

## 药品微生物学基础知识 (上)

潘友文

2015-10 于上海

## 申明

本次培训所有的讲课内容仅代表我本人对制药微生物污染控制的理解。讲课中所有观点和内容与我服务过的所有雇主无关。

特此申明！

申明人：潘友文  
2015年10月22日

## 提 纲

- 无菌药品的意义
- 微生物学基本概念
  - 分类、生长和死亡规律
- 药品生产中的微生物控制
  - 微生物来源、分布、控制、监测方法及特点
- 无菌和无菌保证的概念
- 微生物在灭菌条件下的死亡规律



Louis Pasteur  
1822 – 1895

## 无菌制品被微生物污染所致影响

- 病人（免疫系统相对较弱或丧失）
  - 无菌制品会直接与体内接触
  - 污染微生物会直接感染身体
  - 构成微生物细胞的某些大分子物质会引起热原反应
  - 微生物代谢物对身体具有毒性
  - 合格药品的供应短缺
- 生产商
  - 产品质量不稳定（甚至 不合格品报废）
  - 产品召回（信誉及经济）
  - 关门和（或）被法律追究



Robert Koch  
1843-1910

## 微生物学的基本概念

- 分类
- 大小
- 细菌的分类
- 影响细菌生长、存活和死亡的因素
- 细菌芽孢（或孢子）的特性
- 细菌的死亡规律



## 微生物的分类

病毒



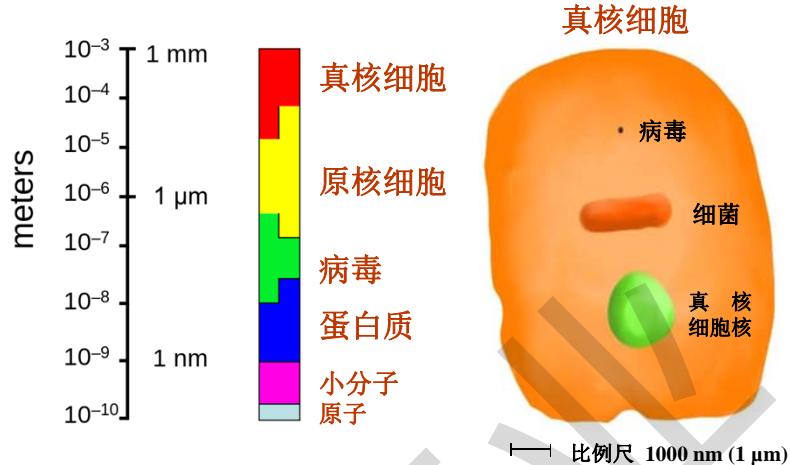
细菌



真菌

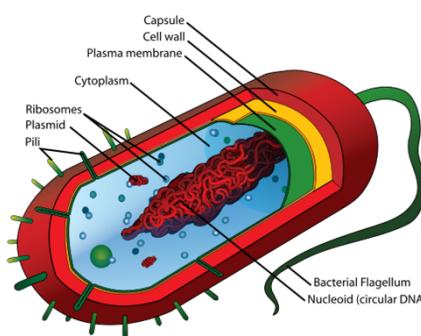


## 微生物的大小

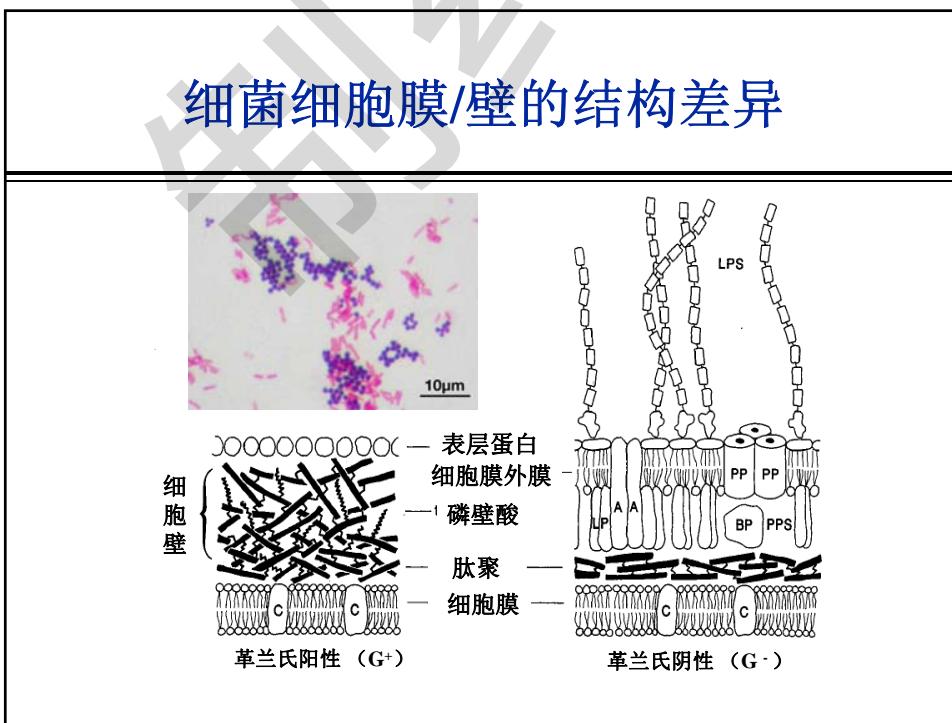
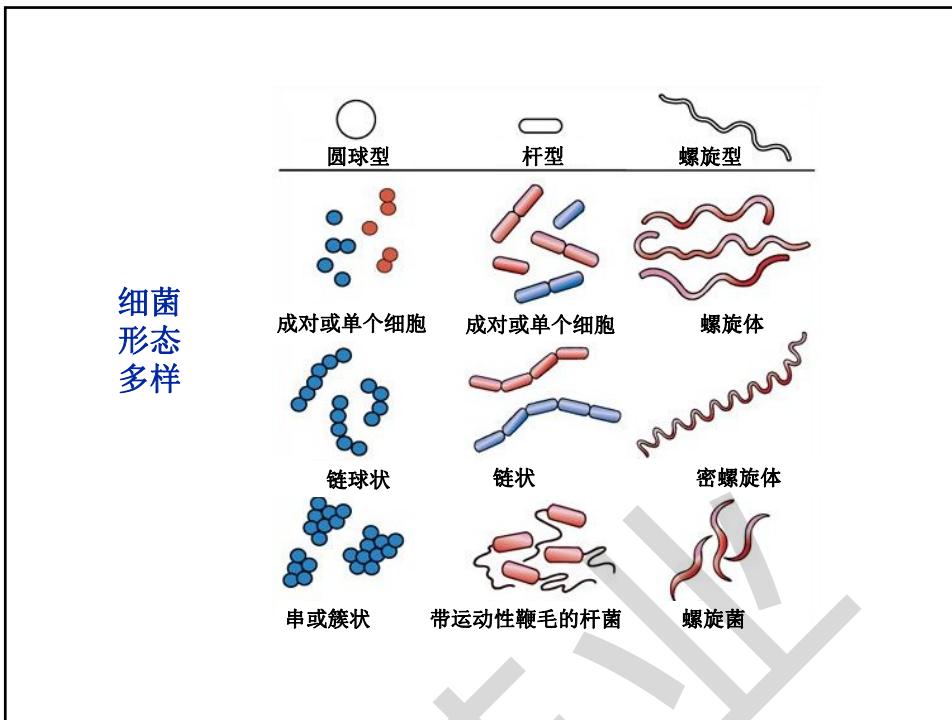


## 细菌的分类及其多样性

- 共性
  - 原核、单细胞、二分裂、形态小、自主代谢
- 多样性
  - 形态
  - 结构
  - 环境
  - 代谢
  - 进化
  - 致病



<http://en.wikipedia.org/wiki/Bacteria>



## 革兰氏阳性菌(G<sup>+</sup>)与革兰氏阴性菌(G<sup>-</sup>)

项目	G <sup>+</sup>	G <sup>-</sup>
外层磷脂膜 (Outer membrane)	无	有
脂多糖 (lipopolysaccharide)	无	有, 位于外层膜
肽聚糖层 (Peptidoglycan)	厚	薄
磷壁酸 (Teichoic acids)	多	少或没有
主要热原物质	肽聚糖、磷壁酸	脂多糖 (内毒素)
对物理条件胁迫的耐受性	高	低
对化学条件胁迫的耐受性	低	高

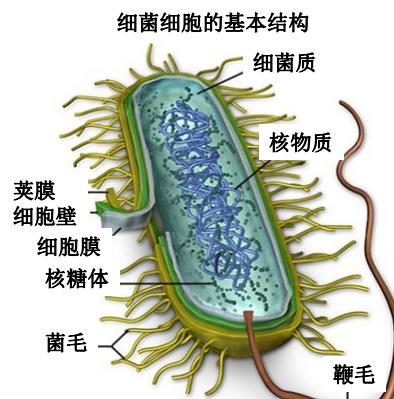
- 不能涵盖所有细菌

## 简易快速革兰氏阴阳性判断法



用牙签挑取一新菌落于3% KOH溶液打搅10-15秒钟，挑起液体有粘丝的为革兰氏阴性；无粘丝出现的为革兰氏阳性

## 生长态细胞与细菌芽孢



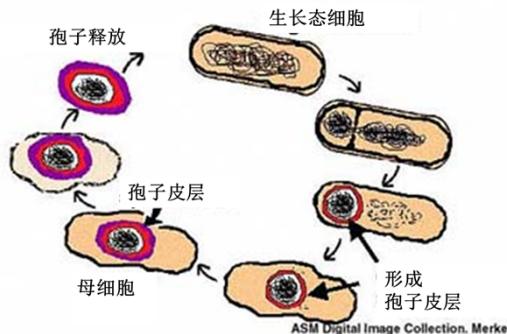
生长态细胞



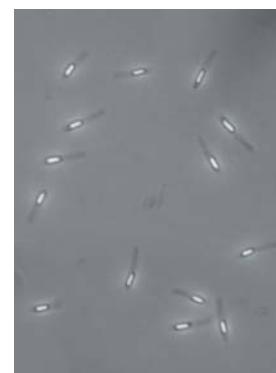
细菌芽孢

## 细菌芽孢 - 常用做生物指示剂

- 某些革兰氏阳性杆菌的休眠体
- 在不良环境条件下由生长态细胞转化而成
- 对不良环境条件有超强抵抗力



<http://archives.microbeworld.org/know/spore.aspx>



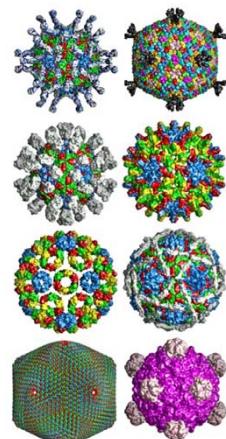
<http://en.wikipedia.org/wiki/Endospore>

## 生长态细胞与细菌芽孢

特 性	生长态细菌细胞	细菌芽孢
结构	细胞壁、细胞膜和原生质	厚皮层、外衣和外壁
显微镜下形态	无折射光	有折射光
钙含量	低	高
水含量	高	极低
吡啶二羧酸（DPA）	无	有
酶、代谢活性	高	低或无
mRNA	有	无或非常低
对环境胁迫条件的耐受性	低	高
小分子酸溶性蛋白	无	有
内部pH	~ 7.0	5.5 – 6.0

## 病 毒

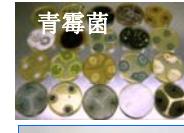
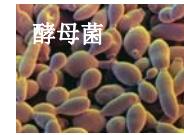
- 三最（体积小、数量多和易突变）
- 没有完整细胞结构
- 多样性（遗传物质、蛋白质）
- 寄生生物、宿主范围相对较小
- 一般对消毒剂、杀菌剂敏感
  - 艾病毒例外
- 生物制品生产的主要控制对象之一



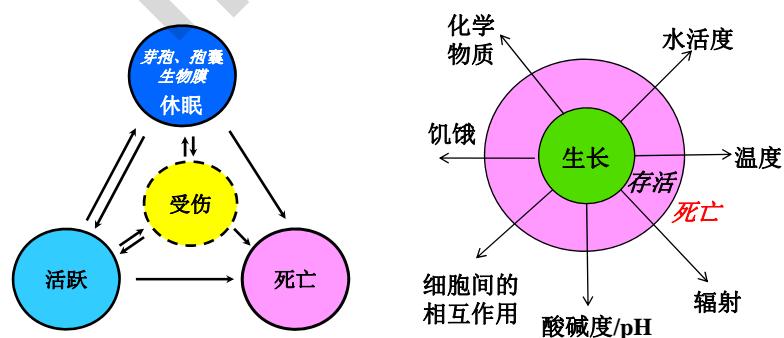
<http://www.virology.ws/2009/03/06/virus-images-at-viperdb/>

## 真菌

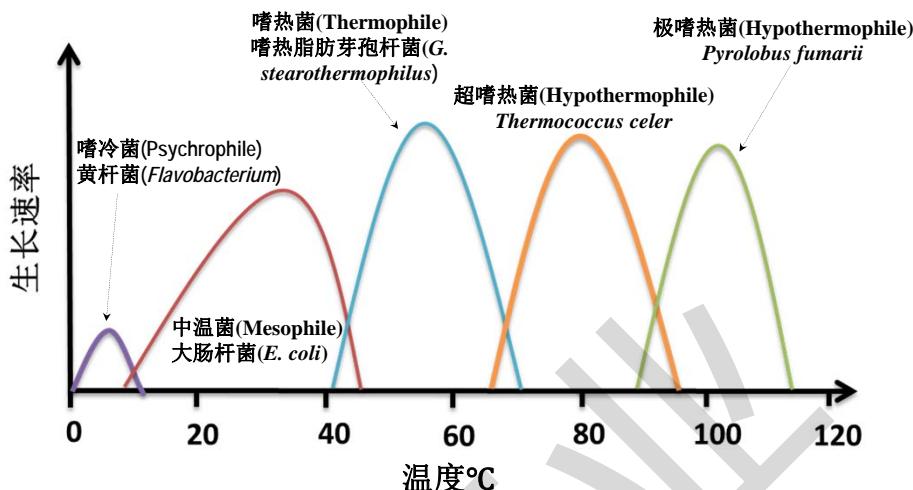
- 真核微生物
- 包括酵母、霉菌和大型担子菌
- 对消毒剂具有耐受性
- 对灭菌剂敏感
  - 例外: 砖火丝菌(*Pyronema domesticum*)  
对环氧乙烷和辐射有一定的耐受性。
- 不耐热
- 霉菌孢子易于扩散、喜阴湿条件



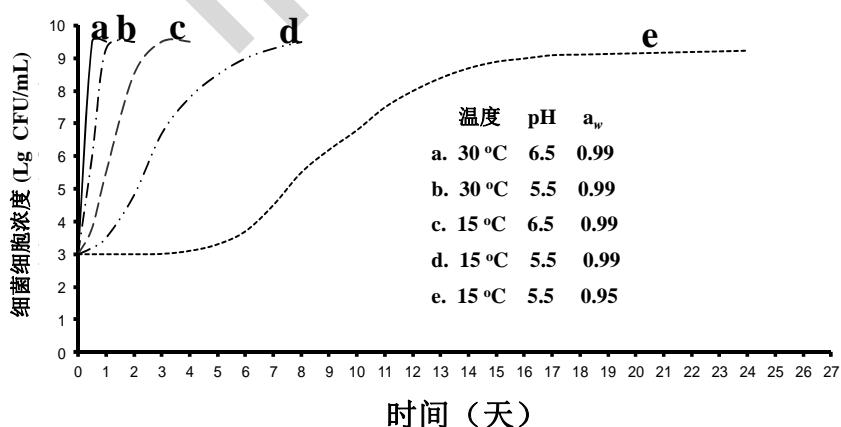
## 细菌在环境中的生存状态

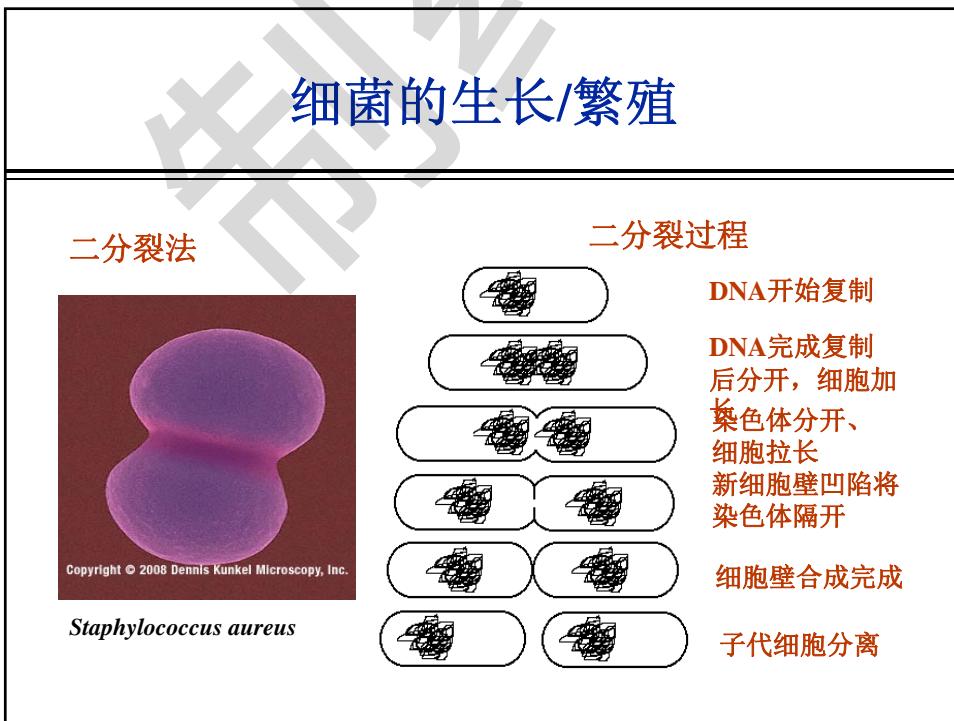
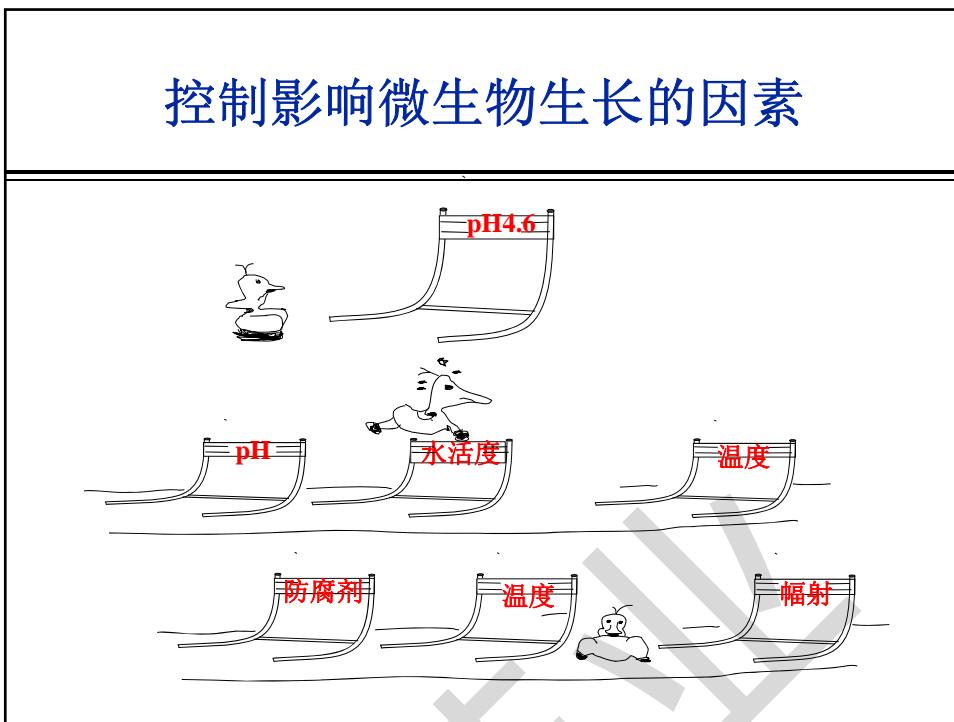


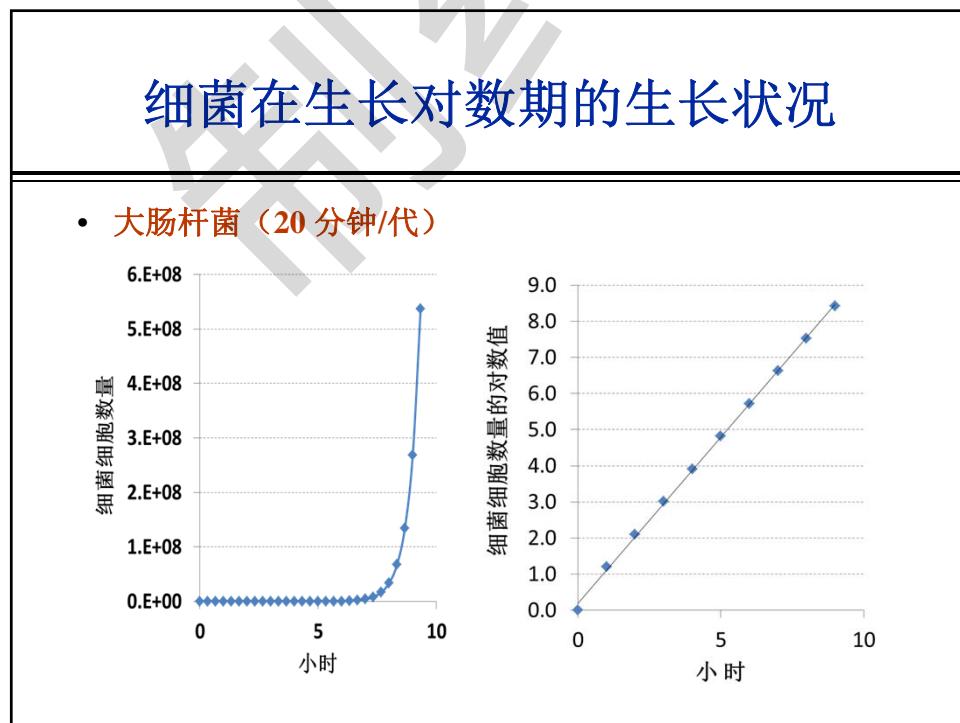
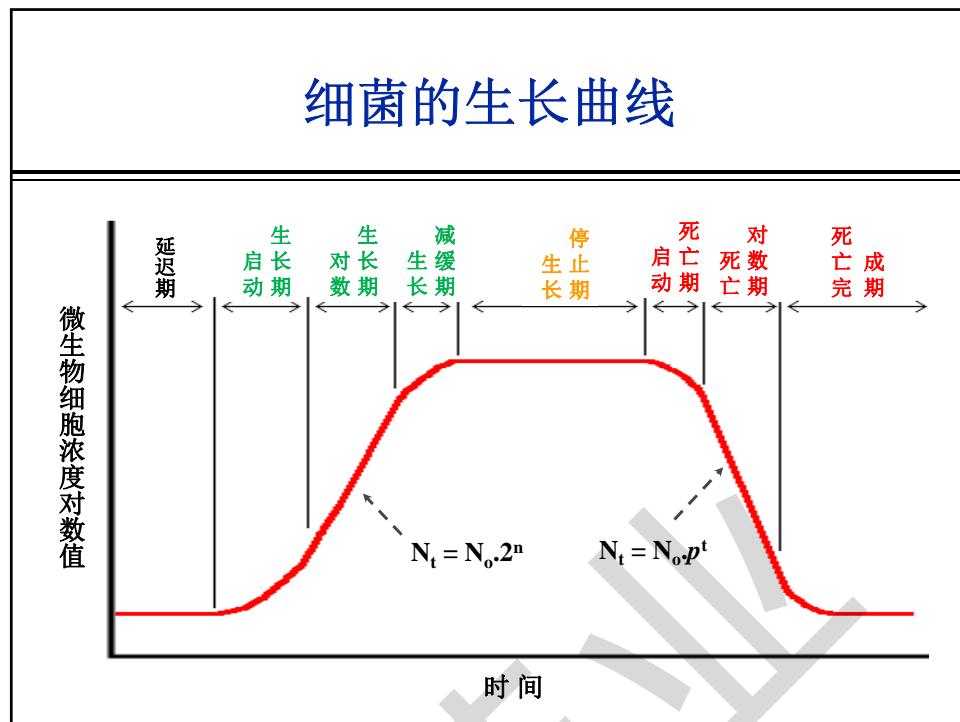
## 温度对细菌生长的影响

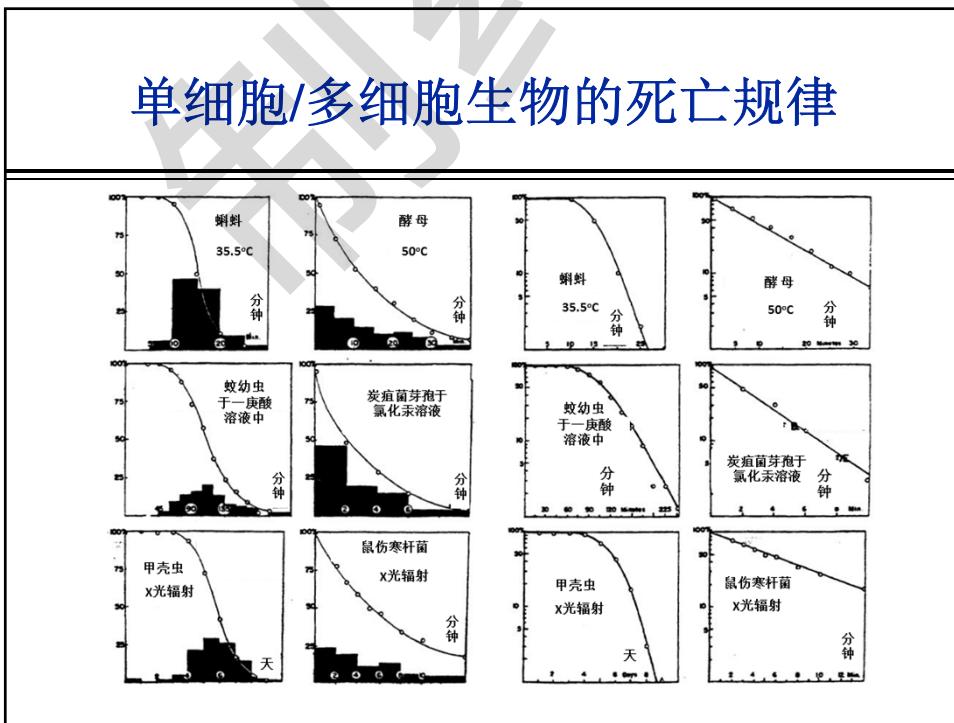
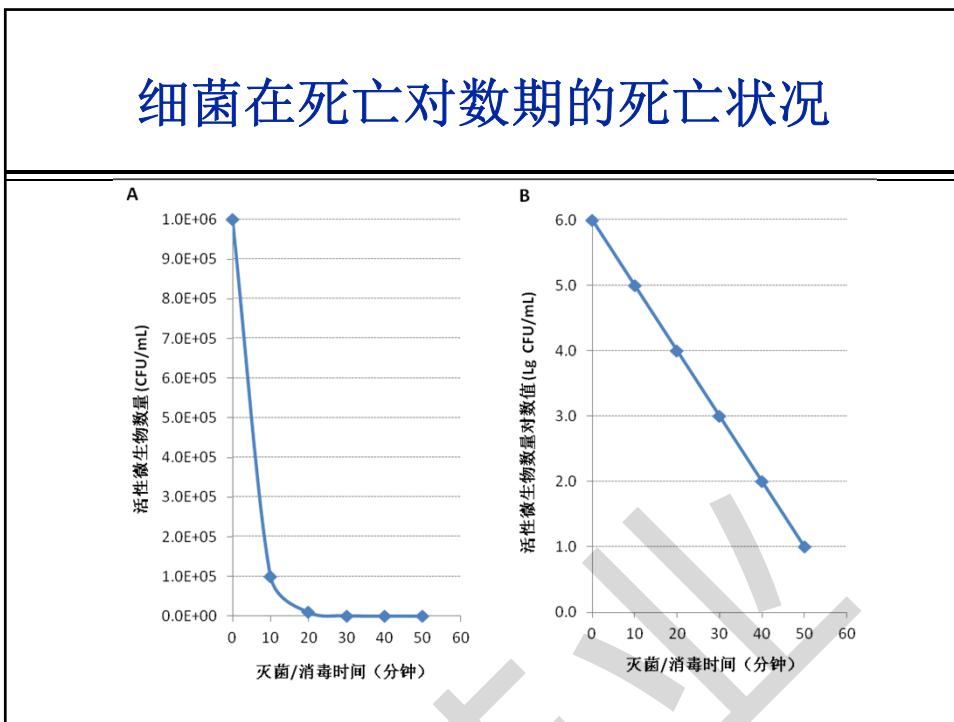


## 细菌在不同环境下的生长速度









## 细菌死亡- Rahn 一级动力学模型

- $\lg N = kt + \lg N_0$

当  $N_0$  下降 90% 时，

$$N = N_0/10$$

因此，

$$kt = -1$$

$$K = -1/t = -1/D$$

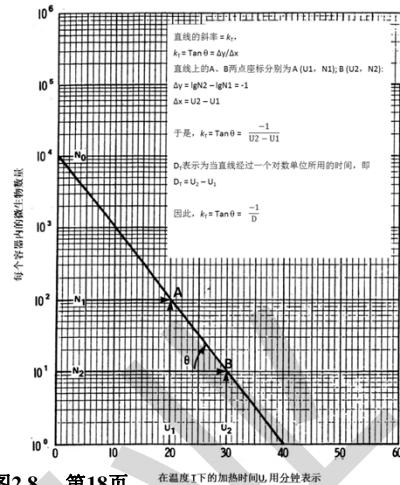


图2.8, 第18页

## Rahn 一级动力学模型实例

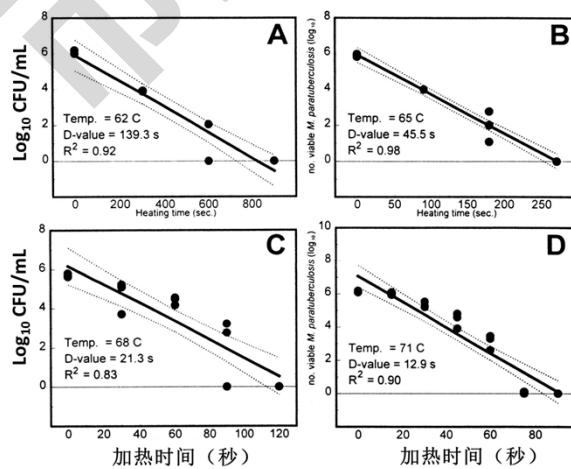


图2.9, 第19页

## 制药微生物学基础 (2/2)

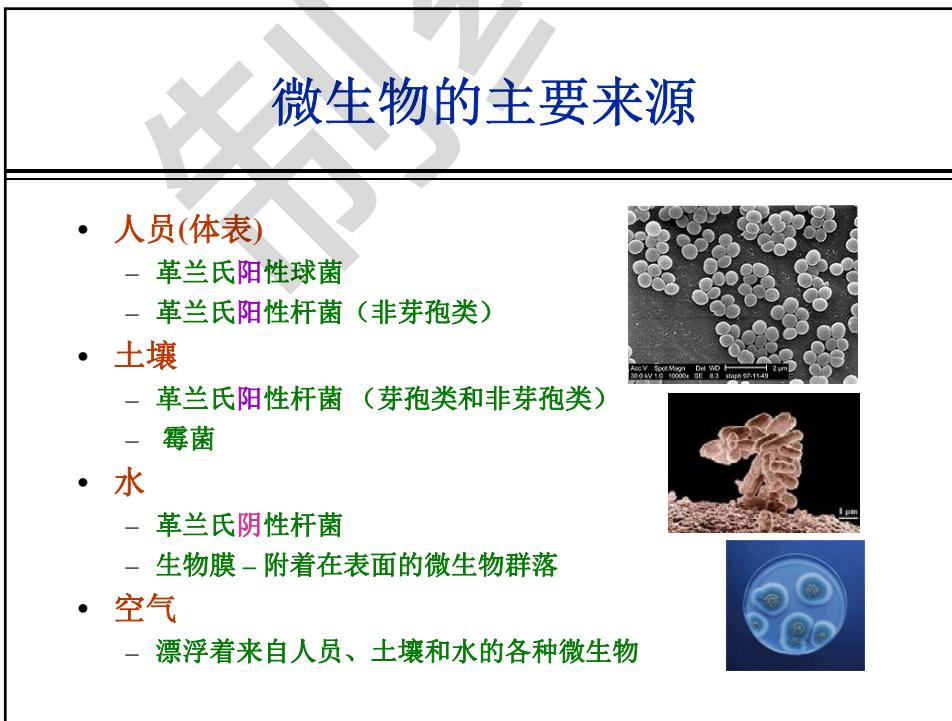
潘友文

2015-10 于上海

### 提 纲

- 污染菌的来源
- 微生物检测方法
- 检测方法 局限性
- 快速检测技术简介
- 业界和官方态度





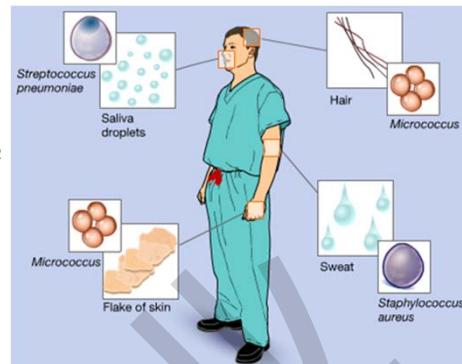
## 人体-微生物污染的主要来源

- 皮肤

- 葡萄球菌 *Staphylococcus*
- 微球菌 *Micrococcus*
- 棒状杆菌 *Corynebacterium*
- 丙酸杆菌 *Propionibacterium*

- 口腔

- 链球菌 *Streptococcus* (*S. pyogenes*, *S. mutans*)
- 奈瑟氏菌 *Neisseria*
- 微球菌 *Micrococcus*

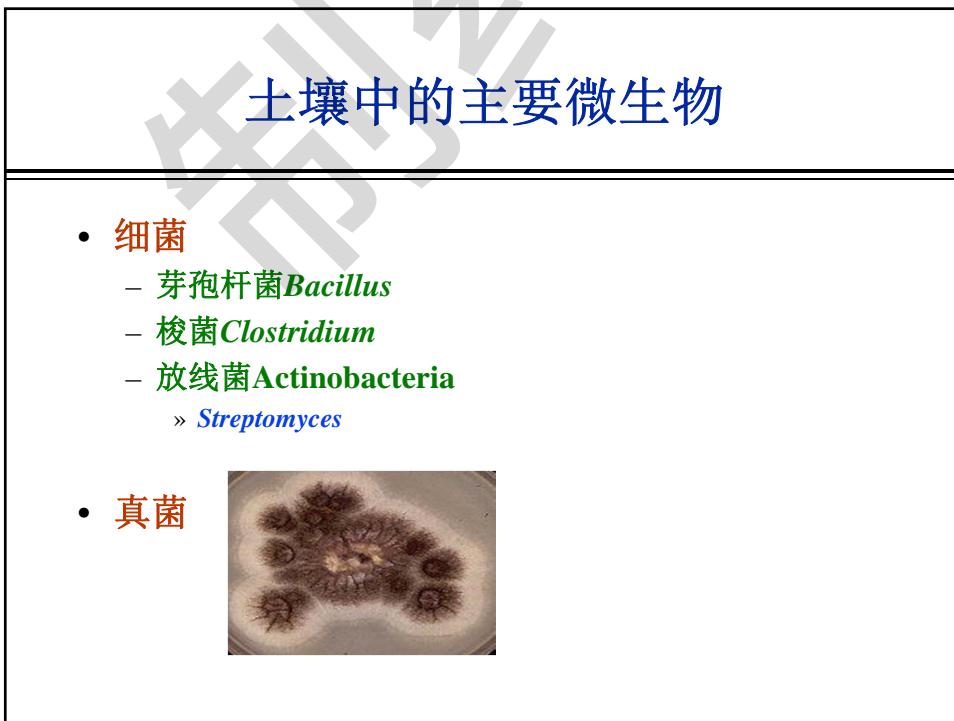
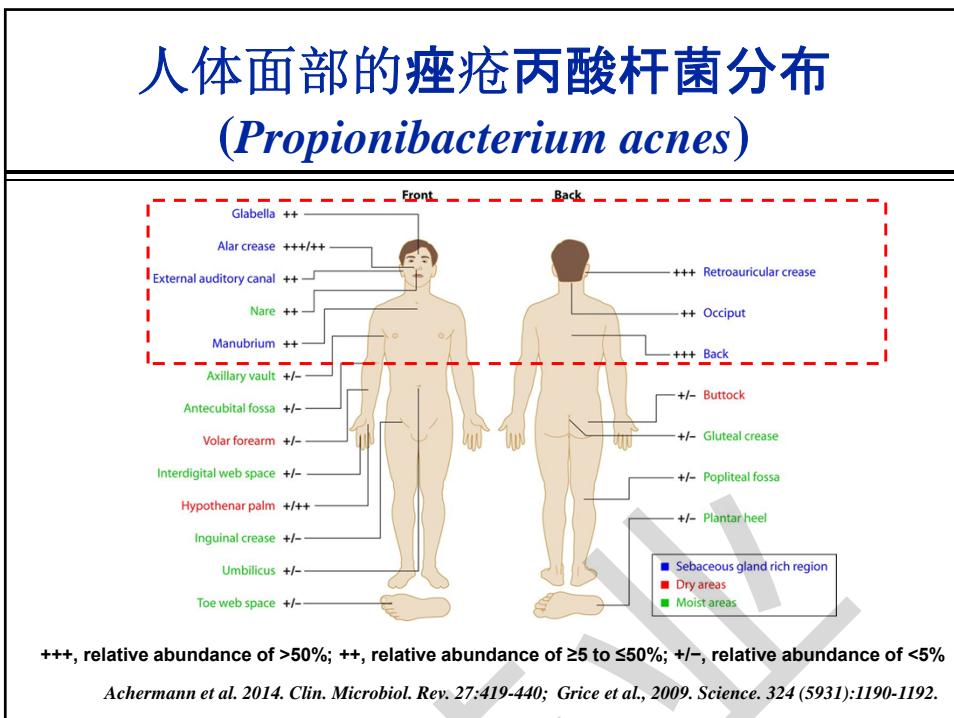


## 人体面部的痤疮丙酸杆菌 (*Propionibacterium acnes*)

- 导致无菌检查假阳性结果
- 导致生物制品生产上游开放式扩大菌种时污染细胞培养物



<http://scienceofacne.com/what-is-propionibacterium-acnes/>



## 水中的主要微生物

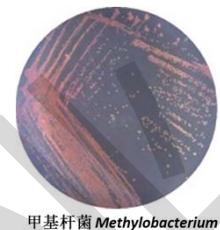
- 公共水源

- 大肠菌群 *Coliforms*
- 军团菌 *Legionella*
- 假单胞菌 *Pseudomonas*
- 病毒
- 原生动物

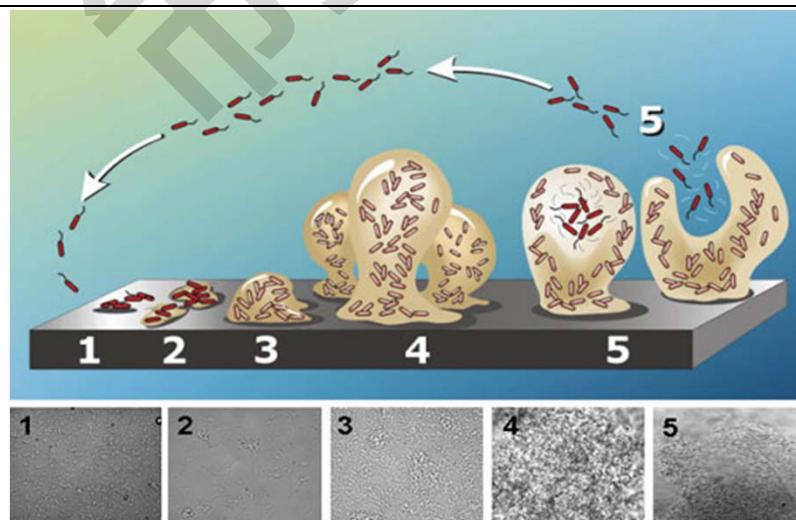


- 纯化水

- 鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas*
- 伯霍尔德杆菌 *Burkholderia*
- 罗尔斯顿氏菌 *Ralstonia*
- 甲基杆菌 *Methylobacterium*
- 分支杆菌属 *Mycobacterium*

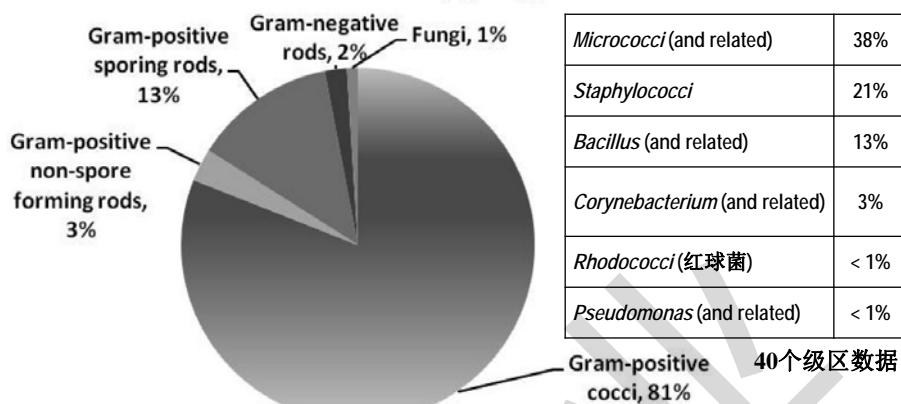


## 生物膜-纯水系统微生物污染顽疾



## A/B级洁净区内的主要微生物种类

Grade A and Grade B microflora by group, 2001-2009



Tim Sandle. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech* 2011, 65 392-403

