



中华人民共和国国家标准

GB/T 16294—20XX
代替 GB/T 16294—2010

医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法

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

(点击此处添加与国际标准一致性程度的标识)

(征求意见稿)

在提交反馈意见时，请将您知道的相关专利连同支持性文件一并附上。

20XX-XX-XX 发布

20XX-XX-XX 实施

国家市场监督管理总局
国家标准化管理委员会 发布

目 次

前 言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 人员要求 1

5 主要仪器设备 2

6 培养基 2

7 方法适用性试验 2

8 测试条件 2

9 测试方法 2

 9.1 确定采样点 2

 9.2 采样步骤 3

 9.3 培养计数 3

10 试验报告 3

附 录 A （资料性） 方法适用性试验指南 4

 A.1 概述 4

 A.2 试验组 4

 A.3 菌液对照组 4

 A.4 本底对照组 4

 A.5 计算回收率 4

 A.6 结果判断 5

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

本文件代替GB/T 16294-2010《医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法》，与GB/T 16294-2010相比，除结构调整和编辑性改动外，主要技术变化如下：

- 更改了术语和定义（见第3章，2010年版的第3章）；
- 增加了培养基的要求（见第6章）；
- 增加了“方法适用性试验”（见第7章和附录A）；
- 更改了采样点数目和位置的要求（见9.1，2010年版的5.4.1、附录A）；
- 删除了“最少培养皿数”的要求（见2010年版的5.4.2）；
- 更改了培养皿暴露时间的要求（见9.2.2、9.2.3，2010年版的4.4.3）；
- 更改了培养条件（见9.3.2，2010年版的4.4.5）；
- 删除了“结果计算”（见2010年版的5.6）；
- 删除了“结果评定”（见2010年版的5.7）；
- 删除了“日常监控”（见2010年版的5.8）；
- 删除了“洁净室（区）采样点布置”（见2010年版的附录A）；
- 删除了“培养基的灭菌及准备”（见2010年版的附录B）；
- 删除了“洁净室（区）沉降菌技术要求”（见2010年版的附录C）。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由国家药品监督管理局提出。

本文件由全国医用输液器具标准化技术委员会（SAC/TC 106）归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

本文件所代替文件的历次版本发布情况：

本文件于1996年首次发布，2010年第一次修订，本次为第二次修订。

医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法

1 范围

本文件规定了医药工业洁净室（区）沉降菌的测试方法。

本文件适用于医药工业洁净室（区）洁净厂房、洁净实验室等的沉降菌测试。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

中华人民共和国药典 2020年版 四部

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

被动式采样法 *passive air sampling*

通过重力作用而自然沉降的方式进行采样的方法。

3.2

沉降菌 *settling microbe*

本文件特指通过被动式采样法收集到的悬浮在空气中的活微生物。

3.3

沉降菌数 *settling microbe count*

规定时间内每个采样点的培养皿收集到空气中的沉降菌菌落数，以cfu表示。

3.4

静态 *at-rest*

洁净室或洁净区建成且设备就位，按议定的方式运行，但无人员在场的状态。

[来源：GB/T 25915.1-2021，3.3.2]

3.5

动态 *operational*

洁净室或洁净区设施按议定方式运行，且有规定数量的人员按议定方式工作的状态。

[来源：GB/T 25915.1-2021，3.3.3]

4 人员要求

洁净室（区）的测试人员应接受卫生和微生物学基础知识等相关专业知识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。应使测试活动对洁净室（区）的干预降至最低。

5 主要仪器设备

培养箱、压力蒸汽灭菌器等，应定期对其进行校准。

6 培养基

一般选择胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA），当监测结果有疑似真菌或考虑季节因素影响时，可增加沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA）。

培养基应符合《中华人民共和国药典》2020 年版 四部的相关要求。在进行培养基适用性检查时，应采用“9.3 培养计数”中的培养方案。

7 方法适用性试验

应进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该洁净室（区）的沉降菌测试。若测试方法或洁净室（区）条件发生变化可能影响测试结果时，应重新进行适用性试验。方法适用性试验指南见附录 A。

8 测试条件

应在空气净化系统运行一定时间后开始测试，运行时间可根据洁净室（区）自净时间确定。

9 测试方法

9.1 确定采样点

应基于洁净室（区）面积和布局、产品类别、生产工艺、人流、物流、洁净室（区）历史数据（若有）等因素进行风险评估，以确定采样点数目和采样点位置。采样点高度一般离地0.8 m~1.5 m（尽可能靠近工作表面，宜距离操作30 cm内）。最少采样点数目见表1。

