药品包装材料生产厂房洁净室（区）的测试方法

Yaopin Baozhuangcailiao Shengchanchangfang Jiejingshi（qu）de Ceshifangfa

Test for Clean Rooms（Areas）Producing Pharmaceutical Packaging Materials

本标准适用于药品包装材料生产厂房洁净室（区）的测试。

【定义】

（1）洁净室 clean room　对空气悬浮粒子及微生物浓度受控的房间或区域。它的建筑结构、装备和使用应具有减少室内诱入、产生及滞留污染源的功能。室内其他有关参数如温度、湿度、压力等按要求进行控制。

（2）单向流 unidirectional airflow　指空气朝着同一个方向，以稳定均匀的方式和足够的速率流动的气流。与水平面垂直的叫垂直单向流（vertical unidirectional airflow），与水平面平行的叫水平单向流（horizontal unidirectional airflow）。单向流能持续清除关键操作区域的颗粒。

（3）非单向流 non-unidirectional airflow　具有多个通路循环特性或气流方向不平行的气流。

（4）悬浮粒子 airborne particle　用于空气洁净度分级的空气悬浮粒子尺寸范围在 0.1～5.0 μm 的固体或液体粒子。

（5）洁净度 cleanliness　以单位体积空气中某一粒径粒子的数量来区分的洁净程度。

（6）隔离操作器 isolator　指配备 A 级或更高洁净度级别的空气净化装置，并能使其内部环境始终与外界环境（如其所在洁净室和操作人员）完全隔离的装置或系统。

（7）*t* 分布 *t* distribution　正态总体中的一种抽样分布，其分布函数为：

$$t=\frac{\text{总体平均值}-\text{样本平均值}}{\text{标准误差}}$$

（8）置信上限（UCL）upper confidence limit　从正态分布抽样得到的实际均值按给定的置信度（本标准为 95%）计算得到的估计上限将大于此实际均值，则称计算得到的这一均值估计上限为置信上限。

（9）菌落 colony forming units　细菌培养后，由一个或几个细菌繁殖而形成的一细菌集落，缩写为 CFU，通常用个数表示。

（10）浮游菌 airborne microbe　通过收集悬游在空气中的生物性粒子于专门的培养基，经若干时间，在适宜的生长条件下让其繁殖到可见的菌落计数。单位体积空气中含浮游菌菌落数的数量，以计数浓度表示，单位是 cfu/m^3。

（11）沉降菌 settling microbe　通过自然沉降原理收集在空气中的生物粒子于专门的培养基，经若干时间，在适宜的生长条件下让其繁殖到可见的菌落计数。单位体积空气中含沉降菌菌落数的数量，以计数浓度表示，单位是 cfu/m^3。

（12）洁净工作区 clean working area　指洁净室（区）内离地面高度 0.8～1.5 m（除工艺特殊要求外）的区域。

（13）洁净工作台 clean bench　能够保持操作空间所需洁净度的工作台，或与之类似的一个封闭围挡工作区。

（14）洁净工作服 clean working garment　把工作人员产生的粒子限制在最小程度所使用的发尘量少的洁净服装。

（15）静态 as-rest　指所有生产设备均已安装就绪，但没有生产活动且无操作人员在场的状态。并且生产操作全部结束、操作人员撤出生产现场并经 15～20 分钟（指导值）自净后，洁净区的悬浮粒子应当达到“静态”标准。

（16）动态 operational　指生产设备按预定的工艺模式运行并有规定数量的操作人员在现场操作的状态。

（17）检漏试验 leakage test　检查空气过滤器及其与安装框架连接部位等的密封性试验。

（18）高效空气过滤器（HEPA）high efficiency particulate air filter　在额定的风量下，对粒径大于等于 0.3 μm 粒子的捕集效率在 99.9%以上以及气流阻力在 250 Pa 以下的空气过滤器。

（19）自净时间 recovery time　洁净室被污染后，空气净化空调系统开始运行至恢复到稳定的规定室内洁净度等级的时间。

（20）验证 validation　证明任何程序、生产过程、设备、物料、活动或系统确实能达到预期结果的有文件证明的一系列活动。

（21）再验证 revalidation　为了重新确定工艺的可靠性而重复进行的一部分或全部的验证试验。

（22）纠偏限度 action levels　对于受控的洁净室（区），由使用者自行设定悬浮粒子和微生物含量等级。当测试结果超过规定等级时，应启动监测程序对该区域的悬浮粒子和微生物污染情况立即进行跟踪。

（23）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悬浮粒子和微生物含量等级，从而给定了一个与正常状态相比最早报警的偏差值。当超过该最早报警的偏差值时，应启动保证工艺或环境不受影响的程序及相关措施。

【人员的职责及培训】 所有的工作人员，包括与测试、维护有关的人员，应该定期接受与洁净室（区）生产有关的培训，其中包含涉及到的卫生知识和基本微生物知识。如果没有接受过这种训练的外来人员（包括建筑或维护的人员）必须进入洁净室（区），那么必须对他们进行指导和监督。

参与动物组织或微生物试验的人员一般情况下不宜进入洁净室（区），除非有相应的严密措施和明确的规程指导。对进入洁净室（区）的人员应有相应的卫生标准，所有工作人员应随时报告非正常的污染（身体灰尘或疾病），并进行每年一次的体检。