## C/D级洁净区内的主要微生物种类

主要种类*	C 级区	D 级区
<b>Gram-positive cocci</b>	<b>63%</b>	<b>41%</b>
<b>Gram-positive sporing rods</b>	<b>10%</b>	<b>19%</b>
<b>Gram-positive nonsporing rods</b>	<b>14%</b>	<b>12%</b>
<b>Gram-negative rods</b>	<b>12%</b>	<b>20%</b>
<b>Fungi</b>	<b>1%</b>	<b>8%</b>

\*2000-2009年数据 35个C级区, 20个D级区

Tim Sandle. 2011. *PDA J Pharm Sci and Tech* 2011, 65 392-403

## 无菌制药工艺微生物的控制措施

- **GMP厂房设施的设计与建造**
  - 有效的通风过滤系统
  - 生产中不同工艺步骤间的隔离
  - 有效并经过验证的公用介质系统 (建立 微生物限度和合格标准)
- **环境控制**
  - 人流、物流、设备流
  - 无菌操作技术和更衣程序
  - 采用封闭系统
  - 有害物的控制
- **有效的清洁、消毒和灭菌计划**
- **风险管理**



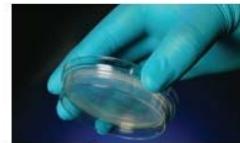
## 无菌制药工艺微生物监控方法

- **环境监控**
- **水系统、原料、内包材、介质、中间品的含菌量检查和内毒素含量检查**
- **生产系统清洗和消毒程序的验证**
- **灭菌、去热原工艺程序的验证**
- **最终成品的无菌、内毒素检查**



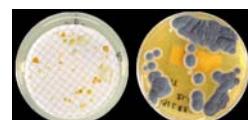
## 环境监控

- 制定监控方案
- 空气中活性粒子和非活性粒子的测定
- 设备、墙壁及地面的微生物检测
- 人员检测
- 分离菌的鉴别
- 数据分析和总结



## 微生物检测

- 含菌量检查
  - 总菌落数
  - 酵母菌和霉菌
  - 控制菌的检测
- 无菌检查
- 细菌内毒素检查
- 生物指示剂检查



## 药品生产中微生物监测的特点

- 微生物含量检查结果往往要等到被检物品被使用/生产后至少三天才能得到
- 监测结果的准确性和可靠性受多种因素影响
  - 样品的代表性?
  - 样品的处置（存储、转移）
  - 培养条件（培养基、温度和湿度等）与污染菌的适应性
  - 检验环境
  - 检验人员的技能
  - 物料的微生物学质量、生产系统的稳定性
- 超标结果事后调查程序复杂、挑战性大

## 微生物恢复生长的局限性

*S. aureus* 接种于7% NaCl ( $\sim 10^6$  CFU/mL) 中室温保存20天后在不同培养基上的生长状况 (0.05mL/平皿)

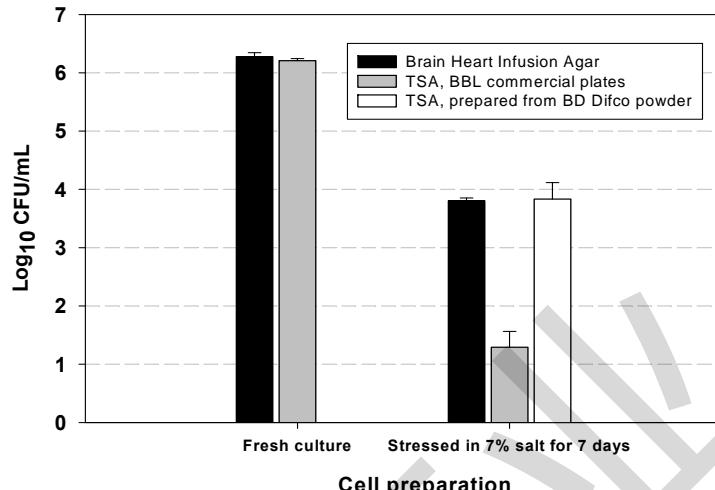


Schaedler

BHI

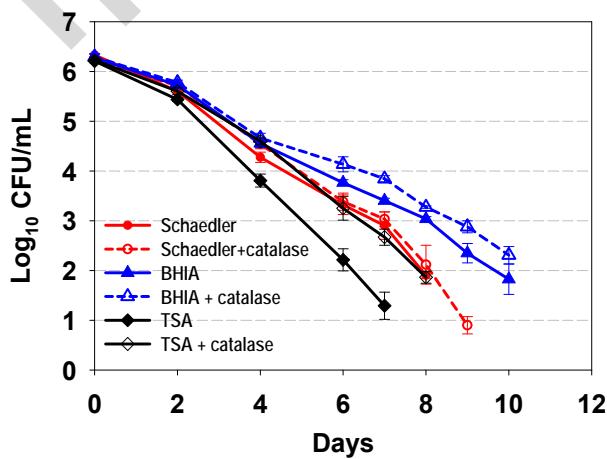
TSA

## 微生物恢复生长的局限性



## 微生物恢复生长的局限性

*E. coli* 接种并室温保存于7%NaCl中在不同培养基上的恢复生长状况



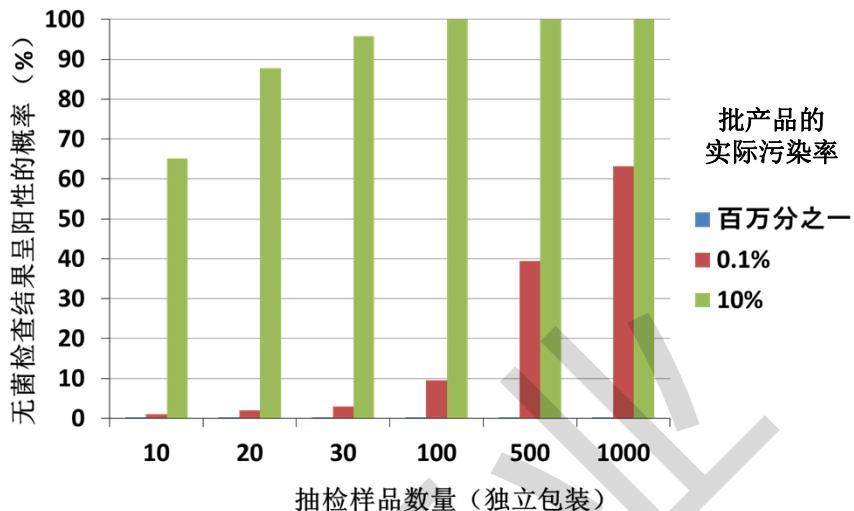
## USP38 《71》 STERILITY TESTS

- These Pharmacopeial procedures are not by themselves designed to ensure that a batch of product is sterile or has been sterilized. This is accomplished primarily by validation of the sterilization process or of the aseptic processing procedures. 药典所提供的这些检验方法并不能确保批产品是否无菌或已灭菌。无菌主要是通过验证灭菌工艺程序或无菌生产工艺来实现。
- The test is applied to substances, preparations, or articles which, according to the Pharmacopeia, are required to be sterile. However, a satisfactory result only indicates that no contaminating microorganism has been found in the sample examined under the conditions of the test. 本检验适用于药典中要求无菌的物品、制剂或成品。但是，合格结果仅仅表明，在测试条件下，没发现被检样品受微生物污染。

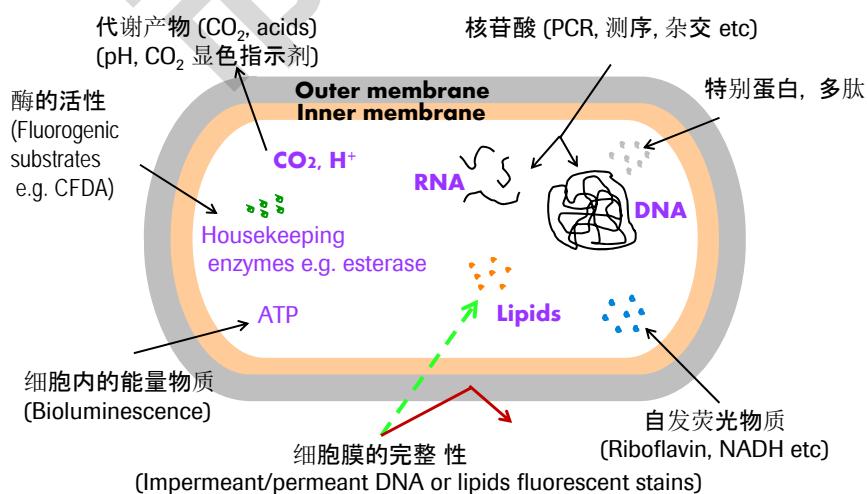
## 中国药典2015版 <1101> 无菌检查法

- 无菌检查法系用于检查药典要求无菌的药品、生物制品、医疗器具、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法。若供试品符合无菌检查法的规定，仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染。

## 无菌检查的局限性



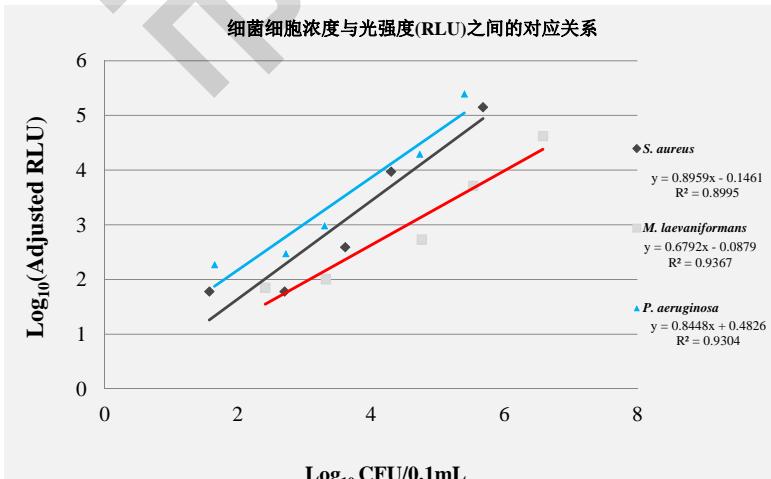
## 快速检测方法(RMM)的原理



## ATP检测技术在RMM中的应用

仪器/系统		Milliflex® Rapid	Pallcheck™	Celsis Advance™
方法	培养型	培养型	培养型	
应用	生物负荷/无菌	无菌		
出结果时间	8-24 小时 / 1-5 天	1-5 天		
检测量	60/天	100/天	120/天	
样品类型	可过滤样品	不限定	不限定	
最低检测限	1 CFU	1 CFU		
局限性	自动化程度低	自动化程度低	检测霉菌有挑战性	

## 定量检测的局限性



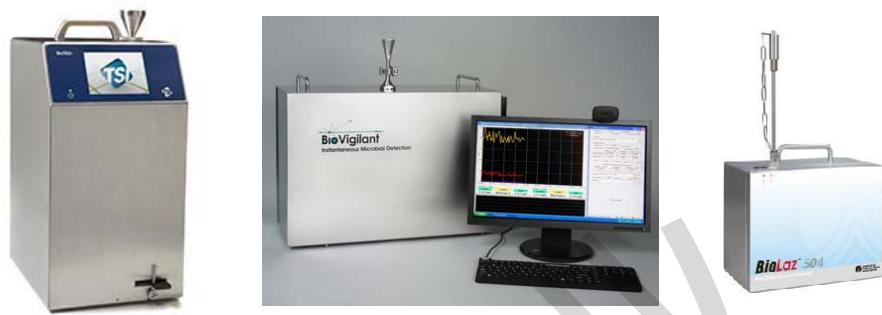
## 酶活性指示探针

		ScanRDI®	Milliflex® Quantum
仪器/系统			
方法	非培养法	培养法	
应用	生物负荷		生物负荷 / 无菌
出结果时间	1.5-3 小时		8-48 小时 / 1-5 天
检测样品数	30/天		60/天
样品类型	可过滤样品		可过滤样品
最低检测限	1 个细胞		1 个菌落
局限性	假阳性、破坏性、投资高、占地大		自动化程度低，很难检测霉菌

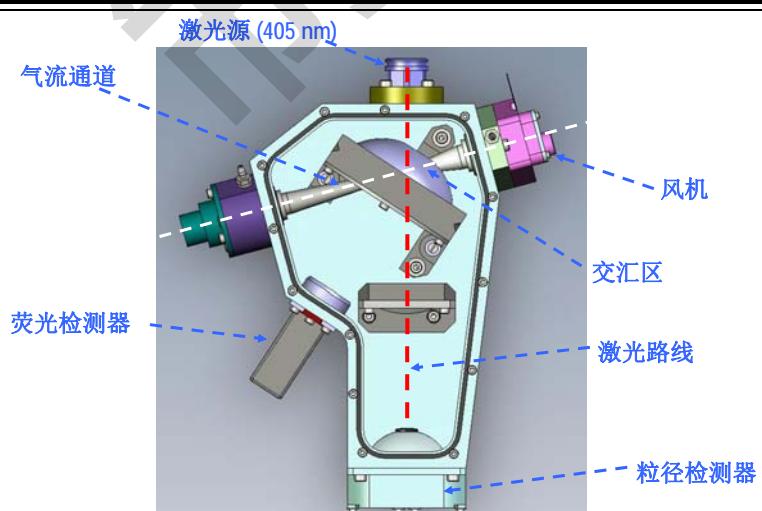
## 自动荧光检测系统

Growth Direct™ – Rapid Micro Biosystems	<ul style="list-style-type: none"> <li>方法: 基于培养</li> <li>应用: 生物负荷和无菌检查</li> <li>检测量: 同薄膜过滤, 依监控需要而定</li> <li>从检测到结果产生: 常规方法的一半时间</li> <li>检测量: ~ 30 样品/天</li> <li>自动化程度高. 自带培养箱, 每3小时读数一次。</li> </ul>
 	<ul style="list-style-type: none"> <li>局限性 <ul style="list-style-type: none"> <li>占地面积大</li> <li>投资大</li> <li>耗材贵</li> <li>日常维护相对复杂</li> </ul> </li> </ul>

## 空气活性/非活性粒子检测



## 空气活性/非活性粒子检测



## 微生物快速鉴定技术

设备/系统	MicroSeq®	MALDI Biotyper	RiboPrinter®
探针	16S rDNA	蛋白质、多肽	DNA 限制性片段
技术	PCR + DDA测序	MALDI-TOF 质谱	DNA印迹技术
检测总耗时	4-5 小时	2-3 分钟	~ 8 小时
检测数量	80/天	30-60/小时	~ 30/天
样品类型	菌落细胞	菌落细胞或菌悬液	菌落细胞
特点	方便操作、经济	快速，但数据库相对较小	数据库小，并且步骤繁琐

## 快速检测技术的挑选

- 成功的影响因素
  - 技术的挑战性
  - 易用性
  - 易于验证
  - 生产上适用/接受
  - 法规上接受
- 投资回报的影响因素
  - 资产/耗材成本
  - 额外的处理时间
  - 不确定性(因为错误的结果造成产品批报废)
  - 得出结果的时间



## 快速检测技术(RMM)小结

- 合理使用RMM可以增强产品和工艺质量
- 多数应用于生产过程监控，少数应用于放行检测
- 没有一个单独的RMM适用于多项目检测
- 应根据用途或使用目的选择适当技术
- 市场上的设备技术未必都成熟可用

## FDA目前对微生物控制的态度

- 从事微生物检测工作人员经过充分培训
- 所有检测方法必须经过验证
- 取样的代表性（统计学手段）
- 检测结果的分析与总结
- 风险管理



# 无菌保证与灭菌的核心概念

潘友文

2015-10 于上海

## 提 纲

- 无菌和无菌保证的概念
- 微生物在灭菌条件下的死亡规律
- D值、z值、和F值的定义和计算方法

## “无菌”的绝对性和相对性

- 绝对性：要么“有”，要么“没有”
- 相对性：“有”或“没有”发生的概率

灭菌过程中，微生物数量在浓度、单位产品和整批产品中的对应关系示例 (表3.1)

121.1°C暴热时间 (分钟)	微生物浓度 (CFU/mL)	单位产品中的存活的 微生物数量 ( $\times 100$ )	污染品的概率 (PNSU)
0.0	10	1000	
0.5	1	100	
1.0	0.1	10	
1.5	0.01	1	
2.0	0.001	0.1	1/10
2.5	0.0001	0.01	1/100
3.0	0.00001	0.001	1/1000
3.5	0.000001	0.0001	1/10000
4.0	0.0000001	0.00001	1/100000
4.5	0.00000001	0.000001	1/1000000

## 概率-机会、风险 Probability – Chance, Risk

- 任何活动或事件的发生都存在“可能性”
- 生活中有时我们会被大脑或双眼“调戏”
- 正确理解“概率”  
并将其有效应用，  
将会帮助我们预测  
和掌握在生活、工作、  
生产中存在的问题  
(风险分析与管理)



## 无菌保证 (Sterility Assurance) 相关概念

- 污染概率/非无菌品的概率 (PNSU)
  - Probability of a Non-Sterile Unit
  - 直接、易懂，被普遍接收和采用
- 无菌保证水平 (SAL)或无菌控制水平 (SCL)
  - Sterility Assurance Level or Sterility Control Level
  - 被采用，但表述不如PNSU直接、正规
- 对数下降值 (LR)
  - Log reduction
  - 不用于表述无菌保证的目标/标准，只用于评价工艺程序的灭菌效力

## 无菌保证 (Sterility Assurance) 相关概念

- 微生物控制的最终目的是为病人生产出符合一定无菌保证标准的无菌产品
  - 如果能预测一批产品的污染概率为千分之一，即使用这批产品的一千个人中，有一人可能会被产品中的污染菌感染
- 12D 的由来
  - 在食品工业，能使肉毒梭菌下降12个对数单位的灭菌程序
  - 在制药工业，用作过度杀灭程序的标准，但非无菌产品的标准
- 被广泛接受的无菌保证标准 (PNSU)或目标
  - 最终灭菌产品: PNSU为百万分之一 ( $1.0 \times 10^{-6}$ )
  - 无菌工艺产品: PNSU为千分之一 ( $1.0 \times 10^{-3}$ )

非无菌品的概率 (PNSU)

## PNSU的理解与计算

- 了解和掌握微生物在特定灭菌条件下的存活/死亡规律
  - 在一定状态下，微生物对灭菌条件的耐受性/抵抗力（D值、Z值）
  - 灭菌条件的精准描述与控制（ $F_0$ 值、辐射剂量等）
- 合理、可靠而准确的计算方法（生物、物理和数学等）
- 生物指示剂的代表性 - 与特定产品相关

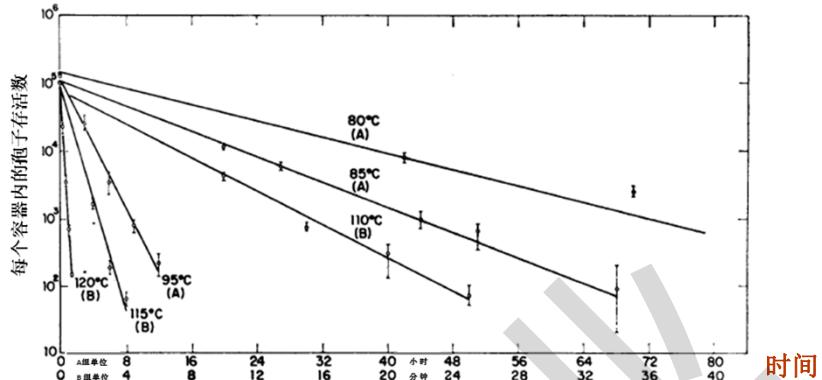
非无菌品的概率 (PNSU)

## 微生物在灭菌条件下的存活/死亡规律

- 熟悉半对数图纸与普通算术图纸的差别
- 根据实验数据在半对数图纸和算术图纸上练习作图
  - 枯草芽孢杆菌孢子在110°C下，加热不同时间后的存活数量
  - 在算术图纸（1.1）和半对数图纸（1.2）上作图
    - » 横坐标：时间
    - » 纵坐标：孢子存活数量
  - 在算术图纸（1.3）上作图
    - » 横坐标：时间
    - » 纵坐标：孢子存活数量的对数值

## 微生物在灭菌条件下的存活/死亡规律

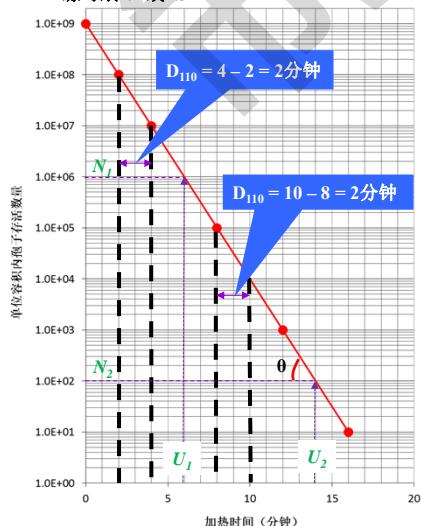
- 一级动力学模型



悬浮于磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 中的生孢梭菌孢子 (*Clostridium sporogenes*) 在不同温度下的残存曲线。(摘自Liciardello and Nickerson, 1963)

**D值:**在一定温度下, 使微生物数量下降90%或一个对数单位所需要的时间

练习纸1.2或1.3



**K:** 直线的斜率

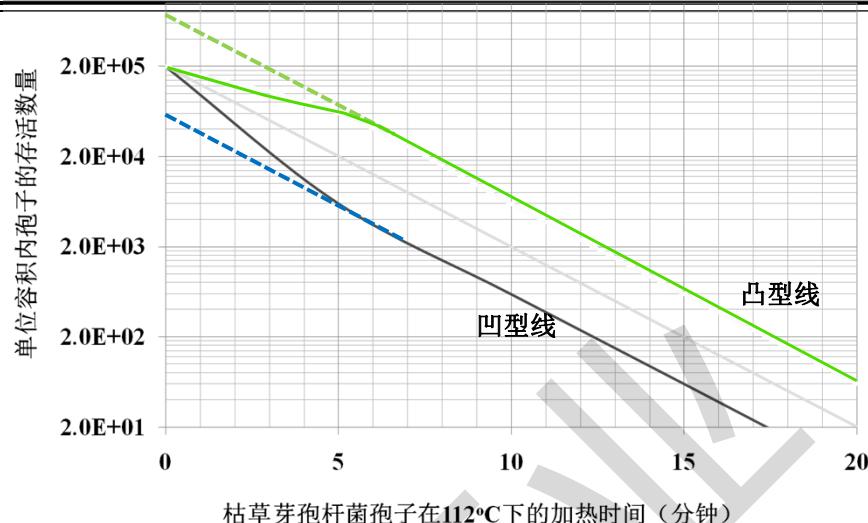
$$K = \tan \theta = \frac{\Delta y}{\Delta x} = \frac{\lg N_2 - \lg N_1}{U_2 - U_1}$$

$$\begin{aligned} &= \frac{2 - 6}{14 - 6} \\ &= \frac{-4}{8} \\ &= -\frac{1}{2} \end{aligned}$$

$$D_{110} = -1/k = 2 \text{ (分钟)}$$

$$D_T = \frac{U}{\lg N_0 - \lg N_U}$$

## 凸型或凹型残存曲线上计算D值

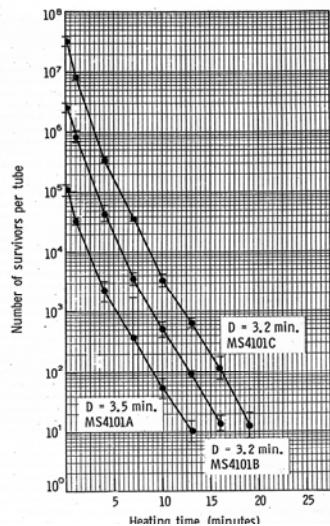


## 练习1.4

- 将孢子浓度为 $1.0 \times 10^8$  spores/mL的嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 孢子分装至四支毛细管内 (0.01mL)，在115°C加热不同时间后，对残存的活孢子计数。结果如下：

时间(分钟)	10	20	30	40
每支管内残存的孢子数量	$4.5 \times 10^4$	$2.0 \times 10^4$	$9.0 \times 10^3$	$4.0 \times 10^3$

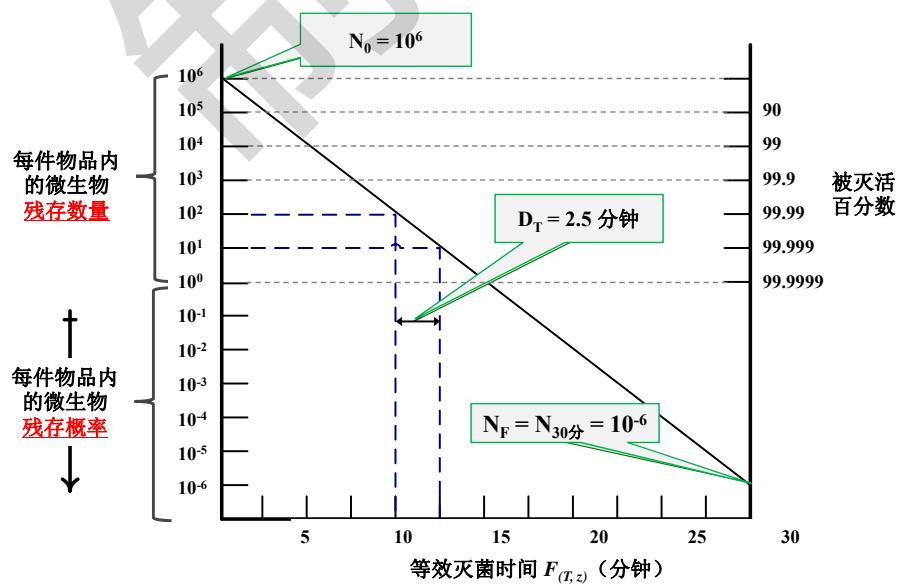
微生物对特定灭菌条件的耐受性(D值)与微生物细胞/孢子浓度基本无关

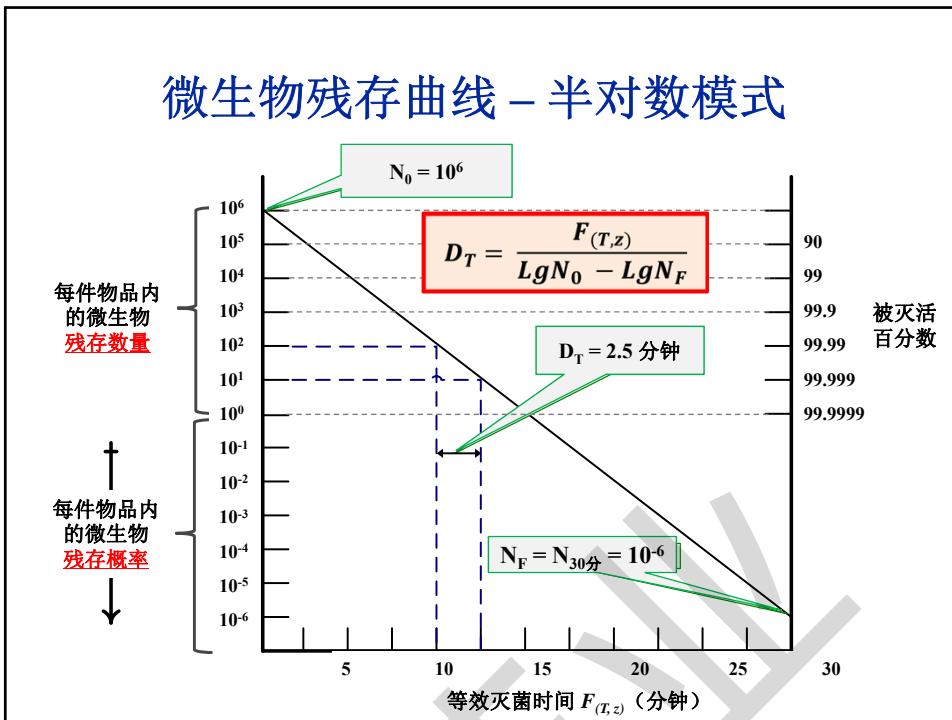


嗜热脂肪芽孢杆菌  
(*Geobacillus stearothermophilus*)孢子在注射用水中,  
121.0°C下加热不同时间的残存数量。

Pflug et al., 1976

### 微生物残存曲线 - 半对数模式





$$D_T = \frac{F_{(T,z)}}{\lg N_0 - \lg N_F}$$

可转换为：

$$F_{(T,z)} = D_T (\lg N_0 - \lg N_F)$$

式中，

$N_0$  = 灭菌前起始微生物数量

$N_F$  = 灭菌完成时被灭菌物品内的微生物数量；或是被灭菌物品的无菌保证标准/目标（如  $10^{-6}$ ）

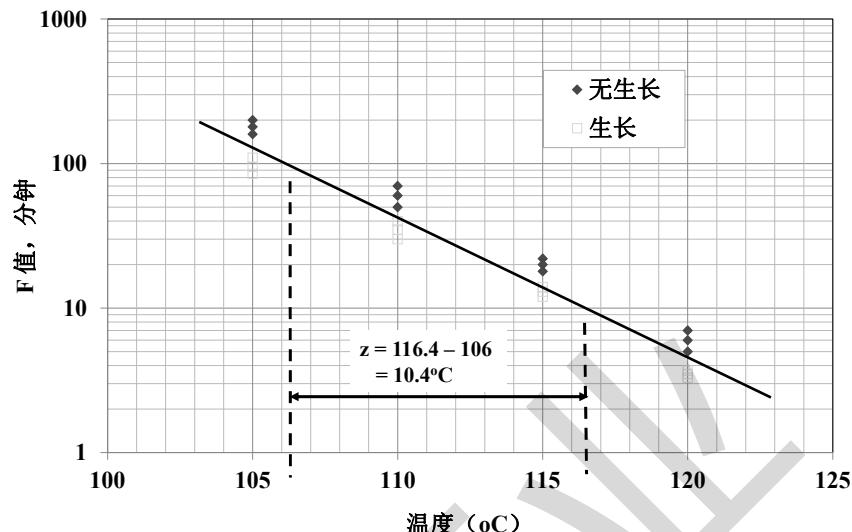
$D_T$  = 物品内的污染菌对灭菌条件的耐受性/抵抗性

$F_{(T,z)}$  = 灭菌值，生物和工程物理之间的桥梁。

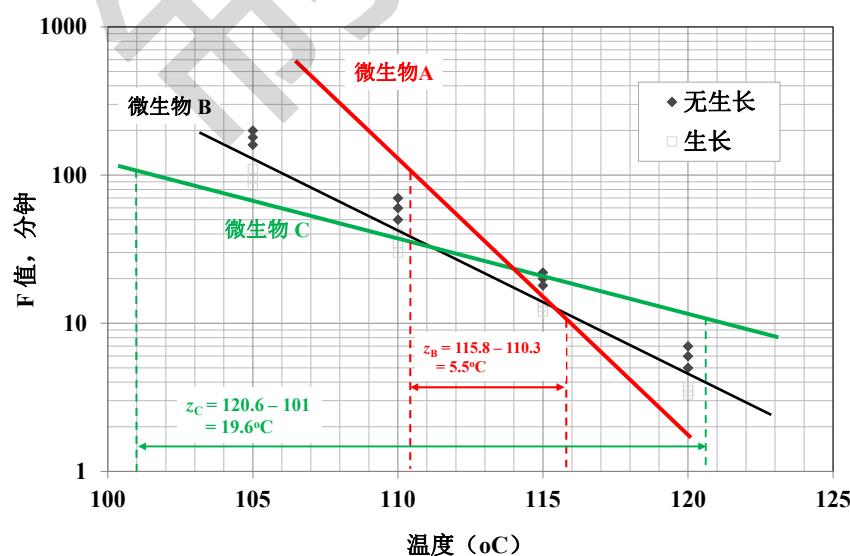
$T$  = 温度（物理参数）

$z$  = 温度相关系数（微生物参数）

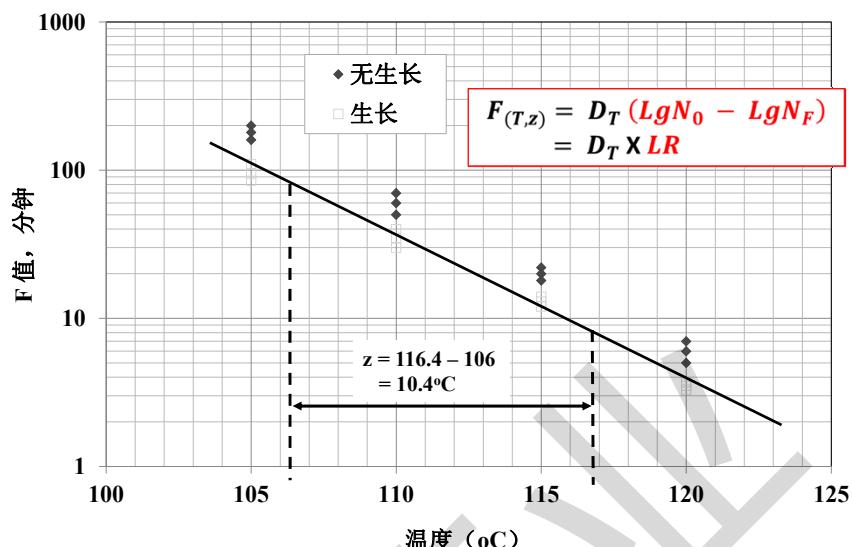
## 热致死时间曲线TDT-温度系数 z



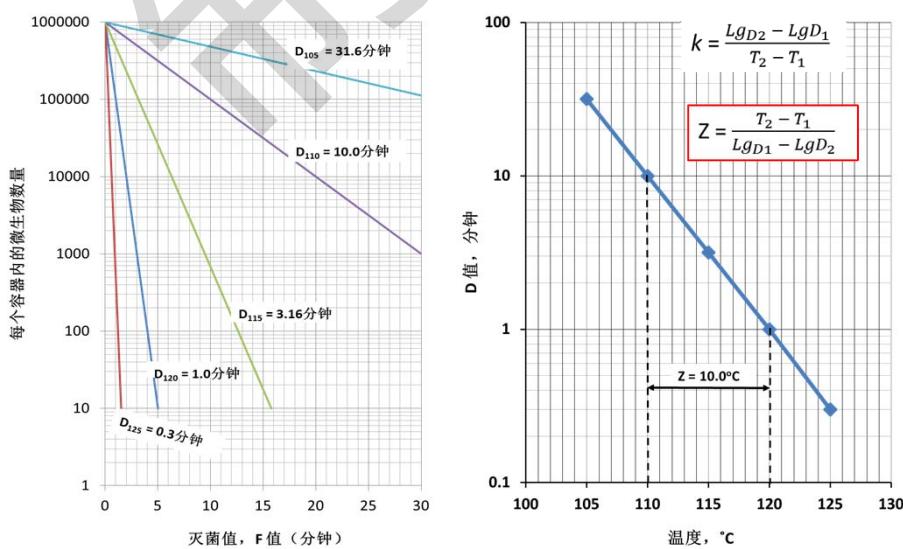
## 热致死时间曲线TDT-温度系数 z

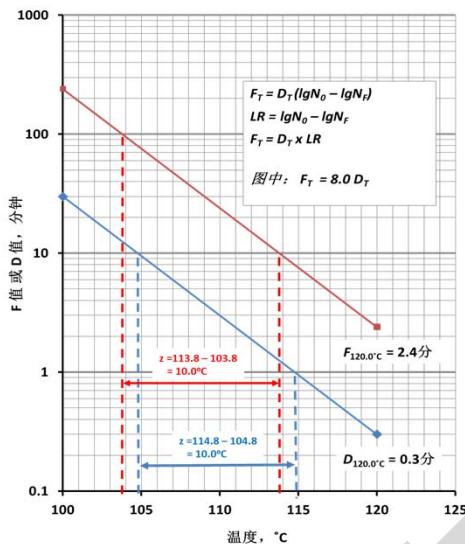


### 热致死时间曲线TDT-温度系数 z



**z**值是指使D变化一个对数单位温度需变化的度数



耐热性曲线( $\text{LgD vs T}$ )和热致死曲线( $\text{LgF vs T}$ )

 斜率  $k$ 

$$k = \frac{\text{Lg}F_{T_2} - \text{Lg}F_{T_1}}{T_2 - T_1}$$

 将  $T_1$  换成参照温度,  $T_2$  为任意温度

$$k = \frac{\text{Lg}F_T - \text{Lg}F_{T_{Ref}}}{T - T_{Ref}} = -\frac{1}{z}$$

于是,

$$\frac{F_{Ref}}{F_T} = 10^{\frac{T-T_{Ref}}{z}}$$

 **$U, F_T, F_{ref}$  和  $F_o$** 

$$F_{(T,z)} = D_T (\text{Lg}N_0 - \text{Lg}N_f) \\ = D_T \times LR$$

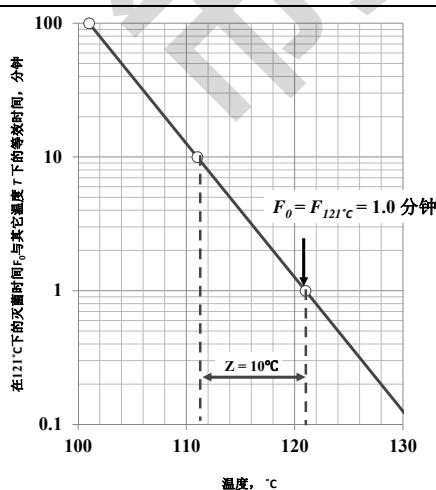
- $U$  指某一特定温度下的实际灭菌时间, 即  $U_T$ ;
- $F_T$  泛指某温度  $T$  下的等效灭菌时间, 与特定的微生物有关, 即  $F_{(T,z)}$ ;
- $F_{ref}$  泛指某参照温度下的等效灭菌时间, 即  $F_{(ref,z)}$ ;
- $F_o$  专指在 **121.1°C (250°F)** 下的等效灭菌时间, 即  $F_{(121.1°C, 10°C)}$

$$\frac{F_{Ref}}{F_T} = 10^{\frac{T-T_{Ref}}{z}}$$

## Z值的应用

- 转换不同温度下的灭菌值  $F_{(T,z)}$ ;  
– 练习 1.5
- 评估灭菌程序对灭菌物品的质量影响
- 计算灭菌率
  - 相对杀灭时间 (Relative Kill time) RKT
  - 灭菌率  $L = 1/RKT$

## 相对杀灭时间 (Relative Kill time) RKT



RKT是以参照温度(121.1°C)下灭菌1分钟为基点，在温度T下杀灭相同数量微生物时需要的等效灭菌时间。

$$\frac{F_{Ref}}{F_T} = 10^{\frac{T-T_{Ref}}{z}}$$

$$\frac{1}{RKT} = 10^{\frac{T-T_{Ref}}{z}}$$

$$RKT = \frac{F_T}{F_{Ref}} = 10^{\frac{-(T-T_{Ref})}{z}}$$

## 灭菌率 $L$

- 是相对杀灭时间（RKT）的倒数

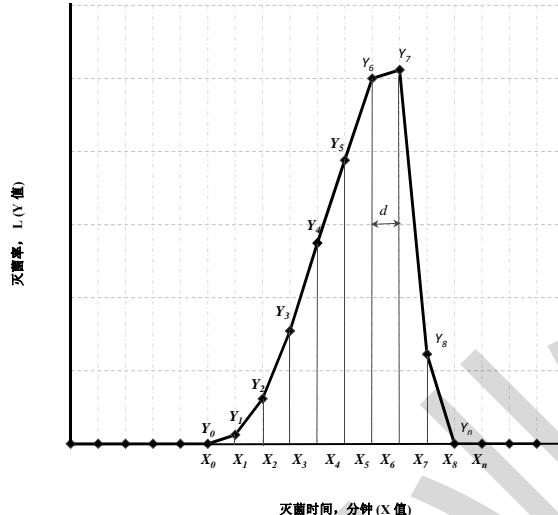
$$L = \frac{1}{RKT} = 10^{\frac{T-T_{Ref}}{z}} = 10^{\frac{T-121.1}{10}}$$

- 考察在温度  $T$  单位时间（1.0分钟）内产生的灭菌效力对应于在参照温度下产生相同灭菌效力所需的灭菌时间（分钟）
- 总是与具体的灭菌温度和参照温度相关，是在参照温度下的等效灭菌时间（分钟），该时间与在某具体温度下灭菌1.0分钟所产生的灭菌效果相当。
- 比率 - 反映特定温度与参照温度的灭菌效果关系。

