\pm 0.5\text{ s/d}$ ；生物安全柜；培养箱：温度偏差 $\pm 1.0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ；高压蒸汽灭菌锅。

8、校准项目和校准方法

(1) 液体流量重复性

无菌过滤检测仪基于薄膜过滤法原理，通过无菌泵将样品介质转移至过滤单元，加压完成过滤。此过程需要确认无菌泵的流量参数与技术要求是否相符合，无菌泵的流量可以通过过滤一定体积的液体，通过计时计算实际流量。具体校准

方法如下：

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。准备一个装有足量无菌水的瓶子，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。

(2) 分配均匀性

培养器每个滤杯内待测试液体的分配应达到一定的均匀性标准。分配均匀性可通过重量法，称取液体的重量，计算分配差异系数。具体校准方法如下：

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 体积的灭菌水，三联过滤器过滤 300 mL 体积的灭菌水。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测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；

(3) 无菌过滤检测仪的无菌性

无菌过滤检测仪所使用的仪器和配套耗材需要保证无菌，等同于该仪器的背景噪声值的检测，检测方法与微生物恢复生长验证项目中的阴性对照组试验方法一致。具体校准方法如下：

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。

(4) 微生物恢复生长检测

微生物恢复生长试验计划通过对一次性使用全封闭培养器的生物学性能进行测试，确认培养器对试验菌恢复生长是否有影响。检测菌株有金黄色葡萄球菌、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。可选用的培养基有硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基，冲洗液可选择 0.1% 蛋白胨水溶液和 pH 7.0 的磷酸盐蛋白胨水溶液。经过滤处理后，将接种上述试验菌种的培养器分别置于不同的温度条件下进行培养，计量阴性对照组和接种试验菌的培养器内培养基的浑浊程度。具体校准方法如下：

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。

(5) 微生物挑战性检测

微生物挑战性检测计划对培养器内过滤膜的完整性进行确认，针对标称孔径 0.45 μm 级别的滤膜，使用粘质沙雷氏菌进行检测；针对标称孔径 0.22 μm 级别的滤膜，使用缺陷假单胞菌进行检测；通过计量截留效率验证过滤膜的完整性。具体校准方法如下：

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 1 mL 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) $^{\circ}\text{C}$ 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 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。

9、校准结果的表达和复校时间间隔

经校准后的无菌过滤检测仪应填发校准证书，校准证书应符合 JJF1071—2010 中 5.12 的要求，并给出各校准项目名称和测量结果。

复校时间间隔原则上由用户决定，建议不超过 1 年。

10、附录

本部分主要对培养基的制备、菌液的制备、无菌过滤检测仪校准原始记录格式、校准证书（内页）内容等进行了具体的描述和规定。

《无菌过滤检测仪校准规范》制定起草小组

2023 年 10 月