表1 洁净室（区）沉降菌最少采样点数目

洁净室（区）面积 m ²	最少采样点数目
≤8	1
>8~28	2
>28~52	3
>52~68	4
>68~104	5
>104~148	6
>148~232	7
>232~436	8
>436~1000	9
>1000	见公式（1）

$$N_L = \frac{\left(27 \times \left(\frac{A}{1000}\right)\right)}{3} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

N_L —最小采样点数目，带小数时向上进位取整数；

A ——待测洁净室（区）的面积，单位为平方米（ m^2 ）。

9.2 采样步骤

9.2.1 按设定的采样点数目和位置逐个放置采样培养皿，从里到外逐个打开培养皿盖，使培养基表面暴露在空气中。采样培养皿应尽量避免避开回风口。

9.2.2 对静态洁净室（区）进行测试时，采样时间宜为 4 h。对动态洁净室（区）进行测试时，药品 A 级、B 级及医疗器械静态 100 级洁净室（区）宜在整个操作期间采样，其他洁净级别应基于风险评估确定采样时间。

9.2.3 采用经方法适用性试验确定的暴露时间进行暴露采样。每个采样点可使用多个采样培养皿连续进行采样。

9.2.4 取同批次制备的培养皿作为阴性对照，与采样培养皿同法操作但不进行暴露采样，培养后阴性对照培养皿应无菌生长，否则测试无效。

9.3 培养计数

9.3.1 采样结束后，将培养皿倒置于培养箱中进行培养。

9.3.2 对于环境微生物种群不确定的情况下，可先在 20℃～25℃培养 2 天～3 天后再转移至 30℃～35℃培养 3 天～4 天。宜根据环境污染微生物历史数据及种群特性调整培养方案。

9.3.3 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。若培养皿上有 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。

10 试验报告

试验报告应包含以下内容：

- a) 测试洁净室（区）名称、地址；
- b) 测试洁净室（区）占用状态；
- c) 测试洁净室（区）环境条件；
- d) 测试洁净室（区）人数；
- e) 测试人数；
- f) 测试时间；
- g) 测试依据；
- h) 采样点数目及布置图；
- i) 培养基种类、培养条件、培养时间；
- j) 每个采样点沉降菌数。

附 录 A

（资料性）

方法适用性试验指南

A.1 概述

本附录为沉降菌方法适用性试验的设计提供指南。采样培养皿的暴露时间是沉降菌测试方法的重要参数。相较于浮游菌和表面微生物测试，用于沉降菌测试的采样培养皿需要较长的暴露时间。放置在高气流、湍流、高温或低湿条件下的采样培养皿可能会变干或以其他方式改变其特性，例如溶解气体、pH 值的变化或培养基某些成分的变质等，从而使先前沉降或新捕获的微生物死亡。应进行方法适用性试验对采样培养皿在特定使用条件下的暴露时间进行验证，以证明暴露操作不对所用培养基的促生长能力产生任何负面影响。

A.2 试验组

A.2.1 接种微生物

一般使用《中华人民共和国药典》2020年版 四部推荐的标准菌株进行，必要时可加入从环境分离的具有代表性的菌株。从环境分离的具有代表性的菌株可包含革兰氏阳性杆菌、革兰氏阳性球菌、丝状霉菌或酵母、革兰氏阴性杆菌。接种菌数量宜小于100 cfu, 以测试采样培养皿对较低数量微生物的促生长能力。为避免因接种较大体积的微生物悬液而使采样培养皿含水量发生变化，接种体积宜不大于0.1 mL。

A.2.2 暴露采样

一般情况下，洁净室（区）不允许进行活菌操作，以免影响正常生产条件。此时，宜在模拟洁净室（区）实际气流及温湿度条件的情况下，让接种微生物的采样培养皿进行暴露采样。单个采样培养皿的暴露时间应结合洁净室（区）实际采样时间进行设计，一般不大于4 h。

A.2.3 微生物回收

按照拟定好的培养条件和培养时间进行微生物回收。

A.3 菌液对照组

按照试验组A.2.1、A.2.3同法操作，接种微生物，不进行暴露采样。

A.4 本底对照组

按照试验组A.2.2、A.2.3同法操作，不接种微生物，进行暴露采样。

A.5 计算回收率

按照公式A.1计算回收率：

$$R = \frac{M-P}{A} \times 100\% \dots\dots\dots (A.1)$$

式中：

R ——回收率，单位为%；

M ——试验组菌落数，单位为cfu；

P ——本底对照组菌落数，单位为cfu；

A ——菌液对照组菌落数，单位为cfu。

A.6 结果判断

每种接种微生物的回收率均应在50 %~200 %之间。

征求意见稿

参 考 文 献

- [1] GB/T 25915.1-2021 洁净室及相关受控环境 第1部分：按粒子浓度划分空气洁净度等级
- [2] 《中华人民共和国药典》2020年版 四部

征求意见稿