### 灭菌程序 $F_0$ 的计算 ( $z=10^{\circ}\text{C}$ , $T_{ref}=121.1^{\circ}\text{C}$ )

运行时间 (t) 温度记录间隔 $d=2$ 分	腔室温度 设定点 $121.5^{\circ}\text{C}$	产品内温度 (T)	灭菌率(L)	$F_0$ 值 $F_0 = \sum L \times d$
0	30	30	0	0
2	60	32	0	0
4	90	40	0	0
6	110	55	0	0
8	118	70	0	0
10	120.5	90	0	0
12	121.5	105	0.025	0.049
14	121.5	112	0.123	0.295
16	121.5	116	0.309	0.913
18	121.5	118.5	0.550	2.012
20	121.5	120	0.776	3.565
22	121.5	121.1	1.000	5.565
24	121.2	121.2	1.023	7.611
26	80	115	0.245	8.102
28	45	97	0	8.102
30	35	80	0	8.102
32	30	63	0	8.102
34	30	45	0	8.102

$$F_0 = \sum L \times d = d [L_{T_1} + L_{T_2} + L_{T_3} + \cdots + L_{T_{(n-1)}}]$$

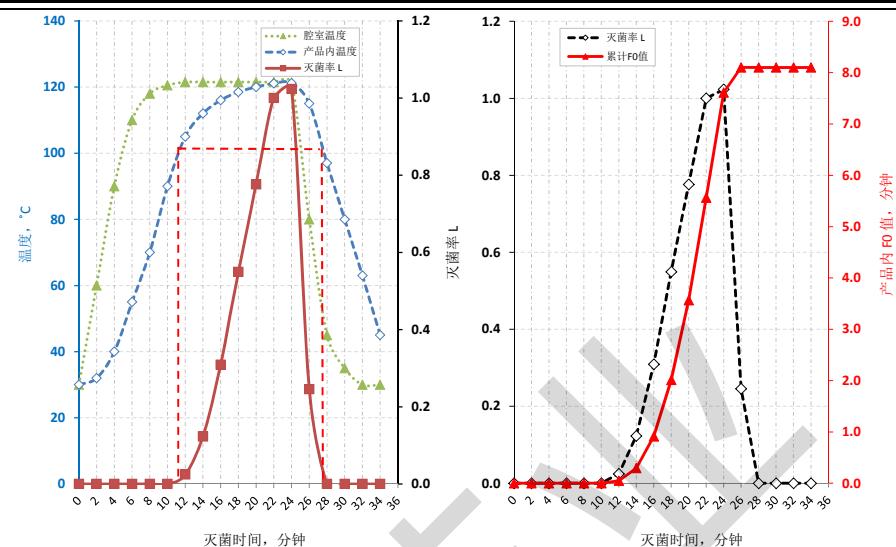


$F_0$  值/ $F_{phy}$  值计算

$$F_0 = F_{(121.1^\circ\text{C}, 10^\circ\text{C})} = \sum 10^{\frac{T-121.1}{10}} dt$$

$$F_{phy} = F_{(T_{ref}, z)} = \sum 10^{(T-T_{ref})/z} dt$$

## 灭菌程序 $F_{0\text{物理}}$ 的计算 ( $z=10^\circ\text{C}$ , $T_{ref}=121.1^\circ\text{C}$ )



# 制药用水系统的微生物污染 控制和生物膜控制

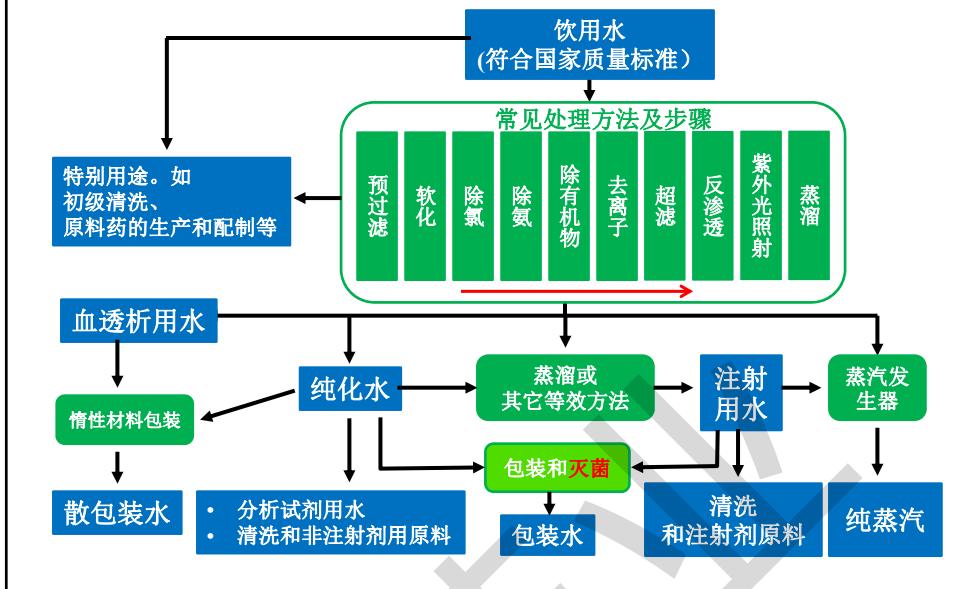
潘友文

2015年10月 上海

## 提 纲

- 制药用水的分类及质量指标 (USP)
- 制药用水生产系统污染控制要点
  - 消毒
  - 日常维护与监控
  - 取样和微生物检测
  - 微生物数据分析与处理
- 生物膜简介及其在水系统的控制

## 制药用水的制备流程示意图



## USP对水的级别划分

- 散装水
  - 纯化水(PW)
  - 注射用水(WFI)
  - 血透析用水(Water for hemodialysis)
  - 纯蒸汽(气态水)
- 包装水
  - 无菌注射用水(SWFI)
  - 无菌清洗用水(SWFIRR)
  - 无菌呼吸用水(SWFInh)
  - 无菌纯化水(SPW)
  - 抑菌性注射用水(BWFI-Bacteriostatic water for injection)



## 制药用水类别及其检测项目 (USP)

种类	散装水				无菌包装水				
	纯水	注射用水	纯蒸汽	血透析用水	纯水	注射用水	清洗用水	呼吸用水	抑菌注射用水
TOC	√	√	√	√	√	√	√	√	
电导	√	√	√	√	√	√	√	√	
内毒素		√	√	√		√	√	√	√
可氧化物					√	√	√	√	
无菌					√	√	√	√	√
生物负荷				√					
微粒						√			√
抑菌组份									√
pH									√
钙									√
CO <sub>2</sub>									√
硫酸盐									√

## 包装水的质量区别(USP)

种类	主要用途	与无菌注射用水(SWFI)的区别
无菌注射用水(SWFI)	药品溶解、稀释	-
无菌冲洗用水(SWFIRR)	手术清洗	无微粒要求
无菌呼吸用水(SWFInh)	呼吸机增湿	内毒素含量标准略高
无菌纯化水(SPW)	实验室、药房配制非注射用药品	无内毒素要求
抑菌性注射用水(BWFI)	溶解、配制多剂量药品	加有一种（或以上）防腐剂

## 散装水的质量标准区别(USP)

种类	化学指标	微生物和内毒素指标
纯化水(PW)		无
注射用水(WFI)	电导率: $\leq 1.3 \mu\text{S}/\text{cm}$ (25°C)	内毒素: $< 0.25 \text{ EU}/\text{mL}$
纯蒸汽(PS)	TOC: $\leq 0.50 \text{ mg/L}$	内毒素: $< 0.25 \text{ EU}/\text{mL}$
透析用水 Water for hemodialysis		内毒素: $< 1.0 \text{ EU}/\text{mL}$ 总菌数: $\leq 100 \text{ CFU}/\text{mL}$ , 无绿脓杆菌( <i>P. aeruginosa</i> )

## 散装水与包装水的理化质量标准

检测项目	纯水 / 注射用水	
	散装水	包装水
电导率 ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ ) $25 \pm 1^\circ\text{C}$	$\leq 1.3$	$\leq 10 \text{ mL}/\text{包装}; \leq 25$ $>10 \text{ mL}/\text{包装}; \leq 5$
TOC (mg/L)	$\leq 0.50$	$\leq 8.0$

## 分析试剂用水的源水为纯水

- 蒸溜水 (Distilled water)
- 新蒸溜水 (Freshly distilled water)
- 去离子水 (Deionized water)
- 新去离子水 (Freshly deionized water)
- 去离子蒸溜水 (Deionized distilled water)
- 过滤水 (Filtered water)
- 高纯水 (High-purity water)
- 无氨水 (Ammonia-Free water)
- 无CO<sub>2</sub>水 (Carbon Dioxide-Free water)
- 无氨和无CO<sub>2</sub>水 (Ammonia- and Carbon Dioxide-Free water)
- 去空气水 (Degaassed water)
- 刚煮开过的水 (Recently boiled water)
- 无氧水 (Oxygen-Free water)
- 药剂用水 (Water for BET or LAL test) – 注射用水
- 无铅水 (Lead-Free water)
- 无氯化物水 (Chloride-Free water)
- 无有机物水 (Organic-Free water)



## 纯水和注射用水系统

### • 生产系统



### • 存储/分配系统



## 制药用水主要生产单元污染控制要点

- **预过滤**
  - 去除源水中7-10微米以上固体颗粒物
  - 监控压差和流速，防止产生沟槽或过滤介质流失
- **活性炭床**
  - 吸附低分子量有机物和氧化性添加剂，如氯、氯胺
  - 易滋生微生物、生成生物膜
- **有机物去除(大网络弱碱性阴离子交换树脂)**
  - 去除有机物和细菌内毒素
  - 监测进出水的TOC含量、压差和流速，下游过滤器截留树脂微粒

## 制药用水主要生产单元污染控制要点

- **软化**
  - 阳离子交换树脂，去除水中的镁、钙离子，也可以去除低亲和力的阳离子（铵离子）
  - 树脂床易于微生物生长并形成生物膜，要定期对树脂和卤液消毒。监测离子浓度、pH、树脂表面结垢、再生频率等
- **去离子**
  - 去离子(DI)带电树脂及连续电除盐(CEDI)设备
  - 易于微生物生长，并形成生物膜、树脂表面结垢。监控电导率及微生物含量。确定适当的消毒方案、树脂再生方案。

## 制药用水生产系统主要单元污染控制要点

### • 超滤(Ultrafiltration)

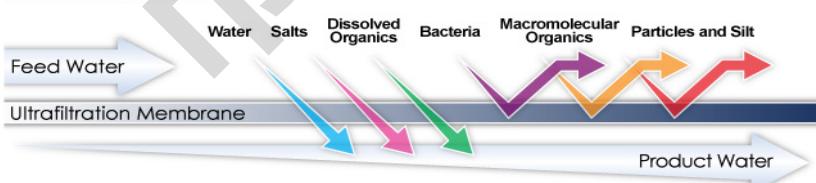
- 去除内毒素等大分子（1万至2万Da）物质，采用聚砜类半透膜或陶瓷超滤器。工作效率取决于源水质量。
- 监控膜的完整性，注意避免有死角，易长生物膜。

### • 反渗透 (Reverse Osmosis)

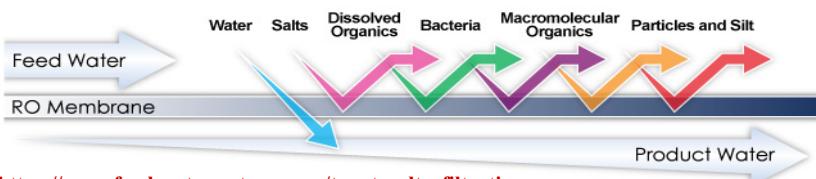
- 常规出水率75%左右，能使杂质（化学物质、微生物和内毒素等）下降1-2 log单位。此单元工作效率取决于源水质量。
- 膜的完整性至关重要。膜对消毒剂敏感，常用加温方法消毒。

## 超滤和反渗透的性能差别

### Ultrafiltration



### Reverse Osmosis



<https://www.freshwatersystems.com/t-waterultrafiltration.aspx>

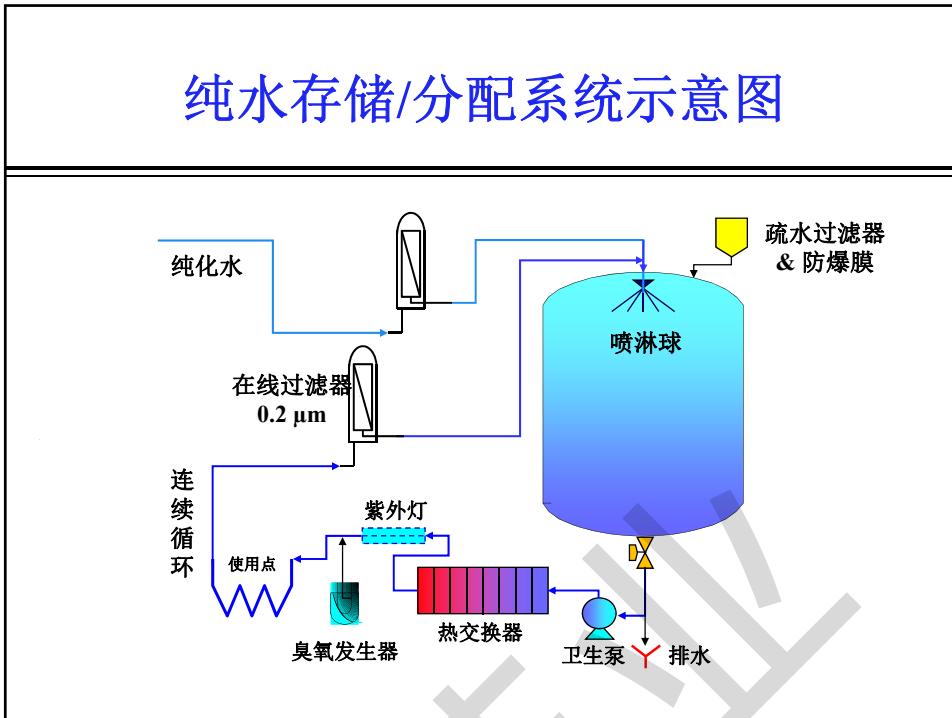
## 制药用水生产系统主要单元污染控制要点

- **微生物截留过滤器**
  - 0.45 微米 或 0.22微米
  - 挑战菌株: 微小短波单胞菌(*Brevundimonas diminuta*)
  - 0.1 微米, 会影响流速
  - 易滋生微生物、生物膜。上游安装紫外灯消毒利于延长过滤器使用寿命
- **紫外灯**
  - 254nm 杀菌和降解臭氧
  - 185nm 利于降解水中的含氯消毒剂, 常用于上游, 与氧化剂如H2O2联合使用利于降低水中TOC水平
  - 监控光的强度、更换灯管、清洁表面

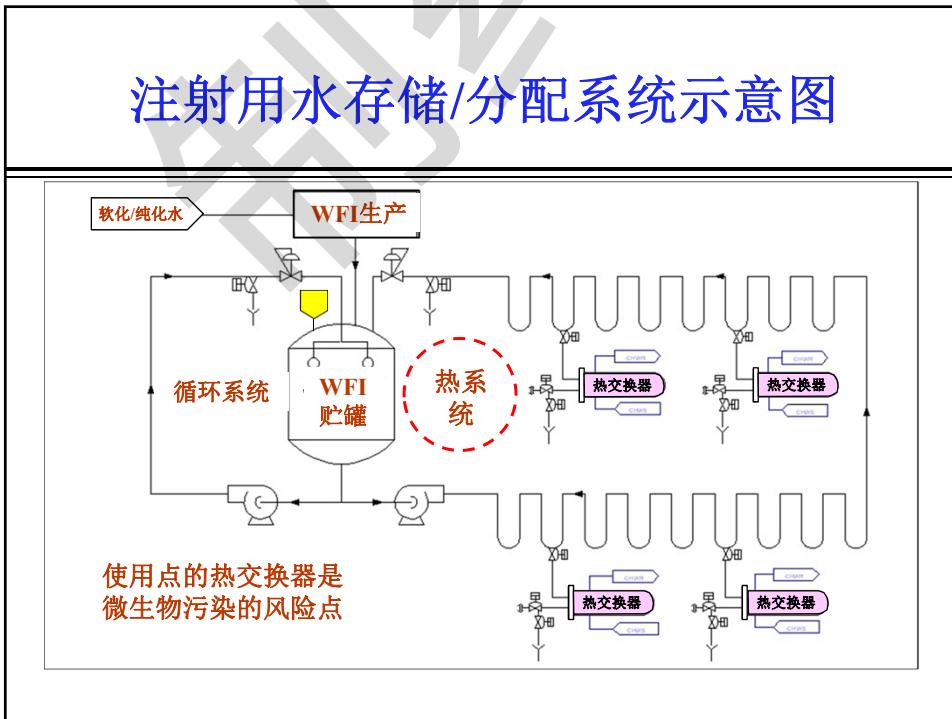
## 制药用水生产系统主要单元污染控制要点

- **蒸馏 (Distillation)**
  - 去除化学物质和微生物物质, 通常可下降 3-4 log 单位
  - 并不能彻底地清除所有污染物
  - 尽可能降低源水中的挥发性或非挥发性污染物
  - 采用卫生级元件设备, 避免微生物和润滑剂污染
- **储罐和分配**
  - 保持水的高速循环, 避免死角, 防止生物膜形成
  - 定期消毒
  - 管路有适当斜度, 便于蒸汽消毒时排冷凝水
  - 任何接口要平滑、不留积水死角等

## 纯水存储/分配系统示意图



## 注射用水存储/分配系统示意图



## 制药用水生产/分配系统的验证和确认

- 建立可靠的制药用水生产、储存和分配系统需要一段适当时间（至少一个月）的监控。需要一个稳定和成熟的过程。
- 验证的目的通过书面证据证明水系统能持续性地生产出符合预定质量要求的水。
- 验证阶段：IQ、OQ、和PQ
- 验证计划通常包括的九个主要步骤
  1. 确定并建立源水和产出水的质量标准
  2. 确定适当的生产单元设备
  3. 选择管道系统、设备、控制系统和监测系统
  4. 建立IQ阶段的文件系统并实施IQ项目，检查并核实图纸的准确性、仪表校验、证实安装符合设计要求相关试验

## 制药用水生产/分配系统的验证和确认

- 验证计划通常包括的九个主要步骤
  5. 建立OQ阶段的文件系统并实施OQ项目：检查并核实设备、系统报警和控制系统运行良好、稳定、符合设定要求。建立与系统相适应的警戒水平和纠偏限度。
  6. 建立PQ文件系统并实施相关测试项目：确认所有关键质量指标的警戒水平和纠偏限度、以及操作参数设置合理适当。
  7. 确保控制性方案措施合理到位，如消毒频率等
  8. 持续性验证周期。考察和评价系统维护计划的合理性，通常包括仪器仪表的校验、清洗和消毒方案的实验效果以及变更管理
  9. 建立系统运行状况的定期检查计划和再确认计划

## 水系统的消毒

- 消毒是控制水系统污染的主要手段
- 消毒方案应经过验证
- 间歇性或持续性热水循环或采用蒸气消毒
  - 常见热水温度 $\geq 80^{\circ}\text{C}$ ;  $\geq 60^{\circ}\text{C}$ 持续性热水循环
  - 仅适用于耐高温系统
  - 可以杀灭生物膜中的微生物, 但不能去除生物膜
  - 与阶段性化学消毒组合, 效果更佳

## 水系统的消毒-续

- 化学消毒
  - 酸、碱、强氧化剂包括 卤代化合物,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_3$ 过氧乙酸或混合物
  - 受浓度影响, 臭氧需要持续加入
  - $\text{UV}_{254\text{nm}}$ 降解过氧乙酸成乙酸, 降解臭氧 $\text{O}_3$ 成 $\text{O}_2$
  - 化学式: 臭氧 $\text{O}_3$ +水+ $\text{UV}_{254\text{nm}}$  $\rightarrow 2\text{OH} + \text{O}_2$
- 在线紫外辐射
  - 与其它消毒方式结合, 能有效控制污染,
  - 例双氧水/ $\text{H}_2\text{O}_2$  + $\text{UV}_{254\text{nm}}$  $\rightarrow 2\text{OH}$
  - 多安装在除菌过滤器前, 有利于延长过滤器寿命和使用效率

## 运行、维护和监控

- 建立系统运行所需要的操作规程
- 建立和实施对关键质量指标包括仪器仪表校验的监控方案
- 建立适当的警戒水平和纠偏限度
- 建立和执行消毒计划
- 设备及零配件的预防性维护和保养
- 机械系统和操作条件变更管理方案

## 取样方案

- 取样频率、取样点数和取样量要能真实反映系统中水的质量
- 取样点应尽可能在使用点或接近使用点
- 样品容器不得对水的质量产生不良影响
- 样品中若含有化学物质，需要在微生物检查前将其中和
- 取样检测无法直接反映系统中生物膜污染状况

## 制药用水系统中常见微生物群

- 绝大多数为 G<sup>-</sup>细菌、极少数为 G<sup>+</sup>细菌

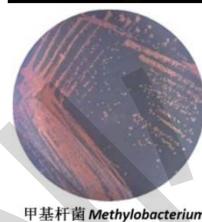
- 公共水源常见种类

- » 大肠菌群 *Coliforms*
- » 军团菌 *Legionella*
- » 假单胞菌 *Pseudomonas*
- » 病毒
- » 原生动物



- 纯化水中常见种类

- » 鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas*
- » 伯霍尔德杆菌 *Burkholderia*
- » 罗尔斯顿氏菌 *Ralstonia*
- » 甲基杆菌 *Methylobacterium*
- » 寡养单胞菌属 *Stenotrophomonas*
- » 分支杆菌属 *Mycobacterium*



## 制药用水系统的监测要点/PDA TR13

	纯化水	纯蒸汽	USP WFI	EP WFI	JP WFI
取样点	分配系统上的代表性使用点	发生器出口及最远使用点	分配系统上所有能采样的使用点		
监测项目	化学(电导、TOC)、微生物(1.0 mL或100 L)	化学(电导、TOC)和内毒素	化学(电导、TOC)、内毒素、微生物(膜过滤100 mL)		
微生物检查方法	标准平皿计数琼脂(PCA), 30-35°C 48-72h; 或R2A琼脂, 20-25°C × 5-7天(≥96h)		R2A琼脂, 30-35°C × 5天	PCA, 30-35°C 48-72h; 或R2A琼脂, 20-25°C × 4-7天	
取样时的注意事项	如果不能在自取样时起2小时内检测, 应将样品存在2-8°C下12小时内检测。如果实在没法做到(远程送检), 须在48小时内检测。		符合GMP, 无具体要求	自取样时起2小时内检测, 否则将样品存在2-8°C下12小时内检测	
频率	生产时每天	每月	每周内所有使用点轮流取样, 最终回水点每日, 蒸馏机进水每日		
接受限度	符合化学标准, <100 CFU/mL	符合WFI要求	符合化学标准; 微生物<10 CFU/100mL; 内毒素<0.25 EU/mL		

## 微生物检查方法

- 根据系统及源水质量选择适当的检查方法
- 传统方法
  - 薄膜过滤法或倒平皿法
  - 富营养培养基（如TSA、营养琼脂），在30-35°C下通常培养48-72小时
  - 富营养培养基（如R2A），在20-25°C下通常培养5-7天
  - 通过对比试验，决定采用适用于本企业水系统的测试方法，USP没指定具体方法
  - 建议定期对比检查，发现系统中是否有新的污染菌
- 快速检测法
  - 借助仪器设备、荧光染色
  - 破坏性测试
  - 假阳性结果
  - 灵敏度偏低



## 内毒素检测

- 取样、存贮条件不得影响水中的内毒素检测水平
- 尽可能采用灵敏度高的鲎试剂
- 动力学法优于凝胶法
- 注射用水系统必检
- 纯水系统推荐检测



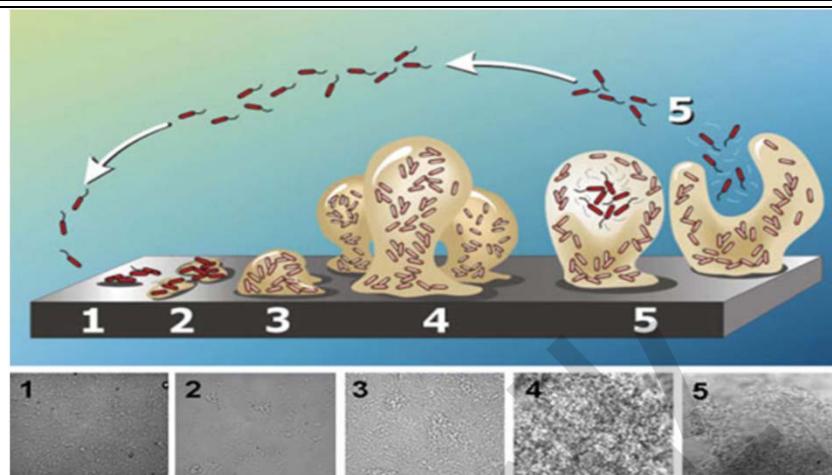
## 警戒/纠偏水平和质量标准

- **水的质量标准**
  - 依水的用途而定, 如果有多种用途, 依最严格标准而定
  - USP对制药用水没有微生物标准, 因为考虑到水的不同用途
- **警戒/纠偏水平的设定**
  - 以从系统中采集的数据为依据, 与系统功能相适应。或以新系统的设计能力为依据。绝不是从书本上抄来的。
  - 有利于早期发现系统可能存在的潜在问题, 并将问题解决在萌芽阶段
  - 可以是定量的, 也可以是定性的
  - 专属于特定的检测方法和生产系统
  - 限度水平应远低于水的质量标准。USP推荐的总菌落数最高纠偏水平 WFI: 10 CFU/100mL; PW: 100 CFU/mL

## 微生物检测数据的分析与处理

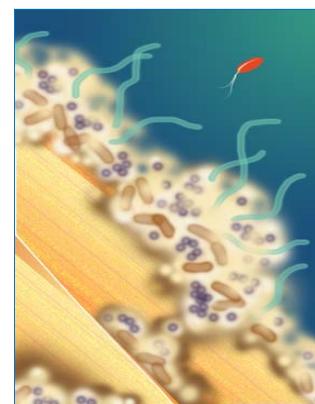
- **需要鉴别污染菌**
  - 利于调查污染源或偏差事件
  - 建立水系统中污染菌的数据库
- 定期进行趋势分析, 及时了解和掌握水系统污染状况
- 将单个数据与上下游数据、及其历史数据相结合, 分析水系统污染状况
- 超过警戒水平, 要通知QA和水系统部门
- 超过纠偏水平, QC要协同QA及水系统部门调查污染源并采适当的纠偏措施和预防性措施

## 生物膜-纯水系统微生物污染顽疾

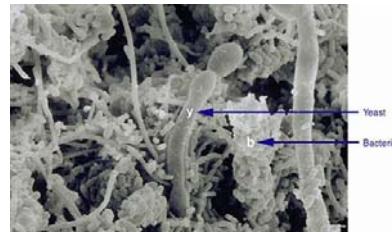


## 生物膜的定义

- 通过含水聚合物连结并附着在表面的微生物群落。
- “Bacteria that attach to surfaces aggregate in a hydrated polymeric matrix of their own synthesis”  
– Costerton, Science, 21 May '1999
- “Biofilms can be defined simply and broadly as communities of microorganisms that are attached to a surface.”  
– O’toole et al, Nature 413: 860-864



## 生物膜

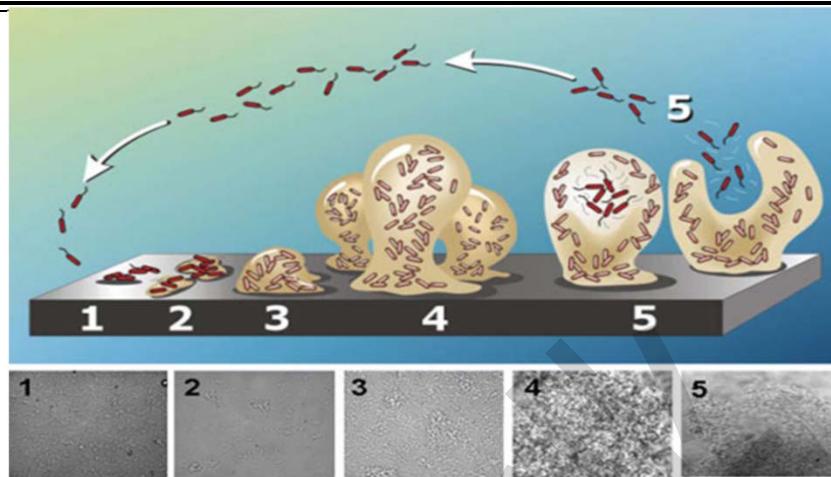


<http://faculty.piercecollege.edu/pregersh/microbiology/007medicalbiofilms.html>

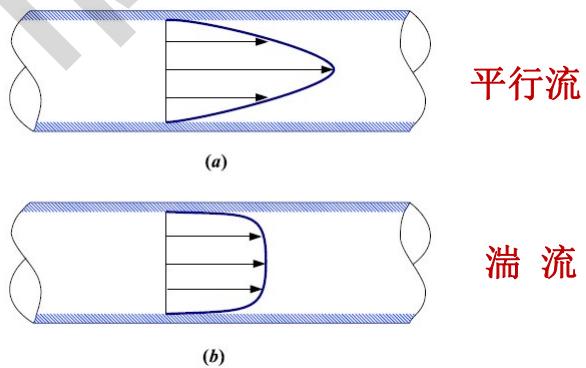
## 大棱镜彩泉



## 生物膜-纯水系统微生物污染顽疾

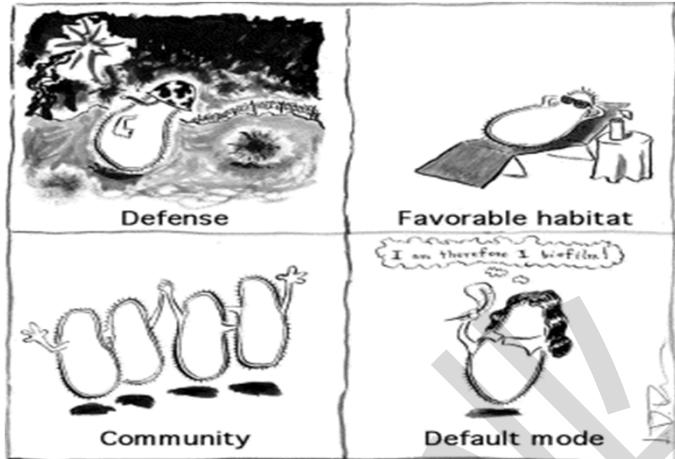


## 液体流动方式对生物膜的影响



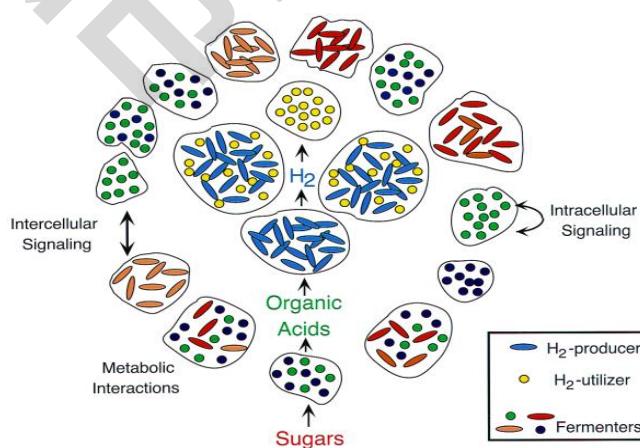
不同流动方式下管道内的液体流动速度分布状况

## 生物膜的成因



– Jefferson, *FEMS Microbiol Letters* 2004, 236:163-173

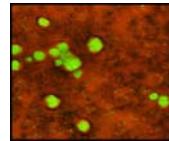
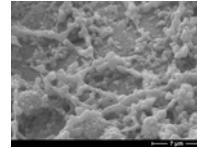
## 生物膜的多样性与复杂性



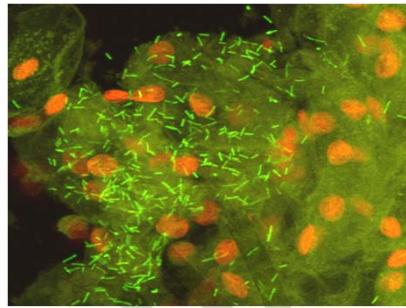
Davey and O'toole. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000, 64(4): 847–867.

## 生物膜的特性

- 多样性
- 普遍性
- 隐蔽性



- 对胁迫条件具有较强的耐受性/抵抗力
- 改变微生物的致病性

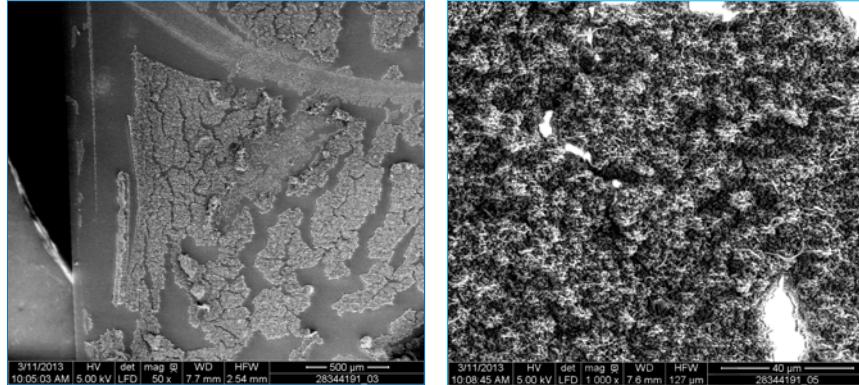


## 生物膜 - 微生物的掩护所

微生物	$D_{55^\circ\text{C}}$ 值	
	浮游菌	聚苯乙烯表面生物膜
<i>P. aeruginosa</i>	0.76	~ 4.5
<i>S. parapaucimobilis</i>	1.88	~ 11.4
<i>R. pickettii</i>	0.67	~ 3.5

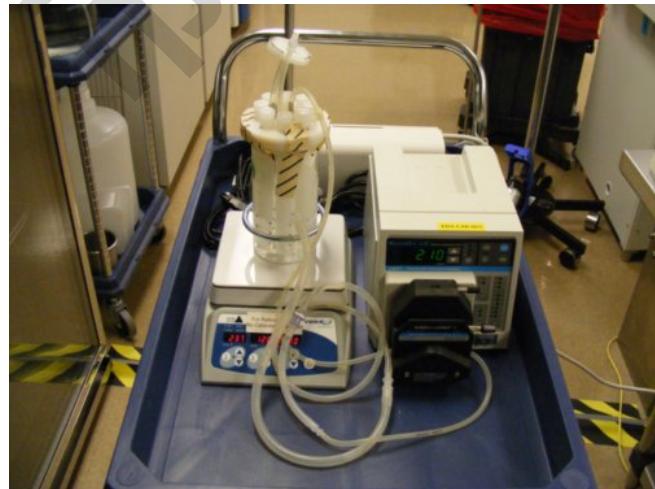
个人采集未发表数据

*Sphingomonas parapaucimobilis* 在硅树脂  
表面形成的生物膜 (1/100 TSB、4 days、室温)

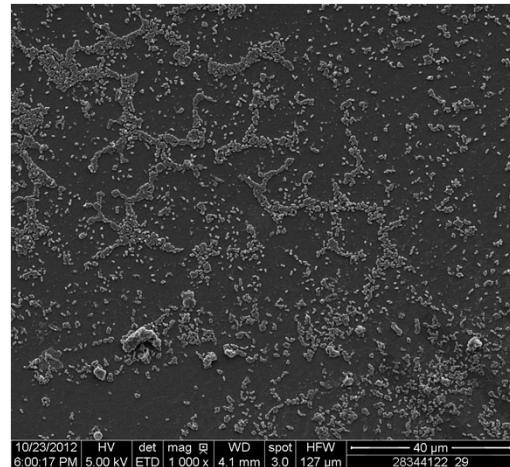


Viable cell population:  $\sim 3 \times 10^8$  CFU/cm<sup>2</sup>

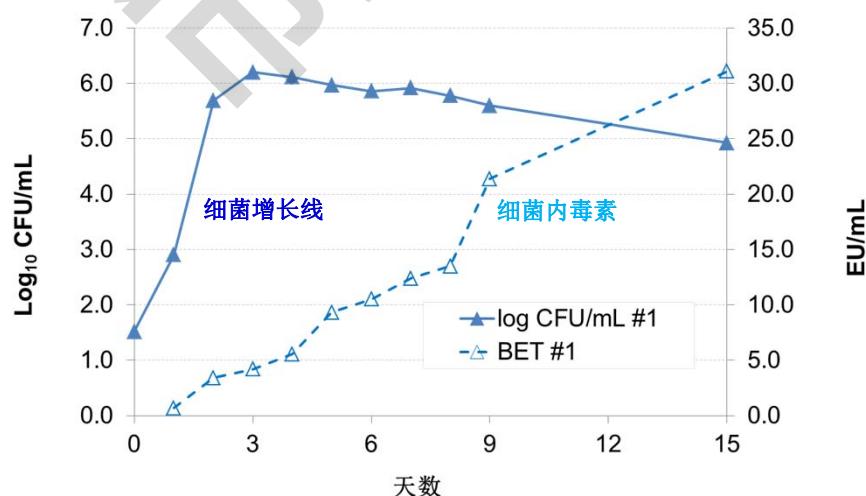
*Ralstonia pickettii* 在纯化水中的  
生长状况 (室温)



*Ralstonia pickettii* 在纯化水中硅树脂  
表面形成生物膜 (室温、14天)

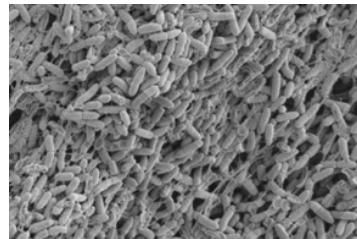


*Ralstonia pickettii* 在纯化水中的  
生长及内毒素水平 (室温)



## 常见的清毒剂和消毒方式

- 湿热, 例如巴氏消毒
- 臭氧 (Ozone)
- 氧化性试剂 (次氯酸,  $\text{ClO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$  etc.)
- 酸 (有机酸)
- 碱 (弱碱、强碱)
- 紫外线



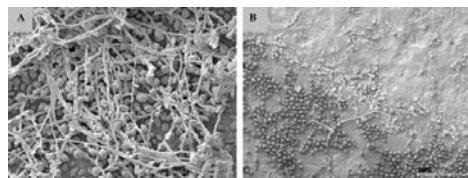
## 热水处理法

- 热水消毒是比较常见并且能有杀灭生物膜的方法:
  - $60-65^\circ\text{C} \geq 8$  小时
  - $65-70^\circ\text{C} \geq 4$  小时
  - $70-80^\circ\text{C} \geq 2$  小时
  - $80-90^\circ\text{C} \geq 1$  小时
  - 计算消毒时间以最难加热部位为准, 因为
    - » 在没有水流直接流通的地方, 传热相对较慢; 或者, 对热有散失的位点 (如阀门等)
  - 热水只能杀死生物膜, 但并不能去除死的生物膜
    - » 死的生物膜仍会释放热原物质、为活的微生物提供营养、并且促进新生物膜的形成



## 去除生物膜 - 很高的挑战性

- 机械性去除尽管有效，但很少可行
- 氧化性化学消毒剂通过氧化作用将生物膜降解从而杀灭和去除生物膜，关键参数包括
  - 浓度
  - pH值
  - 氧化强度
  - 作用时间
  - 作用温度
- 在整个处理过程中维持消毒效力
- 处理后，需确认生物膜和消毒剂残留物是否清除干净



## 去除生物膜的建议方案

- 制定并执行消毒方案（不同层次）
  - 每天（一般性消毒）
  - 定期消毒（比一般消毒更强的消毒措施）
  - 全面清洁消毒
    - » 此消毒方案要比前两种具有更高的杀菌和除去生物膜的效力
    - » 可设为每半年一次、或一年一次、以及出现超标结果的纠偏措施之一
- 检查消毒清洗、效果
  - 表面擦拭分析
  - 浮游菌和内毒素的监测及趋势分析
  - 可在系统中放置一些小的试验片，定期取出检查

## 主要参考资料

- **USP 38 <1231> Water for Pharmaceutical Purposes.**
- **PDA TR69. 2015. Bioburden and Biofilm Management in Pharmaceutical Manufacturing Operations.**
- **PDA TR13. 2014 Revised. Fundamental of an Environmental Monitoring Program.**

