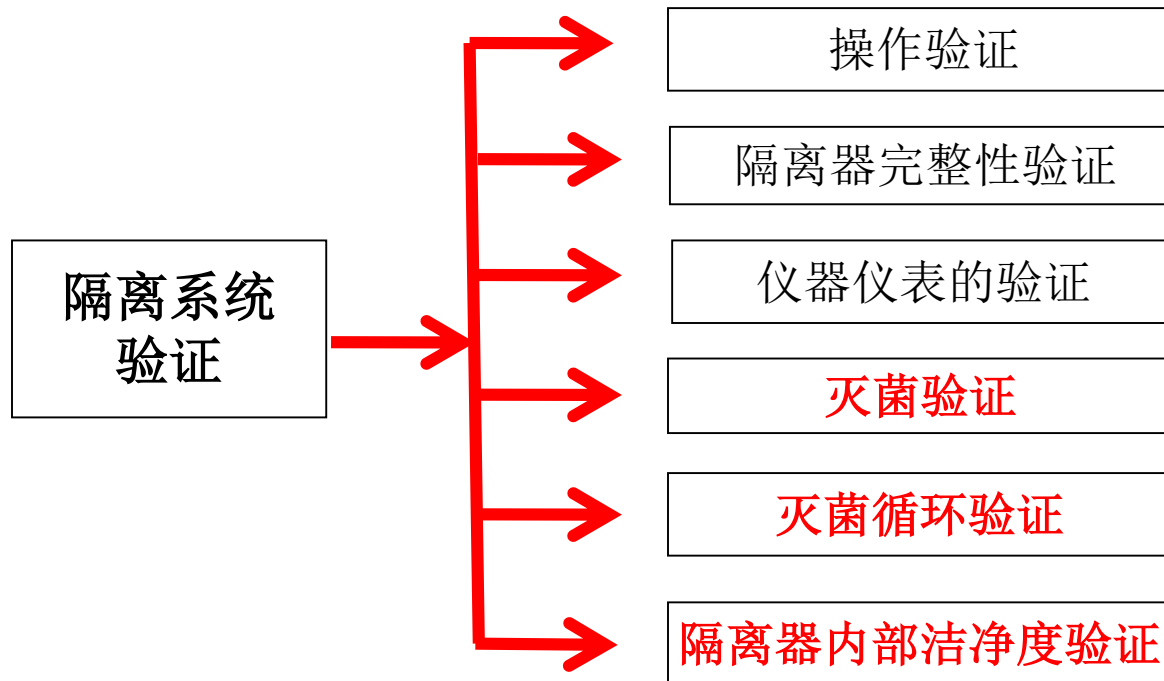


无菌检查用隔离系统验证指导原则讨论

默克密理博

栗 壮

验证内容



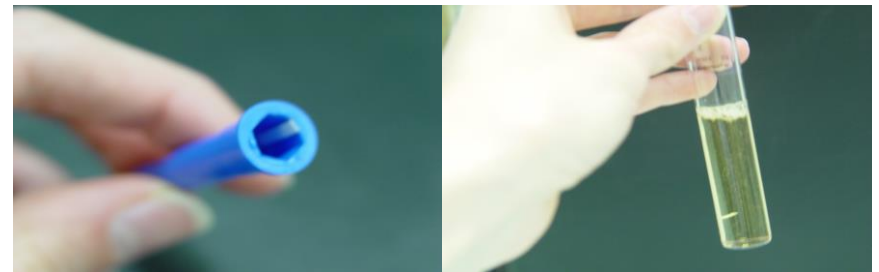
灭菌验证

- 隔离器表面、隔离器内的设备及进入隔离器的各种物料都应经过处理以降低微生物负载。

微生物负载：

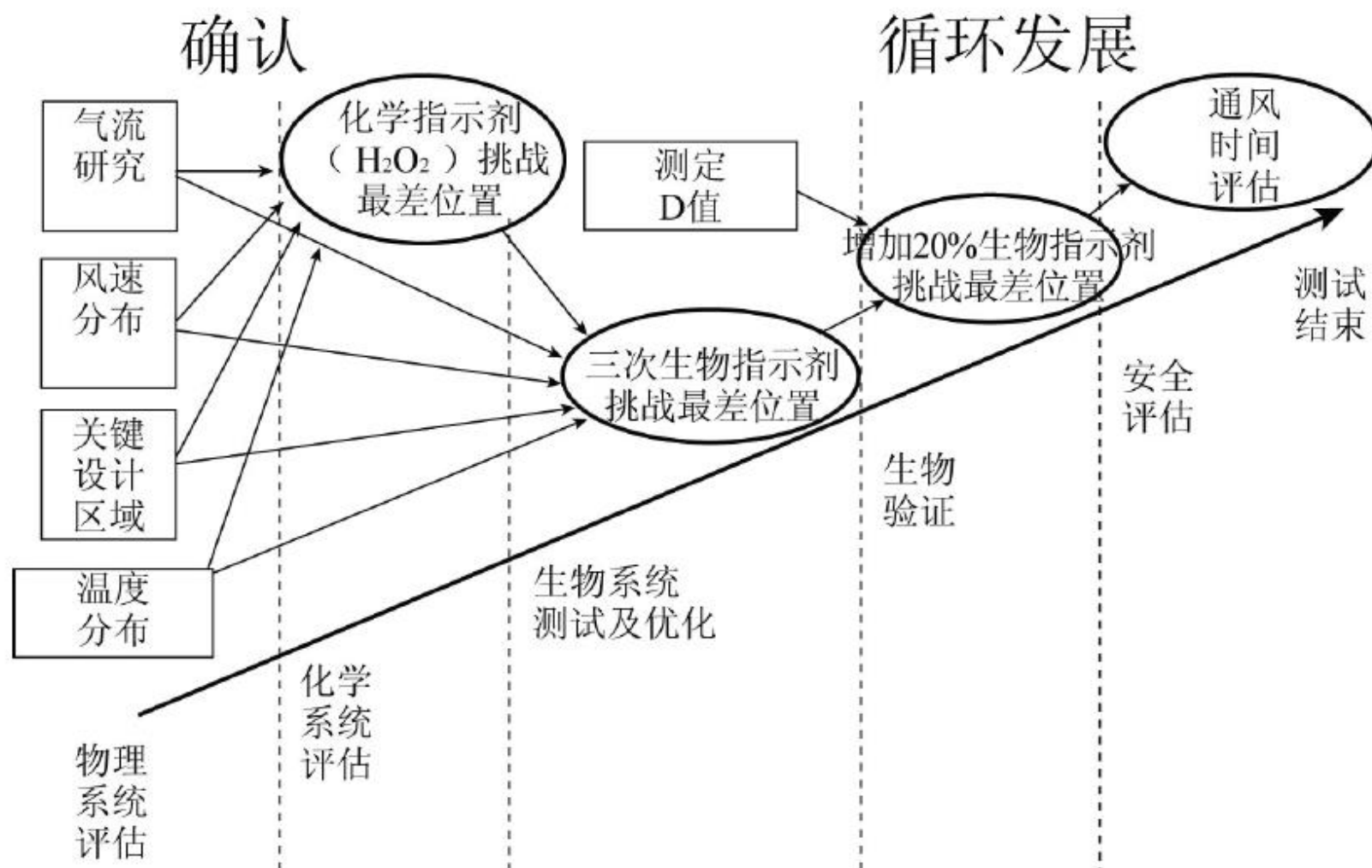
原料或者中间产品在灭菌工艺前的固有的微生物数量和种类

- 灭菌方法要达到或超过使生物指示剂下降6个对数值。
- 完全灭菌法应采用每单位 10^6 孢子数的生物指示剂。
- 阴性对照应该采用每单位孢子数不少于 10^6 孢子数的生物指示剂。