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。

【仪器装置】

（1）在适当的情况下，对洁净室（区）的测试仪器的需求和功能进行评估，减少潜在的测试隐患；

（2）测试仪器必须满足有效操作及使用精度要求，满足测试的重现性，满足性能与环境条件的关系，满足校验的要求和便于维护保养；

（3）若必需，则为测试仪器安装预警系统，有安全防护措施和明确的标识；

（4）在用的测试仪器必须校验合格，且在使用有效期内。

【人员和物品的出入限制】

（1）在洁净室（区）内，所需操作人员在不影响生产的条件下应考虑最小数量，以避免人员的活动对环境的影响；

（2）应当按照操作规程更衣和洗手，尽可能减少对洁净区的污染或将污染物带入洁净区；

（3）工作服及其质量应当与生产操作的要求及操作区的洁净度级别相适应，其式样和穿着方式应当能够满足保护产品和人员的要求，各洁净区的着装要求规定如下：

D 级洁净区：应当将头发、胡须等相关部位遮盖，应当穿合适的工作服和鞋子或鞋套，应当采取适当措施，以避免带入洁净室（区）外的污染物；

C 级洁净区：应当将头发、胡须等相关部位遮盖，应当戴口罩。应当穿手腕处可收紧的连体服或衣裤分开的工作服，并穿适当的鞋子或鞋套，工作服应当不脱落纤维和微粒；

A/B 级洁净区：应当用头罩将所有头发以及胡须等相关部位全部遮盖，头罩应该塞进衣领内，应当戴口罩以防散发飞沫，必要时戴防护目镜；应当戴经灭菌且无颗粒物（如滑石粉）散发的橡胶或塑料手套，穿经灭菌或消毒的脚套，裤腿应当塞进脚套内，袖口应当塞进手套内。工作服应为灭菌的连体工作服，不

脱落纤维或微粒，并能滞留身体散发的微粒。

个人外衣不得带入通向 B 级或 C 级洁净区的更衣室。每位员工每次进入 A/B 级洁净区，应当更换无菌工作服；或每班至少更换一次，但应当用监测结果证明这种方法的可行性。操作期间应当经常消毒手套，并在必要时更换口罩和手套。

洁净区所用工作服的清洗和处理方式应当能够保证其不携带有污染物，不会污染洁净区。应当按照相关操作规程进行工作服的清洗、灭菌，洗衣间最好单独设置。

（4）物品进出洁净区域应设置缓冲设施，宜采用气闸或连锁装置。

【测试指导原则】

（1）在进行测试之前，应先确定待测区域、测试状态、仪器设备、测试规程、采样点位置、评价标准以及相关注意事项。

（2）建立环境监测程序，这样才能证实设备以及产品的接触环境是洁净和卫生的，并可以确定潜在的污染物是否能被控制到适当水平，确保消毒剂保持对微生物群的效力，书面的监测程序应有科学的取样时间表，包括采样点位置及频次，此外，最高微生物限度和发现样品超过这一限度时采取行动的明确过程均应确定。

【测试法】

（1）温度与相对湿度的测试

①测试之前空气净化系统应至少已连续运行 24 小时，且系统处于稳定和正常运行的状态，测试人员在采样时也应注意站在测试仪器的下风侧，并应尽量少活动。

②若局部为恒温恒湿区域，则必须在测试记录中注明，并按规定布置采样点和计算偏差，采样点布置如下：若非恒温恒湿洁净室（区），则采样点为离地 0.8 m、距墙 0.5 m 的室内中心位置；若为恒温恒湿度洁净室（区），则应符合以下规定：

a. 每次测试间隔不大于 30 分钟；

b. 室内采样点布置应包括送回风口处、恒温工作区具有代表性的地点（例如沿着工艺设备周围布置或等距离布置）；

c. 采样点一般应布置在距墙面大于 0.5 m，离地面 0.8 m 的同一高度上，也可以根据恒温区的大小，分别布置在离地不同高度的几个平面上；

d. 采样点数应符合表 1 规定。

表 1　温度与相对湿度采样点数

波动范围	室面积≤50 m^2	每增加 20～50 m^2
Δt=±0.5 ℃～±2.0 ℃	5 个	增加 3～5 个
ΔRH=±5%～±10%		
Δt≤±0.5 ℃	采样点间距不应大于 2 m，采样点数不应少于 3 个	
ΔRH≤±5%		

③采用直接读数法，从而评定该洁净室（区）的温度与相对湿度。若使用电子元件支持的数字式温度与相对湿度计，则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，并选定相应的测试量程范围，宜将温度和相对湿度计的测试探头尽量与采样点保持水平面一致，在确认读数稳定后方可开始测试。

④应同时测试室外的温度和相对湿度值。

⑤对于无恒温恒湿要求的洁净室（区），温度与相对湿度的采样数据与标准对比后得出合格与否的结论。对于有恒温恒湿要求的洁净室（区），判断温度与相对湿度是否符合标准应同时满足：室温波动范围与各采样点的各次温度测试数据中偏差控制点温度的最大值一致，占采样点总数的百分比整理成累积统计曲