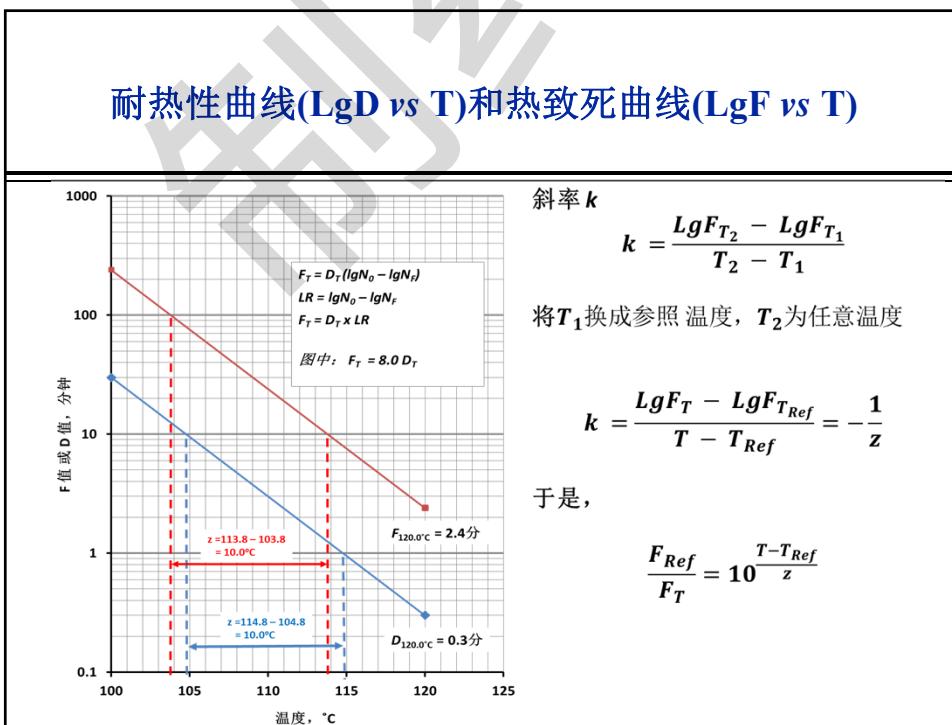
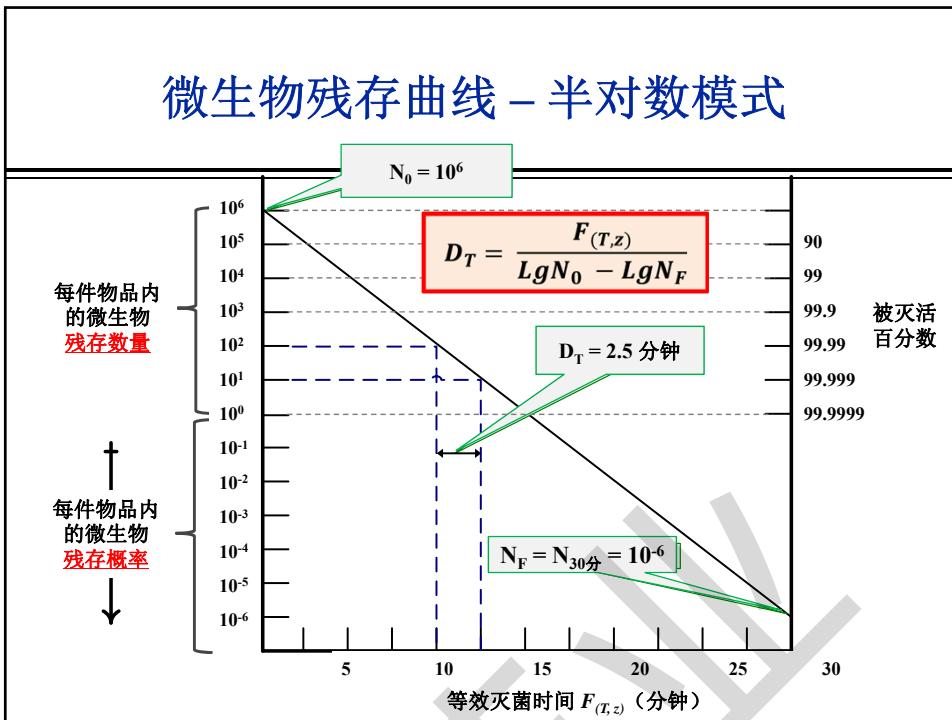
# 生物指示剂在湿热灭菌工艺 中的应用

潘友文

2015年10月 于上海

## 复习

- **核心概念**
  - D值、Z值、F值
  - 微生物残存曲线 – 半对数模式
  - 热致死曲线 – 等效灭菌线
  - 无菌保证的标准
- **湿热灭菌工艺、程序的选择**
- **工艺程序开发**
  - 过度杀灭法设计原则
  - 产品物性法设计原则



## 物理灭杀时间 $F_{PHY}$

- 采用物理数据（热穿透温度和时间）预测一个灭菌程序所赋予装载的灭菌效果
- 一般采集产品最冷点部位的温度（但不包括干热位置）
- 仅适用于饱和湿热条件，即不包括无饱和蒸汽的相对干燥位置

$$F_{PHY} = \sum 10^{\frac{T-121}{Z}} \Delta t$$

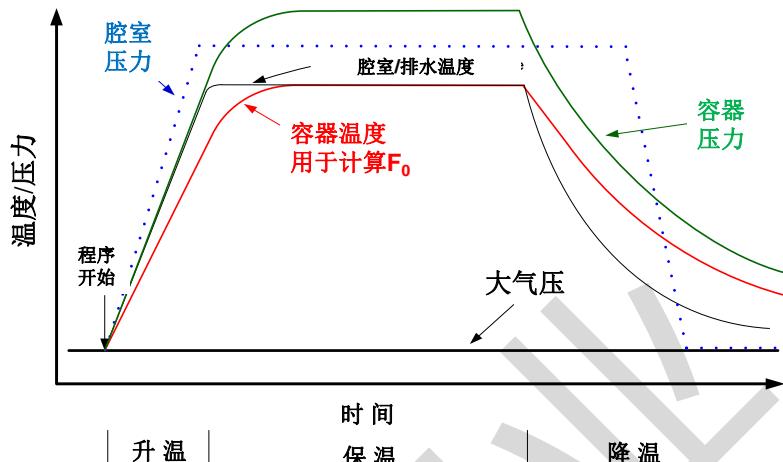
- $\Delta t$  – 穿透温度下的过渡时间（例如，通常为1分钟）
- $Z$  – 生物指示剂的温度系数

## 标准灭菌时间 $F_0$

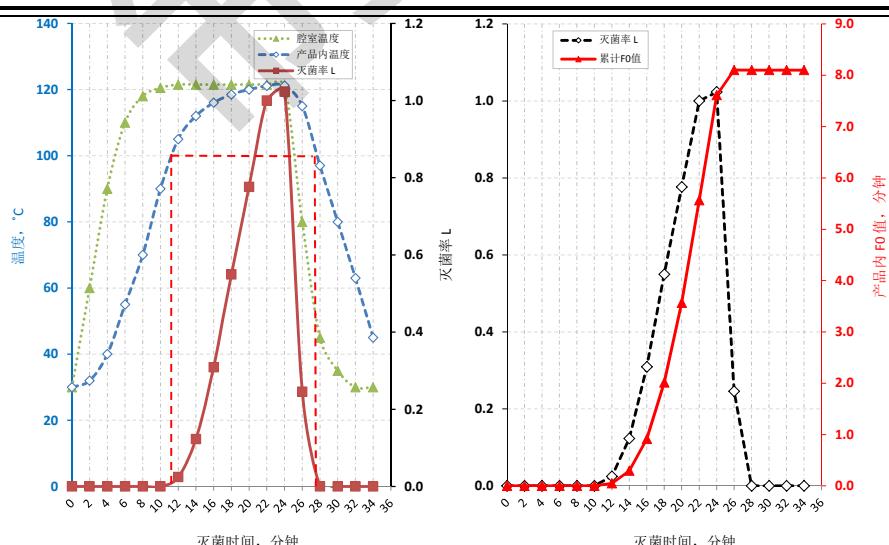
$$F_0 = \sum 10^{\frac{T-121}{10}} \Delta t$$

- 在121 °C灭菌一分钟，可看作标准状态下1分钟（一个单位）
  - $F_0 = 10^{(121^\circ\text{C}-121^\circ\text{C})/10^\circ\text{C}} = 1.0$  分钟
- 在118 °C灭菌一分钟，与121 °C灭菌的等效灭菌时间为：
  - $F_0 = 10^{(118^\circ\text{C}-121^\circ\text{C})/10^\circ\text{C}} = 0.5$  分钟

用于计算 $F_0$ 的温度，应取自物品内



灭菌程序 $F_{0\text{物理}}$ 的计算( $z=10^\circ\text{C}$ ,  $T_{\text{参照}}=121.1^\circ\text{C}$ )



## $F_{phy}$ 、 $F_0$ 、 $F_{bio}$ 值的计算

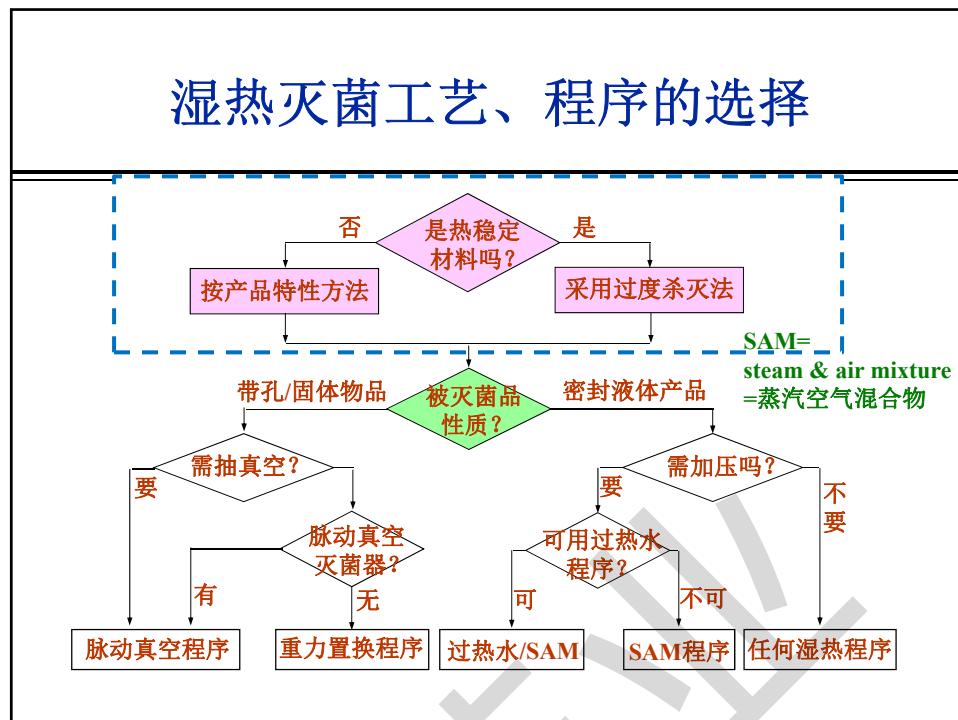
$$F_{phy} = F_{(T_{ref}, z)} = \sum 10^{(T-T_{ref})/z} dt$$

$$F_0 = F_{(121.1^\circ C, 10^\circ C)} = \sum 10^{\frac{T-121.1}{10}} dt$$

$$F_{bio} = D_T \times (\lg N_0 - \lg N_t)$$

## 无菌保证的标准

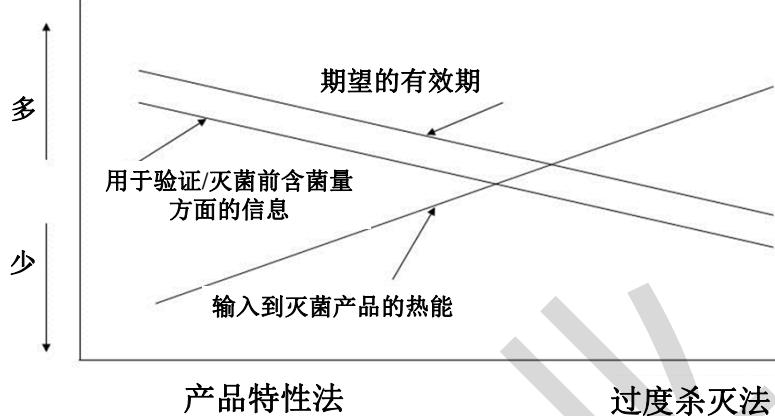
- 最终灭菌产品: 非无菌品的概率 (PNSU) 不得超过百万分之一 ( $\leq 1.0 \times 10^{-6}$ )
- 无菌工艺产品: 非无菌品的概率 (PNSU) 不得超过千分之一 ( $\leq 1.0 \times 10^{-3}$ )
- $F_0$ 值的大小、对数下降单位均不是无菌保证标准的直接参数指标



## 湿热灭菌工艺程序设计方法

- **过度杀灭法(使污染菌至少下降12个对数单位)**
    - 用于热稳定性好的产品/物品
  - **产品特性法(根据污染菌特性确保 $PNSU \leq 10^{-6}$ )\***
    - 适用于对热不是很稳定的产品
    - 需考虑被灭菌产品中污染菌的含量和耐热性

## 过度杀灭与产品特性法的选择



## 过度杀灭法与产品特性法

Overkill approach vs. Product specific approach

关键点 \ 工艺	过度杀灭法	产品特性法
产品(灭菌对象)	非常耐热	产品配方和(或)包装材料的耐热性相对较差
$F_0$ 值(灭菌值/效果)	不少于15分钟	没有具体要求或标准
实际灭菌应用程序	产品内或物品包装内达到121°C 并至少保持15分钟	根据具体产品的耐热性和传热性而定, 通常在105°C-121°C之间, 时间从20分钟到60分钟不等。
灭菌前产品内含菌量的控制与监测(含菌总量和耐热性)	无要求, 因为灭菌程序赋予被灭菌物品的 $F_0$ 值足以保证无菌保证的标准要求。	必须监控。每个独立包装产品内的总活菌数量一般不得超过 $10^3$ 个; 并且污染菌的耐热性不得高于生物指示剂的耐热性

## 过度杀灭法的设计原则

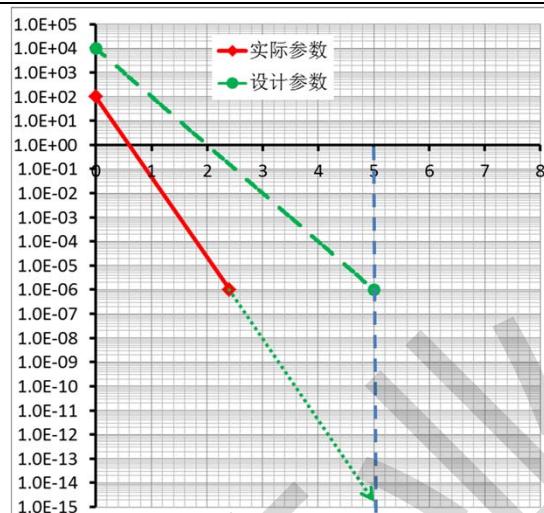
- 灭菌前，单位产品内的最高含菌量  $N_0 = 10^6$
- 污染菌的最强耐热性： $D_{121.1^\circ\text{C}} = 1$ 分钟, z值为 $10^\circ\text{C}$ 。
- 无菌保证标准（PNSU不超过百万分之一）
- 按上面数值，可以计算出达到设计要求的 $F_{PHY}$ 和 $F_{BIO}$ ：
  - $F_{(121.1^\circ\text{C}, 10^\circ\text{C})} = F_{BIO} = D_{(121.1^\circ\text{C})} \times (\lg N_0 - \lg N_F)$
  - $F_{BIO} = 1.0 \text{分钟} \times (\lg 10^6 - \lg 10^{-6}) = 12 \text{分钟}$
- 过度杀灭程序被定义为“一个能使被灭菌物品获得 $F_0$ 值和 $F_{BIO}$ 值至少均为12分钟的灭菌程序”
- 欧盟在最终灭菌制剂的法规中，将过度杀灭定义为“湿热灭菌 $121^\circ\text{C}$ 下15分钟”

## 产品特性法的设计原则 (练习1.6)

在半对数图纸上画出依产品特性法设计的灭菌程序

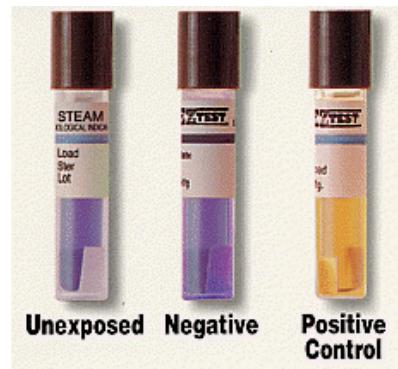
监控项目	实际参数	设计用参数
灭菌前单个产品中污染菌的含量， $N_0$	< 100 CFU/产品	10,000 CFU/产品
污染菌的耐热性， $D_{121.1^\circ\text{C}}$	< 0.3 分钟	0.5分钟
灭菌后的无菌保证标准	$N_F = 10^{-6}$	$N_F = 10^{-6}$
灭菌程序需要赋予产品的灭菌值 $F_{BIO}$ $F_0 = D_{121.1^\circ\text{C}} \times (\lg N_0 - \lg N_F)$	< 2.4分钟	5分钟

### 练习1.6: 半对数作图 (答案)



### 生物指示剂应用实例

- 生物指示剂的定义、种类及特性
- D值、z值测定方法
- 主要概念:  $F_{Bio}$ ,  $F_{Phy}$  和  $F_0$
- $F_{bio}$  和  $F_{phy}$  的一致性
- 应用案例一: 主溶液法
- 应用案例二: 产品特性法
- 应用案例三: 过度杀灭法
- z值对计算  $F_{phy}$  的影响
- 总结



## 生物指示剂 /BI (ISO 11138)

- 定义：含有活性微生物并对特定灭菌工艺具有明确耐热性的测试系统。
- 用途：能够定量测定和评价灭菌效果的生物检测器。适用于灭菌程序的设计、开发、验证、确认，和/或灭菌程序的日常监测。
- 特性：
  - 具有较高的耐受性、贮存稳定性、批与批之间的一致性、无致病性、易于培养和制备-细菌芽孢
  - 耐受性要高于灭菌前产品中污染菌的耐受性
  - 符合地方、国内、国际相关法规要求
  - 可根据灭菌程序的设计要求而制备



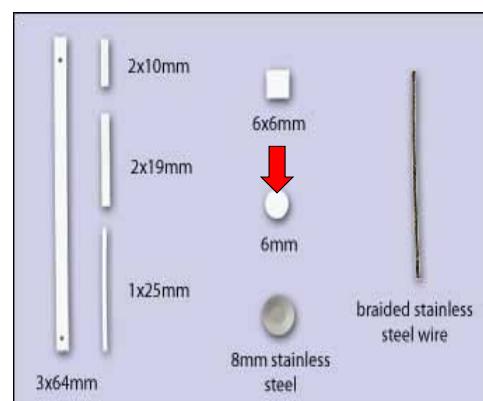
## 生物指示剂 (BI)



悬浮液



安瓿瓶



溶液监测

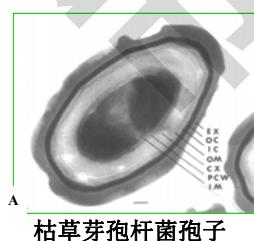
干燥区监测

## BI耐受性的影响因素

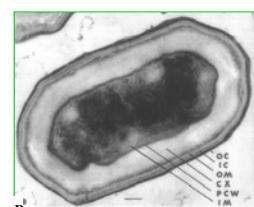
- 生物学种类
- 制备孢子的培养条件
  - 温度
  - 培养基成份
- 孢子悬浮液的组份
- 孢子载体材料
- 灭菌后的培养条件
  - 温度
  - 培养基质量



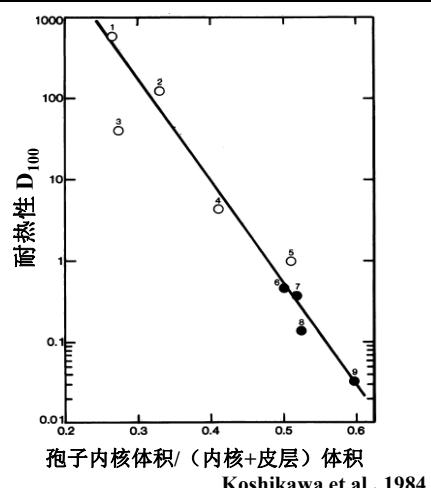
## 菌种对BI耐受性的影响示例



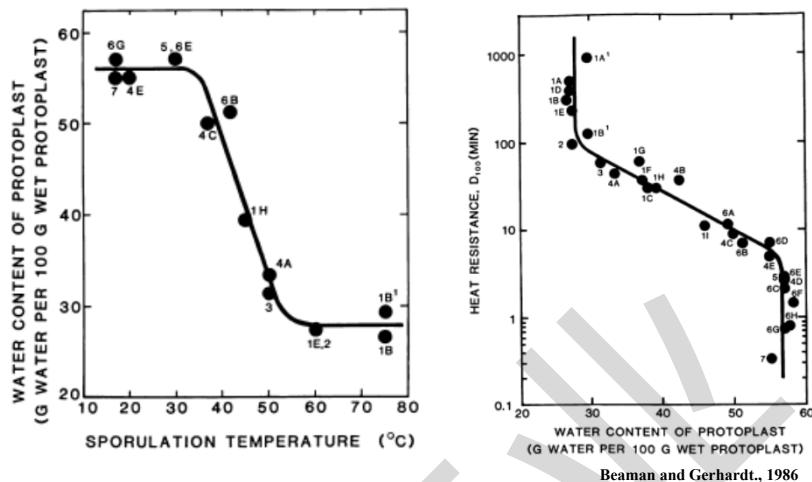
枯草芽孢杆菌孢子



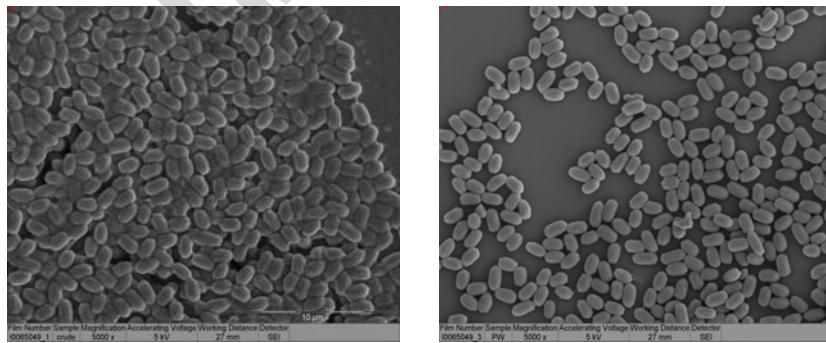
嗜热脂肪芽孢杆菌孢子



## 芽孢形成温度对含水量和耐热性影响



## 基质对孢子耐受性影响



枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 5230) ATCC® 35021™ 孢子  
在纯化前、后的对比

## BI耐热性举例

菌株名称	D值（分钟）	参考资料
嗜热脂肪芽孢杆菌 <i>G. stearothermophilus</i>	在不同输液、缓冲液中 1.5 ~ 6.0 分钟 <sup>(1)</sup>	Pflug and Smith, 1977.
凝结芽孢杆菌 <i>B. coagulans</i>	在不同输液、缓冲液中 4.9 ~ 9.7分钟 <sup>(2)</sup>	Pflug and Jones, 1981.
生孢梭菌 <i>C. sporogenes</i> ATCC 7955	各种输液: 0.3 ~ 1.5 分 滤纸: 0.7 分 <sup>(1)</sup>	Berger, et al., 2000.
枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> 5230	生理盐水、缓冲液: 0.4 ~0.7 分 <sup>(1)</sup>	Odlaug, et al., 1981.

(1) D<sub>121°C</sub>; (2) D<sub>115°C</sub>

## 不同灭菌工艺用BI的耐受性-USP37

灭菌工艺	微生物芽孢	常见D范围	存活时间	灭活时间
湿热 121°C	嗜热脂肪芽孢杆菌 ( <i>G. stearothermophilus</i> ) 生孢梭菌 ( <i>C. sporogenes</i> ) 枯草芽孢杆菌 ( <i>B. subtilis</i> ) 冻结芽孢杆菌 ( <i>B. coagulans</i> ) 1×10 <sup>6</sup> - 5×10 <sup>6</sup> 孢子/指示剂	0.3 - 3分	1.2 - 14分	3 - 32分
环氧乙烷 600mg/L, 54°C 相对湿度60%	枯草芽孢杆菌黑色变种 ( <i>B. Subtilis var. niger</i> ) 1×10 <sup>6</sup> - 5×10 <sup>7</sup> 孢子/指示剂	2.5 - 5.8分	10 - 27分	25 - 68分
干热 (热空气)	枯草芽孢杆菌 ( <i>B. atropphaeus</i> ) 1×10 <sup>6</sup> - 5×10 <sup>6</sup> 孢子/指示剂	1 - 3分	4 - 14分	10 - 32分

## D值测定方法 (ISO 11138-1)

- 残存概率法
  - 多采用水/油浴+毛细管
- 阴性分数法
  - Stumbo-Murphy-Cochran (SMC) 法

$$D_T = \frac{U_i}{\lg N_0 - \lg N_{U_i}}$$

- Holcomb-Spearman-Karber法(简称 HSK法)

$$\bar{D} = \frac{U_{HSK}}{\log_{10} N_0 + 0.2507}$$

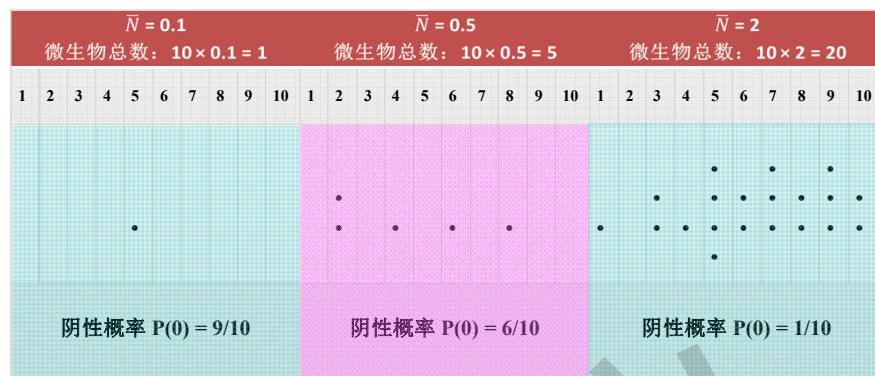
## 阴性分数法

自Halvorson 和 Ziegler根据泊松分布模型发现:

$$\bar{N} = \ln \left( \frac{n}{r} \right)$$

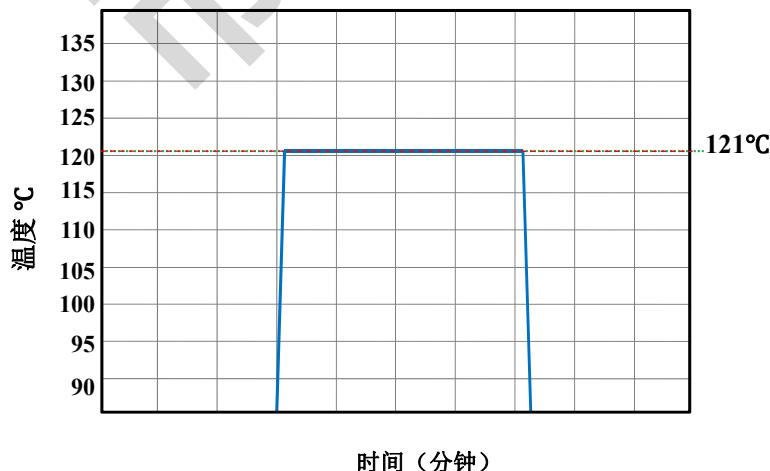
- 式中,
- $\bar{N}$  代表每个平行样品内被估测的平均微生物数量;
- $n$ 表示用于测定的平行样品总数;
- $r$ 表示培养结果呈阴性的样品数量。

## 阴性分数法



- 10个平行样品, 可测出的平均微生物数量范围在 0.105-2.30之间
- 20个平行样品, 可测出的平均微生物数量范围在 0.05- 3.00之间
- 1000个平行样品, 可测出的平均微生物数量范围在 0.001- 6.9之间

## BI耐热性测试温度曲线模式



**生物指示剂耐热性测定仪(1) (ISO 18472)  
BIER (BI evaluator resistometer)**



**生物指示剂耐热性测定仪(2) 水/油浴**



## 生物灭杀时间 $F_{BIO}$

- 表示一个灭菌程序在一定温度下杀灭某种微生物的实际效果

$$F_{BIO} = D \times LR$$

-D: 微生物的耐热参数

-LR: 在灭菌过程中微生物数量的对数下降值, 即

$$LR = \text{Lg}(N_0) - \text{Lg}(N_F)$$

## $F_{Bio}$ 与 $F_{Phy}$ 的一致性

- 在理想状态下,  $F_{Bio} = F_{Phy}$ 
  - 加热和冷却曲线为矩形波
  - 每个BI的数量/耐热性和孢子的受热程序均没有差异
  - 每个产品所受到的热效应均相同
- 实际情况下,  $F_{Phy} > F_{Bio}$ 
  - 每个产品内的热穿透总有一些差异, 会导致  $F_{phy}$  的差异
  - 如果估算出的  $F_{phy}$  值与  $F_{Bio}$  值之间有很大的差异, 那么将会导致 BI 的阳性结果
  - 验证时, 可以运行最差灭菌程序条件, 如降低温度或缩短保温阶段时间, 最低  $F_{Phy}$  要大于  $F_{Bio}$

## $F_{BIO}$ 与 $F_{Phy}$ 的一致性-续

- 仅凭物理数据不能完全保证灭菌程序所赋予产品足够的灭菌效果
  - 灭菌效果与具体产品组份相关
  - 有些点可能无法采集热穿透数据, 需用BI监控
- 同样, 仅凭生物指示剂数据也不能保证灭菌程序的适当性和合理性
  - 物理数据还可以用来评价灭菌程序对产品质量的稳定性考察
- 生物数据与物理数据之间要相互支持

## LVP产品灭菌的工艺开发

BI应用案例 1

- 问题: 如何有效且科学地对以下具有相同包装(如250毫升/袋)的大容量注射剂产品, 进行灭菌工艺程序的开发与验证?
  - 5%葡萄糖
  - 20%葡萄糖
  - 50%葡萄糖
  - 10%复方氨基酸注射液
  - 0.9%氯化钠注射液
  - 注射用水

## LVP产品灭菌的工艺开发

BI应用案例 1

- 可选取其中一种（或两种）溶液作为主溶液，代表同组产品进行灭菌程序的开发和验证。主溶液的选择标准
  - BI在其中具有最高耐受性 – BI验证
  - 加热速度（热穿透）最慢（如高粘度）-热穿透研究
- BI主溶液和热穿透主溶液可以不同
- 本次讨论主题：BI主溶液

## LVP产品灭菌的工艺开发

BI应用案例 1

### BI (*B. subtilis*)在各个产品溶液中的耐热参数

注射液	D <sub>121°C</sub> 值	z-值
5%葡萄糖	0.34	14.4
20%葡萄糖	0.37	14.7
50%葡萄糖	0.51	16.7
10%复方氨基酸注射液	0.22	14.6
0.9%氯化钠注射液	0.66	12.8
注射用水	0.44	13.9

Caputo et al., 1979

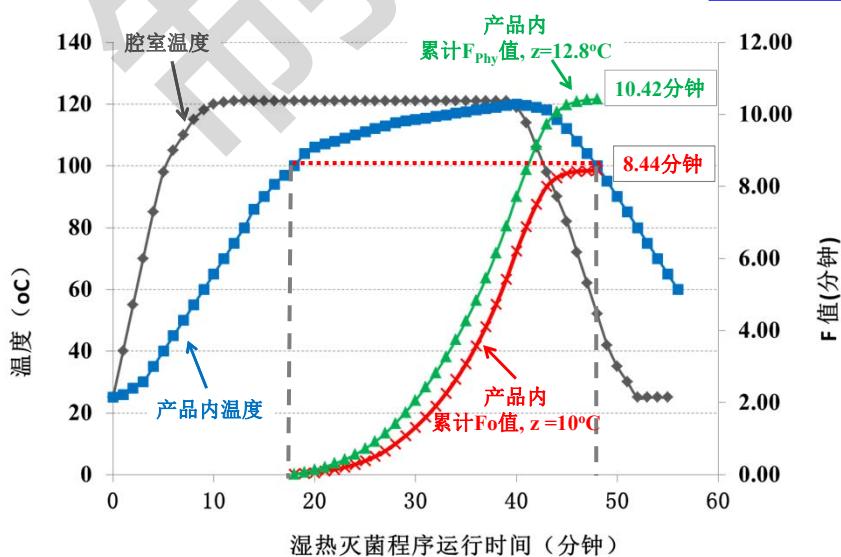
## LVP产品灭菌程序评估

BI应用案例 1

- 选择0.9%氯化钠注射液为同组产品灭菌工艺验证的主溶液
- 接种枯草芽孢杆菌孢子至0.9%氯化钠注射液(100毫升), 形成至少 $10^8$ 孢子/袋的含量
- 将接有BI的容器紧挨在插有温度探头的容器
- 运行最差灭菌程序条件, 随机采集热穿透数据、 $F_{Phy}$ 值和 $F_{Bio}$ 值
- 对接有BI的所有容器进行无菌检查

### 0.9%氯化钠注射液在最差灭菌条件下的热穿透数据、 $F_{Phy}$ 值和 $F_{Bio}$ 值

BI应用案例 1



## 计算 $F_{Bio}$

BI--应用案例 1

- 经检查，20个接有BI的产品均呈阴性，采用阴性分数法计算每个产品内的残存孢子时，需要假设有一个产品呈阳性。
- $N_0 = 10^8$  孢子/袋
- 计算
 
$$N_F = \ln\left(\frac{n}{r}\right) = \ln\left(\frac{20}{19}\right) = 0.0513$$
- $LR = \text{Lg}N_0 - \text{Lg}N_F = \text{Lg}(1 \times 10^8) - \text{Lg}0.0513 = 9.3$
- $F_{bio} = D \times LR = 0.66 \times 9.3 = 6.1$  分钟

## 数据对比

BI--应用案例 1

- $F_{Bio} = 6.1$  分钟 ( $LR = 9.3, D_{121C} = 0.66$  分钟)
- $F_O = 8.4$  分钟 ( $121.1^\circ\text{C}, z = 10.0^\circ\text{C}$ )
- $F_{Phy} = 10.4$  分钟 ( $121.1^\circ\text{C}, z = 12.8^\circ\text{C}$ )
  - 赋予BI的估计效果
 
$$\gg LR = F_{Phy} / D_{121C} = 10.4 / 0.66 = 15.7$$
- 如果产品的灭菌前含菌量限度控制在1000 CFU/袋，污染菌的耐热性 ( $D_{121C}$ ) 控制在0.66分之内，那么， $F_O$  值为8.4分钟的湿热灭菌程序在产品灭菌后非无菌品的概率可估算为；

$$\text{Lg}N_F = \text{Lg}N_0 - F_{Phy} / D_{121C} = 3.0 - 15.7 = -12.7$$

$$PNSU = N_F = 10^{-12.7} < 10^{-6}$$

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI评价

### 物品特性灭菌程序

-BI应用案例 2

- 产品中含有细菌芽孢的最大可能数
  - 10个孢子/产品, 计算时可用100个孢子/产品
- 产品中含有细菌芽孢的最高耐热性
  - $D_{121^\circ\text{C}} = 0.3$ 分钟, 计算时可采用0.5分钟
- $F_{Bio} = D_{121^\circ\text{C}} \times (\lg N_0 - \lg N_F)$ 
  - $= 0.5 \times [\lg 100 - \lg(10^{-6})]$
  - $= 0.5 \times [2 - (-6)]$
  - $= 4.0$ 分钟, 增加一安全值 取5.0分钟作为对灭菌工艺 $F_0$ 值要求

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI评价

### 物品特性灭菌程序

-BI应用案例 2

- 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*G.steothermophilus*) BI特性
  - 孢子数量,  $N_0 = 2 \times 10^6$ 孢子/BI
  - 孢子耐热性,  $D_{121^\circ\text{C}} = 2.0$ 分钟
- 当孢子置于 $F_0$ 值为5.0分钟的灭菌程序后, 估算出其残存孢子数量
  - $F_0 = D_{121^\circ\text{C}} \times (\lg N_0 - \lg N_F)$
  - $\lg N_F = \lg N_0 - F_0 / D_{121^\circ\text{C}} = 6.3 - 5/2 = 3.8$
  - $N_F = 10^{3.8} = \sim 6.3 \times 10^3$ 孢子
- 问: 只要BI孢子残存数量不超过 $6.3 \times 10^3$ 孢子, 灭菌程序符合无菌保证要求?

