

细菌挑战测试报告

1 实验目的

对 E02B-0005、E02B-0005A 灭菌针头滤器进行液体细菌截留能力评价，证明该型滤器能达到除菌级别。

2 测试样品信息

货号	E02B-0005、E02B-0005A
品名	灭菌聚醚砜针头滤器
规格	孔径 0.22 μ m，直径 33mm
类型	针头滤器

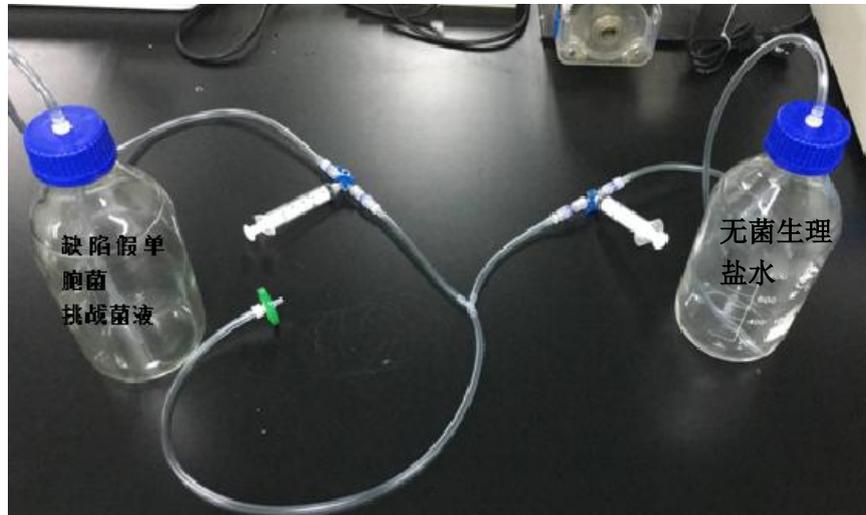
3 参考文献

文献编号	文献名称
ASTM F838-20	Standard Test Method for Determining Bacterial Retention of Membrane Filters Utilized for Liquid Filtration
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
YY/T 1551.3-2017	输液、输血器具用空气过滤器 第 3 部分:完整性试验方法
YY/T 0918-2014	药液过滤膜、药液过滤器细菌截留试验方法
GB 4789.2-2016	食品微生物学检验 菌落总数测定
MS-WI-078	针头滤器检测企业标准 (版本 A/5)



4 主要仪器

- 细菌挑战过滤装置（如下图所示）



- 生化培养箱（ $30^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ ）
- 立式压力蒸汽灭菌器
- 气浴恒温振荡器
- 超净工作台
- 不锈钢三联过滤器
- 真空泵
- 涡旋仪
- 移液枪（1mL、10mL）
- 酒精灯
- 镊子
- 一次性无菌接种环
- 泡点测试装置

5 主要试剂与耗材

- TSA 平板：按照培养基说明书进行配置。
- TSB 培养基：按照培养基说明书进行配置。



- 无菌生理盐水 0.85%。
- 一次性小滤杯 MCE045。

6 检测样品编号说明

样品编号	样品货号	样品编号	样品货号
BLI-1	E02B-0005A	BL-1	E02B-0005
BLI-2	E02B-0005A	BL-2	E02B-0005
BLI-3	E02B-0005A	BL-3	E02B-0005
BLI-4	E02B-0005A	BL-4	E02B-0005
BLI-5	E02B-0005A	BL-5	E02B-0005
BLI-6	E02B-0005A	BL-6	E02B-0005
BLI-7	E02B-0005A	BL-7	E02B-0005
BLI-8	E02B-0005A	BL-8	E02B-0005

7 所用菌种信息

缺陷假单胞菌(ATCC19146)。

8 实验步骤

8.1 挑战用菌液制备

菌液分为三种：

第一种：磁珠菌种保存管；保存于-20℃冰箱内，理论上此温度保存期为一年。因此需要及时活化保种，确保菌株活性。

第二种：菌种悬液，由第一种菌活化培养后加入 TSB 培养基中培养，可在 4℃冰箱中保存 3 周以上；

第三种：挑战用菌液；计算好后将第二种菌液用水或缓冲液进行稀释，进行细菌挑战；在细菌挑战后，需要对该菌液进行计数确保挑战数量无误。



8.2 菌种悬液培养

- 1) 从质检室磁珠菌种保存用冰箱的冷冻层中取出一支缺陷假单胞菌磁珠冻存管于超净台中解冻，每管用完后拿新管，并注意传代冻存，以保证冻存管数量，注意使用菌种传代次数不得超过 5 代。
- 2) 准备若干支 TSB 培养基管（如 5 管），每管装入 5 ml 经高压蒸汽灭菌器灭菌的 TSB 培养基；
- 3) 使用一次性无菌接种环从磁珠冻存管中挑取一颗磁珠，接种入上述 TSB 培养基中；30°C 静置培养或放入 30°C 的控温摇床，100RPM，24h±4h。
- 4) 将培养后的 TSB 菌液，放入 4°C 冰箱保存备用；
- 5) 细菌挑战前一天，取出一管 TSB 菌液，涡旋备用，以免发生细菌沉淀；
- 6) 使用 5ml 移液器，取出 5ml 的菌液，加入 200ml TSB 培养基溶液中，放入 30°C 的控温摇床，100RPM，24h±4h。
- 7) 培养后对菌液进行计数，并置于 4 度储存。