线，若90%以上的采样点的偏差值在室温波动范围内，则为符合规定，反之则不合格，相对湿度的波动范围可按室温波动范围的规定执行。

⑥若同时测试两个项目以上时，温度和相对湿度的测试宜在最先进行，有利于综合评估温度与相对湿度对其他项目的影响；太低的相对湿度会导致静电问题，使灰尘吸附在金属表面，而相对湿度过高时，微生物污染的风险显著增大；对于洁净室（区）的加湿处理，应使用高质量的水以避免污染。

（2）换气次数的测试

①对于非单向流洁净室（区），对每个送风口测试送风量来换算出换气次数。换气次数的计算公式如下：

$$\text{换气次数（次/小时）}=\frac{\text{洁净室（区）送风量（}m^3/h\text{）}}{\text{洁净室（区）体积（}m^3\text{）}}$$

②采用空气平衡热辐射测量仪或风量罩，直接读出每个送风口的送风量值（m^3/h），洁净室（区）内所有送风口的送风量之和即为洁净室（区）送风量。

③对于非单向流洁净室（区），也可采用风口法或风管法确定送风量，方法如下。

a. 风口法是在安装有高效过滤器的送风口处，根据送风口形状连接辅助风管进行测量。即用镀锌钢板或其他不产尘材料做成与风口形状及内截面相同，长度等于2倍风口长边长的直管段，连接于风口外部，在辅助风管的出口平面上，按最小采样点数不小于6点均匀布置采样点，用风速仪测定各采样点风速。采样点范围为送风口边界内0.05 m以内的面积，以所有采样点风速读数的算术平均值作为平均风速；然后以送风口截面平均风速乘以送风口净截面积求取风量。

b. 对于风口上风侧有较长的矩形支管段，且已经或可以钻孔时，可以用风管法确定风量。测量断面应位于大于或等于局部阻力部件前3倍管径或管径长边长的部位，也可以是局部阻力部件后5倍管径或管径长边长的部位，对于圆形风管，应根据管径大小将截面划分成若干个面积相同的同心圆环，每个圆环设4个采样点，圆环数量宜不少于3个，以所有采样点风速读数的算术平均值作为平均风速，对于矩形风管，可将风管截面划分成若干个相等的小截面，每个小截面尽可能接近正方形，边长最好不大于200 mm，以每个正方形的中心点作为采样点测试风速值，但整个截面上的采样点数不少于3个，以所有采样点风速读数的算术平均值作为平均风速；然后，以送风口截面平均风速乘以送风口净截面积求取送风量。

c. 截面平均风速换算成送风量的公式如下。

截面平均风速 $\overline{v}$：

$$\overline{v}=\frac{\sum_{i=1}^{n}v_i}{n}$$

式中　$\overline{v}$ 为截面平均风速，m/s；

v_i 为某一采样点的风速（i=1，2，…，n），m/s；

n 为采样次数，次。

某一送风口的送风量 S：

$$S=\overline{v}\times 3600\times\text{风口截面积}$$

④测试数据经过计算整理后，与标准值比较后得出结论。

（3）截面平均风速的测试

采用风速计直接测试。风速为0.36～0.54 m/s（指导值）。

①对于垂直单向流洁净室，测试时取离高效过滤器0.3 m垂直于气流处的截面作为采样截面，对于水平单向流洁净室，测试时采样点应取在距送风面0.5 m的垂直截面上，截面上的采样点间距不宜大于0.6 m，均匀布点；采样点数应不少于5个。

②测试风速时，宜用测定架固定风速仪，以避免人体干扰；若不得不用手持风速仪测试时，手臂应伸至最长位置，尽量使人体远离采样点；在具体操作时要注意的是，测试截面风速时测试仪器的测试元件前

后不能有遮挡物，否则就会导致数据失准或者无法测出风速。

③以所有测点的风速读数的算术平均值作为截面平均风速，并以截面平均风速的数值与标准对比得出合格与否的结论。截面平均风速 $\bar{v}$ 按本标准“测试方法”项下第（2）项“换气次数的测试”中的“截面平均风速 $\bar{v}$ ”进行。

④截面风速不均匀度 β_v 应按下式计算：

$$\beta_v = \frac{\sqrt{\frac{\sum(v_i - \bar{v})^2}{n-1}}}{v}$$

式中 β_v 为截面风速不均匀度；

v_i 为某一采样点的风速（i=1，2，…，n），m/s；

n 为采样次数，次；

$\bar{v}$ 为截面平均风速：m/s；

截面风速不均匀度 β_v 不大于 0.25。

（4）气流流型的测试

本项测试的目的是确认 A 级或 B 级区域的气流流型和洁净室与相邻区域的气流方向。方法按照 ISO 14644.3《Cleanrooms and associated controlled environments-Part 3 Test Methods》中 4.2.5 条款 Airflow direction test and visualization 中测试程序 B7 进行。

对于 A 级或 B 级区域的气流流型测试，采用 MSP-2010 气流可视化测试仪测试。将 MSP-2010 气流可视化测试仪注满注射用水，调节释放蒸汽流量到 4 升/分钟并达到稳定，将柱型蒸汽流放置于层流罩 LAF 下缓慢水平移动，观察柱型蒸汽流的流动方向，用数码影像记录并文件化，同时确认气流流型是否符合接受标准；对于洁净室与相邻区域的气流方向测试，采用气流方向测试棒，在洁净室与相邻区域的缝隙处释放烟雾，用数码影像记录并文件化，同时确认是否符合接受标准。