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI评价

### 物品特性灭菌程序

-BI应用案例 2

- 问：只要BI孢子残存数量不超过 $6.3 \times 10^3$ 孢子，灭菌程序符合无菌保证要求？
  - BI状况： $N_0=2 \times 10^6$ 孢子/BI；  $D_{121^\circ\text{C}}=2.0$ 分钟
  - 计算使BI数量下降至 $6.3 \times 10^3$ 孢子/BI所需要的 $F_{Bio}$ 值
- $$F_{Bio} = D_{121^\circ\text{C}} \times (\text{Lg}N_0 - \text{Lg}N_F)$$
- $$= 2.0 \times [\text{Lg}(2 \times 10^6) - \text{Lg}(6.3 \times 10^3)] = 5.0 \text{ 分}$$
- 产品污染菌状况： $N_0=100$ ；  $D_{121^\circ\text{C}}=0.5$ 分钟
  - 计算产品经 $F_0$ 为5.0分钟程序后，残存的孢子数量

$$\text{Lg}N_F = \text{Lg}N_0 - F_0 / D_{121^\circ\text{C}} = 1 - 5.0 / 0.3 = -15.7$$

$$N_F = \text{PNSU} = 10^{-15.7} ; N_F < 10^{-6} \text{ (无菌保证标准)}$$

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI用于过度灭菌工艺效力评价

-BI应用案例 3

- 过度杀灭湿热灭菌工艺
  - 用于带孔/固体物品的灭菌
  - 灭菌效力要求
    - »  $F_0$ 值和 $F_{Bio} \geq 12$ 分钟
    - 温度探头必须摆放在蒸汽最难穿透的部位
    - 嗜热脂肪芽孢杆菌BI的要求
      - » 孢子含量 $\geq 1 \times 10^6$ 孢子/BI
      - » 耐热性 $D_{121^\circ\text{C}} \geq 1.5$ 分钟

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI用于

## 过度灭菌工艺效力评价-初始评价

-BI应用案例 3

- 物理杀灭值（20支探头）， $F_0$ 值16-20分钟
- 所有BI在灭菌、培养后，全部呈阴性结果
  - BI孢子起始数量 $2.3 \times 10^6/\text{BI}$
  - $D_{121\text{ }^\circ\text{C}}=1.8\text{分钟}$
- 计算 $F_{Bi0}$ 值

$$\begin{aligned}
 F_{Bi0} &= D_{121\text{ }^\circ\text{C}} \times (\text{Lg}N_0 - \text{Lg}N_F) \\
 &= 1.8 \times \{\text{Lg}(2.3 \times 10^6) - \text{Lg}[\ln(20/19)]\} \\
 &= 13.8\text{分钟}
 \end{aligned}$$

- 最小 $F_0$ 值和 $F_{Bi0}$ 值均大于12分钟

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI用于

## 过度灭菌工艺效力评价-再评价

-BI应用案例 3

- 物理杀灭值（20支探头）， $F_0$ 值16-20分钟
- 20个BI在灭菌、培养后，18个阴性，2个阳性
  - BI孢子起始数量 $2.3 \times 10^6/\text{BI}$
  - $D_{121\text{ }^\circ\text{C}}=1.8\text{分钟}$
- 计算 $F_{Bi0}$ 值

$$\begin{aligned}
 F_{Bi0} &= D_{121\text{ }^\circ\text{C}} \times (\text{Lg}N_0 - \text{Lg}N_F) \\
 &= 1.8 \times \{\text{Lg}(2.3 \times 10^6) - \text{Lg}[\ln(20/18)]\} \\
 &= 13.2\text{分钟}
 \end{aligned}$$

- 最小 $F_0$ 值和 $F_{Bi0}$ 值均大于12分钟

## 嗜热脂肪芽孢杆菌BI用于 过度灭菌工艺效力评价-再评价

--BI应用案例 3

- 如果要求或希望BI被全部杀灭，则
  - 延长暴热时间
  - 检查BI的z值是否小于10°C ?
- 如果允许有阳性结果
  - 在每个探头放至少两个BI
  - 对有阳性结果出现的位点，根据阴性分数法计算出孢子的残存量

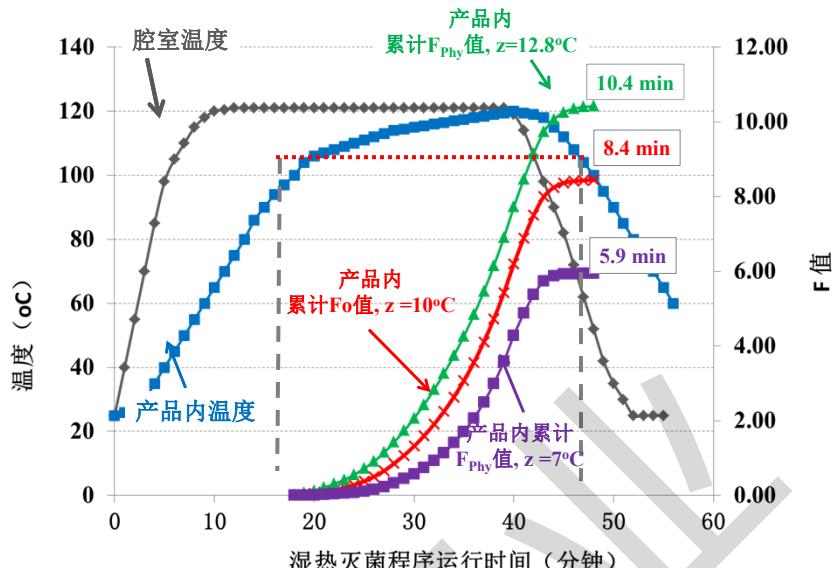
## z值对计算F<sub>0</sub>值的影响

- z值是D值变化一个对数单位时，灭菌温度变化的度数，随微生物种类受热环境而变化
- 用于换算杀灭率，从而估算等效灭菌值（等效灭菌时间，F<sub>PHY</sub>值）
- 采用热穿透温度计算F<sub>PHY</sub>值

$$F_{PHY} = \sum 10^{\frac{T-121}{z}} \Delta t$$

- 标准等效灭菌时间F<sub>0</sub>以121 °C参照温度，z值取10°C
- 用F<sub>0</sub>值来估测灭菌程序对BI的杀灭效果
- 当z值不等于10 °C时，F<sub>PHY</sub>值会出现什么样的变化？

### z值对计算 $F_{PHY}$ 值的影响



### 总结

- 开发、评价和确认一个灭菌工艺程序对灭菌物品的灭菌效果时，需要同时测定 $F_{PHY}$ 值和 $F_{BIO}$ 值，并且 $F_{PHY}$ 值 $\geq F_{BIO}$ 值。
- $F_{PHY}$ 值由物理和数学方法计算出来
  - 当z值取10°C，得到 $Fo$ 值
  - 当z值取测试用BI的实际值，得到 $F_{PHY}$ 值
- $F_{BIO}$ 值由BI测试而计算出来
- 对组份、特性和包装相似的产品，可采用统筹法(主溶液)对全组产品的灭菌程序效果进行评价和确认

# 制药行业环境监控的基本原则

主讲人： 崔强

2015年10月

-1-

## 洁净环境的工程学定义

- 洁净区是一个对空气悬浮粒子浓度进行控制的区域，该区域的建造结构、装备及使用不仅能够截留粒子，而且会尽可能地减少粒子向该区域的介入，并且，可根据需要对该区域的温度、湿度以及压差等参数进行控制
- 根据空气悬浮粒子浓度进行划分，计算公式为

$$C_n = 10^N \times \left(\frac{0.1}{D}\right)^{208}$$

- 为洁净室制造商和药厂提供相应工程标准

注：在ISO14644-1和国标 GB 50073-2001中的定义基本相同

-2-

## 制药行业洁净环境主要法规



## 其它参考标准与技术文献

- 世界标准化组织 ISO/TC 209中的 ISO 14644和 ISO 14698 系列(Cleanrooms and associated controlled environments)
- 国标 GB 50073-2013 《洁净厂房设计规范》
- 国标 GB 50457-2008 《医药工业洁净厂房设计规范》
- 国标 GB/T 16292~16294 – 2010 《医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》
- PDA第13号技术报告《Fundamentals of an Environmental Monitoring Program》

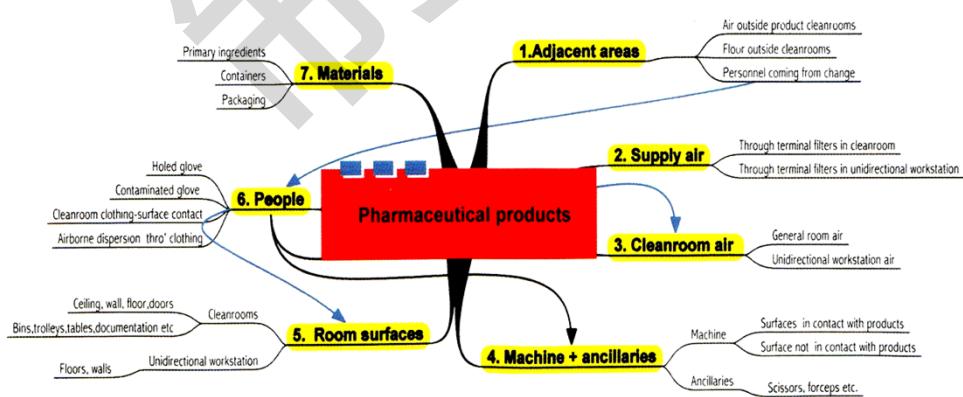
## 制药业的洁净环境要求

### ➤ 国家新版GMP（2010年修订）

- 洁净区：需要对环境中尘粒及微生物数量进行控制的房间（区域），其建筑结构、装备及其使用应能减少该区域内污染物的引入、产生和滞留
- 与EU GMP、FDA指南、USP定义相近
- 控制悬浮粒子和微生物达到特定级别水平

-5-

## 洁净室的污染来源和途径



Whyte, W., Eaton, T: "Microbial risk assessment in pharmaceutical cleanrooms"

Jette Christensen, 2010 PDA Conference

-6-

## 洁净室的污染来源和途径

### ➤ 污染模式

- 直接接触与气流携带

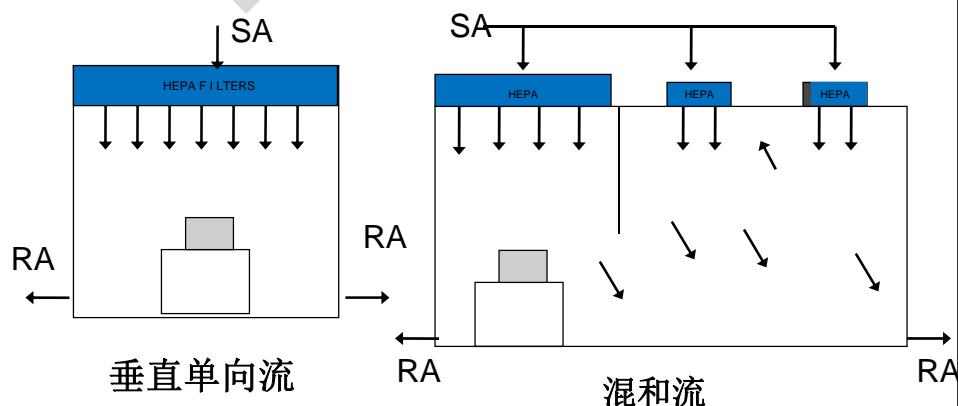
1.	相邻区域	工艺洁净室外的空气、地板、人员
2.	空气	洁净室和洁净设备的送风
3.	表面	房间、机器及设备配件表面
4.	人员	手套、防护服
5.	物料	成分、容器、包装材料

-7-

## 维持洁净状态

### ➤ HVAC系统

- 稀释作用（非单向流）与活塞作用（单向流）



-8-

## 维持洁净状态

- 有效的屏障作用
  - 气锁、光滑洁净的表面
  - 防护性着装（头罩、护目镜、操作服、脚套、手套）
- 人员的正确行为
  - 减少对气流保护作用的影响
  - 避免接触敏感表面
- 恰当的消毒

-9-

## 环境级别的划分

### ➤ 国际标准（ISO 14644-1）

级别	最大浓度界限（空气悬浮粒子数/m <sup>3</sup> ）					
	0.1μm	0.2μm	0.3μm	0.5μm	1μm	5μm
1	10	2				
2	100	24	10	4		
3	1 000	237	102	35	8	
4	10 000	2 370	1 020	352	83	
5	100 000	23 700	10 200	3 520	832	29
6	1 000 000	237 000	100 200	35 200	8 320	293
7				352 000	83 200	2 930
8				3 520 000	832 000	29 300
9				35 200 000	8 320 000	293 0000

## 洁净级别与生产活动

级别	主要生产活动
ISO 5	无菌生产区；无菌半成品和/或包装材料的暴露区。层流。
ISO 7	与无菌生产区（ISO 5）直接衔接的外围区（也可采用ISO 6，但不作推荐或强制要求）。
ISO 8	非无菌物料的配制、以及相关材料的准备；最终灭菌产品灌装。

-11-

## 制药洁净区标准 - 空气悬浮粒子 (粒子/m<sup>3</sup>)

粒径	ISO 14644	USFDA无菌生产指南	USP 1116	EU Annex 1 & WHO Annex 4	Japan 无菌生产指南	JP XVI
	ISO 5	100 级*	ISO 5/100 级	A 级, B级(静)	A 级, B级(静)	A 级, B级(静)
≥ 0.5 μm	3 520	3 520	3 520	3 500	3 520	3 520
≥ 5 μm	29	无规定	无规定	20	20	无规定
	ISO 6	1000 级	ISO 6/1000 级	无	无	无
≥ 0.5 μm	35 200	35 200	35 200	无	无	无
≥ 5 μm	290	无规定	无规定	无	无	无
	ISO 7	10 000 级	ISO 7/10000 级	B 级(动) C级(静)	B 级(动) C级(静)	B 级(动) C级(静)
≥ 0.5 μm	352 000	352 000	352 000	350 000	352 000	352 000
≥ 5 μm	2 900	无规定	无规定	2 900	2 900	无规定
	ISO 8	100 000 级	ISO 8/100 000 级	C 级(动) D级(静)	C 级(动) D级(静)	C 级(动) D级(静)
≥ 0.5 μm	3 520 000	3 520 000	3 520 000	3 500 000	3 520 000	3 520 000
≥ 5 μm	29 000	无规定	无规定	29 000	29 000	无规定

-12-

\* 100级和A级（欧盟与WHO中级别的提法）要求层流

## 制药洁净区环境监控要求/指南

监控指南	USFDA无菌生产指南	USP 1116	EU Annex 1 & WHO Annex 4	Japan 无菌生产指南	JP XVI
频率(空气粒子、浮游菌、表面微生物面等)	100级: 每班次 其 它: 无具体规定	ISO 5: 每班次 ISO 7: 每班次 ISO 8: 两周一次	A/B: 持续粒子监测, 每班次微生物取样 C/D: 频次依风险定.	A/B: 每班次 C/D: 空气微生物每周两次; 空气粒子每月一次, 人员无具体要求	A/B: 每班次 C/D: 有产品/容器暴露每周两次; 否则, 每周一至
空气微生物(主动采集)	百级: 1 CFU/m <sup>3</sup> 万级: 10 CFU/m <sup>3</sup> 十万级: 100 CFU/m <sup>3</sup>	建议采用取样污染百分率, 非菌落数: ISO 5: < 1% ISO 6: < 3% ISO 7: < 5% ISO 8: < 10% (空气及表面)	A: < 1 CFU/m <sup>3</sup> B: 10 CFU/m <sup>3</sup> C: 100 CFU/m <sup>3</sup> D: 200 CFU/m <sup>3</sup>	A: < 1 CFU/m <sup>3</sup> B: 10 CFU/m <sup>3</sup> C: 100 CFU/m <sup>3</sup> D: 200 CFU/m <sup>3</sup>	A: < 1 CFU/m <sup>3</sup> B: 10 CFU/m <sup>3</sup> C: 100 CFU/m <sup>3</sup> D: 200 CFU/m <sup>3</sup>
空气微生物(被动采集) 90 mm培养皿/4h	百级: 1 CFU/m <sup>3</sup> 万级: 5 CFU/m <sup>3</sup> 十万级: 50 CFU/m <sup>3</sup> 选择使用	与主动采集样的标准相同	A: < 1 CFU/m <sup>3</sup> B: 5 CFU/m <sup>3</sup> C: 50 CFU/m <sup>3</sup> D: 100 CFU/m <sup>3</sup>	A: < 1 CFU/m <sup>3</sup> B: 5 CFU/m <sup>3</sup> C: 50 CFU/m <sup>3</sup> D: 100 CFU/m <sup>3</sup>	无规定

## 制药洁净区环境监控要求/指南 (续)

监控指南	USFDA无菌生产指南	USP 1116	EU Annex 1 & WHO Annex 4	Japan 无菌生产指南	JP XVI
表面微生物纠偏限*	无规定	与主动采集空气样的标准相同 (采用接触碟或拭子)	直径55mm接触碟 A: < 1 CFU B: 5 CFU C: 25 CFU D: 50 CFU	24-30 cm <sup>2</sup> 接触或擦拭面积 A: < 1 CFU B: 5 CFU C: 25 CFU D: 50 CFU	24-30 cm <sup>2</sup> 接触或擦拭面积 A: < 1 CFU B: 5 CFU C: 25 CFU D: 50 CFU
个人微生物(工作服)*	无规定 依工作责任建立工作服取样计划	与主动采集空气样的标准相同 (ISO 8区内不一定要求穿无菌服)	无规定	无规定	无规定
个人微生物(手套)	无规定	与主动采集空气样的标准相同 (采用接触碟)	手套五指按培养基 A: < 1 CFU B: < 5 CFU	手套五指按培养基 A: < 1 CFU B: < 5 CFU	手套五指按培养基 A: < 1 CFU B: < 5 CFU

## 环境监控的要素

- 数据的采集方式应符合cGMP的要求
- 环境监测管理人员的要求
  - 科学知识、培训、资质
- 基本要素
  - 清洁和消毒
  - 取样位点的选择
  - 取样频率
  - 警戒和纠偏限度
  - 数据管理
  - 分离菌的鉴别
  - 调查/纠偏措施
  - 文件

-15-

## 清洗、清洁和消毒

- 执行清洁和消毒程序是厂房控制的重要组成部分
- 环境监测数据可用于评价这些程序的有效性
- 消毒剂的一般知识
  - 按杀灭水平分类, 清洁剂、消毒剂、杀芽孢剂
  - 每种消毒剂对特定微生物的杀灭能力, 取决于浓度与作用时间
  - 微生物对消毒剂的耐受能力排序, 细菌芽孢>真菌孢子>繁殖体细胞
  - USP提出的消毒剂效力研究标准: 繁殖体细胞下降3个对数单位, 芽孢下降2个对数单位

-16-

## 清洗、清洁和消毒

### ➤ 杀芽孢剂

- 使用频率应低于卫生清洁剂与消毒剂
- 通常包括次氯酸钠、过氧乙酸、过氧化氢 ( $\geq 6\%$ )
- 考虑因素
  - ✓ 接触时间
  - ✓ 拟杀灭的微生物种类
  - ✓ 效力确认
  - ✓ 毒性
  - ✓ 残留
  - ✓ 使用方法

-17-

## 取样位点的选择

### ➤ 取样目的

- 提供有意义的数据，以便发现由特定工序、设备、材料和工艺所带来的实际或潜在的污染

### ➤ 取样点的设置原则

- 取决于洁净室的设计和生产流程
- 易导致产品受到污染的位置
- 可以靠近但不要接触产品

-18-

## 取样位点的选择

➤ 选择日常监测点时的风险评估考量点

- 发生微生物污染后最可能对产品质量造成不良影响的地点
- 生产过程中最容易出现微生物繁殖的地点
- 统计学设计或根据网格分布法？
- 在常规监测中，有一些点需要轮流取样吗？
- 哪些地方是清洁、消毒或灭菌时最难覆盖/接触或最难奏效的部位？
- 什么活动会导致污染的扩散？
- 在某位点进行取样操作所造成的干扰，是否会使测试数据失真或污染产品？

-19-

## 取样位点示例

系统	取样位置
环境空气（灌装线）	靠近敞口或被灌装的容器
洁净室内空气	靠近工作活动区
设施表面	门把手、墙、帘子、地板
设备表面	灌装线、控制面板、胶塞桶、称量工具、灌装针（灌装结束）
灌装线操作员工或隔离器操作员的手套	按手指，每手五指，双手
层流区（例：层流台）	高频率活动区，手套五指取样
压缩空气	使用点

-20-

## 取样频率

- 取样频率的确定取决于多种因素
  - 适用的法规要求
  - 生产工艺或产品类型、设施/工艺的设计、人员干预
  - 后续处理方式和环境监测历史数据
- 取样频率的调整
  - 生产操作、法规要求、微生物趋势发生变化
  - 添加新设备、附近房间或公用系统的改造
- 所选择的取样频率应有助于发现系统潜在的缺陷

-21-

## 取样频率示例

- 法规文件的要求

监控指南	USFDA无菌生产指南	USP 1116	EU Annex 1 & WHO Annex 4	Japan 无菌生产指南	JP XVI
频率(空气粒子、浮游菌、表面微生物等)	100级: 每班次 其 它: 无具体规定	ISO 5:每班次 ISO 7:每班次 ISO 8: 两周一次	A/B: 持续粒子监测, 每班次微生物取样 C/D: 频次依风险定.	A/B: 每班次 C/D: 空气微生物 每周两次; 空气 粒子每月一次. 人员无具体要求	A/B: 每班次 C/D: 有产品/容 器暴露每周两次; 否则, 每周一次

### 中国药典 9205 (适用于药品洁净实验室)

设施类型	受控区域	通用采样频次	监测项目
无菌隔离系统		每次实验	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物 (含手套)
微生物洁净实验室	A级	每次实验	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物 (含手套及操作服)
	B级	每周一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物 (含手套及操作服)
	C级	每月一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物
	D级	每季度一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物

-22-

## 警戒和纠偏限度

- 纠偏限度的确定
  - 法规指南, 历史数据
- 建议设置警戒限度
- 警戒/纠偏限度属于保护性措施
  - 指示潜在或实际偏离情况的发生
  - 针对不同情况, 规定纠偏措施

-23-

## 警戒和纠偏限度

- USP 1116删除了警戒、纠偏限度, 代之以样品污染率

房间级别	空气样 (%)	沉降碟/9cm 4hr (%)	接触碟/擦拭 (%)	手套/衣服 (%)
隔离操作器 封闭式RABS	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ISO5/ A级	<1	<1	<1	<1
ISO 6/ 1000	<3	<3	<3	<3
ISO 7/ C级	<5	<5	<5	<5
ISO 8/ D级	<10	<10	<10	<10

注意适用条件

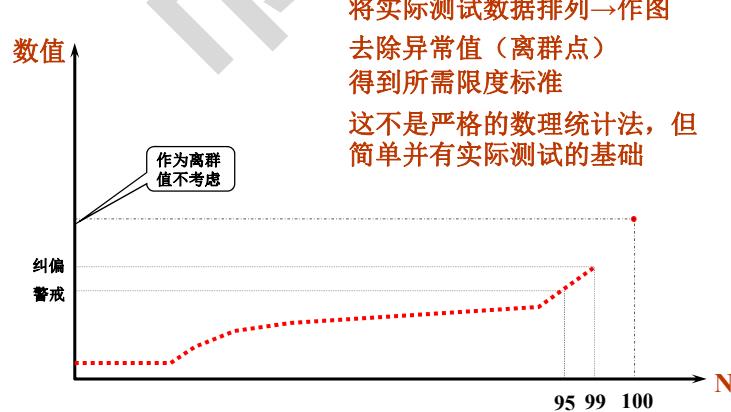
-24-

## 警戒和纠偏限度

- 警戒、纠偏限度的设定，目前无统一的方法
- 通常采用：
  - 临界值（Cut-off-value）法：将100个数据由低到高排序，第95个和99个数据分别作为警戒、纠偏水平
  - 正态分布法（Normal Distribution）：警戒、纠偏限度分别为历史数据的平均值 + 2倍、3倍标准偏差
  - 负二项分布、泊松分布等

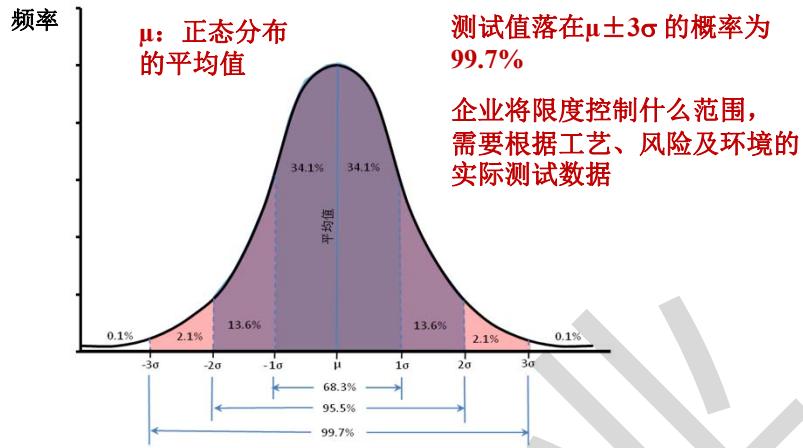
-25-

## 警戒和纠偏限度



-26-

## 警戒和纠偏限度



-27-

## 数据管理

### ➤ 数据管理

- 确定过程的稳定性
- 评估环境的总体控制水平

### ➤ 数据采集

- 记录的内容应包括：监测日期、取样地点、取样方法（培养基和培养条件）、取样数据（菌落数和悬浮粒子数）、鉴别结果、产品批号、纠偏限度。
- 检查数据的完整性
- CFU与RLU

-28-

## 数据管理

### ➤ 数据分析

- 如果环境微生物监测值通常比较低时，很难看出趋势
- 利用一定时间范围内的数据点编制图表，是进行趋势分析的一种有效工具

-29-

## 数据管理

### ➤ 基本原则

- 不同检测方法产生的结果会不同
- 指南或相关的行业标准可能较松，需要建立适合相关洁净环境的纠偏限度
- 如果有三个或以上的点超过警戒限度，可能需要采取调查和纠偏措施
- 过别数据过高或过低于大多数历史数据，可认为是监测中的异常值
- 正确理解和应用USP 《1116》中建议的污染概率

-30-

## 数据管理

➤ USP 1116样品污染率概念的应用

- 该指南只适用于穿戴无菌服的环境（隔离系统除外）
- 如果ISO 6, 7和8的污染率达不到USP <1116>中的要求，企业可以建立自己的污染率限度
- 应结合传统的警戒和纠偏限度评估环境污染控制状况

-31-

## 分离菌的鉴别

➤ 微生物鉴别是环境监控计划的重要组成部分

➤ 鉴别的内容

- 形态、革兰染色、自动或人工鉴别系统

➤ 鉴别的频率

- 起始阶段，形成鉴别数据库
- 随后日常工作中的鉴别频率可以有所降低

-32-

## 分离菌的鉴别

### ➤ PDA TR13建议的环境微生物鉴别方案

鉴别程度（最低要求）	分离菌及其来源
常规观察，包括革兰氏染色、菌落和细胞形态	ISO 7 (C) 或以上级区，超警戒限
鉴别到属或种	ISO 7 (C) 或以上级区，超纠偏限
鉴别到种	ISO 5或6级 (A/B) 区中所有超警戒或纠偏限度的分离菌，包括辅料、成品、环境和水等
菌株分型或分子水平鉴别	产品污染事件（涉及培养基灌装、无菌检查试验）和环境严重异常事件

-33-

## 调查、纠偏措施

- 出现异常时，监测数据可能会漂离正常范围
- 进行调查的目标
  - 识别造成环境质量水平出现异常的原因，寻找污染源
- 纠偏措施的程度差别
  - 取决于关键区与非关键区

-34-

## 调查及纠偏措施示例

### --空气中微生物/粒子超标

- 人员活动的程度
- 气流方式及高效过滤器检漏
- 审查工作人员的无菌操作技术和培训记录
- 审查更衣程序及要求
- 高效过滤器系统的运行状况（间歇/持续）
- 检查空气过滤器的完整性以及上下游压差
- 审查洁净室的清洁和消毒程序、消毒频率及消毒剂的效力
- 自上次消毒后的室内外压差
- 检查室内设备内外是否有微生物污染源
- 审查近期相关历史数据
- 审查灭菌程序记录等

-35-

## 文件

### ➤ 文件记录中应包括以下项目

- |            |             |
|------------|-------------|
| - 监测时间和日期  | - 取样区域及其级别  |
| - 产品信息     | - 标有测点的取样图  |
| - 监测人员     | - 取样点的重要性   |
| - 测试方法或参考号 | - 取样频率      |
| - 测试状态     | - 取样结果及读取日期 |
| - 设备信息     | - 数据记录人员    |
| - 测试区域物理参数 | - 警戒/纠偏限度   |

-36-

## 文件

➤ 文件记录中应包括以下项目

- 培养条件
- 对照试验结果
- 污染菌鉴别结果
- 复核人
- 数据报告
- 历史数据回顾
- 设备校验日期
- 各限度的确定原理与具体分析
- 调查/纠偏措施的文件记录

-37-

## 延伸：不同生产工艺的微生物学监控泛例

最终灭菌	无菌工艺*	隔离系统*
原料、水、包装材料、生产用气体	原料、水、生产用气体	-
配料、灌装/组装区环境	灌装/组装区的环境监测 数据是评价批产品无菌保证水平的重要资料依据	生产结束后监测表面
过滤前、后药液含菌量，或灭菌前含菌量	过滤前药液含菌量	-
灭菌用水、冷却用水	操作人员手套和工作服	生产结束后监测手套的泄漏状况
鉴别主要污染菌并建立污染菌数据库	计数并鉴别所有的污染菌、建立污染菌数据库	计数并鉴别所有的污染菌、建立污染菌数据库
无菌检查，或参数放行	无菌检查	无菌检查

\*适用于无菌检查环境

-38-

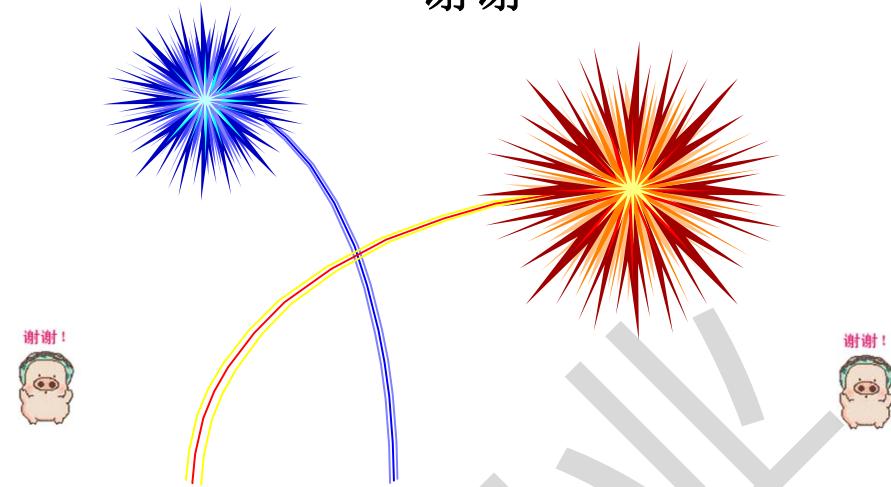
## 延伸：制药用水系统的监控要点

	纯化水	纯蒸汽	USP WFI	EP WFI	JP WFI
取样点	分配系统上的代表性使用点	发生器出口及最远使用点	分配系统上所有能采样的使用点		
监测项目	化学（电导、TOC）、微生物(1.0 mL 或 100 L)	化学（电导、TOC）和内毒素	化学（电导、TOC）、内毒素、微生物（膜过滤 100 mL）		
微生物检查方法	标准平皿计数琼脂(PCA), 30-35°C 48-72h; 或R2A琼脂, 20-25°C × 5天 (不少于96h)		R2A琼脂, 30-35°C × 5天	PCA, 30-35°C 48-72h; 或R2A琼脂, 20-25°C × 4-7天	
取样时的注意事项	如果不能在自取样时起2小时内检测，应将样品存在2-8°C下12小时内检测。如果实在没法做到，须在48小时内检测（远程送检）。		符合GMP, 无具体要求	自取样时起2小时内检测，否则将样品存在2-8°C下12小时内检测	
频率	生产时每天	每月	每周内所有使用点轮流取样, 最终回水点每日, 蒸馏机进水每日		
接受限度	符合化学标准, < 100 CFU/mL	符合WFI要求	符合化学标准, 微生物 < 100 CFU/mL; 内毒素 < 0.25 EU/mL		-39-

## 洁净区工作人员的培训

- 人员培训/资质确认内容
  - 人员的卫生习惯, 疾病报告, 着装、微生物基础知识
  - 无菌操作技术、更衣方式
  - 根据需要, 参与培养基灌装
- 再培训和再确认
  - 更衣确认失败时的处理
  - 日常监测出现超标时的处理

谢谢



41

# 无菌工艺的验证、监控与评价

主讲人： 崔强

2015年10月

-1-

## 无菌药品分类

- 按照药品的卫生学质量要求，可以将药品划分为无菌药品和非无菌药品两类
- 无菌药品是指法定药品标准中列有无菌检查项目的制剂和原料药，包括无菌制剂和无菌原料药
- 无菌药品按照生产工艺可分为两类
  - ✓ 采用最终灭菌工艺的最终灭菌产品
  - ✓ 部分或全部采用无菌生产工艺的非最终灭菌产品

-2-

## 两种生产方式的差别

### ➤ 最终灭菌工艺

- 在高洁净环境下进行灌装和密封
- 最大限度地降低中间产品的微生物和微粒的污染，并有助于确保此后灭菌工艺的成功
- 通常，产品、容器和密封件的微生物污染水平很低
- 在密封容器中进行最终灭菌

-3-

## 两种生产方式的差别

### ➤ 无菌生产工艺

- 产品、容器和密封件分别进行灭菌，然后进行灌封
- 在极高洁净环境下进行灌装和密封
- 产品在最终容器中不再做进一步的灭菌处理
- 对各个组成部分的灭菌工艺需要进行严格验证和监控
- 在灌封前和灌封过程中的操作会带来污染风险

-4-

## 微生物学关注点

### ➤ 无菌生产工艺

- ➔ 验证时以污染瓶数衡量无菌保证水平
- ➔ 影响因素多
- ➔ 各类微生物污染都可能导致工艺失败

### ➤ 最终灭菌工艺

- ➔ 赋予产品更高的无菌保证水平
- ➔ 生产中可变因素少，出现偏差的概率低
- ➔ 几乎能杀灭产品中的所有微生物
- ➔ 需要关注的微生物范围集中在具有耐受性的芽孢上面

-5-

## EMEA灭菌工艺决策树（适用于液体制剂）

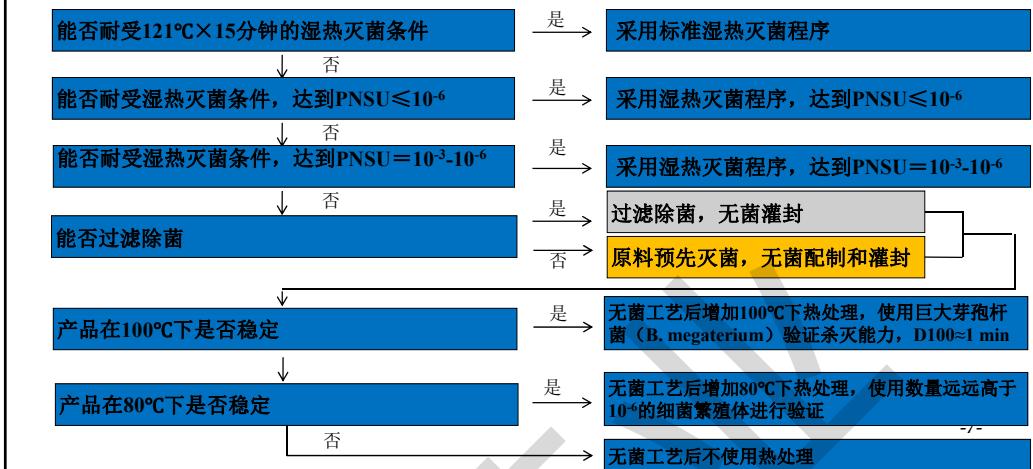


-6-

## 新观点：无菌生产与最终杀灭处理相结合

### ➤ 基于患者风险考虑

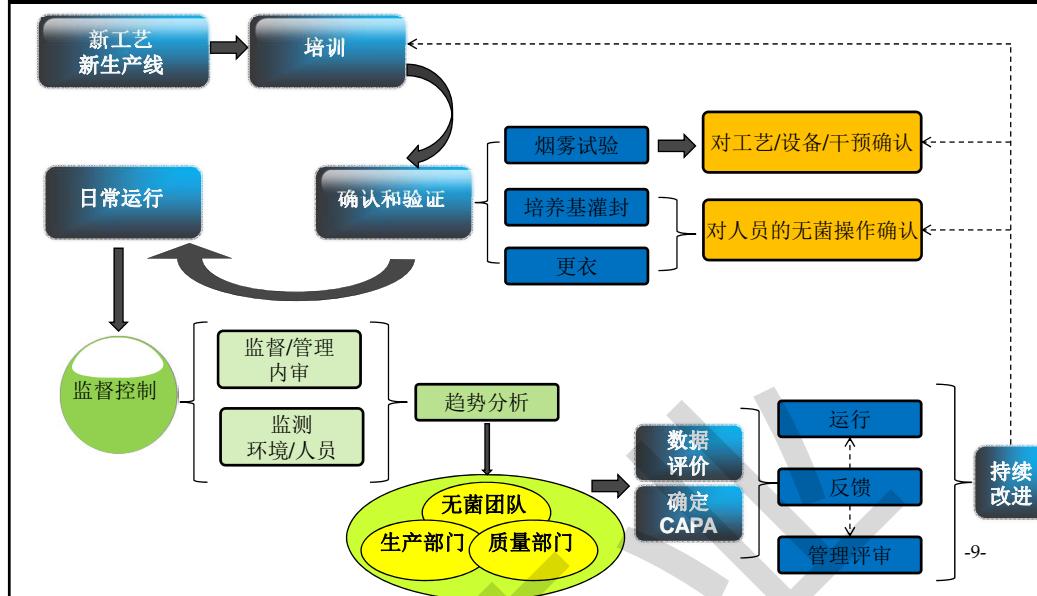
- 增加千分之一灭菌残存概率和无菌工艺后热致死处理选项



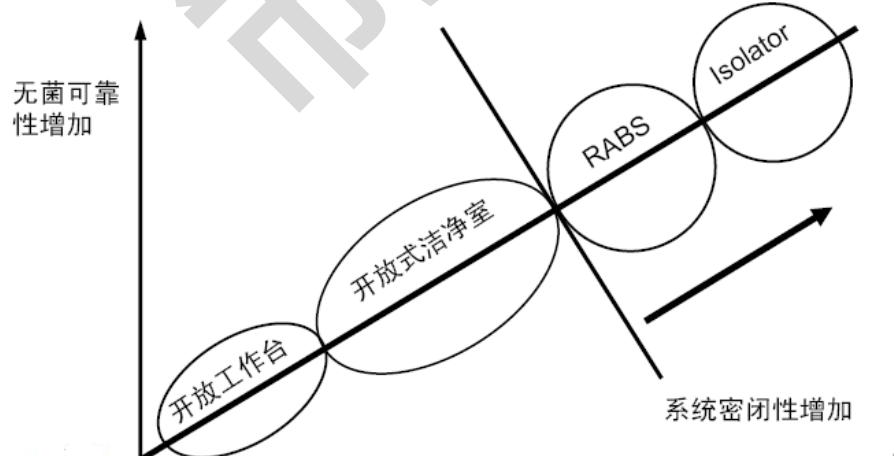
## 无菌工艺产品的微生物学质量保证

- 无菌药品质量保证的重点是在于对可能引起微粒、微生物和内毒素的潜在污染进行控制
- 无菌工艺的本质
  - 减少或消除以上潜在污染源
- 无菌药品的质量保证同时需要关注防止差错、混淆和交叉污染

## 无菌工艺产品的微生物学质量管理系统

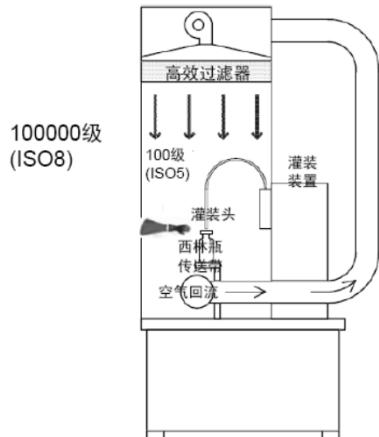


## 洁净室与洁净设备



## 先进的洁净室

### ➤ 隔离器 (Isolator) 的工作原理



-11-

ISPE-CCPE Training module

## 先进的洁净室

### ➤ 隔离器 (Isolator) 的工作原理

- 较小的封闭空间，操作者不进入
- 关键工艺核心区 (A级) 位于D级 (ISO8) 背景环境下
- 操作者只在停产期间打开设备。人通过手套箱进行操作，密闭的工艺加料
- 去除微生物污染的方式为对隔离器内部进行气雾或蒸汽消毒，以及对隔离器内部表面局部消毒
- 操作者与无菌工艺核心相互隔离，使用隔离罩、窗、手套箱、更换配件和部件的传递口

-12-

## 先进的洁净室

### ➤ 限制进出隔离系统（RABS）的工作原理

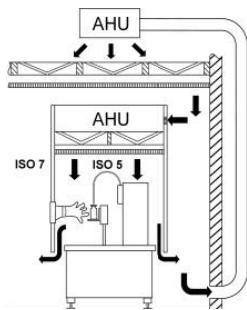
- 背景房间B级
- 关键区域为A级（ISO5），操作者通过手套箱进行操作
- 玻璃或聚碳酸酯材料
- 手套孔、传递系统和传递门
- 门的互锁
- HEPA安装在门的上方。使用洁净室送风，或RABS单独送风

-13-

## 先进的洁净室

### ➤ 主动式RABS

- ✓ 自带空气处理系统，装置内的空气经过HEPA再次过滤
- ✓ 气流分布达到单向流水平



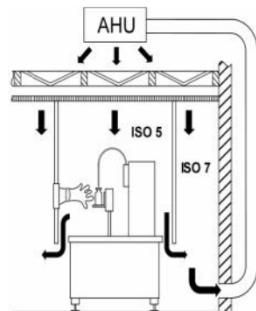
BOSCH, Packaging Technology

-14-

## 先进的洁净室

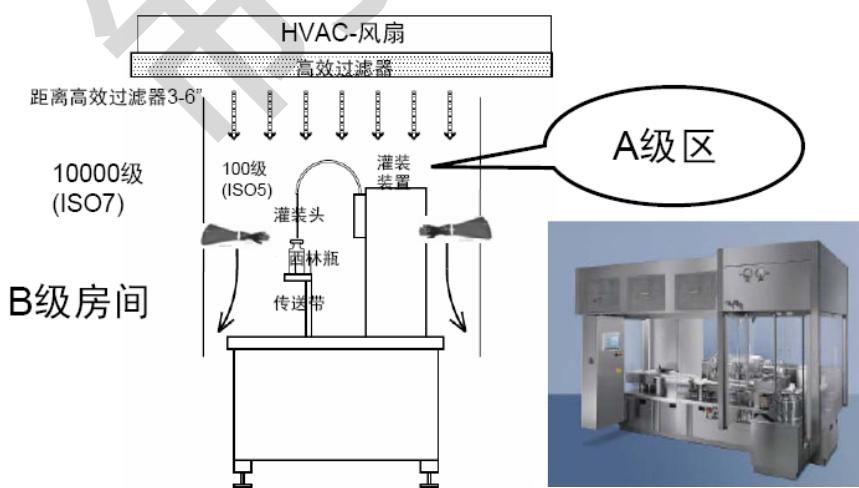
### ➤ 被动式RABS

- ✓ 使用洁净室空气处理系统
- ✓ 空气过滤和流向通过洁净室顶部实现



-15-

## 最低要求的开放式洁净室

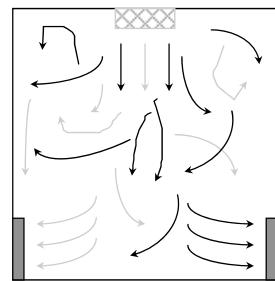


ISPE-CCPE Training module

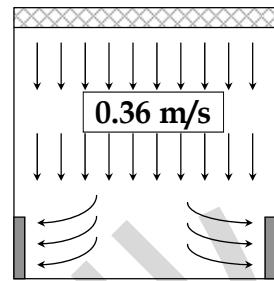
-16-

## HVAC系统的工作原理

乱流-紊流  
将脏空气稀释



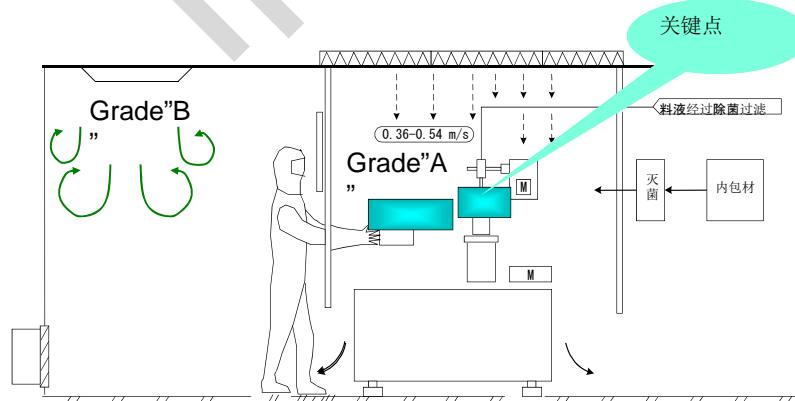
单向流/层流  
将脏空气置换



-17-

## HVAC系统的工作原理

### ➤ 关键区域的气流保护技术



-18-

## 烟雾试验（气流可视化研究）

### ➤ 启动时机

- 生产线新建/改建，变更的验证，偏差调查

### ➤ 变更类型举例

- 涉及空气处理系统，无菌工艺设备，高效过滤器

### ➤ 气流可视化研究要素

- 在动态条件下进行，考察设备运行和人员干预的影响
- 主要用于考察关键区域的单向流保护作用，也用于考察不同洁净度区域之间的气流方向
- 在试验前后适当消毒，消除污染

-19-

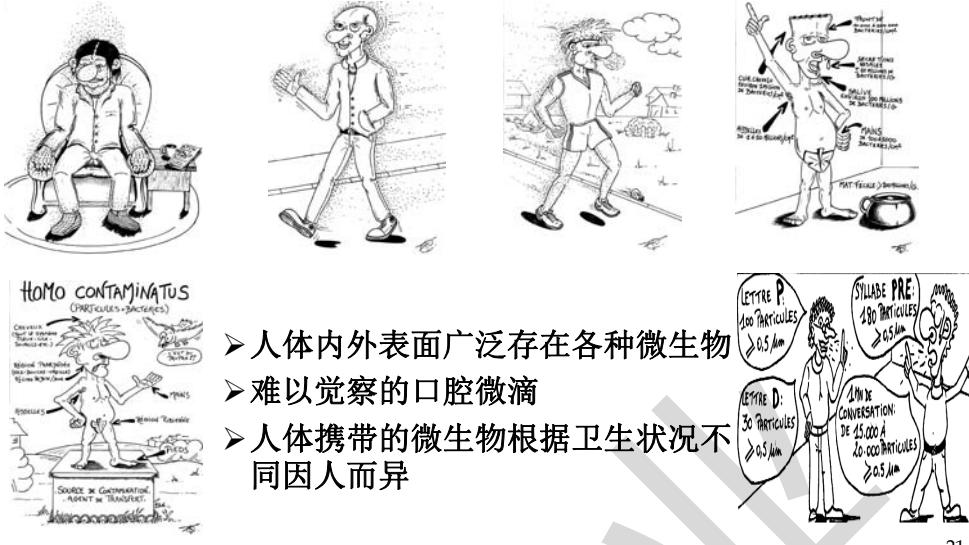
## 烟雾试验（气流可视化研究）

### ➤ 测试方法

- 示踪线法、示踪剂法、采用图像处理技术的气流显形检查、借用速度分布测量的气流显形检查
- 产生示踪粒子的物质主要是去离子水、乙醇、乙二醇、干冰
- 衣物和背景材料应具有一定对比度
- 烟雾发生速度与角度的选择
- 多管和单管发生器的使用
- 拍摄过程中应减少抖动，去除噪音，注意场景移动与集中
- 被拍摄生产线和人员应保持正常工作状态