8.3 细菌菌落计数

取 8 支 10mL 无菌离心管，每管加 4.5mL 无菌生理盐水，将上述培养后试剂瓶中菌液充分混匀后无菌吸取 0.5mL 于第一支 10mL 离心管中，充分混匀后，依次进行 10 倍梯度稀释，每稀释一次用旋涡震荡仪混匀后进行下一个梯度稀释。取 3 个稀释度（如 10^4 、 10^5 、 10^6 ），每个稀释度吸取 100 μ L 进行涂板，每个稀释度涂 2 个板，30°C 于恒温培养箱培养 48 小时后计数。大于 300 或小于 10 个的平板为无效。计算菌液浓度。

菌落计数方法详述可参见 GB 4789.2-2016，培养后菌液可放于 4 度冰箱储存，超过 1 周需要重新计数。

实验前初始菌液浓度结果： $(120+130) / 2 * 10^7 = 1.25 * 10^9$ CFU/mL

8.4 细菌挑战

按每个滤器过滤 50mL，过滤面积为 4.9cm²，挑战菌量至少为 10⁷CFU/cm² 计算所需要的菌液体积，每 1000mL 挑战液所需菌悬液体积为 784 μ L。将稀



释好的挑战菌液转入挑战装置中，每个滤器用注射器抽取 50mL 进行过滤,滤出液用 MCE045 小滤杯进行细菌截留检测.真空泵抽滤完毕，用镊子将膜取出，贴于 TSA 培养皿于 30°C培养箱中进行培养，分别在第三天和第七天对平板进行观察，观察各滤膜长菌情况。

初始菌液浓度为 1.25×10^9 CFU/mL,滤器有效膜面积为 4.9cm^2 ，则每个滤器挑战用菌至少 4.9×10^7 CFU。每个滤器过滤 50mL 菌液，则从初始菌悬液中吸取 784 μL 菌液加入于 1000mL 无菌生理盐水中。

8.5 阴性与阳性对照

在进行滤器细菌挑战前进行阴性对照测试，使用注射器抽取 50mL 无菌生理盐水打入无菌滤器样品进行过滤，收集滤出液，滤出液用 MCE045 小滤杯进行细菌截留检测，真空泵抽滤完毕，用镊子将膜取出，贴于 TSA 培养皿于 30°C培养箱中进行培养，分别在第三天和第七天对平板进行观察。

在滤器细菌挑战结束后进行阳性对照测试，将滤器更换为 $0.45\mu\text{m}$ 孔径过滤器按照细菌挑战步骤及条件进行测试，在第二天对平板进行观察。

8.6 实验后滤器完整性测试

细菌截留实验后对测试滤器进行泡点测试，记录泡点测试结果。测试结果如下：

样品编号	实验后泡点(MPa)	样品编号	实验后泡点(MPa)
BLI-1	0.5	BL-1	0.44
BLI-2	0.38	BL-2	0.48
BLI-3	0.48	BL-3	0.46
BLI-4	0.5	BL-4	0.44
BLI-5	0.46	BL-5	0.48
BLI-6	0.46	BL-6	0.48
BLI-7	0.5	BL-7	0.48
BLI-8	0.52	BL-8	0.48



9 实验可接受标准

- 最终的细菌挑战水平不低于 1×10^7 cfu/cm² EFA。
- 阴性对照无细菌生长，阳性对照有细菌（指缺陷短波单胞菌）生长。
- 滤出液无细菌生长。
- 完成实验后滤器样品的泡点值 ≥ 0.35 Mpa。

10 实验结果记录及结论

本次实验中样品培养开始日期为 2022.09.08，结束日期 2022.09.15，实验培养结果记录如下表：

样品编号	实验后泡点 (MPa)	滤出液菌落数 (CFU)	实验结果
BLI-1	0.5	0	合格
BLI-2	0.38	0	合格
BLI-3	0.48	0	合格
BLI-4	0.5	0	合格
BLI-5	0.46	0	合格
BLI-6	0.46	0	合格
BLI-7	0.5	0	合格
BLI-8	0.52	0	合格
BL-1	0.44	0	合格
BL-2	0.48	0	合格
BL-3	0.46	0	合格
BL-4	0.44	0	合格
BL-5	0.48	0	合格
BL-6	0.48	0	合格
BL-7	0.48	0	合格
BL-8	0.48	0	合格



样品编号	实验后泡点 (MPa)	滤出液菌落数 (CFU)	实验结果
阴性对照		无菌	
阳性对照		长菌	

实验结论：细菌挑战用的细菌量满足使滤器的 $EFA \geq 10^7 CFU/cm^2$ 的标准；所测试实验滤器样品的滤出液无细菌生长，阴性对照无细菌生长，阳性对照有细菌（指缺陷假单胞菌 ATCC19146）生长；测试后滤器样品完整性测试的最低泡点为 0.38MPa，实验结果满足实验的可接受标准。

根据以上实验结果可知，本次细菌挑战测试成功证明了 E02B-0005、E02B-0005A 滤器能达到除菌级别。