（5）压差和压差梯度的测试

本标准定义的压差值为被测洁净室（区）与相邻区域或相邻室外大气的气体压力差。

压差测试应在风量平衡调节完毕后进行。为了测量相邻区域的压差，在整个测试过程中用微压差计进行测量。测量时必须把所有门全部关紧，然后从洁净室的最里面逐步向外测量，每一个房间相对于所有其他房间或区域的压差均应测量，在测量时应特别注意每一个测点与其相邻位置压差的方向，同时在气流流向图上标明压差梯度。

如果相邻两个房间或区域之间的压差有接受标准，则用具体数值表示，无压差要求则用“/”表示；“+”则表示“房间”的压力高于“相对位置”的区域；“–”则表示“房间”的压力低于“相对位置”的区域。测试时应尽量远离送风口和回风口或其他可以影响压差测量的因素。有不可关闭的开口与邻室相通的洁净室，还应测试开口处的两端压差，气流流速和气流流型等。

①若使用指针型微压差计，则采用直接读数法，并根据测试的压差值评定该洁净室（区）与相邻区域的气体压力，若使用其他微压差计，则应先调整水平，确认符合后方可进行，若使用电子元件支持的数字式微压差计，则仪器开机预热至稳定后，方可按说明书的规定对仪器进行校正，并选定相应的测试量程范围。

②若可能，宜将微压差计的连接管尽量与采样点水平面一致，采样点位置离地约 0.8 m 高度的水平面上，选择在无涡流无回风口的位置，在确认读数稳定后可开始测试。

③压差值的采样数据与标准比较得出合格与否的结论，测试压差的同时应结合被测洁净室（区）的换气次数或截面风速的测试，有利于对洁净室（区）进行综合评价，A 级（ISO Class 5）以上洁净级别的洁净室（区）在开门时，若必需，则要监控门内 0.6 m 处的悬浮粒子的浓度。

（6）悬浮粒子的测试

采用计数浓度法，即通过测定洁净环境内单位体积空气中含大于或等于某粒径的悬浮粒子数，来评定

该洁净室（区）的洁净度等级。测试方法采用 ISO 14644.1《Cleanrooms and associated controlled environments-Part 1 Classification of air cleanliness》以及 GB/T 16292—2010《医药工业洁净室（区）悬浮粒子的测试方法》。为确认 A 级洁净区的级别，每个采样点的采样量不得少于 1 m^3。A 级洁净区空气悬浮粒子的级别为 ISO 4.8，以≥5.0 μm 的悬浮粒子为限度标准。B 级洁净区（静态）的空气悬浮粒子的级别为 ISO 5，同时包括表中两种粒径的悬浮粒子。对于 C 级洁净区（静态和动态）而言，空气悬浮粒子的级别分别为 ISO 7 和 ISO 8。对于 D 级洁净区（静态）空气悬浮粒子的级别为 ISO 8。

测试方法如下。

①最少采样点数量 N_L：

$$N_L = \sqrt{A}$$

式中　N_L 为最少采样点；

A 为洁净室或被控洁净区的面积，m^2。

注：在水平单向流情况下，面积 A 为垂直于气流方向的横截面积。

静态测试时，采样点离地面 0.8 m 高度的水平面上均匀布置。每点采样 2～3 次。

②结果计算

采样点的平均悬浮粒子浓度：

$$\bar{x}_i = \frac{\sum_{i=1}^{n} x_i}{n}$$

式中　$\bar{x}_i$ 为某一采样点的平均粒子浓度，粒/m^3；

x_i 为某一采样点的粒子浓度（i=1，2，…，n），粒/m^3；

n 为某一采样点上的采样次数，次。

平均值的均值：

$$\bar{\bar{x}} = \frac{\sum_{m=1}^{m} \bar{x}_i}{m}$$

式中　$\bar{\bar{x}}$ 为平均值的均值，即洁净室（区）的平均粒子浓度，粒/m^3；

$\bar{x}_i$ 为某一采样点的平均粒子浓度（i=1，2，…，L），粒/m^3；

m 为某一洁净室（区）内的总采样点数，个。

标准差 S：

$$S = \sqrt{\frac{(\bar{x}_{i,1} - \bar{\bar{x}})^2 + (\bar{x}_{i,2} - \bar{\bar{x}})^2 + \cdots + (\bar{x}_{i,m} - \bar{\bar{x}})^2}{(m-1)}}$$

式中　S 为平均值均值的标准误差，粒/m^3。

95%置信上限（95%UCL）：

$$95\%\text{UCL} = \bar{\bar{x}} + t_{0.95} \times \left(\frac{s}{\sqrt{m}}\right)$$