-20-

## 洁净环境中的主要微生物污染源



-21-

## 不同动作状态的污染发生率



- 人体产生体表脱落物、体表呼吸道排出物、微生物
- 人体携带附着的污染物质、尘粒、服装磨损脱落物
- 每天脱落1亿个表皮细胞。到70岁时，一个人脱落皮屑总重量约48kg

-22-

## 无菌工艺现场工作人员的培训

- 受训范围应包括工作于环境控制区内的所有人员
  - 包括生产操作人员、环境监测人员、现场维修人员
- 培训内容
  - GMP培训, SOP培训
  - 无菌工艺的基本原理, 基础知识培训
  - 生产和操作程序与产品污染的相关性
  - 无菌操作技术, 洁净室行为

-23-

## 无菌工艺现场工作人员的培训

- 基本无菌操作技术
  - 严格执行更衣规范
  - 只能用无菌器具与无菌物料相接触
  - 所有活动慢而轻
  - 人员身体应始终置于层流区之外
  - 任何操作方式不得影响产品的无菌性
  - 人员间保持距离, 少讲话, 着装不可相互接触
  - 手套在必要时以及定时消毒
  - 定时检查着装的完整性

-24-

## 无菌工艺现场工作人员的更衣确认

- 人员更衣确认针对所有进入卫生B级区的工作人员
- 初始确认连续进行3次
- 再确认应定期进行，并在年度数据回顾中对动态监测数据加以总结
- 只有确认更衣行为符合SOP要求后，才能开始进行取样监测
- 对操作服表面监测时应包括着力点、衣物连接处和更衣时可能接触到的衣物表面，如头罩、口罩、护目镜、肩下部、前臂、肘部、腹部、拉链、膝部、脚套、背部等
- 每只手套至少取2个样品

-25-

## 无菌工艺验证 - 培养基模拟灌封试验

- 目的
  - 评估无菌生产工艺能力
  - 确定无菌工艺变化的可接受性
  - 评估人员的操作资质
  - 满足法规符合性要求
  - 证明生产操作的可接受性
  - 出现微生物污染后的调查

-26-

## 无菌工艺验证 - 培养基模拟灌封试验

### ➤ 通常做法

- 以培养基代替原料，暴露于设备、容器胶塞密封系统的表面和关键环境条件下，并模拟实际生产完成工艺操作
- 装有培养基的密闭容器经培养以检查微生物的生长，然后对结果进行评价，借以确定实际生产中产品污染的概率

### ➤ 作用

- 验证结果合格的有效性不同于灭菌工艺验证
- 验证结果同产品的无菌性没有直接关系，但意味着存在异常因素
- 不能成为高风险技术、活动和干预的辩护理由

-27-

## 无菌工艺验证的法规要求

### ➤ 国家新版GMP（2010年修订）附录一 无菌药品

无菌生产工艺的验证应当包括培养基模拟灌装试验。

应当根据产品的剂型、培养基的选择性、澄清度、浓度和灭菌的适用性选择培养基。应当尽可能模拟常规的无菌生产工艺，包括所有对无菌结果有影响的关键操作，及生产中可能出现的各种干预和最差条件。

培养基模拟灌装试验的首次验证，每班次应当连续进行3次合格试验。空气净化系统、设备、生产工艺及人员重大变更后，应当重复进行培养基模拟灌装试验。培养基模拟灌装试验通常应当按照生产工艺每班次半年进行1次，每次至少一批。

-28-

## 无菌工艺验证的法规要求

### ➤ 国家新版GMP（2010年修订）附录一 无菌药品

培养基灌装容器的数量应当足以保证评价的有效性。批量较小的产品，培养基灌装的数量应当至少等于产品的批量。培养基模拟灌装试验的目标是零污染，应当遵循以下要求：

（一）灌装数量少于5000支时，不得检出污染品。

（二）灌装数量在5000至10000支时：

1. 有1支污染，需调查，可考虑重复试验；

2. 有2支污染，需调查后，进行再验证。

（三）灌装数量超过10000支时：

1. 有1支污染，需调查；

2. 有2支污染，需调查后，进行再验证。

（四）发生任何微生物污染时，均应当进行调查。

-29-

## 培养基模拟灌封试验的基本原则

### ➤ 试验次数和频率

- 作为全面验证的一部分内容来实施

- 对新生产线实施模拟灌封试验前的必要条件

✓ 厂房和HVAC系统、工艺设备、灭菌工艺验证结束

✓ 已进行房间消毒和环境监测

✓ 人员经培训并且更衣确认合格

✓ 提供SOP

- 新生产线应通过连续3次的成功试验

- 此后，通常每半年进行1次试验

- 基于变更的风险评估，应酌情增补

-30-

## 培养基模拟灌封试验的基本原则

### ➤ 最差条件

- 人数的增加或减少
- 清洁消毒后的最长使用时间
- 以最快的速度灌装最小规格（最难处理）和以最慢的速度灌装最大规格的容器（暴露时间最长）

### ➤ 风险评估

- 识别可能影响实验结果的因素
- 评估风险因素的影响性，采取必要的措施

### ➤ 工艺的持续评估

- 在变更系统中给予必要的风险评估

-31-

## 溶液产品的模拟要点

### ➤ 配制阶段的要点

- 灭菌处理、设备链、保存时间
- 配制阶段中的无菌操作，包括取样、无菌连接、重新过滤、药液回流等

### ➤ 灌装阶段的要点

- 灌装速度、灌装线上进行的常规操作
- 灌装完成后容器的倒置与旋转
- 盛装容器的编号

### ➤ 录像及其保存

-32-

## 冻干产品的模拟要点

- 模拟装载/卸载及缩短的放置时间
  - 冻干箱在室温下抽真空并保持到预定时间
  - 优点：培养基未经冷冻，关注易产生污染风险的操作
- 模拟装载/卸载及正常放置时间
  - 冻干箱中的保持时间同于正常冻干周期
  - 优点：培养基未经冷冻，模拟整个冻干放置时间
- 特殊关注点
  - 培养基冷冻
  - 真空度和保持时间
  - 厌氧条件

-33-

## 混悬剂的模拟要点

- 配制阶段的要点
  - 混悬液生产的特殊操作
  - 向培养基罐中添加无菌对照粉末
- 灌装阶段的要点
  - 特殊设备的调试及模拟使用

-34-

## 软膏/乳膏/乳剂/凝胶的模拟要点

- 生产工艺与溶液或混悬剂产品相似
- 配制阶段的要点
  - 可能需要增加培养基的粘度
- 灌装阶段的要点
  - 设备设计和操作具有特殊性
- 培养后检查的要点
  - 使用不透明容器时，需将内容物移出容器再行检查
  - 也可选择透明的容器

-35-

## 粉末产品的模拟要点

- 设备和工艺具有特殊性
- 配制阶段的要点
  - 使用对照剂粉末模拟操作
- 灌装阶段的要点
  - 对实际灌装操作进行适当变更
  - 进行工艺模拟实验时，通常要进行两种不同的灌装操作
  - 在线和离线

-36-

## 粉末产品的模拟要点

### ➤ 阴性对照 - 特殊考虑因素

- 取一定量的小瓶，单独灌装液体，作为阴性对照
- 如果组合灌装出现污染，阴性对照可用于确定污染源是否来自液体灌装系统

-37-

## 模拟试验的文件记录

### ➤ 文件记录

- 工艺模拟实验的重要组成部分
- 受到监管机构的重视

### ➤ 内容

- 工艺的界定
- 验证方案
- 方案的执行记录
- 验证报告
- 模拟过程的观察和录像

-38-

## 无菌工艺验证方案

### ➤ 方案的制定

- |                                      |  |
|--------------------------------------|--|
| - 试验编号                               | - <input type="checkbox"/> 容器中应灌装培养基的体积  |
| - <input type="checkbox"/> 房间编号      | - <input type="checkbox"/> 培养箱编号         |
| - <input type="checkbox"/> 设备和灌装线编号  | - 培养温度和时间                                |
| - <input type="checkbox"/> 容器或密封件的类型 | - <input type="checkbox"/> 环境监测项目        |
| - <input type="checkbox"/> 生产线运行速度   | - 待用的批记录复印件                              |
| - <input type="checkbox"/> 准备灌装的容器数  | - <input type="checkbox"/> 试验的合格标准       |
| - 参与人数                               | - <input type="checkbox"/> 最差状况的确定依据     |
| - 所用培养基                              | - <input type="checkbox"/> 促生长试验的要求及合格标准 |
- 39-

## 无菌工艺验证实施记录

### ➤ 方案实施记录

- |                                      |                                      |
|--------------------------------------|--------------------------------------|
| - 参与人员                               | - <input type="checkbox"/> 灌装数量平衡    |
| - <input type="checkbox"/> 灌装瓶数      | - 过滤器信息及完整性测试数据                      |
| - <input type="checkbox"/> 培养瓶数      | - <input type="checkbox"/> 环境和人员监测结果 |
| - 培养开始时间, 温度与时长                      | - 灌封间的事件记录                           |
| - <input type="checkbox"/> 阳性瓶/盒/盘编号 | - <input type="checkbox"/> 不符合方案的偏差  |
| - <input type="checkbox"/> 培养前剔除的样品数 |                                      |
| - 培养基促生长试验结果                         |                                      |
| - 培养基的灭菌                             |                                      |
- 40-

## 无菌工艺验证中的环境监测

### ➤ 环境监测数据的意义

- 评判工艺条件是否满足要求
- 如果工艺模拟实验失败，有助于查找原因
- 环境监测超标结果并不导致工艺模拟实验失败
- 伴有环境监测数据超标的工艺模拟实验，即使培养结果合格也并不意味着对日常监测限度可以放宽

-41-

## 无菌工艺验证的关键要素

### ➤ 有效模拟的关键要素 - 如，灌装体积、灌装速度、容器规格和运行的持续时间

- |             |             |
|-------------|-------------|
| - 厂房和灌装机因素  | - 持续时间和灌装瓶数 |
| - 设备装配和调试   | - 集中性生产     |
| - 培养基选择和制备  | - 培养前容器检查   |
| - 惰性气体      | - 培养条件      |
| - 容器规格      | - 培养后检查     |
| - 容器/密封件的形状 | - 容器的计数一致性  |
| - 灌装速度      | - 培养基的促生长性  |
| - 灌装体积      | - 手工灌装      |
| - 干预        |             |

-42-

## 无菌工艺中的干预

### ➤ 干预分类

- 工艺型 **Inherent interventions**
- 纠正型 **Corrective interventions**

### ➤ 模拟干预的实施要点

- 清单
- 频率与人员
- 相关容器的处理

-43-

## 无菌工艺人员资格确认

### ➤ 先决条件

- 更衣确认合格
- 完成所有相关培训

### ➤ 初始及年度确认

### ➤ 未确认者进入灌装区的处理

### ➤ 确认状态失效

- 确认结果不合格
- 洁净室行为失当

-44-

## 无菌工艺验证中培养基的选择与灭菌

➤ 培养基的选择

- 胰蛋白胨大豆肉汤 (SCDM, TSB)

➤ 灭菌方法

- 首选湿热灭菌法
- 次选除菌过滤法

➤ 模拟灌装时的培养基温度要求

-45-

## 无菌工艺验证结果解释和接受标准

➤ 目标：零污染

➤ 阳性结果表明有潜在问题

➤ 调查要点

- 重新检查阳性品的容器完整性
- 微生物的鉴别
- 工艺及辅助系统的审核

-46-

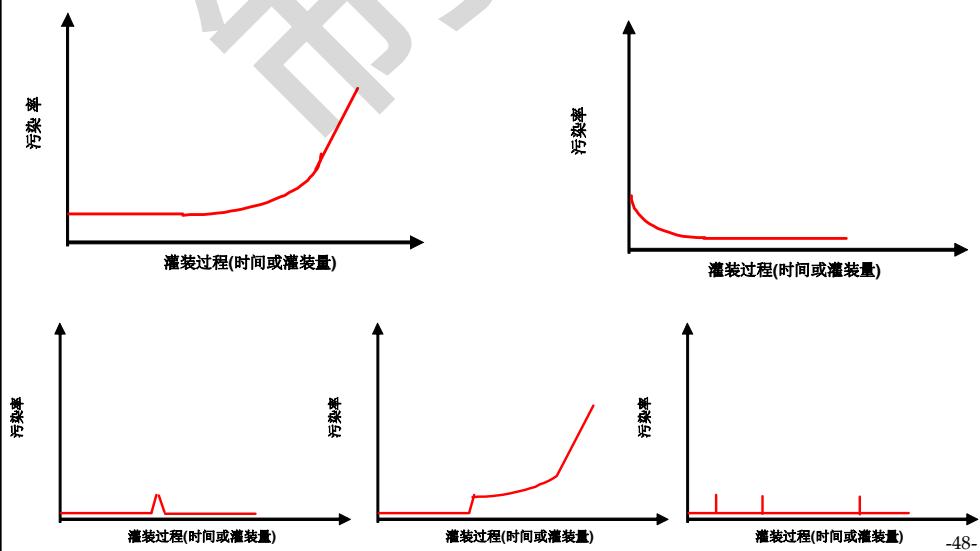
## 无菌工艺验证接受标准和结果解释

### ➤ 失败调查报告的内容

- 事件概述
- 已采取的纠正措施
- 所有系统调查结果
- 补充工艺模拟试验的结果
- 失败原因结论
- .....
- 对以前生产批次的潜在影响

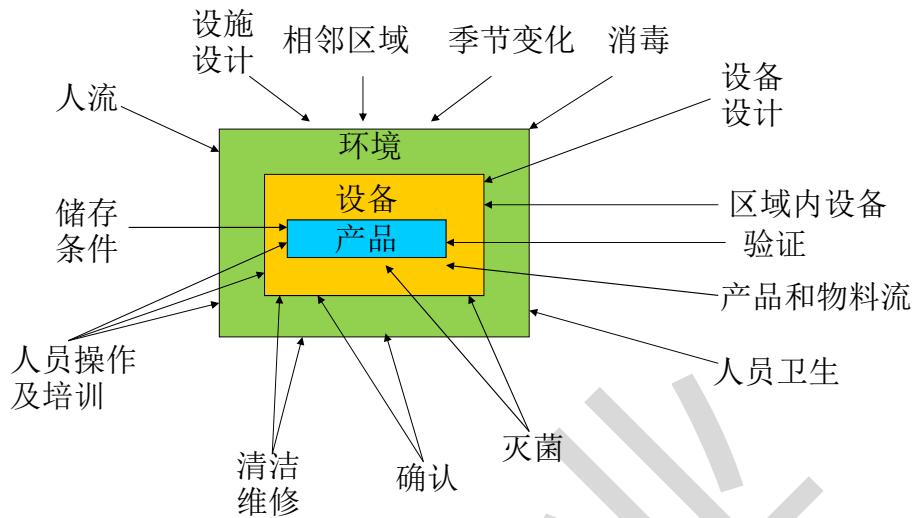
-47-

## 无菌工艺验证的污染品典型分布



-48-

## 无菌工艺产品日常运行控制



## 无菌工艺产品日常运行控制

- 无菌工艺产品（以冻干品为例）的微生物学质量影响因素
  - 过滤前药液微生物污染水平
  - 无菌生产设施设备的完好性管理
  - 无菌生产区HVAC系统运行状况
  - 无菌生产环境设施的消毒有效性
  - 无菌生产/监测/维修人员行为
  - 生产过程与时限

## 无菌工艺产品日常运行控制

➤ 微生物学质量直接控制点

- 过滤前药液含菌量
- 无菌生产环境监测数据
- 无菌检查实验数据

➤ 微生物学质量间接控制点

- 验证管理
- 偏差管理
- 变更控制

-51-

## 无菌工艺设施的消毒管理

➤ 耐用的污染控制系统

- 选择合适的消毒剂和消毒方式
- 详细的操作SOP
- 正确实施
- 根据环境监测结果进行适当调整
- 满足法规要求

-52-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 有效耐用的污染控制系统

- 选择合适的消毒剂和消毒方式
- 详细的操作SOP
- 正确实施
- 根据环境监测结果进行适当调整
- 满足法规要求
- 保护产品、人员、设施
- 技术以外的关注，如经济性、时间性、可持续供应能力、后续服务...

-53-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 官方检查的关注点

- |                  |                     |
|------------------|---------------------|
| - 确认的供应商和消毒剂     | - 使用者和管理人员的培训、资质和责任 |
| - 清洁消毒方法         | - 清洁消毒频率            |
| - 即配型/即用型消毒剂     | - 接触时间              |
| - 配制用水           | - 残留物的处理            |
| - 除菌过滤方法         | - 记录和文件             |
| - 无菌工艺区消毒剂的灭菌与储存 | - 清洁消毒后的保持时间        |
| - 清洁用具的灭菌与储存     | - 清洁消毒前的允许时间        |
| - 消毒剂使用效期        | - 停机或发现污染后的清洁消毒措施   |
| - 消毒剂的交替使用       |                     |

-54-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 消毒剂的有效性影响因素

- 自身的杀微生物活性
- 浓度
- 作用时间
- 待消毒表面的性质
- 消毒剂稀释用水的硬度
- 待消毒表面上的有机物数量
- 污染微生物的种类与数量

-55-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 常用消毒剂示例

化学分类	等级	示例
醛类	杀芽孢剂	2% 戊二醛
醇类	通用型消毒剂、防腐剂、抗病毒剂	70% 异丙醇, 70% 乙醇
氯和次氯酸钠	杀芽孢剂	0.5% 次氯酸钠
酚类	通用型消毒剂	500 $\mu$ g/g 氯化甲酚, 500 $\mu$ g/g 氯二苯甲酚
臭氧	杀芽孢剂	8% 气体(重量比)

-56-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 常用消毒剂示例

化学分类	等级	示例
过氧化氢	气态灭菌剂, 液态杀芽孢剂, 防腐剂	4 $\mu$ g/g H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 蒸气, 10% - 25% 溶液, 3% 溶液
双胍类替代物	防腐剂	0.5% 双氯苯双胍己烷葡萄糖酸盐
过氧乙酸	液态杀菌剂, 气态杀菌剂	0.2% 过氧乙酸, 1 $\mu$ g/g 过氧乙酸
环氧乙烷	气态杀菌剂	600 $\mu$ g/g 环氧乙烷
季胺盐类化合物	通用型消毒剂、防腐剂	200 $\mu$ g/g 苯扎氯铵(氯化苯甲羟胺)
$\beta$ - 丙内酯	杀芽孢剂	100 $\mu$ g/g $\beta$ - 丙内酯

-57-

## 无菌工艺设施的消毒管理

### ➤ 消毒剂的效力测试

- 消毒剂的效力确认通常包括两个阶段内容, 第一阶段为实验室考察或模拟现场考察, 第二阶段为现场考察
- 第一阶段考察: 采用悬液定量法或载体试验法, 以特定菌为指示微生物, 确定安全消毒剂量的有效性
- 第二阶段考察: 通过监测清洁/消毒前、后的环境微生物学质量进行的。经历一段时间的积累后才能用以评估消毒和清洁程序的数据 (建议至少三次试验)
- 现场考察可在最差条件下(如预防性维修之后)检测环境的污染状况, 而后进行消毒处理, 对比消毒前后的数据变化
- 载体试验要求, 细菌芽孢数量下降2个对数单位, 细菌繁殖体下降3个对数单位

-58-

## 无菌工艺设施的消毒步骤

### ➤ 清洁

- 避免消毒剂失效，确保消毒剂与微生物的充分接触
- 清洁剂与消毒剂的兼容性

### ➤ 消毒

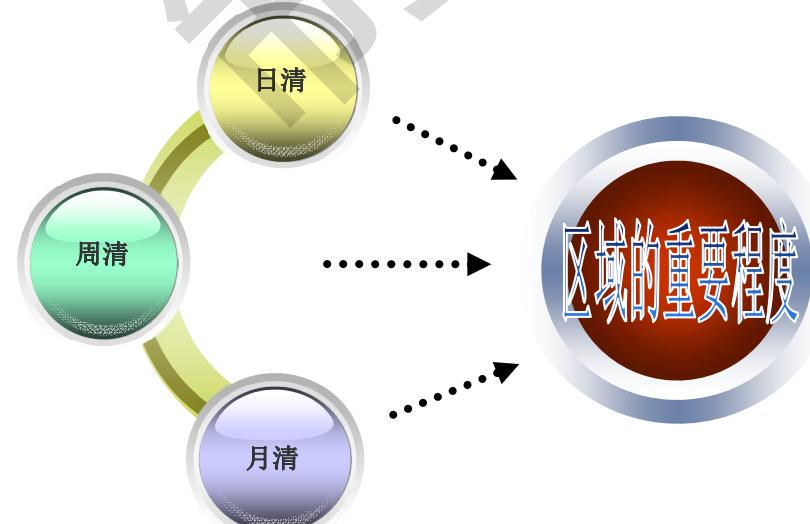
- 拖洗法、擦拭法：适用于平整表面
- 喷洒或喷雾法：适用于高处、管道、复杂设备

### ➤ 清除残留

- 去除残留、避免影响工艺过程
- 确保充分的接触时间
- 避免产生二次污染

-59-

## 无菌工艺设施的消毒频率



-60-

## 无菌工艺环境监测方案

### ➤技术要素：

- 监测方法
- 鉴别手段
- 文件记录
- 人员培训

### ➤管理要素：

- 限度标准
- 监测位点
- 监控计划
- 人员培训

### ➤管理要素：

- 趋势分析
- 偏差调查
- 纠正和预防
- 决策依据

-61-

## 无菌工艺环境监控方案的关注点

### ➤技术层面

- 具备可操作性
- 结果准确、可靠，必要时考虑时间因素

### ➤管理层面

- 监测限度和计划的适用性
- 及时准确地识别异常趋势
- 偏差调查的深入程度
- 由科学依据与合理推测所构建的风险决策

-62-

## 环境洁净度监测项目

### ➤ 微粒监测

- ✓ 监测项目为空气悬浮粒子，不区分微粒的生物活性

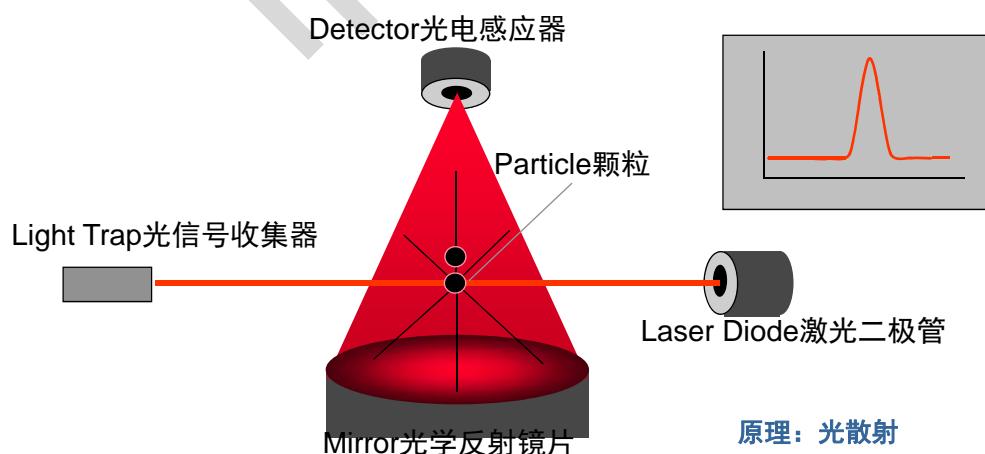
### ➤ 微生物监测

- ✓ 监测项目包括空气微生物、设备表面微生物、人员卫生

-63-

## 空气悬浮粒子监测

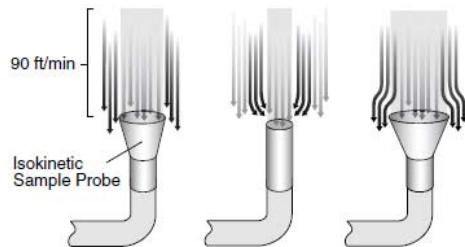
### ➤ 计数器工作原理



-64-

## 空气悬浮粒子监测

### ➤ 等动力取样



- 又称为等速采样

进入采样管入风口的平均风速  
与该位置上单向流的平均风速  
相同的采样条件

Mark Hallworth, Validation of pharmaceutical processes

-65-

## 空气微生物监测

### ➤ 传统的空气微生物采样原理

- 撞击法 (impaction)
- 离心法 (centrifugation)
- 气旋法 (cyclone scrubbing)
- 冲击法 (impingement)
- 过滤法 (filtration)
- 静电沉降法 (electrostatic precipitation)
- 自然沉降法 (sedimentation)

### ➤ 空气浮游菌的监测使用主动采样法，空气沉降菌监测使用被动式的自然沉降法

-66-

## 空气微生物监测

### ➤ 典型固体撞击式采样器

- 筛孔式采样器
  - MBV、Thermo...
  - 重量轻，可编程
  - 使用标准培养皿
  - 关键部件可灭菌处理

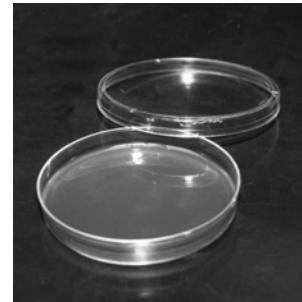


-67-

## 空气微生物监测

### ➤ 自然沉降法

- |               |               |
|---------------|---------------|
| - 优点:         | - 缺点:         |
| ✓ 简单直观反映落下菌情况 | ✓ 缺乏同悬浮菌量的相关性 |
| ✓ 简便          | ✓ 采样条件难以控制    |
| ✓ 价廉          |               |
| ✓ 对空气环境破坏小    |               |



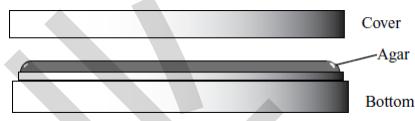
-68-

## 表面微生物监测

### ➤ 表面取样方式

#### - 接触碟取样概述

- 接触碟的英文名Contact plate 或 RODAC plate。RODAC是Replicate Organism Direct Agar Contact的缩写
- 接触碟直径为60mm，取样面积一般约为25cm<sup>2</sup>
- 接触碟内装固化后呈凸面状的琼脂培养基
- 适用于对平整的规则性表面进行取样
- 取样后注意去除残留培养基



-69-

## 表面微生物监测

### ➤ 表面取样方式

#### - 擦拭取样 (Swabbing) 概述

- 拭子通常为一根棒状物，其顶端由吸水性材料制成
- 吸水材料多为藻酸钙、尼龙或棉花
- 拭子头在取样前应先行浸湿
- 擦拭取样的面积一般约为25cm<sup>2</sup>
- 适用于不规则表面，特别是难于清洁消毒区域，如裂缝、粗糙点的取样
- 如果拭子头的材料为藻酸钙，则可用稀的盐溶液（如1%柠檬酸钠溶液）作为浸湿剂



-70-

## 表面微生物监测

### ➤ 人员卫生取样方式

#### - 人员卫生取样概述

- 对操作服表面监测时应包括着力点、衣物连接处和更衣时可能接触到的衣物表面
- 通常，操作服取样位置为头罩、护目镜、口罩、胸部、前臂、腹部、拉链、脚套处
- 每只手套均应取样
- 可使用直径9cm平皿或直径6cm接触碟

-71-

## 环境微生物监测用培养基和培养条件

### ➤ 培养基选择

#### - 关注点

- 支持广谱微生物生长
- 可使用TSA培养基，必要时使用SDA培养基
- 如有消毒剂残留，应考虑使用中和剂
- 对非抗生素生产级区环境设施表面监测时，通常在大豆胰蛋白胨琼脂（TSA）培养基内添加0.7%的聚山梨酯（吐温）80和0.1%的卵磷脂

-72-

## 环境微生物监测用培养基和培养条件

### ➤ 培养条件

#### - 关注点

- 多数专家建议，可在30-35°C下培养48-72小时
- USP 35 <1116>提到，在20-25°C和30-35°C下均需培养不少于72小时。不能确定微生物种类时，可将同一块平板放置在两个温度下培养，并且采用先高温后低温的做法

-73-

## 环境监控限度标准的制定

### ➤ 制定依据

#### ✓ 法规限度来源

- 药品生产质量管理规范（2010年修订）附录1
- FDA无菌工艺药品 cGMP 工业指南（2004年）
- 欧盟GMP附件1（2008年版）
- USP 34和USP 35

#### ✓ 历史数据

-74-

## 监控计划与监控位点的确定

### ➤ 制定依据

- ✓ 考虑法规要求与风险分析结果
- ✓ 区别对待设施确认阶段与日常监测阶段
- ✓ 取样计划和监控位点可以动态调整
- 考虑厂房设施、通风系统、加工设备与制造工艺的变化
- 考虑监测数据的变化

-75-

## 数据回顾与趋势分析

- 数据收集并经评价后，由专业技术人员定期进行趋势分析
- 可用统计分析图将趋势直观地反映出来，在图中标出警戒限度及纠偏限度
- 根据趋势分析结果可对环境控制区的微生物学质量做出评估，并对警戒和纠偏限度做出相应调整
- 通过趋势分析，可以直观地反映洁净区的运行和维护状况，有利于提早发现潜在偏差，及时查找原因并采取纠正措施，避免环境质量进一步恶化

-76-

## 数据回顾与趋势分析

➤ 利用趋势分析来评价环境是否受控时应关注以下几个方面

- ✓ 环境控制限度的可靠性
- ✓ 数据是否连续三次超出警戒限度
- ✓ 监测结果是否随季节变化而出现有规律的波动或跳跃
- ✓ 对于1个或几个明显低于或高于大多数监测值的数据，可作为异常值（outliers）处理

-77-

## 数据回顾与趋势分析

➤ 利用趋势分析来评价环境是否受控时应关注以下几个方面

- ✓ 环境控制限度的可靠性
- ✓ 数据是否连续三次超出警戒限度
- ✓ 监测结果是否随季节变化而出现有规律的波动或跳跃
- ✓ 对于1个或几个明显低于或高于大多数监测值的数据，可作为异常值（outliers）处理

-78-

## 无菌工艺产品日常生产评价

➤ 微生物学质量直接控制点监测数据评价

- 过滤前药液含菌量
- 无菌生产环境监测数据
- 无菌检查实验数据

➤ 微生物学质量间接控制点评价

- 验证管理
- 偏差管理
- 变更控制

-79-

## 无菌工艺产品日常生产评价

➤ 持续的工艺评估

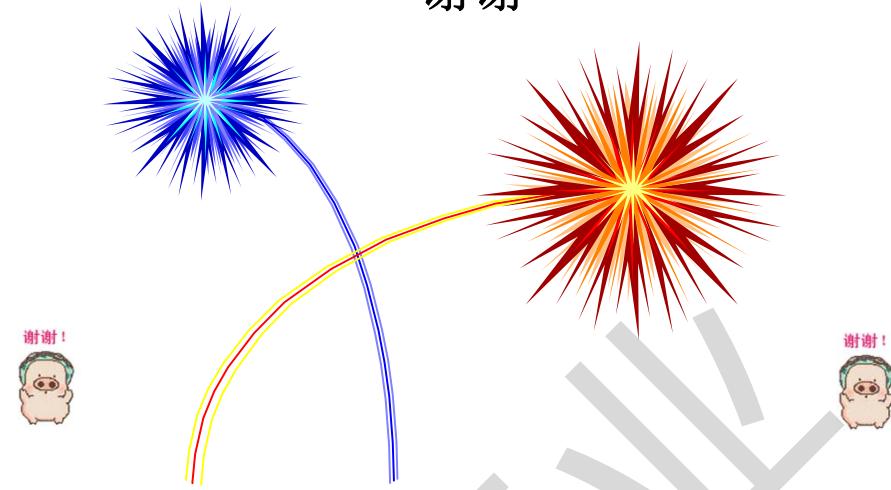
- 证明验证状态的可维持性
- 涉及监测数据、验证管理、变更管理、偏差管理

➤ 需要重新进行无菌工艺模拟试验的情形

- 环境监测数据连续超出警戒/纠偏标准
- 产品无菌检查实验失败
- 无菌生产区的无菌性遭到破坏

-80-

谢谢



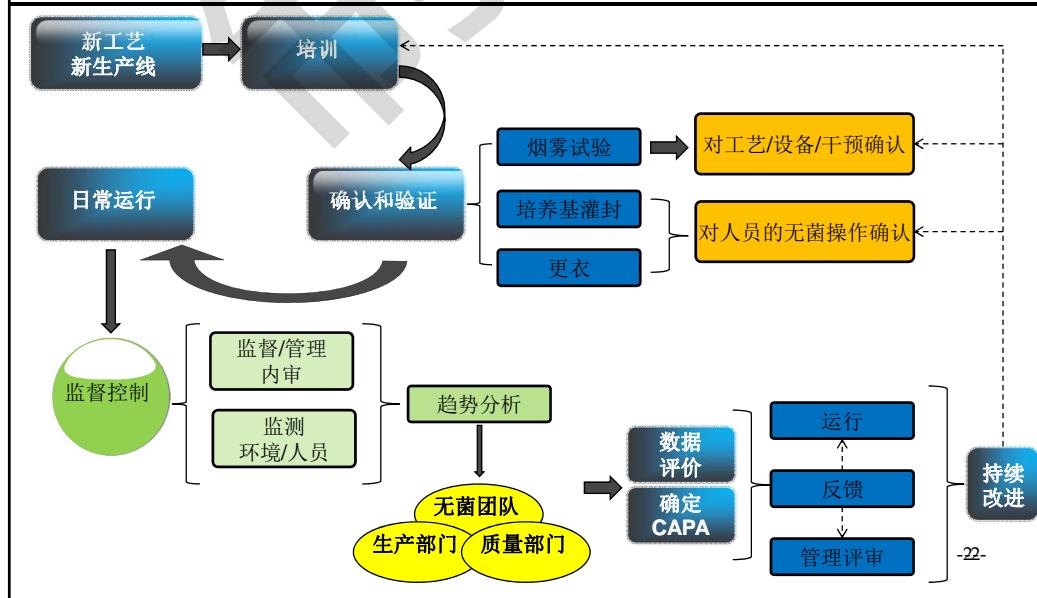
# 无菌工艺产品微生物学相关偏差调查

主讲人： 崔强

2015年10月

-1-

## 无菌工艺产品的质量保证



-22-

## 无菌工艺产品微生物学质量保证

- 无菌工艺验证偏差的评价
- 日常直接控制点监测数据评价
  - 过滤前药液含菌量
  - 无菌生产环境监测数据
  - 无菌检查实验数据
- 日常间接控制点评价
  - 验证管理, 如设备、材料、防护用具的灭菌工艺再验证, HVAC系统再验证
  - 偏差管理, 如无菌工艺相关设备运行偏差
  - 变更控制

-3-

## 微生物学相关偏差处理基本原则

- 微生物学相关偏差是一类特殊的偏差
  - ✓ 需要关注偏差处理的通常要素
  - ✓ 偏差调查过程与结论带有明显的微生物污染控制学专业特征
  - ✓ 整个处理过程强调系统性与整体性思维

-4-

## 微生物学相关偏差处理要素

### ➤体现质量风险管理原则

- ✓ 偏差分级与处理
- ✓ 确定偏差调查的深度
- ✓ 偏差的影响性确认
- ✓ 根本原因分析
- ✓ 纠正预防措施
- ✓ 偏差评估
- ✓ 时限要求
- ✓ 阶段性回顾与趋势分析

-5-

## 培养基灌封实验阳性结果的调查

### ➤ 调查的范围应包括

- ✓ 环境微生物监测数据, 空气悬浮粒子监测数据
- ✓ CIP设备, 清洁、消毒程序的执行情况
- ✓ 培养基、设备和零件的灭菌工艺, 灭菌釜的校正情况
- ✓ 高效过滤器检测(空气悬浮粒子水平, 过滤器检漏, 风速测量, 密封系统检查, 使用年限等)
- ✓ 除菌过滤器完好性
- ✓ 房间气流型式与压差
- ✓ 人员操作技术培训情况

-6-

## 培养基灌封实验阳性结果的调查

### ➤ 调查的范围还包括

- ✓ 以往产品无菌检查实验结果
- ✓ 人员卫生状况监测数据
- ✓ 培养基灌装实验中的干预方式分析
- ✓ 该区域近期是否有过维修活动，生产线的改造情况
- ✓ 该生产线培养基灌封实验历史数据
- ✓ 已灭菌物品的储存条件
- ✓ 培养基灌封过程中的异常事件
- ✓ 阳性污染菌与环境监测污染菌的鉴别

-7-

## 培养基灌封实验阳性结果的调查

### ➤ 调查结论与风险评估

- 培养基灌封实验结果有效
  - » 暂停生产，直至确定污染来源并采取有效的纠偏措施
  - » 再验证合格后，产品方可放行。
  - » 对培养基灌封实验后和此前所生产的产品，进行风险评估
- 培养基灌封实验结果无效→重新进行培养基灌封实验
  - » 条件1 无菌灌装区的物理条件不满足要求
  - » 条件2 人员未按照正常生产程序操作

-8-

## 培养基灌封实验阳性结果的调查引申问题

- 重新模拟试验的次数取决于根本原因分析
  - 污染数量的提示
    - » 多瓶与单瓶之间的差别
  - 如果根本原因不确定，必须重新进行3批的模拟试验
- 对日常产品的影响
  - » 验证阳性批的监测数据和录像数据同日常数据进行对比
  - » 来自设施原因的影响程度考量

-9-

## 环境监测偏差调查SOP

### ➤文件结构与内容

1. 目的
2. 环境监测偏差的类型 – 涉及：环境参数、环境洁净度数据等
3. 职责
4. 通知与记录
  - a. 环境监测超标通知书
  - b. 偏差登记表
  - c. 偏差分级表
  - d. 专业调查报告
  - e. 偏差调查报告

-10-

## 环境监测偏差调查SOP

### ➤文件结构与内容

5. 调查范围
  - a. 一般偏差与重要偏差的调查程度差别
  - b. 数据回顾期限
6. 调查结论
  - a. 可能的微生物污染来源
  - b. 查找造成污染的根本原因
  - c. 偏差批与相关批产品发生微生物污染的可能性
7. 后续措施

-11-

## 无菌生产关键表面监测到微生物的调查

### ➤ 调查内容至少应包括

- |               |                  |
|---------------|------------------|
| ■ 对所检出微生物进行鉴别 | ■ 回顾无菌检查实验数据     |
| ■ 回顾环境监测数据    | ■ 回顾培养基灌封实验的历史数据 |
| ■ 检查批生产记录     | ■ 检查人员培训状况       |
| ■ 检查关键设备的运行记录 | ■ 检查关键设备的运行记录    |
| ■ 无菌灌封间的工作记录  | ■ 检查相关灭菌记录       |

-12-

## 无菌生产关键表面监测到微生物的调查

### ➤ 原则

- 从关键区检出微生物并不简单意味着无菌产品的报废
- 必须进行详细的调查
- 调查应有详细记录
- 从调查数据中得出明确合理的调查结论
- 最终评价应建立在充分的分析推理基础之上

-13-

## 无菌生产关键表面监测到微生物的调查

### ➤ 调查结论

- 结论的一种可能：无菌保证与无菌保护系统没有缺陷，微生物的检出有可能来自于监测过程
- 结论的另一种可能：无菌保证与无菌保护系统可能存在缺陷，需要采取纠正和预防措施，并对检出批及其前后所生产的各批产品进行评价

-14-

## 无菌生产环境监测超标调查示例1

### ➤ 无菌灌装A级区发现芽孢杆菌

- ✓ 污染菌类别: 某种特定的芽孢杆菌
- ✓ 出现区域: 只在A级区发现过, 在B级区中从未发现
- ✓ 检出位置: 出现在A级层流罩内侧表面, 位置不固定, 从未在与产品接触的表面上检出过
- ✓ 数量: 低检出。A级区内每100个表面样品中约有1个样品检出芽孢杆菌
- ✓ 项目: 仅发现于A级区表面样品中, 从未自A级区空气样品中检出
- ✓ 持续时间: 几个月
- ✓ 其它: B级区和人员防护用具中的微生物检出率约1/100-2/100

-15-

## 无菌生产环境监测超标调查示例1

### ➤ 可能的污染来源

- ✓ HVAC
- ✓ 清洁消毒程序及其执行
- ✓ 洁净设施
- ✓ 灌封机
- ✓ 操作人员
- ✓ 除菌过滤工序
- ✓ 环境监测
- ✓ 实验室错误

-16-

## 无菌生产环境监测超标调查示例1

➤ 常规调查后的深入性调查

- ✓ 针对可能的污染源，采取针对性监测活动
- ✓ 根据针对性监测结果，执行特定消毒措施
- ✓ 采取特定消毒措施后的连续监测结果
- ✓ 查找造成污染源的根本原因