式中　95%UCL 为平均值均值的 95%置信上限，粒/m^3；

$t_{0.95}$ 为 95%置性上限的 t 分布系数，见表 2。

表 2　95%置信上限的 t 分布系数

采样点数（m）	2	3	4	5	6	7	8	9	>9
t	6.3	2.9	2.4	2.1	2.0	1.9	1.9	1.9	—

注：当采样点数多于 9 点时，不需要计算 95%UCL。

③接受标准为同时满足以下两条：

a. 每个采样点的平均悬浮粒子浓度不得大于规定的级别界限，即 $\overline{x}_i \leqslant$ 级别界限；

b. 全部采样点的悬浮粒子浓度平均值均值的 95%置信上限必须不大于规定的级别界限，即 $UCL \leqslant$ 级别界限。

④任何洁净室（区）的采样点不得少于 2 个，每个选定的采样点至少采样一次，在一个区域内至少采样 5 次，不同采样点的采样次数可以不同，工作区的采样点位置宜在离地 0.8 m 高度的水平面上，采样点多于 5 点时，也可以在离地面 0.8～1.5 m 高度的区域内分层布置，但每层不少于 5 点。

⑤采样管必须干净，连接处不得有渗漏，采样管的长度应根据允许长度确定，如果无规定时，不宜大于 1.5 m。对于单向流洁净室（区），粒子计数器的采样管口朝向应正对气流方向，对于非单向流洁净室（区），采样器的采样管口向上，采样时应适当避开尘粒较集中的回风口，测试人员在采样时也应在粒子计数器采样管口的下风侧，并尽量少活动。

⑥采样管口置于采样点采样时，宜在粒子计数器确认计数稳定后方可开始连续读数，粒子计数器的采样管口与仪器工作位置宜处在同一气压和温度下，以免产生测量误差，采样完毕后，仪器须自净。

⑦应采取一切措施防止采样过程的污染。静态测试时采样点可遵循均匀布置的原则，同时根据相应的洁净度级别开展风险评估，确定动态监测的采样点位置并推荐进行日常动态监控。

⑧若同时测试两个以上项目时，悬浮粒子的测试宜在温度和相对湿度、送风量（换气次数）、压差等项目结束后进行，以降低干扰。

（7）浮游菌的测试

采用计数浓度法。即通过收集悬游在空气中的生物性粒子于专门的培养基（选择能证实其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。测试方法采用 GB/T 16293—2010《医药工业洁净室（区）浮游菌的测试方法》。

若被测区域为洁净度 A 级洁净区（静态或动态），B 级洁净区（静态）应满足每个采样点的最小采样量不小于 1 立方米，应满足最少采样点和每个采样点的最小采样量的规定。

①最少采样点数量 N_L：

$$N_L = \sqrt{A}$$

式中 N_L 为最少采样点；

A 为洁净室或被控洁净区的面积，m^2。

静态测试时，采样点离地面 0.8 m 高度的水平面上均匀布置。每点采样 1～2 次。同时根据相应的洁净度级别开展风险评估，确定动态监测的采样点位置并推荐进行日常动态监控。

②浮游菌采样器一般采用撞击法机制，可分为狭缝式、离心式或针孔式采样器。狭缝式采样器由附加的真空抽气泵抽气，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皿上，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。

③浮游菌采样器一般采用ϕ150 mm×15 mm、ϕ90 mm×15 mm、ϕ65 mm×15 mm 等规格的平板培养皿，也可根据所选用的采样器选择合适的培养皿。培养基为肉汤琼脂培养基或其他《中国药典》认可的培养基。恒温培养箱：必须是定期检定的满足相应的培养温度及精度要求的培养箱。

④培养基的准备及灭菌：一般采用商品脱水培养基，临用时按照使用说明书进行配制，并调节 pH 值使灭菌后培养基的 pH 值符合规定。若为自制培养基，原料应挑选，琼脂凝固力应测定，以决定配制时的琼脂用量，试剂规格应为化学纯以上。培养基配制后应在 2 小时内按《中国药典》规定的方法灭菌，避免

细菌繁殖。

⑤培养皿的制备：空白培养皿在注入培养基前应为无菌状态，然后将配制灭菌后的培养基加热熔化，冷却至 45 ℃左右时，在无菌操作的要求下将培养基注入培养皿，直径为 150 mm 的培养皿不少于 60 ml 培养基，直径为 90 mm 的培养皿不少于 20 ml 培养基。

⑥培养皿使用前的培养：待琼脂凝固后，将培养皿倒置于 30～35 ℃的恒温培养箱中培养 48 小时以上，若培养皿上确无菌落生长，即可供采样用。

⑦对于单向流洁净室（区），采样器的采样管口朝向应正对气流方向，对于非单向流洁净室（区），采样器的采样管口向上，采样时应适当避开尘粒较集中的回风口，测试人员在采样时也应站在采样器采样管口的下风侧。

⑧应采取一切措施防止采样过程的污染和其他对样本可能的污染。测试状态有静态和动态两种，必须在测试记录中注明。

⑨在进行测试之前，应先对所用的培养皿进行检查，确认没有气泡、无凹陷、无细菌生长并在使用有效期内；培养皿在使用前必须用消毒剂擦净外表面。

⑩采样器的采样头及盖子应采用可以灭菌的材料，在进入洁净室（区）测试前也应采用适当方式消毒。若必须进入 A 级洁净室（区）采样，整个设备要有措施保护，然后才能带入相关洁净室（区）。在开始采样准备前，采样器的采样头的内外表面宜用消毒剂擦拭，狭缝式和离心式采样器应检查采样器的采样管，严禁渗漏，内壁应光滑，采样管应尽量减少弯曲，采样管的内外壁都要消毒，检查采样器的流量显示，并选定合适的采样时间，仪器在消毒后，先不放入培养皿，开启采样器一段时间驱赶消毒剂的残留物。