➤ 调查结论？

➤ 关于产品的风险决策

-17-

## 无菌生产环境监测超标调查示例2

➤ 无菌灌装人员手套表面发现芽孢杆菌

- ✓ 多位操作者的手套表面微生物严重超标
- ✓ 部分设施表面检出少量相同污染微生物
- ✓ 灭菌工艺调查
  - 灭菌工艺参数达到验证要求
  - 手套和无菌服的灭菌装载方式未按相应SOP规定执行，实际操作过程与验证要求明显不符
  - 手套和操作服灭菌不彻底，从而检出污染微生物
  - 由于人员活动，此微生物进一步污染了临近设施
- ✓ 措施与决策

-18-

## 无菌检查试验结果阳性的常规调查程序

### ➤ 实验室初步调查针对以下因素

- ✓ 检验用设施设备与检验环境监测数据
- ✓ 实验准备、操作或样品培养中是否有明显的人为差错
- ✓ 阴性对照试验结果是否呈阳性

### ➤ 实验室初步调查结论

- ✓ 如果有上述一种或几种情形出现，则定为明显的实验室偏差
- ✓ 反之，进入调查的第二阶段

-19-

## 无菌检查试验结果阳性的常规调查程序

### ➤ 实验室深入调查

- ✓ 分离并鉴别污染菌
- ✓ 如果是最终灭菌工艺产品，则考查阳性污染菌对灭菌工艺的耐受性
- ✓ 审核检验及实验记录，找出存有潜在偏差可能的实验步骤
- ✓ 回顾灭菌前半成品（或过滤前药液）的微生物污染水平
- ✓ 对最终灭菌工艺产品，检查灭菌釜冷却用水含菌量数据
- ✓ 实验室近期相关数据趋势分析
- ✓ 实验室相关记录调查



-20-

## 无菌检查试验结果阳性的常规调查程序

### ➤ 生产过程调查

- ✓ 审查批生产工艺记录，调查有无异常情况发生
- ✓ 审查近期生产环境监测资料，进行趋势分析
- ✓ 审查人员卫生状况监测数据
- ✓ 对于无菌工艺产品，回顾培养基灌装记录
- ✓ 其它调查，如清洁消毒、过滤器使用、设备运行故障情况、人员受训状态等

-21-

## 无菌检查试验结果阳性的常规调查程序

### ➤ 综合实验室调查和生产过程调查结果，写出偏差调查报告

- ✓ 如通过根本原因分析确定阳性结果来自实验室系统，并且符合药典判定依据时，才能说明初检无效，则以复检结果作为放行依据
- ✓ 如无法确定初检结果呈阳性的原因，则批产品无菌检查试验结果应判为不合格

-22-

## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 偏差概述

- ××年××月××日，微生物实验室对3批无菌工艺药品和3批最终灭菌工艺药品进行无菌检查初试，其中有1批无菌工艺药品和1批最终灭菌工艺药品的检验结果呈阳性。有关偏差情况见下表

检验日期	检验人员	产品名称	批号	初试结果	微生物鉴别
××年××月××日	A	无菌工艺药品 ×××	×××1	其中1瓶TSB内的培养结果呈阳性	副溶血弧菌 或嗜水气单胞菌
××年××月××日	A	最终灭菌工艺药品 ×××	××××2	其中1瓶TSB内的培养结果呈阳性	副溶血弧菌 或嗜水气单胞菌

-23-

## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 实验室初步调查

- 检验过程、培养结果、初检当日无菌检查试验环境监测数据(仅地板检出1CFU/25cm<sup>2</sup>)、初步调查结论。

检验日期	检验人员	产品名称	批数	初试结果	微生物鉴别
××年××月 ××日	A	最终灭菌工艺药品 ×××	2批	其中1瓶TSB内的培养结果呈阳性 (产品批号: ×××2)	副溶血弧菌 或嗜水气单胞菌
		无菌工艺药品 ×××	3批	其中1瓶TSB内的培养结果呈阳性 (产品批号: ×××1)	副溶血弧菌 或嗜水气单胞菌
	B	最终灭菌工艺药品 ×××	1批	均呈阴性	---

-24-

## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 实验室深入调查

- 无菌工艺药品阳性结果的实验室深入调查 - 污染菌鉴别（微生物表现型鉴别结果）
  - 使用革兰氏染色、镜检和/或API数值分类系统
  - 在无菌工艺药品无菌检查试验初检中所发现的污染菌为副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*, id%=79.2）或嗜水气单胞菌/豚鼠气单胞菌（*Aeromonas hydrophila/caviae*, id%=11.5）。该污染微生物为革兰氏阴性杆菌，弧菌科，菌体直径在0.3-1.3 $\mu\text{m}$ 间。
  - 在最终灭菌工艺药品无菌检查试验初检中所发现的污染菌为副溶血弧菌（*Vibrio parahaemolyticus*, id%=79.2）或嗜水气单胞菌/豚鼠气单胞菌（*Aeromonas hydrophila/caviae*, id%=11.5）。该污染微生物为革兰氏阴性杆菌，弧菌科，菌体直径在0.3-1.3 $\mu\text{m}$ 间。

-25-

## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 实验室深入调查

- 无菌工艺药品阳性结果的实验室深入调查 - 污染菌鉴别（微生物遗传型鉴别结果）
  - 由于无菌工艺药品和最终灭菌工艺药品无菌检查试验初试中所发现的污染菌表现型鉴别结果高度接近，故将样品委托有关机构进行微生物遗传型鉴别
  - 遗传型鉴别结果显示，虽然这两种污染菌的测序结果非常相似，但仍有4个部位的核苷酸是不同的，这说明两种污染菌在遗传型上并不完全相同
  - 从无菌工艺药品无菌检查初试阳性样品中所分离出的污染菌与从最终灭菌工艺药品无菌检查初试阳性样品中所分离出的污染菌并不完全相同，而且也不同于从批无菌检查实验环境中和批无菌灌封生产环境中所监测到的微生物

-26-

## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 产品无菌风险评估

- 无菌工艺药品
  - ◆ 尽管偏差有来自于检验系统的可能性，但该批无菌工艺药品无菌检查试验初试阳性结果与检验系统之间不存在绝对的联系。
  - ◆ 尽管没有明显证据表明偏差来自生产系统，但在目前生产条件下，对于无菌风险程度非常高的无菌灌装工艺产品而言，无法彻底排除在生产阶段中非常偶然地发生微生物污染这一可能性。
  - ◆ 综合上述两点可以推断，无菌工艺药品×××（批号：×××1）无菌风险相对较高。

-27-

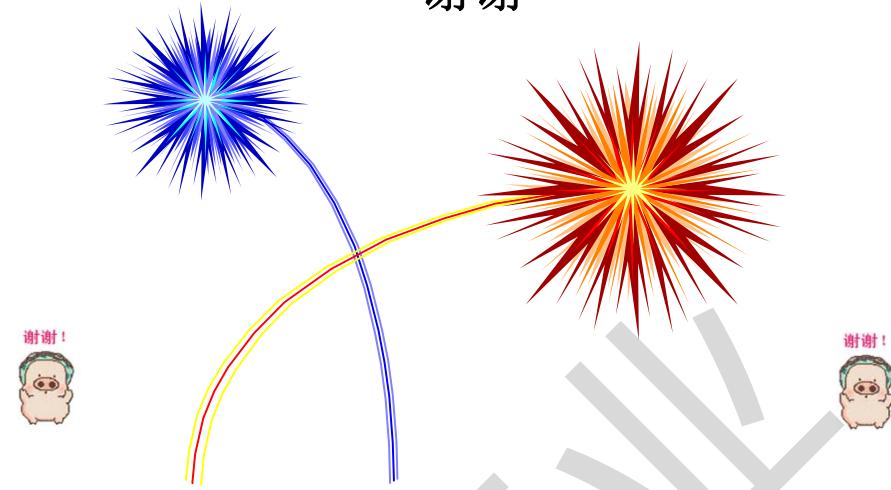
## 无菌检查试验阳性结果调查示例

### ➤ 产品无菌风险评估

- 最终灭菌工艺药品
  - ◆ 根据污染菌来源分析可知，最终灭菌工艺药品××××（批号：××××2）无菌风险很低。应予以复检。

-28-

谢谢



-29-

# 对干热去热原若干问题探讨

-- PDA TR No.3 报告-2013要点

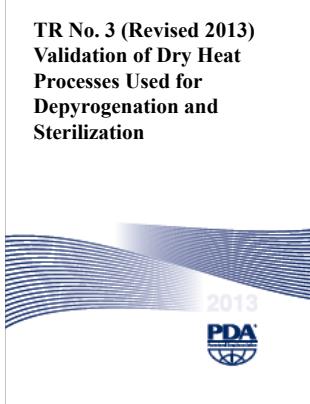
潘友文

2015年10月 上海

## 内 容 提 要

- 干热灭菌及去热原机理
- 干热灭菌与去热原等效时间计算公式之间的差别
- 热力去热原的二级反应动力学简介
- 不同z值用于去热原计算公式的由来
- 相关国内外法规、行业协会对干热灭菌去热原的要求
- 干热灭菌去热原工艺程序开发、验证及日常监控
- 小结

## PDA TR No.3 2013-要点



- **TR No. 3 (Revised 2013)**
- **注射剂协会技术报告  
No.3 (2013年修订)**
- **报告名称：干热灭菌和  
去热原工艺的验证**

## 术语 (PDA TR No. 3, 2013修订)

- **灭菌 (Sterilization)**
  - 能使物品内的微生物含量下降到指定水平 (通常PNSU  $\leq 10^{-6}$ ) 的工艺。
- **去热原 (Depyrogenation)**
  - 指将细菌内毒素破坏和/或去除。去热原的工艺应当能够证明细菌内毒素至少下降3个lg单位或99.9%。
- **F-值**
  - $F_H$ : 用于灭菌效果计算。计算特定参照温度  $T_{参照}=160\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $z=20\text{ }^{\circ}\text{C}$  下等效灭菌时间 (分钟)。
  - 当  $F$  用于去热原效果时,  $T_{参照}= 250\text{ }^{\circ}\text{C}$ ,  $z$  值最低取46.4 $\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

## 干热灭菌及去热原机理及特点

- 干热灭菌中，微生物灭活的机理主要是氧化。
- 与湿热灭菌的差异：干热的穿透性差，温度不均；随着热空气将水分逐渐带走，被灭菌物品及微生物失水，从而导致灭菌率发生相应的变化，最终使微生物的灭活曲线偏离线性。
- 提高干热空气温度，延长加热时间，可以氧化和分解微生物细胞壁上的脂多糖等热源物质，达到去热原的目的。

## PDA TR No.3 干热灭菌的 $F_H$

- 用于 $F_H$ 计算的参照温度通常设定在160°C，z值设为20°C

$$F_H = \int_{T1}^{T2} 10^{\frac{T-160}{20}} dt$$

- 干热灭菌应确保装载的污染率不超过百万分之一（PNSU）；过度杀灭工艺的灭菌效果应能使耐热孢子下降值 $\geq 12$ 个log单位。
- 挑战用BI：深棕色芽孢杆菌孢子 (*B. atropphaeus*)
- 此公式与ISO 20857:2010中的干热灭菌公式相同。但USP采用170°C为参照温度。

### PDA TR No.3 干热去热原的F值

- 物理F值根据温度-时间按下式计算，参照温度 $T_R$ 为250°C，z至少取46.4 °C；
$$F = \int_{t1}^{t2} 10^{\frac{(T-250)}{46.4}} dt$$
- 接受标准：细菌内毒素下降 $\geq 3 \log$ 单位。
- 由于去热原工艺能使孢子的对数下降值超过 $10^{100}$ ，因此，当达到去热原要求时，不需要再作芽孢的挑战试验（意：去热原涵盖了灭菌）。
- Z值有时取46.4 °C，有时取54 °C或50°C。

### 内毒素被热力灭活的二相性 (二级反应动力学)

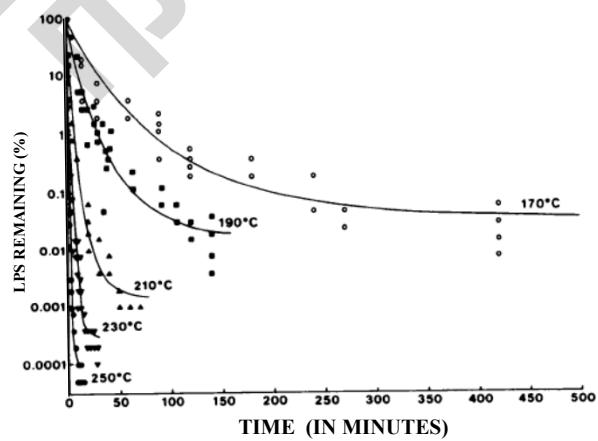
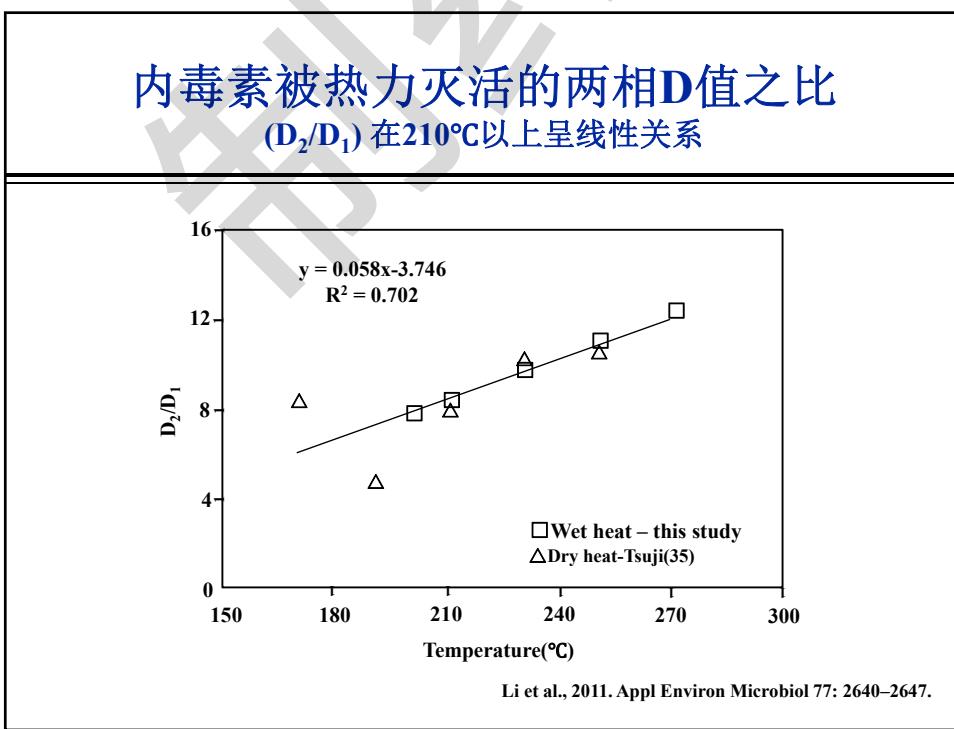
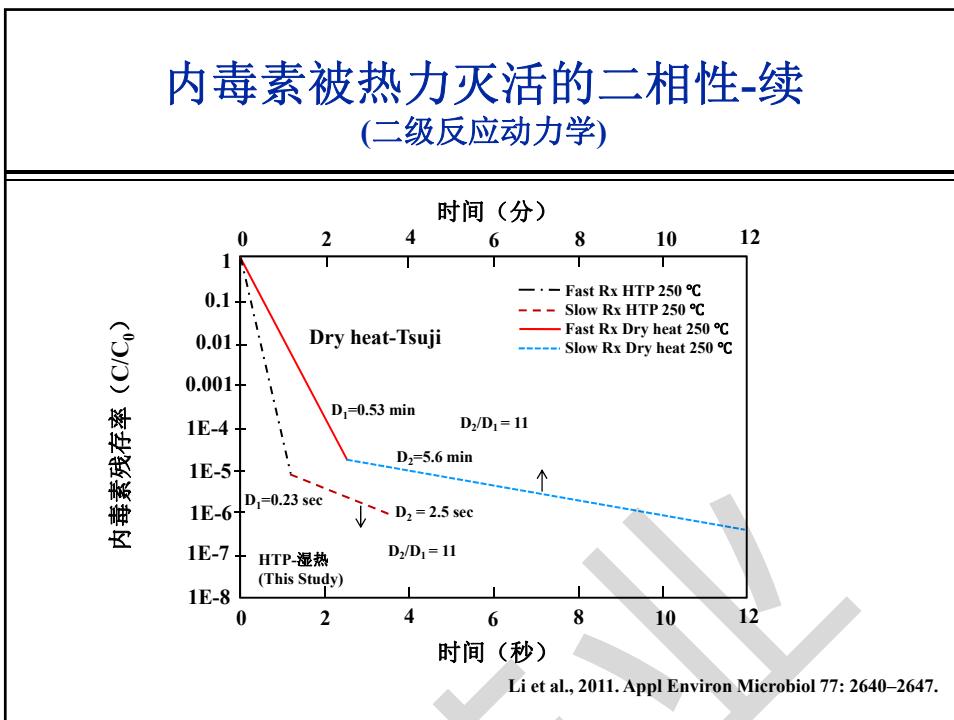


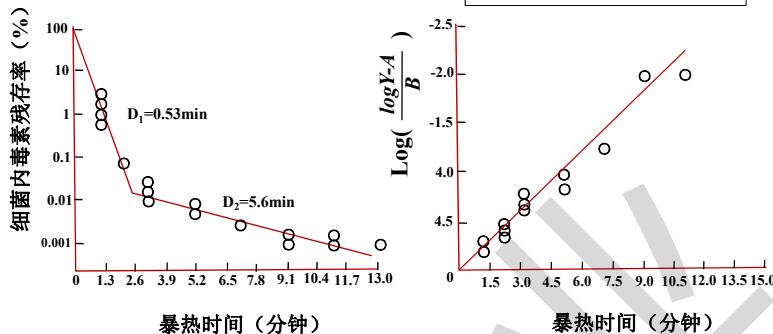
FIG. 1. Dry-heat destruction curves of LPS from *E. coli*. Tsuji, K., and S. Harrison. 1978. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:710-714.



## 热力去热原的二级反应动力学

大肠杆菌内毒素在250 °C干热下的残存率与时间之间的关系：

$$\log Y = A + B \cdot 10^{Cx}$$



Tsuji, K., and S. Harrison. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:710–714.

## 热力去热原的二级反应动力学

大肠杆菌内毒素在250 °C干热下的残存率与时间的关系。

$$\log Y = A + B \cdot 10^{Cx}$$

在一定温度下, A、B 和 C 为常数  
 $D_3 = 1/C$

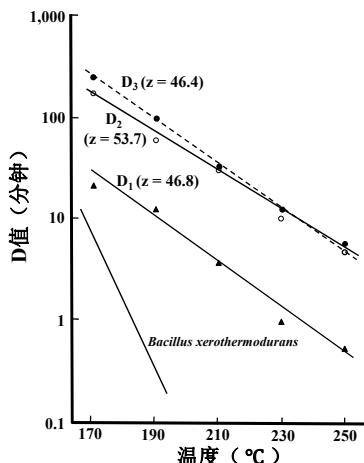
Table 3. List of parameters for linearization of the  
 Dry-heat destruction curves of LPS from E.coli

Temp °C)	A	B	C	D <sup>a</sup>
170	-1.532	3.383	-0.003981	251.2
190	-1.814	3.740	-0.01006	99.4
210	-2.839	4.770	-0.03000	33.3
230	-3.553	5.486	-0.0816	12.3
250	-4.068	6.051	-0.2002	4.99

<sup>a</sup>  $Z_3 = 46.4^\circ\text{C}$ .

Tsuji, K., and S. Harrison. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:710–714.

## 去热原计算公式中z值的由来



D值	z值 (°C)
D <sub>1</sub>	46.8
D <sub>2</sub>	53.7
D <sub>3</sub>	46.4

D<sub>1</sub>和D<sub>2</sub>来自一级反应动力学；

D<sub>3</sub>来自二级反应动力学公式

$$\log Y = A + B \cdot 10^{Cx}, D_3 = 1/C$$

Tsuji, K., and S. Harrison. 1978. Appl. Environ. Microbiol. 36:710-714.

## 相关医药法规/标准对去热原的要求

- 中国GMP-2010修订，附录一，第七十二条（二）干热灭菌用于去除热原时，验证应当包括细菌内毒素挑战试验
- FDA 无菌产品生产指南（2004），VI章B节中要求：
  - 将已知量的细菌内毒素对容器和胶塞布样，在去热原处理后，再测定细菌内毒素的下降值...此挑战性试验通常要将配好的细菌内毒素溶液直接加到被测试表面，然后让其在空气中凉干...。验证资料应能证明所用程序能使内毒素污染水平下降三个对数单位。
- 欧盟GMP附录一，69条 当干热灭菌用于去除热原时，验证应包括内毒素挑战试验。
- ISO 20857:2010 要求验证干热去热原程序使标准内毒素至少下降三个log单位。

## 药典干热灭菌/去热原要求

药典	灭菌	去热原
中国药典 2010年版	160~170°C × 120 min 以上 170~180°C × 60 min 以上	250°C × 45 min
美国药典 USP38	<1229.8> 160~190°C × ? Min $F_H = \int_{t_1}^{t_2} 10^{\left(\frac{T-170}{20}\right)} dt = \sum_{t_1}^{t_2} 10^{\left(\frac{T-170}{20}\right)} \Delta t$	<1211> 250 ± 15°C × ? min
欧洲药典 EP8.2 5.1.1, 5.1.2	≥ 160°C × 120 min;	≥ 220°C × ? min
日本药局方 JP16	(160~170°C) × 120 min、 (170~180 °C) × 60 min、 (180~190°C) × 30 min	?

## 中国制药机械行业标准

- **JB 20002.3 -2004 安瓿隧道式灭菌干燥机**
  - 4.3 安瓿通过灭菌隧道的温度应不低于300°C，时间不少于4 min。
- **JB 20007.3 – 2004 口服液瓶灌装灌装联动线隧道式灭菌干燥机**
  - 4.6.1 箱内灭菌区温度应不低于300°C
  - 4.6.2 瓶子在高温灭菌区停留不少于 5 min
- **JB/T 20093-2007 抗生素瓶表冷式隧道灭菌干燥机**
  - 5.5.3 ...高温灭菌区加热温度范围为室温至350°C
  - 5.5.4 灭菌性能 a) 空载热分布温差为±15°C; b) 热穿透性 (腔体冷点)  $F_H \geq 1365\text{min}$ .

## 中国制药机械行业标准中 $F_H$ 的由来

- **JB/T 20093-2007 要求 $F_H \geq 1365$ 分钟**
  - 中国药典提到“干热灭菌用于去热原 $250^{\circ}\text{C} \times 45$ 分以上...”，按以下公式计算

$$F_H = \int_{t1}^{t2} 10^{\frac{(T-T_R)}{z}} dt$$

- $T_R$ 取 $170^{\circ}\text{C}$ ,  $z$ 取 $54^{\circ}\text{C}$ 计算, 得 $F_H 1363.62$ 分钟, 取整数 $1365$ 分钟为制药设备的行业标准。
  - » 将灭菌和去热原公式中的参照温度和 $z$ 值混用
  - » 设备性能没必要规定 $F$ 值要求

## $F$ 值在评价干热灭菌/去热原 工艺程序的应用

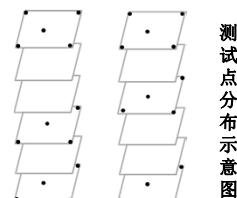
- $F$ 值并不是用做干热灭菌/去热原的标准
- $F$ 值只是用来评价整个装载(或隧道)内各部位的热穿透分布状况, 与去热原效果没有直接的对应关系。因此,  $F$ 值的大小是相对的。在验证时, 只有找到 $F_{\text{物理}}$ 值与 $F_{\text{生物}}$ 值之间的对应关系时, 才能用它来评价特定工艺的灭菌或去热原效果。
- 现国外引进的连续式干热灭菌器, 在使用说明书中要求: 去热原 $F$ 值计算中 $z$ 至少取 $46.4^{\circ}\text{C}$ , 国产设备 $z$ 取 $54^{\circ}\text{C}$ 。因此,  $F_{\text{物理}}$ 值在不同设备上会因 $z$ 值不同而相差很大。

## 干热灭菌去热原程序运行参数

- **关键参数**
  - 温度、暴热时间（传送带速度）
- **重要参数**
  - 升温、保温和降温阶段的时间和温度
  - 各区域间的压差、风速等
- **程序参数的设计、评价和验证原则标准**
  - 灭菌程序确保被灭菌品的无菌保证PNSU $\leq 10^{-6}$
  - 去热原程序能使标准细菌内毒素下降3个对数单位
  - 确保在最差运行条件下，程序参数满足上述标准

## 柜式分批工艺程序的开发与评价

- **建立装载方式**
  - 找出最差装载状态，在此基础上设立程序参数以保证在任何装载方式下程序运行达到无菌或去热原要求
- **装载状态下的温度分布试验**
  - 每个探测点的最大允许温度变化
  - 不同位点间最大允许温度变化
  - 设定温度和实测温度之间的最大允许差异
- **装载状态下的热穿透试验**
  - 探头放置：分布均衡、冷点、物品内部并与物品直接接触
  - 计算各探头的F值确定装载内是否存在冷点
  - 同时进行生物指示剂或标准内毒素测试



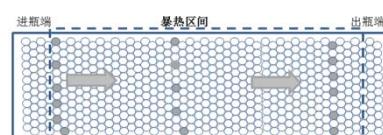
## 隧道连续工艺程序的开发与评价

- **建立装载方式**

- 找出最差装载状态，在此基础上设立程序参数以保证在任何装载方式下程序运行达到无菌或去热原要求
  - 选用单位面积质量最大的容器、最快传输速度、隧道的最快装载方式

- **装载状态下的温度分布试验**

- 每个探测点的最高和最低温度
  - 不同位点间的温度差异
  - 设定温度和实测温度之间的差异

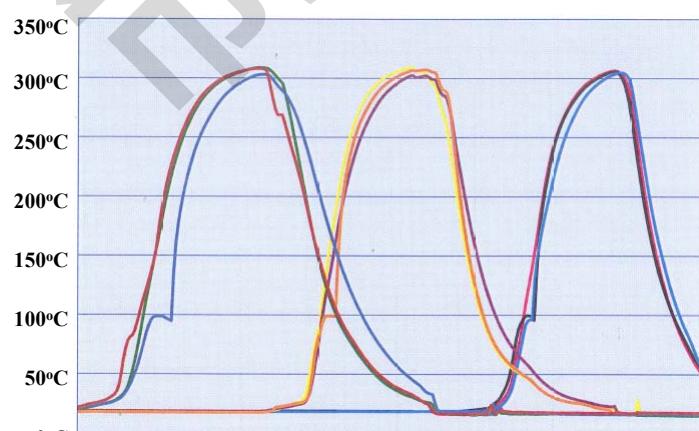


测试点分布示意图

- **装载状态下的热穿透试验（三次）**

- 探头放置：分布均衡、冷点、物品内部并与物品直接接触
  - 计算各探头的F值确定装载内是否存在冷点、稳定性和重现性
  - 同时进行标准内毒素测试

## 西林瓶在隧道连续工艺内的热穿透图谱



## 去热原的挑战试验



- 将细菌内毒素接入冷点的瓶中，凉干，去热原程序完成后测试。
- 温度分布要用插入西林瓶中的探头测定，以获得物理数据
- 将物理数据与去热原的结果比较。

## 洁净级别的设置情况

隧道灭菌器中级别的描述				
洗瓶 上瓶间	干燥预热 级别 C	加热段 级别: A	冷却段 级别: A	无菌操作区
级别 C 或 D				进瓶A级

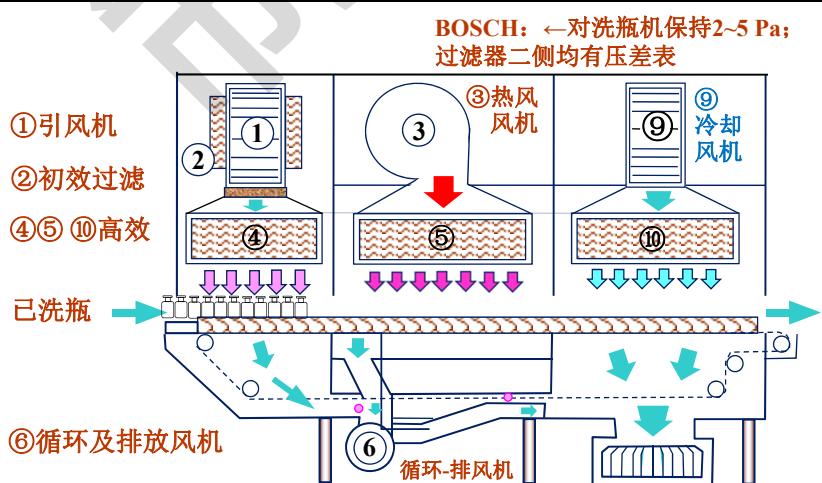
- 瓶子进入干燥/预热段时，洗瓶不可能达到无菌的要求，因此，这里是C级。
- 换言之，用质量风险管理的理念去理解
- 预热段是一个过渡区，尽管这里有A级送风，但不可能有动态100级的要求。

## 压差设定的原则要求

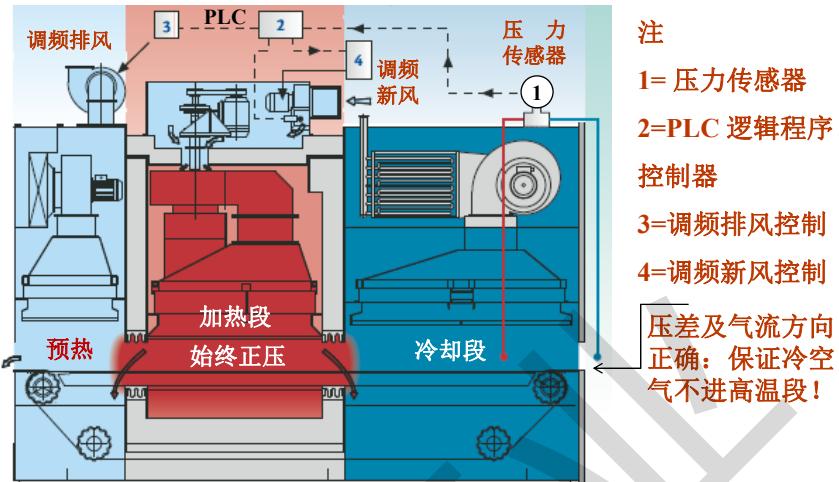


- 压差的设定和控制
- 最关键的是，不要让冷空气进入灭菌/去热原区域，影响灭菌去热原效果。
- 无菌区的垂帘内空气虽是100级，如对洗瓶间的压差太大，会影响灭菌去热原的效果。

## 隧道灭菌器压差设定



## 隧道各段压差及控制手段



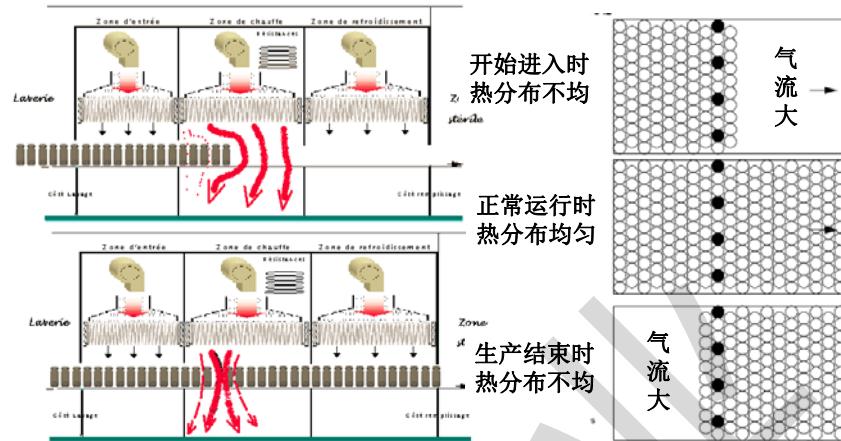
## 隧道灭菌器运行可能的情况

	Infeed-进瓶段	Hot zone 加热	Cooling zone 冷却	Aseptic area 无菌区
A	+	++++	+++	++
B	+	+++	++	+++
C	+	+++	++	++

- 在变频控制器(4)保持新风量不变时, 当压力传感器(1)测得偏离设定值时, 逻辑程序管理器(2)自动通过变频控制器(3)提高或降低排风量。
- 依靠这一系统, 冷却段在对无菌操作区正压下运行 (A) ; 或在负压下运行 (B) 或在同一压力 (无压差, C) 运行, 避免冷空气进入灭菌区是控制的关键! !

## 验证应考虑装载对热分布的影响

接种细菌内毒素的瓶，应包括右侧三种情况



## TR No.3 日常监控要求

- 应制订、实施并有去热原工艺 日常监控的书面规程，保证工艺的受控状态。每次干热灭菌去热原，应检查、审核关键参数，有记录并将记录归入批档案。
- 关键参数不符合要求时，须调查并采取措施
- 关键参数包括但不限于：
  - 灭菌温度（日常监控不计算 $F_H$ ）
  - 压差（冷却段与无菌区，隧道内部、B对D级区）
  - 传送带速度。应根据设备情况，通过QRM确定。

## 小结

- 干热去热原国际公认的标准是使内毒素下降3个对数单位，无  $F_H \geq 1365$  分钟的提法。
- 去热原  $F$  值的计算会因  $z$  值（46.4 - 54 °C）不同而相差很大， $F$  值仅限于评价同一设备内的热分布状况，不能用它作为去热原效果的标准。
- 认为 250 °C 以上才能去热原，是一个误区。
- 口服剂生产用的隧道灭菌器，无去热原要求。
- 按风险管理，验证及关键参数的控制至关重要。

## 参考资料-1

- 中国药典2010 版，附录 XI 灭菌法
- JB/T 20093-2007 抗生素瓶表冷式隧道灭菌干燥机，中华人民共和国制药机械行业标准，国家发展和改革委员会发布，2007年9月1号实施。
- JB 20002.3 -2004 安瓿隧道式灭菌干燥机，中华人民共和国制药机械行业标准，国家发展和改革委员会发布，2004年6月1号实施
- JB 20007.3 – 2004 口服液瓶灌装灌装联动线隧道式灭菌干燥机，中华人民共和国制药机械行业标准，国家发展和改革委员会发布，2004年6月1号实施。
- PDA Technical Report No. 3 (revised 2013). Validation of Dry Heat Processes Used for Depyrogenation and Sterilization. Parenteral Drug Association. 2013.

## 参考资料-2

- *ISO 20857:2010. Sterilization of health care products — Dry heat — Requirements for the development, validation and routine control of a sterilization process for medical devices.*
- *USP 38 <1229.8> DRY HEAT STERILIZATION. 2014.*
- *欧洲药典 EP 8.2 5.1.1 Methods of preparation of sterile products. 2014*
- *日本药典 第16版 General Information/microorganisms. Methods of preparation of sterile products. 2011.*
- *FDA, 2004. Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing — Current Good Manufacturing Practice.*
- *Tsuji, K., and S. Harrison. 1978. Dry-heat destruction of liposaccharide: dry-heat destruction kinetics. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:710–714.*
- *Li L, Wilbur CL, Mintz KL 2011. Kinetics of hydrothermal inactivation of endotoxins. *Appl Environ Microbiol* 77: 2640–2647.*

# 生物制品原料药生产的微生物 污染控制

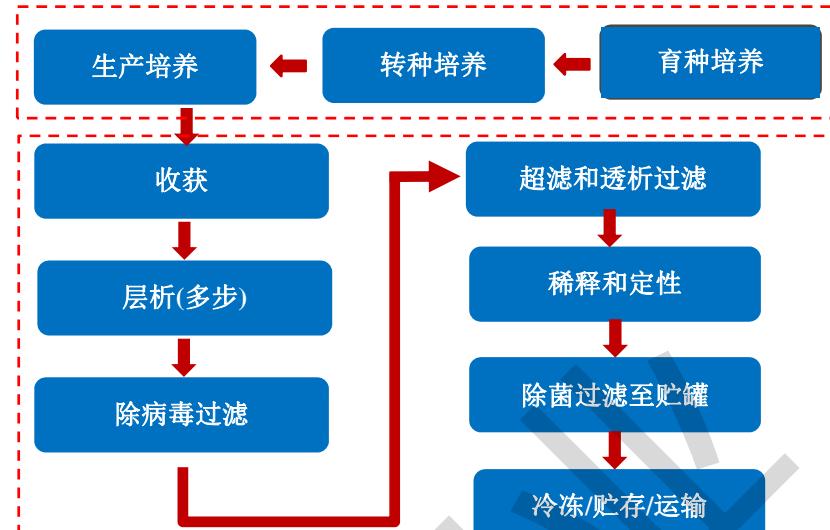
潘友文

2015年10月上海

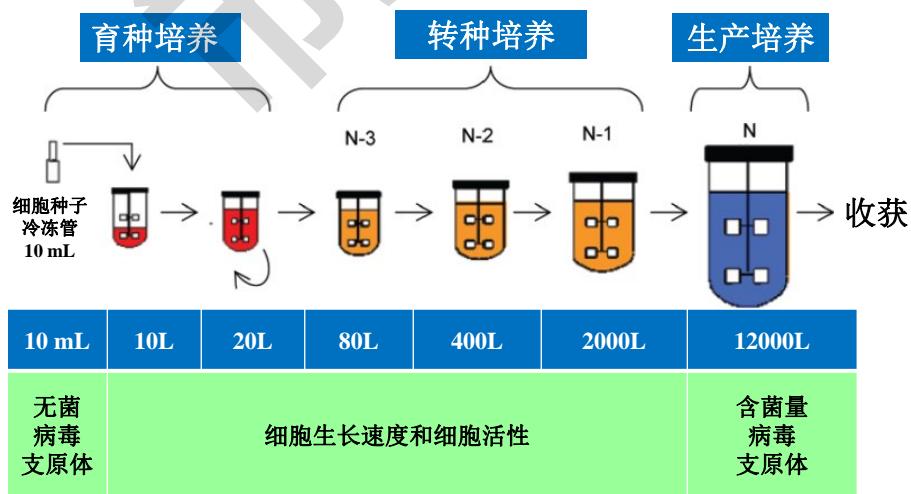
## 提 纲

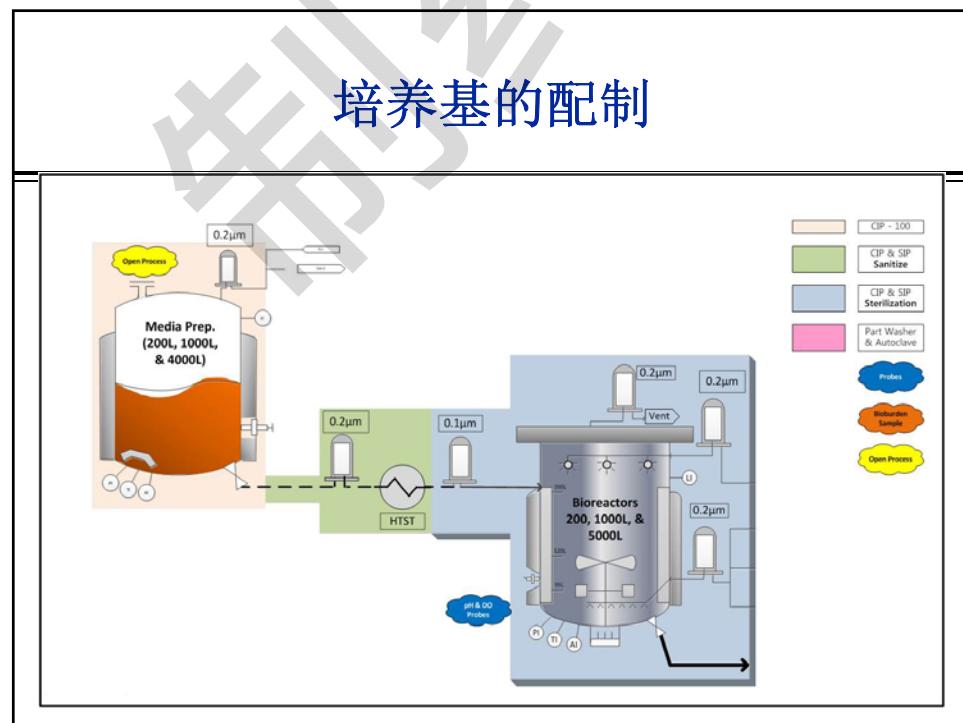
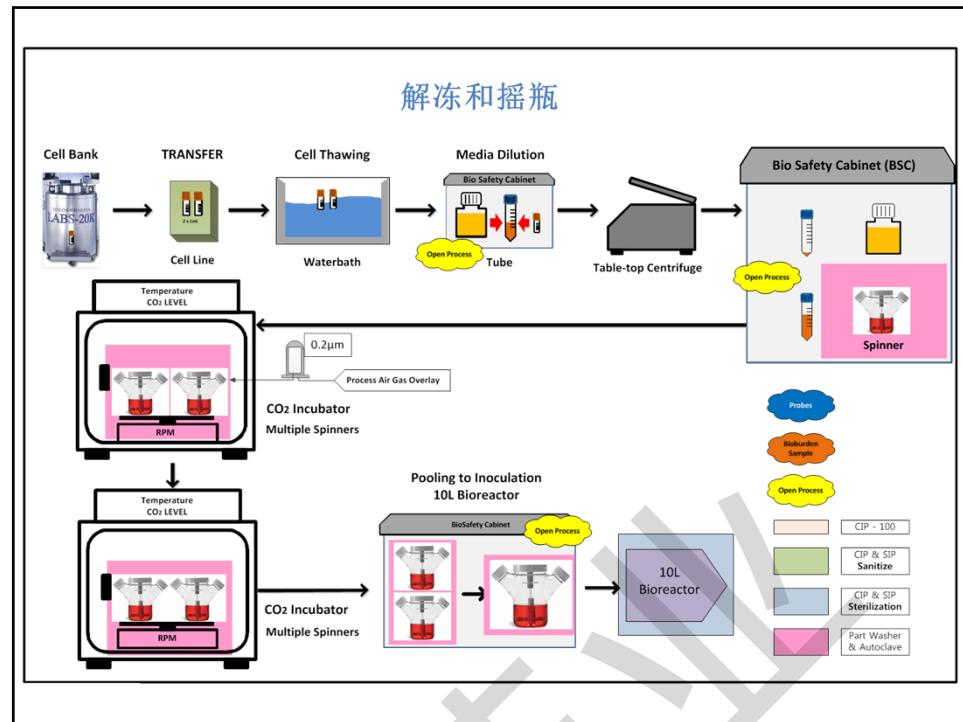
- CHO细胞生产工艺流程
- 微生物污染控制策略
- 微生物污染风险评估
- 微生物污染的监控措施
- 出现超标结果后的调查及产品质量评价