⑪测试人员在采样时应避免接触采样头和采样管的内表面，在采样器内放入培养皿后，取下培养皿的盖子，避免被水滴或其他浮游物质污染，然后开启采样器；采样过程结束后，盖上培养皿的盖子，取下培养皿，在采样器上调换培养皿时，测试人员宜双手消毒，也可戴无菌手套操作，每一个培养皿上都应作标识。

⑫全部采样结束后，将培养皿倒置于恒温培养箱中培养。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 天，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 天。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。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。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。

⑬用计数方法得出各个培养皿的菌落数后，用下式计算每个采样点浮游菌的平均浓度：

$$\text{平均浓度（cfu/m}^3\text{）} = \frac{\text{菌落数（cfu）}}{\text{采样量（m}^3\text{）}}$$

若某个采样点的平均浓度大于级别上限，则必须对该区域重新消毒，再采样 2 次，2 次必须均合格后才能判定合格。

⑭对于浮游菌的监控，应采用基于风险的原则设定纠偏限度和警戒限度，以保证洁净室（区）的微生物浓度受到控制，操作规程中应当详细说明结果超标时需采取的纠偏措施。应定期测试以检查微生物负荷以及消毒剂的效力，并作趋势分析。静态和动态的监控都可以采用以上方法。

⑮若同时测试两个以上项目时，浮游菌浓度的测试宜在其他项目结束后进行，以降低干扰。

⑯培养皿在用于测试时，宜同时进行空白试验校正，避免培养皿运输或搬动过程造成的影响。每次或每个区域取 1 个对照皿，然后与采样后的培养皿（肉汤琼脂）一起放入 35 ℃±2 ℃的培养箱内培养 48 小时以上，结果应无细菌生长。

⑰浮游菌采样时，由于气流以每秒几十米的速度从缝隙或细孔中吹向培养基表面，时间过久就会使培养基水分减少导致灵敏度降低，因此采样时间宜控制在 20 分钟之内。

（8）沉降菌的测试

采用沉降法，即通过自然沉降原理收集空气中的生物性粒子于培养皿（选择能证实其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形成一个个独立可见的菌落为计数依据，以判定该洁净室（区）的微生物浓度。

①沉降菌测试一般采用ϕ90 mm×15 mm、ϕ65 mm×15 mm 等规格的平板培养皿，也可根据工艺要求选择合适的培养皿。

②培养基的准备及灭菌、培养皿的制备、培养皿使用前的培养采用与本标准“测试方法”项下第 7 项“浮游菌的测试”相同的方法制备。

③静态测试时洁净室（区）沉降菌采样点的布置应遵循均匀全面的原则，避免采样点在某局部区域过于集中，除非是为了特殊的目的。工作区的采样点位置离地 0.8～1.5 m 左右，离开送风面 30 cm 以上，动态测试时也可在关键设备或关键工序处增加采样点。采样点的位置可以与悬浮粒子的采样点相同，每个采样点至少采样一次。

④对于单向流洁净室（区），采样时应正对气流方向，对于非单向流洁净室（区），采样时培养基平皿打开向上，采样时应适当避开尘粒较集中的回风口，测试人员在采样时也应站在采样器采样管口的下风侧。

⑤在进行测试之前，应先对所用的培养皿进行检查，确认没有气泡、无凹陷、无细菌生长并在使用有效期内，培养皿在使用前必须用消毒剂擦净外表面。

⑥应采取一切措施防止采样过程的污染和其他对样本可能的污染。静态测试时，室内测试人员不得多于 2 人。沉降菌采样时应按事先确定的采样点位置从里到外放置好培养皿，然后从里到外取下培养皿的盖子，同时避免被水滴或其他浮游物质污染，采样过程结束后，从外到里盖上培养皿的盖子，也可带无菌手套操作，每一个培养皿上都应作标识。

⑦全部采样结束后，将培养皿倒置于恒温培养箱中培养。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 天；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 天。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。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。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。

⑧用计数方法得出各个培养基平皿的菌落数后，用下式计算沉降菌的平均浓度：

$$M(\text{cfu}/\text{皿})=\frac{\sum_{i=1}^{n}M_i}{n}$$

式中　M 为平均菌落数，cfu/皿；

M_i 为某一编号培养皿的菌落数，cfu/皿；

n 为培养皿总数。

⑨对于沉降菌的监控，应采用基于风险的原则设定纠偏限度和警戒限度，以保证洁净室（区）的微生物数量受到控制，操作规程中应当详细说明结果超标时需采取的纠偏措施。应定期测试以检查微生物负荷以及消毒剂的效力，并作趋势分析。静态和动态的监控都可以采用以上方法。

⑩若同时测试两个以上项目时，沉降菌浓度的测试宜在其他项目结束后进行，以降低干扰；沉降菌测试时，在放置培养皿时应注意尽量防止人员走动引起的气流扰动影响检测结果。

⑪培养皿在用于测试时，宜同时进行空白试验校正，避免培养皿运输或搬动过程造成的影响。每次或每个区域取 1 个对照皿，然后与采样后的培养皿（肉汤琼脂）一起放入 35 ℃±2 ℃的培养箱内培养 48 小时以上，结果应无细菌生长。

（9）照度的测试

本标准定义的照度值为被测洁净室（区）的室内最低照度值。采用直接读数法，即通过测定洁净环境

内各点的照度值，并从中筛选出最低照度值，从而评定该洁净室（区）的照度。若必需，也可根据测试的照度值计算出照度均匀度。

①照度测试应在光源输出趋于稳定，并尽量避开自然采光的情况下进行，若有局部照明，则必须在测试记录中注明动态测试时的局部照明位置和局部照明的照度值，照度测试时应确认所有光源的工作状态处于正常，否则必须详细记录光源状况，应注意测试者的投影以及服装的反射影响测试结果。

②应在测试出被测洁净室（区）的温度值后再进行照度测试。照度测试仪器开机、预热至稳定后，方可按说明书的规定对仪器进行校正，并选定相应的测试量程范围。

③应将照度计的受光面尽量与测试点相应水平面一致，在确认读数稳定后方可开始测试。

④照度测试时的采样点布置：任何洁净室（区）的采样点不得少于 2 个，除受洁净室（区）内的设备限制之外，采样点应在整个洁净室（区）内均匀布置，采样点距墙 1 m（小面积房间 0.5 m），按 1～2 m 间距布点。每个选定的采样点之间间距不超过 2 m，不刻意在灯下或避开灯下选点，至少采样一次，在一个区域内至少采样 5 次，不同采样点的采样次数可以不同。如无特别规定，采样点置于离地 0.8 m 高度的水平面上，若以室内工作台为对象面时，测试面定为其面上 0.05 m 的水平面。

⑤最低照度值的采样数据应按下述步骤进行统计计算：

$$B=A_{\min}$$

式中　B 为洁净室（区）的照度值，lx；

$A_{\min}$ 为某一采样点的最低照度值（i=1，2，…，N），lx；

照度均匀度按下述步骤进行统计计算：

平均照度 B_{Avg}：

$$B_{\mathrm{Avg}}=\frac{\sum_{i=1}^{n}A_i}{n}$$

式中　B_{Avg} 为平均照度，lx；

A_i 为某一采样点的照度（i=1，2，…，n），m/s；

n 为采样次数，次。

照度均匀度 $B_{均}$：

$$B_{均}=\frac{B}{B_{\mathrm{Avg}}}$$

⑥判断照度是否符合标准应同时满足：

a. 洁净室（区）内主要工作区的最低照度值必须大于规定的范围，即 $B\geqslant 300$ lx；有局部照明的除外；

b. 若必须，洁净室（区）内主要工作区的照度均匀度宜大于 0.7；

⑦备用照明和应急照明的测试不在本标准规定的范围内。

【结果评价】

（1）在测试过程中，与洁净室（区）有关的环境参数和观察结果都应作记录。这些参数可能包括（但不仅限于此）：测试状态、室外空气的温度和相对湿度、采样点的位置（必要的话，再注明采样点高度）、与相邻区域的压差和压差梯度、洁净室（区）的位置，必要时注明相邻的区域，注明采样点的特定编号和示意图等，还有动态测试时设备和人员的活动情况等，以便在结果评价和分析时参考。

（2）对于浮游菌和沉降菌测试的取样频次，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测试频次。

①连续超过警戒限度和纠偏限度；

②停工时间比预计延长；

③关键区域内发现有传染的试剂；

④在生产期间，空气净化系统进行任何重大的维修；

⑤日常操作记录反映出倾向性的数据；

⑥净化和消毒规程的改变；

⑦引起生物污染的事故等。

【注意事项】

（1）适宜的监测频次：保证洁净室（区）始终处于受控状态。关键区域在正常使用期间，应规定定期测试的频次，以检查洁净室（区）的以上九个控制参数值背离正常水平的一切变化。若出现了不正常的状况，应进行调查并采取措施。静态和动态的监控都可以采用以上方法。应当对无菌生产洁净室（区）的微生物进行动态监测，评估无菌生产的微生物状况。监测方法有沉降菌法、浮游菌法和表面微生物法（如棉签擦拭法和接触碟法）等。动态取样应当避免对洁净区造成不良影响。成品批记录的审核应当包括环境监测的结果。对表面微生物和操作人员的监测，应当在关键操作完成后进行。在正常的生产操作监测外，可在系统验证、清洁或消毒等操作完成后增加微生物监测。对生产洁净室（区）的换气次数、压差、悬浮粒子和微生物的检测建立程序，对检测数据分类整理，并作趋势分析，用以判断空调净化系统的性能和开展风险评估。

（2）适宜的清洁消毒和检查：包括洁净工作服的定期清洗和消毒等，保证洁净室（区）的悬浮粒子和微生物污染处于受控状态。

（3）验证：洁净室（区）投入运行之前应对其综合性能进行确认和验证，确认或验证的范围和程度应当经过风险评估来确定。应当建立确认或验证的文件和记录，包含设计确认、安装确认、运行确认和性能确认。例如系统运行以后，设计值与安装竣工后输出的数据之间的对照可以通过静态或动态的测试来获得。验证工作贯穿整个过程，包括施工前期设计、工程准备及承包商的选择以及整个施工周期的监控，项目竣工后静态运行阶段的测试（包括高效过滤器的检漏试验和自净时间等），实际生产时的动态测试等。