## 由CHO细胞表达的生物原料生产流程

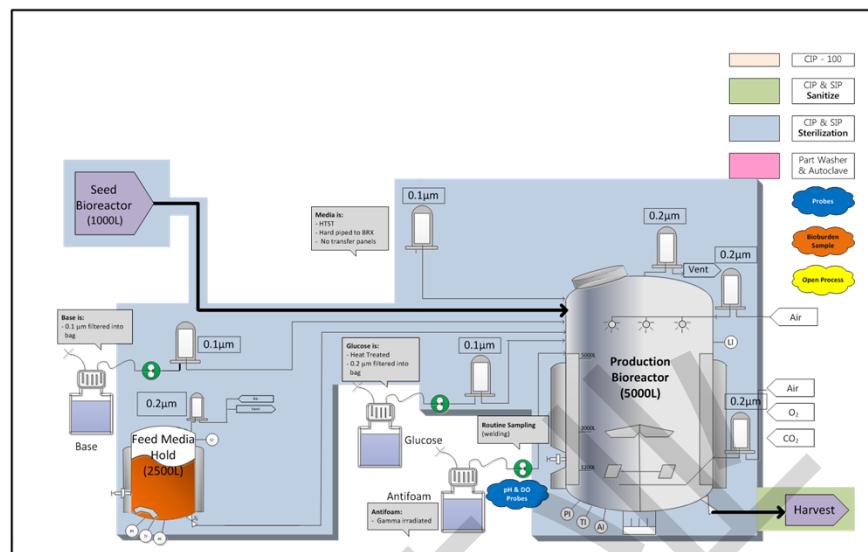


## 细胞培养流程及微生物检测

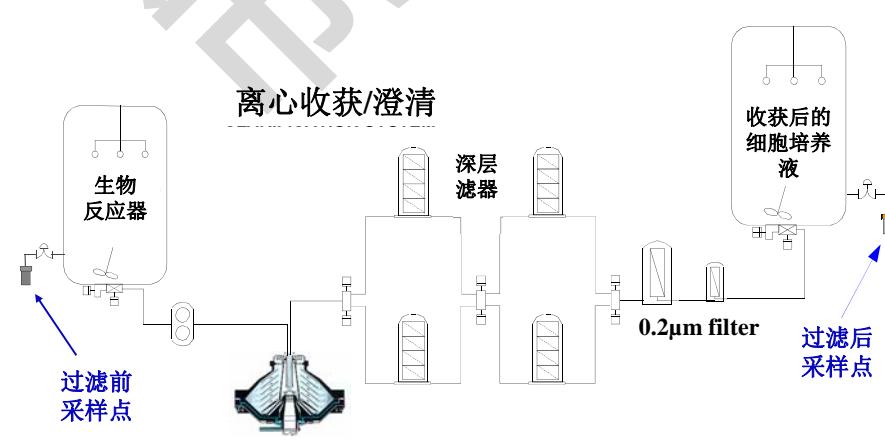




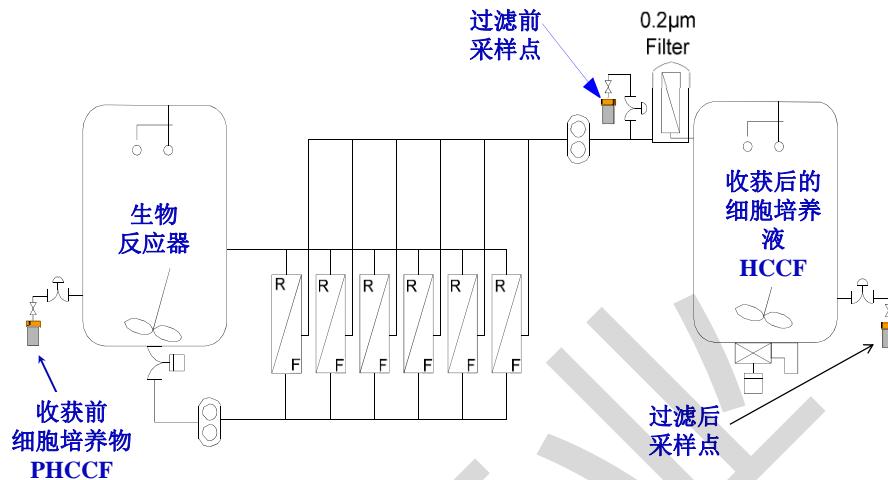
## 生产培养



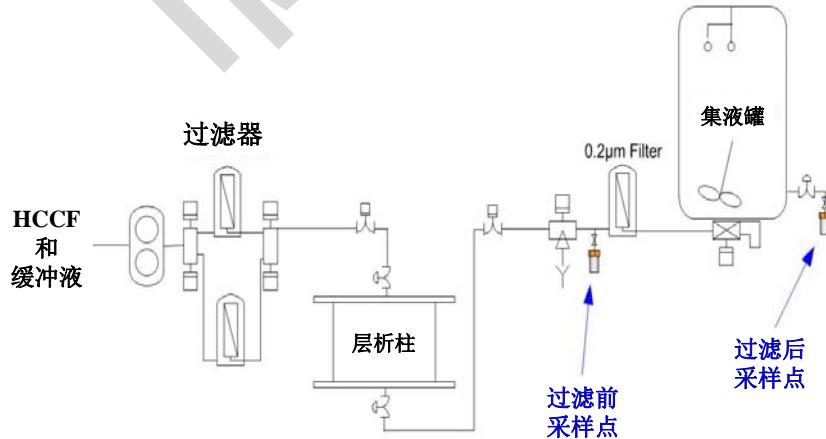
## 收获: 离心和粗滤



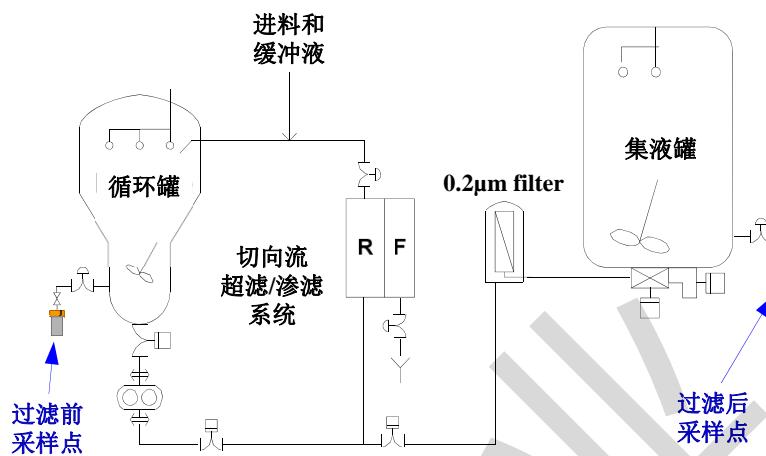
## 收获: 切向流过滤 (TTF)



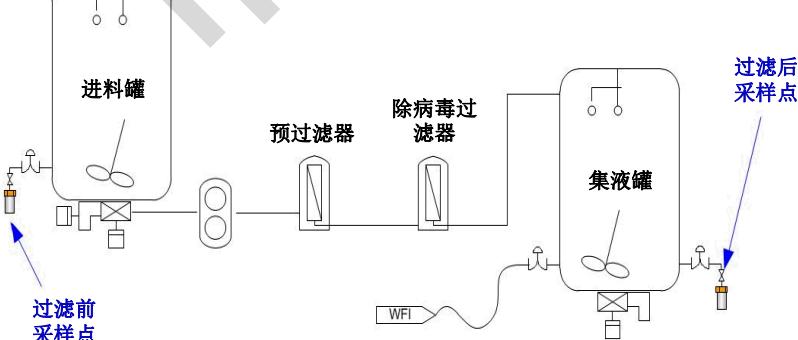
## 层析 (多步)



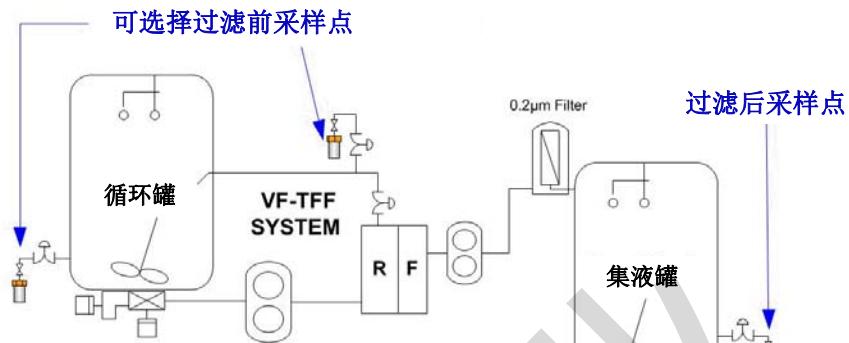
## 超滤/渗滤



## 除病毒过滤(常规流)



## 除病毒过滤（切向流）



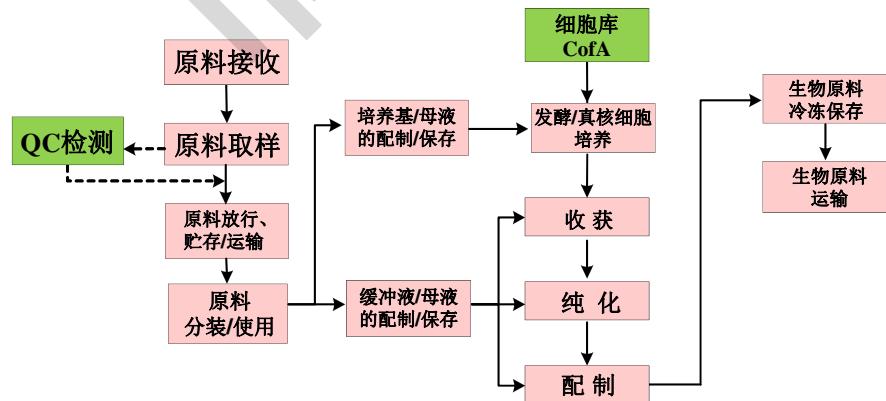
## 微生物控制策略

- 生产系统的清洁、消毒/灭菌
- 封闭管路系统
- 控制性生产环境
- 微生物和内毒素检测
  - 两级监控
    - » 警戒限度/纠偏限度
    - » 纠偏限度/合格标准
- 风险管理
  - 风险评估

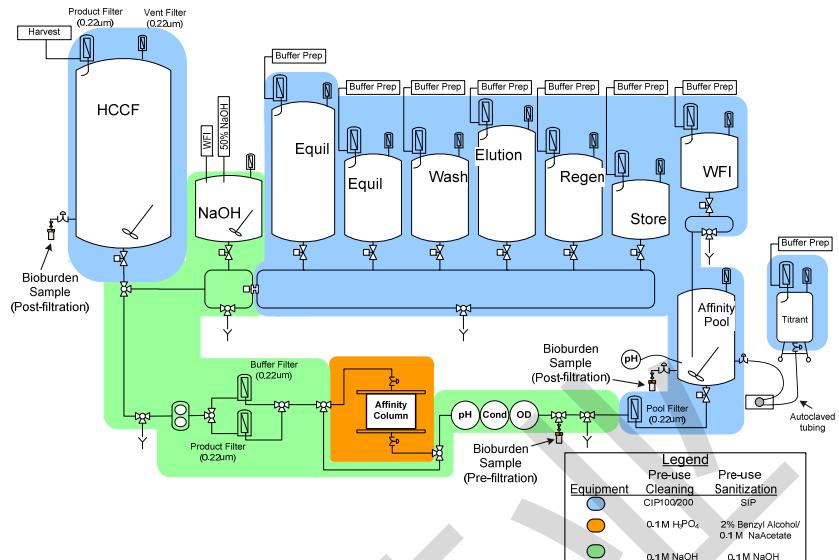
## 风险评估-续

- 生产设施的设计（人流、物流和废物流）
- 设备（清洁消毒设计、组装、清洁、消毒规程）
- 工艺（开放还是封闭、微生物促生长条件评估、贮存时间评估）
- 物料（原料、重复用树脂和渗透膜的保存）
- 公用系统（空调、环境监控、水系统、气体系统等）
- 工作人员（进出、卫生和更衣规范）

## 生物制品原料生产微生物污染控制 风险评估范围



## 准确/详细的工艺流程图



## 风险评估的实施

1. 列出每个工艺单元的各关键操作步骤的微生物污染风险点:
  - 如设备的准备、柱子的填充、层析操作、树脂的再生、消毒、防腐剂、存贮条件等
2. 确定每个操作步骤是否符合封闭工艺系统的要求
  - 封闭工艺是指一个系统在运行过程中既能够防止内容物跑出也能阻止外围环境中的微生物进入系统内。即系统内的生产物料与周围环境没有直接接触
3. 列出每个风险点的潜在污染源
  - 环境、人员、设备和运行条件等

## 风险评估的实施

4. 分析现行污染控制措施是否能有效降低和消除风险（阻止微生物侵入、抑制微生物繁殖生长）
  - 如发现有风险，提出降低风险的措施及理由
  - 如没有风险，分析并给出支持结论的理由
  - 既使没有风险，也要提出预防性的持续改进措施
5. 根据风险的大小确定每个生产单元/设备是否需要监控微生物污染状况

## 风险评估的实施

6. 监控微生物污染的关键要点
  - 取样点/时间的确定
    - 除菌过滤器的前、后点
    - 生产/贮存的终点
    - 工艺条件（极端pH、试剂、除病毒、系统的洁净状况）
  - 检测量/检测方法的确定（检测方法需经过验证）
  - 样品的储存条件
  - 警戒水平和纠偏水平的设定

CONFIDENTIAL

## 生产中间体贮存条件的评估与验证

- 可采用有促微生物生长特性的液体来替代生产系统的中间体进行贮存条件的评估与验证
- 通过试验证明替代品溶液的促微生物生长能力至少与生产中间体相当
- 尽可能模拟生产过程中会出现的所有环节和步骤（最差可能生产条件，如管路连接操作、添料操作、以及循环操作等）
- 通过三次实际模拟试验，每次的含菌量检查结果和内毒素检测结果均在警戒限度这内。

## 警戒水平、纠偏水平和接受标准

- 警戒水平：设定一具体的警示性量值，超过时，表明相关系统有偏离正常运行状态的潜在风险。通常不需要采取纠偏措施，但需要进行适当调查。
- 纠偏水平：设定一内控生物负荷指标，超过时，表明相关系统已偏离正常运行状态。需要调查原因、评估对产品质量的影响程度、并采取相关纠偏措施。
- 合格/接受标准：产品或关键物料必须达到的生物负荷指标。超标结果一旦被确认后，相关产品或物料将不得被放行或报废。

## 警戒/纠偏/合格水平的设定原则

- 生物负荷对产品质量或生产工艺的重要程度
  - 关键: 纠偏限度和合格水平（或可接受标准）
  - 重要: 警戒水平和纠偏水平
- 工艺对微生物污染的控制能力
  - 控制能力越强, 生物负荷的预期值越低
- 工艺步骤的次序
  - 越接近最终生产步骤, 生物负荷的预期值越低
- 检测方法的有效测定范围
  - 取决于取样量、检验量和检验方法的选择与使用

## 警戒水平的设定方法

- 依据具体的产品和生产工艺而定, 并且能体现工艺对微生物污染的控制能力。
- 收集至少30个数据点（不包括异常值）, 按从小到大排列, 取位于95%的高位数据点为警戒水平。
- 新的工艺或系统可根据制药行业的通行做法设定暂定警戒水平。
  - 建议水平
    - » 除菌过滤前: > 10 CFU/10 mL
    - » 除菌过滤后: > 5 CFU/10 mL

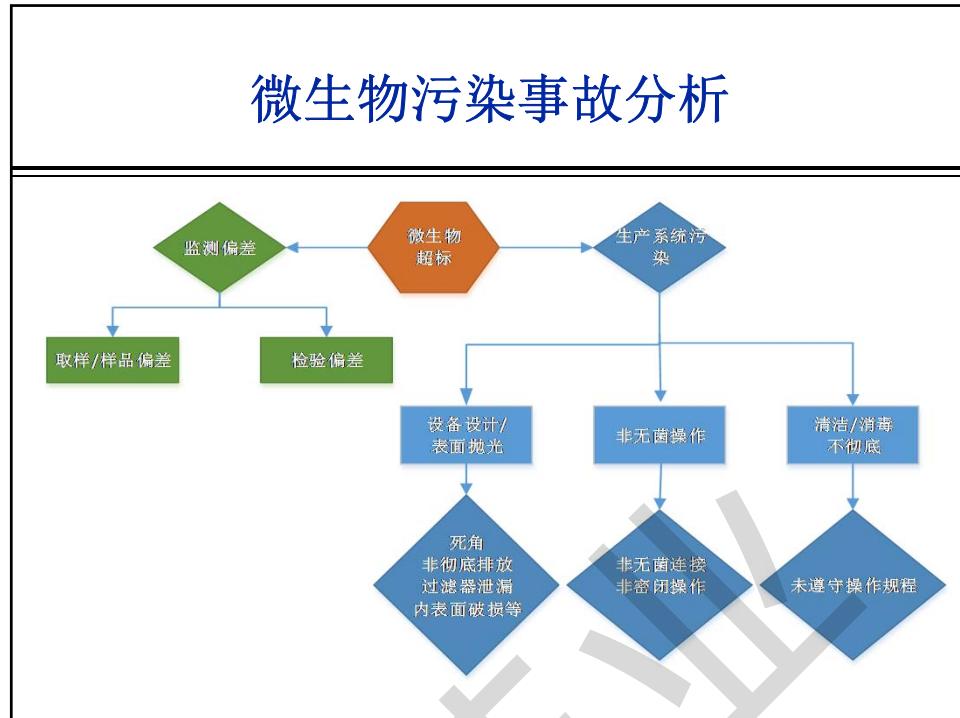
## 纠偏水平的设定方法

- 依据具体的产品和生产工艺而定，并且能体现工艺对微生物污染的控制能力。
- 常规：收集至少30个数据点（不包括异常值），按从小到大排列，取位于95%的高位数据点的10倍。
- 还需考虑的因素：工艺条件/能力、步骤次序、上下游限度、法规要求
- 建议水平
  - 除菌过滤前：> 100 CFU/10 mL
  - 除菌过滤后：> 10 CFU/10 mL

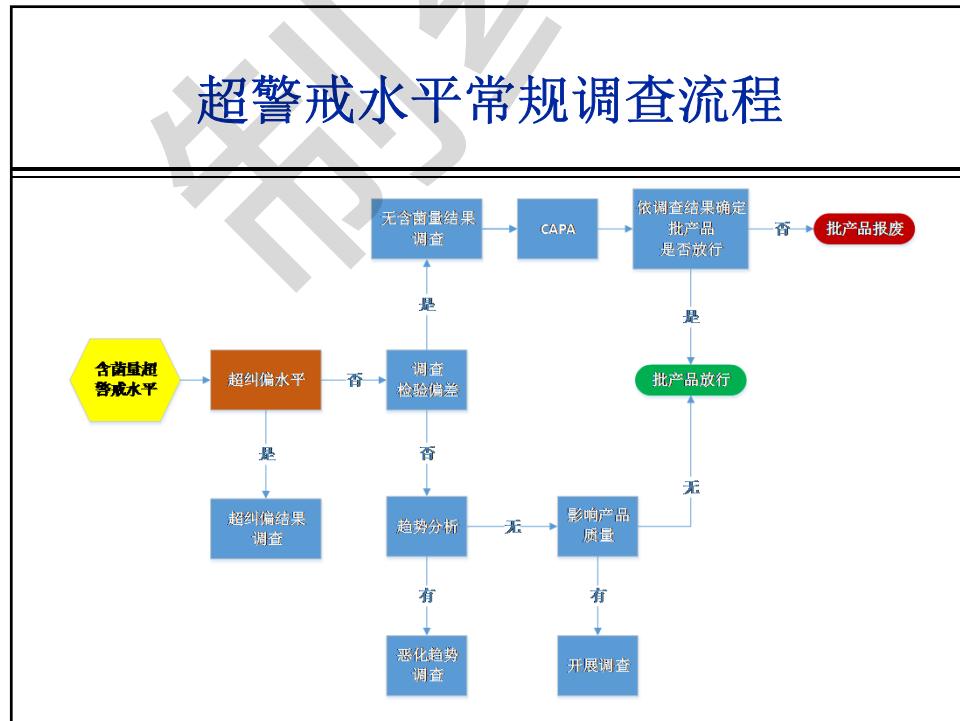
## 合格水平/可接受标准的设定原则

- 仅适用于关键工艺步骤，例如：
  - 收获期的细胞培养液(PHCCF)
  - 最终生物原料(DS)
- 一旦超标，须进行调查(调查方法如同超纠偏水平)。结果确认后，相关物料不得被放行。

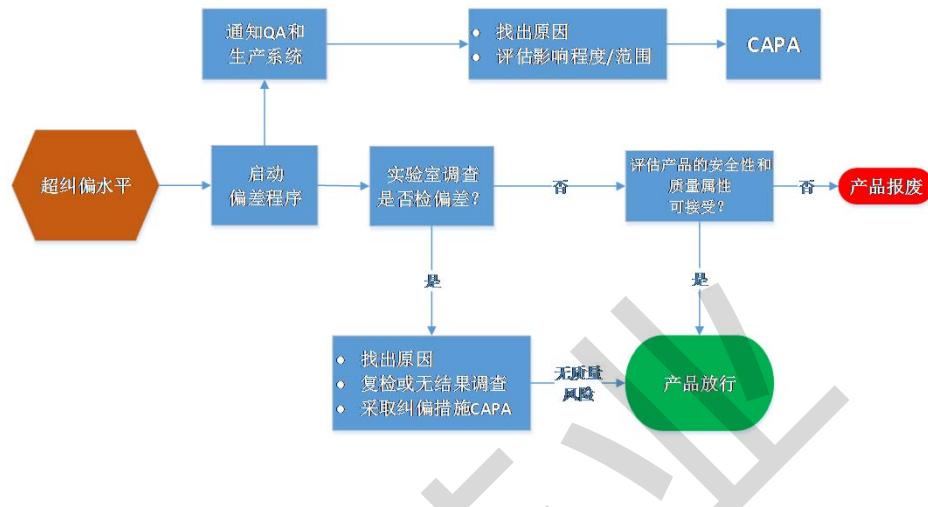
## 微生物污染事故分析



## 超警戒水平常规调查流程



## 超纠偏水平常规调查流程



## 含菌量超标相关批产品的评价

- 病人的安全风险评估
  - 考虑最差状况
  - 评估关键安全因子
    - » 细胞外毒素（蛋白类、非蛋白类毒素）、DNA、鞭毛蛋白和肽聚糖等
- 产品质量属性评估
  - 评价检验结果是否符合质量标准
  - 评价化学指标与其它批次的化学指标是否类似
  - 稳定性考察（加速试验）

## 参考资料

- **US FDA. 1997. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use.**
- **ICH Q5D. 1997. Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products.**
- **PDA TR69. 2015. Bioburden and Biofilm Management in Pharmaceutical Manufacturing Operations.**

## 由细胞系生产的生物制品外源因子的 监控策略及其发展趋势

潘友文

2015年10月 上海

### 提 纲

- 检测目的
- 检测对象
- 检测方法
- 风险评估
- 污染控制
  - 污染源控制
  - 工艺控制



## 为什么要检测外源因子？

- 外源因子（Adventitious Agents）是指存在于接种物、细胞基质及（或）生产制品所用的原材料及制品中的污染物，包括细菌、真菌、支原体和外源性病毒等。
- 检测外源因子具有强制性：主要是支原体和病毒
  - 各国药典：CP, Ph. Eur., USP, JP等等
  - ICH-Documents - Q5A- Q5E-Series: Quality of Biotechnological Products
  - Q7: Good Manufacturing Practice of Guide for Active Pharmaceutical Ingredients
  - CFR – 21 CFR Part 610: General Biological Products Standard
  - 21 CFR Part 864, Subpart C: Cell and Tissue Culture Products
  - 9 CFR Part 147, Subpart A: Blood Testing Procedures
  - 9 CFR 113.300: General Requirements for live virus vaccines
  - Points to Consider (FDA) – Points to Consider in the Characterization of Cell Lines Used to Produce Biologicals

## 生物工艺制品被外源因子污染的后果

- 改变蛋白质、DNA和RNA的合成水平
- 改变宿主细胞的代谢和增殖
- 导致宿主细胞染色体的变异
- 改变细胞形态
- 干扰生化反应
- 影响信号传递
- 导致细胞培养物退化并降低产量
- 抑制或激活淋巴细胞
- 抑制或增强细胞因子（cytokine）的表达



## 生产用细胞被外源因子污染的可能表征

- **细胞代谢活动异常**
  - 氧气消耗异常升高或下降
- **细胞生产繁殖速度可能会下降**
- **产物的产量会下降**



## 病毒污染生物制品的报道汇总

Virus	Cell	Year	Company	Reported by
EHDV	CHO	1988	Bioferon GmbH	Bioferon GmbH
MMV	CHO	1993	Genentech	Genentech
MMV	CHO	1994	Genentech	Genentech
Reovirus	Human Kidney	1999	Abbott	FDA
Reovirus	CHO	?	?	BioReliance
Cache Valley	CHO	1999	Amgen	Amgen
Cache Valley	CHO	2000	?	BioReliance
Vesivirus 2117	CHO	2003	Boehringer Ingelheim	Boehringer Ingelheim
Cache Valley	CHO	2003	?	BioReliance
Cache Valley	CHO	2004	?	BioReliance
Human Adenovirus	HEK 293	?	Eli Lilly	Eli Lilly
MMV	CHO	2006	Amgen	Amgen
Vesivirus	CHO	2008	Genzyme	Belgium Genzyme
Vesivirus	CHO	2008	Genzyme	USA Genzyme
Vesivirus	CHO	2009	Genzyme	USA Genzyme
MMV	CHO	2009	GlaxoSmithKline	GlaxoSmithKline
PCV-1	Vero	2010	GlaxoSmithKline	GlaxoSmithKline
MMV	BHK	2013	FMD Institute	Turkey FMD Institute

## 我国生物制品生产用细胞外源因子污染情况检测

中国药品生物制品检定所细胞所和国家药品安全评价中心

目的：对我国目前生物制品生产用细胞外源因子污染情况进行检测。

方法：按照《中国生物制品规程》2000版规定的细胞外源因子检测方法,对我国生物制品生产用细胞进行细菌、真菌、支原体及一般外源病毒污染检测。

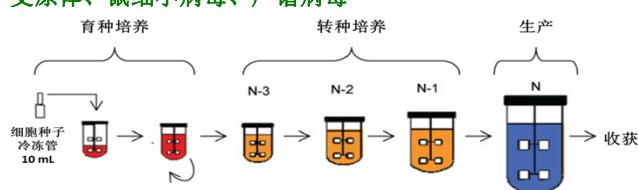
结果：自2003~2006年3月间共检测了用于生物制品生产用细胞库细胞79株。支原体污染细胞10株(12.7%); 外源病毒污染细胞5株(6.3%),这5株外源病毒污染的细胞中, 2株293细胞体外接种至人二倍体细胞后致细胞形态明显异常; 2株Vero细胞接种鸡胚后致鸡胚全部死亡; 1株Vero细胞接种乳鼠及成鼠后第7天, 致接种动物全部死亡, 组织病理学检查结果显示, 接种待检细胞组小鼠脑组织有不同程度的病变。

结论：目前我国生物制品生产用细胞存在一定程度的外源因子污染。

孟淑芳、李修兰、冯建平、林林、郎淑惠、王佑春和李德富。  
中国生物制品学杂志, 2006年06期

## 需要检测外源因子的物料

- 原料 - 血清、胰蛋白酶降解物等由动物或植物制成的原料
  - 牛、猪病毒的筛查
- 主细胞库、工作细胞库
  - 支原体、鼠细小病毒、广谱病毒、和逆转录病毒
- 生产过程的最终阶段收获细胞液
  - 支原体、鼠细小病毒、广谱病毒



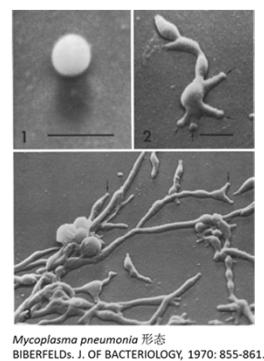
## 需要监控的主要外源因子

- **柔膜细菌(Mollicutes) (USP <63>)**
  - 一类没有细胞壁的细菌
  - 寄生于动植物，生活于宿主细胞内或细胞外。
  - 许多能引起人类疾病，尤其是引起呼吸道疾病的支原体 (Mycoplasma)和泌尿生殖疾病的脲原体 (Ureaplasma )
- **病毒 (USP <1050>)**
  - 反转录病毒和其它内源性病毒
  - 非内源性病毒
  - 根据细胞系确定具体的检测对象
    - » CHO细胞系，要检测鼠细小病毒 MMV (Mice Minute Virus)(ssDNA)

## 支原体的传统/法定检测方法

**任何检测方法都不是万能的**

- **法定方法**
  - 培养基检测法
  - 指示细胞培养检测法
- **PCR法**
  - 一代PCR – 终点PCR
  - 二代PCR – 实时(Real-time) PCR



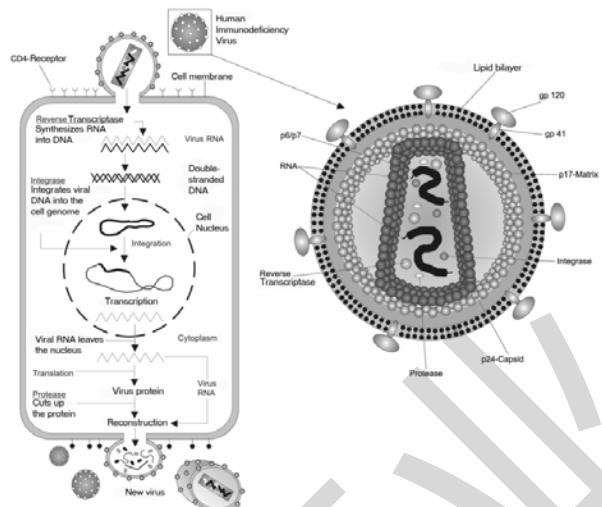
## 支原体的传统/法定检测法USP 《63》

方法	琼脂培养	肉汤和琼脂培养	指示细胞培养
样品检测量	0.4 – 0.8 mL 2-4 x 0.2mL/皿	10 mL 直接接种至100mL	1.0 mL 接种至指示细胞培养液
培养条件	厌氧或微氧； 35-37°C, 14天	拧紧瓶盖； 35-37°C, 21天	35-37°C, 至少6天
培养与检查	每隔7天镜检 (40倍和100倍)	培养第 3, 7, 14, 21天转种至 琼脂；每次 2 x 0.2mL/皿 如琼脂培养法培养和检查。 但是，第21天的转种琼脂只 需培养7天	接种后培养至少3 天后转种，再培养 3-5天后固定、荧 光染色细胞，荧光 显微镜检
总时间	14天	28天	≥ 6天

## 需要监控的主要外源因子

- **柔膜细菌(Mollicutes) (USP <63>)**
  - 一类没有细胞壁的细菌
  - 寄生于动植物，生活于宿主细胞内或细胞外。
  - 许多能引起人类疾病，尤其是引起呼吸道疾病的支原体 (Mycoplasma)和泌尿生殖疾病的脲原体 (Ureaplasma)
- **病毒 (USP <1050>)**
  - 反转录病毒和其它内源性病毒
  - 非内源性病毒
  - 根据细胞系确定具体的检测对象
    - » CHO细胞系，要检测鼠细小病毒 MMV (Mice Minute Virus)(ssDNA)

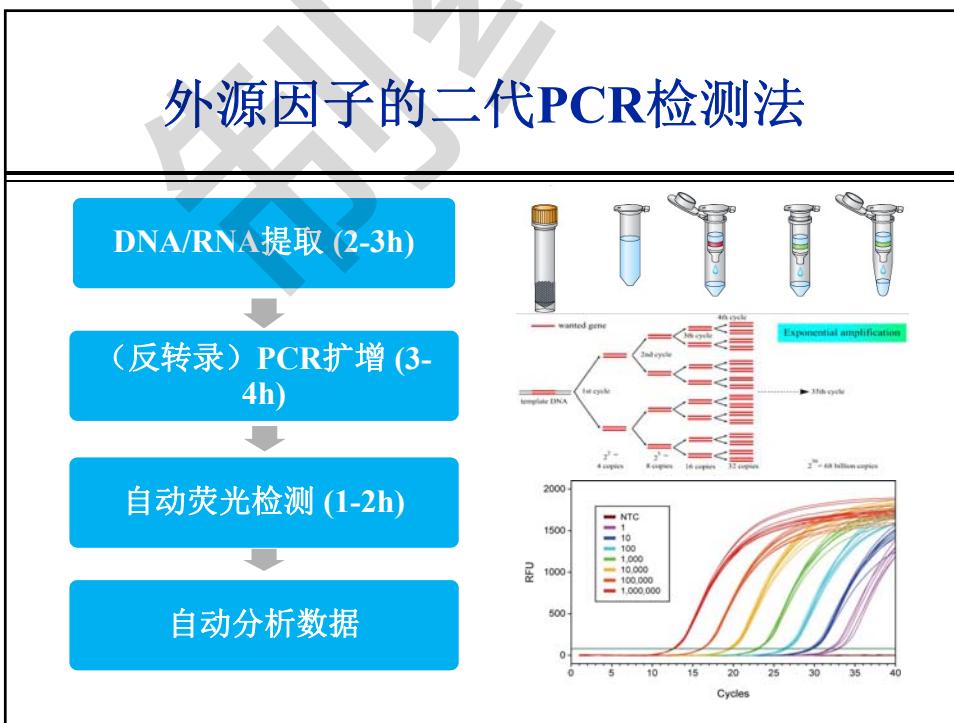
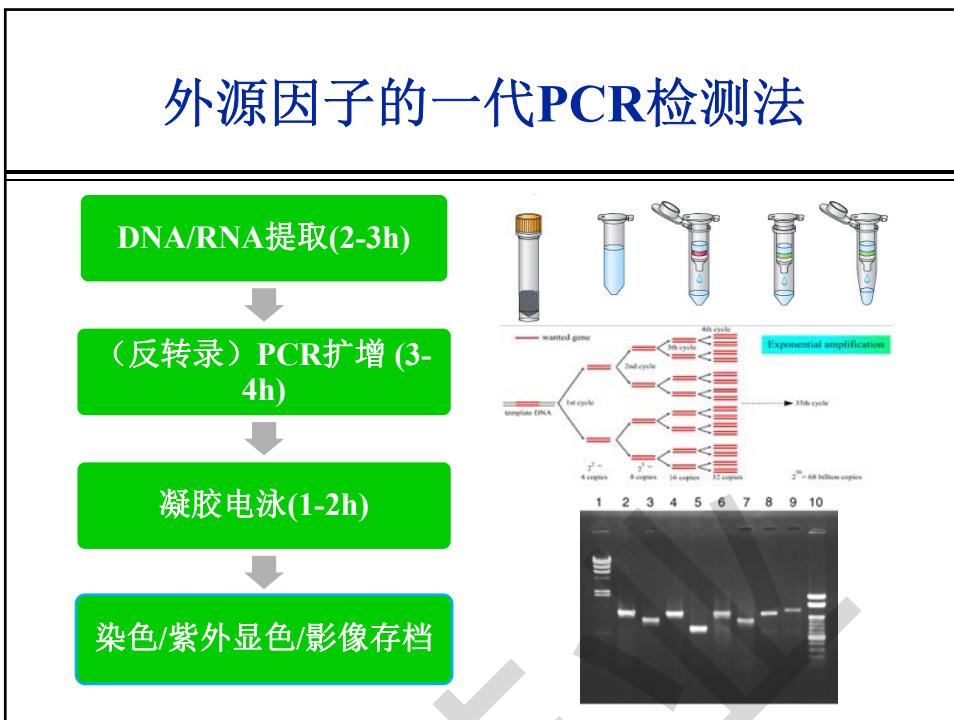
## 反转录病毒与内源性病毒



## 生产用细胞的病毒检测方法示例

- 反转录病毒和其它内源性病毒
  - 感染性(Infectivity)
  - 电镜
  - 反转录酶
  - 专属性检测
- 非内源性病毒
  - 体外检测: 接种至不同指示细胞培养物培养检查
  - 体内检测: 接种至动物(幼、成年鼠)和孵化蛋等
  - 抗体检测: 接种至动物后检查抗体 (MAP, RAP HAP)
  - 其它专属性检测, 针对从人、灵长类动物或其它转化而来的细胞





## 一代与二代PCR的主要区别

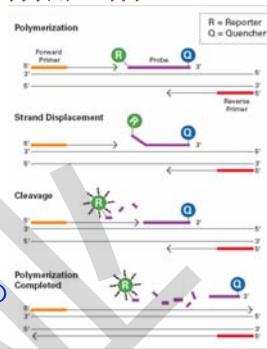
	终点PCR	实时PCR
<b>PCR反应后处理</b>		
定性	√	√
定量		√
专属性	低	高
灵敏度	低	高
精确度	低	高
准确度	低	高
自动化程度	低	高

## 全自动外源因子检测系统

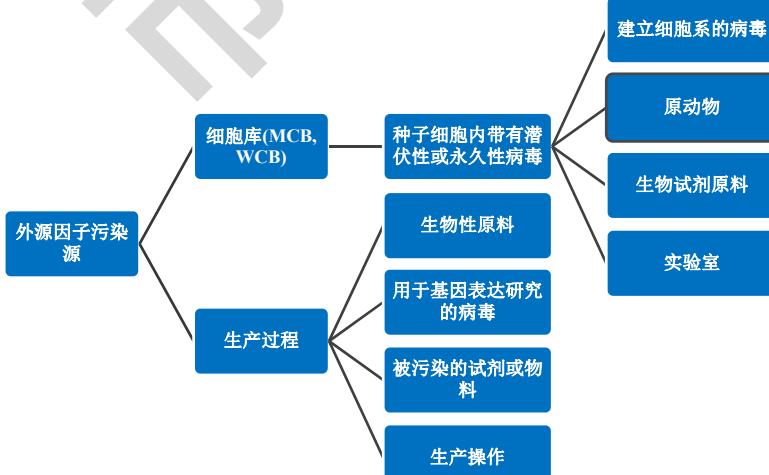


## PCR取代传统检测方法？

- USP、EP认为只要方法通过验证即可
- PCR阳性结果需要经传统方法证实
- PCR检测病毒有相当的局限性 – 引物的有限广谱性
- 完全取代还有很长的路要走
- 方法验证（USP 指南性章节 <1223>）
  - 主旨：与传统方法的等效性
  - 主要指标
    - » 专属性（specificity）
    - » 准确性（Accuracy）
    - » 精确性（Precision）
    - » 最低检测限/灵敏度（Limit of detection/sensitivity）
    - » 可重复和稳定性（Robustness and ruggedness）



## 生物制品外源因子的可能污染源



## 外源因子的污染风险评估

原料	外源因子的污染风险水平		
	高	中	低
来源	动物	植物	微生物发酵、化学合成
生产工艺	未经加工	适当纯化过	灭菌、清除病毒
供应链	隔离措施差	有些隔离措施	完善的隔离措施
用量	大量	中等用量	少量

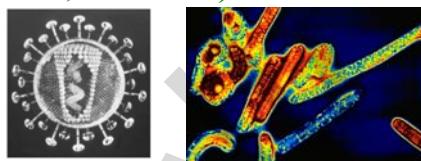
## 原料的污染控制策略

- 尽可能减少或不使用动物性原料
- 控制植物性原料与动物接触、被动物污染



## 生产下游控制策略

- 全封闭生产系统
- 清除病毒工艺步骤
  - 除病毒过滤
  - 试剂 (Triton X-100)
  - 层析 (chromotography)
  - 超低pH (pH ≤ 3.8, ≥15°C, ≥ 15 分钟)
  - 巴氏消毒



## 主要参考资料

- USP38 <63> Mycoplasma tests
- USP38 <1050> Viral safety evaluation of biotechnology products derived from cell lines of human or animal origin
- US FDA 1997 Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use
- ICH Q5D. 1997. Derivation and Characterization of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products.