常规的验证工作有以下几个步骤：设立验证的组织机构（验证小组等）；制定验证计划，确定所需的设备、系统、过程和时间表，制定验证方案，必须确定为达到预期目的的具有可操作性的验证方法，包括验证目的、适用范围、系统或设备、验证方法、可接受标准、实施步骤等，按照验证方案实施，收集验证数据出具验证报告，包括验证结果、验证评价和建议、再验证周期等。

附件一

《药品生产质量管理规范》（2010 年修订）中规定的洁净室（区）悬浮粒子和室内微生物标准见表 3、表 4。

表 3　各级别空气悬浮粒子的标准规定

洁净度级别	悬浮粒子最大允许数/立方米			
	静态		动态[3]	
	≥0.5 μm	≥5.0 μm[2]	≥0.5 μm	≥5.0 μm
A 级[1]	3520	20	3520	20
B 级	3520	29	352 000	2900
C 级	352 000	2900	3 520 000	29 000
D 级	3 520 000	29 000	不作规定	不作规定

注：①为确认 A 级洁净区的级别，每个采样点的采样量不得少于 1 m^3。A 级洁净区空气悬浮粒子的级别为 ISO 4.8，以≥5.0 μm 的悬浮粒子为限度标准。B 级洁净区（静态）的空气悬浮粒子的级别为 ISO 5，同时包括表中两种粒径的悬浮粒子。对于 C 级洁净区（静态和动态）而言，空气悬浮粒子的级别分别为 ISO 7 和 ISO 8。对于 D 级洁净区（静态）空气悬浮粒子的级别为 ISO 8。测试方法可参照 ISO 14644-1。

②在确认级别时，应当使用采样管较短的便携式尘埃粒子计数器，避免≥5.0 μm 悬浮粒子在远程采样系统的长采样管中沉降。在单向流系统中，应当采用等动力学的取样头。

③动态测试可在常规操作、培养基模拟灌装过程中进行，证明达到动态的洁净度级别，但培养基模拟灌装试验要求在“最差状况”下进行动态测试。

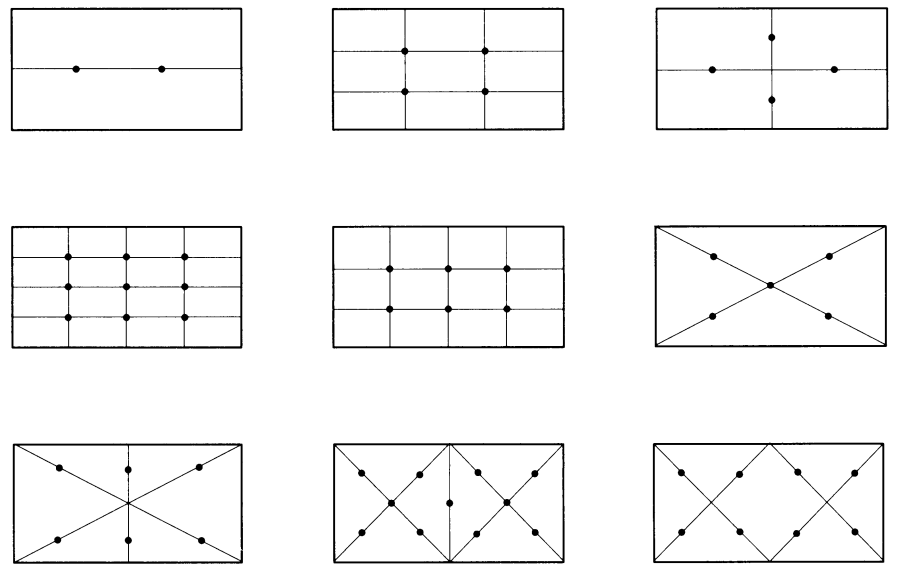
表 4　洁净区微生物监测的动态标准①

洁净度级别	浮游菌（cfu/m³）	沉降菌（φ90 mm）（cfu/4 小时）②	表面微生物	
			接触（φ55 mm）（cfu/皿）	5 指手套（cfu/手套）
A 级	＜1	＜1	＜1	＜1
B 级	10	5	5	5
C 级	100	50	25	—
D 级	200	100	50	—

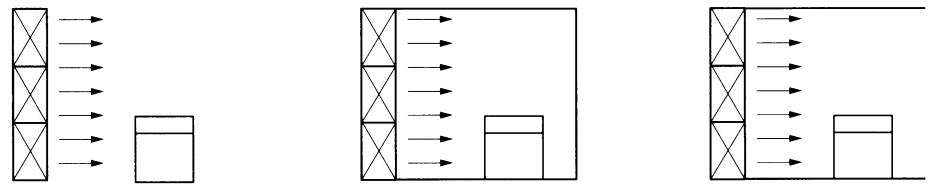
注：①表中各数值均为平均值。

②单个沉降碟的暴露时间可以少于 4 小时，同一位置可使用多个沉降碟连续进行监测并累积计数。

附件二　采样点的布置参考图



水平单向流



垂直单向流