- 选择合适数量的生物指示剂，从统计学上证明灭菌效果可以再现以及灭菌剂的分布是否合适。



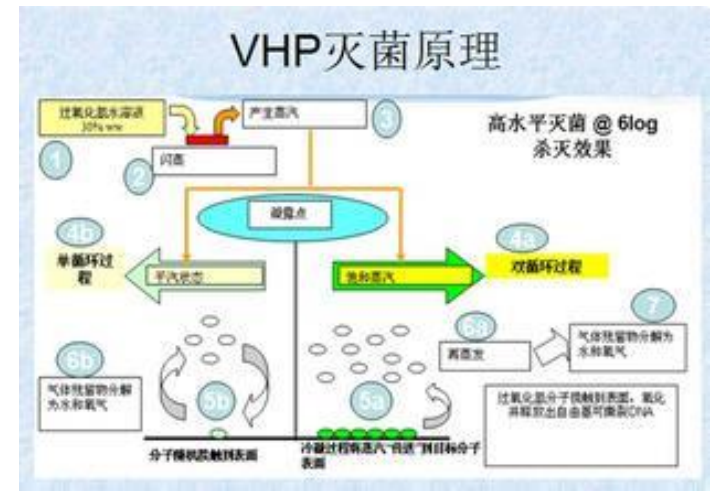


灭菌循环验证



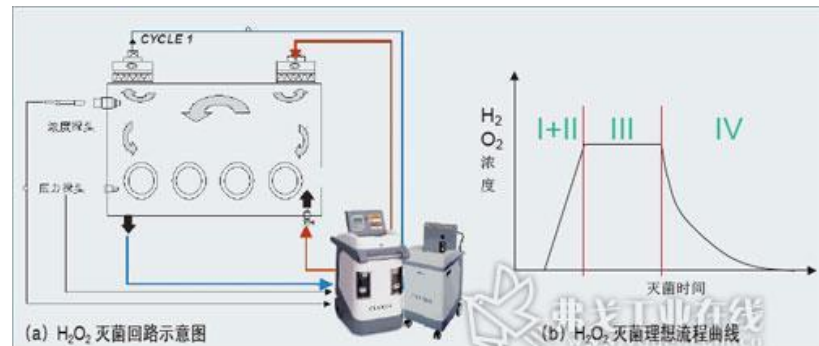
灭菌循环验证

- 运行一个灭菌循环，以确认实际运行值与设定值是否相符。
- ◆ 常用化学试剂：过氧乙酸、二氧化氯、臭氧、过氧化氢
 - 注意：不同的试剂有不同的暴露条件和过程控制。
- ◆ 使用过氧化氢蒸汽灭菌，房间的温湿度控制是关键。灭菌过程中隔离器内部的温度影响非常重要，要保持过氧化氢的浓度，避免低于过氧化氢的冷凝点。
- ◆ 二氧化氯和臭氧，要求在灭菌前预先增加隔离器的湿度。



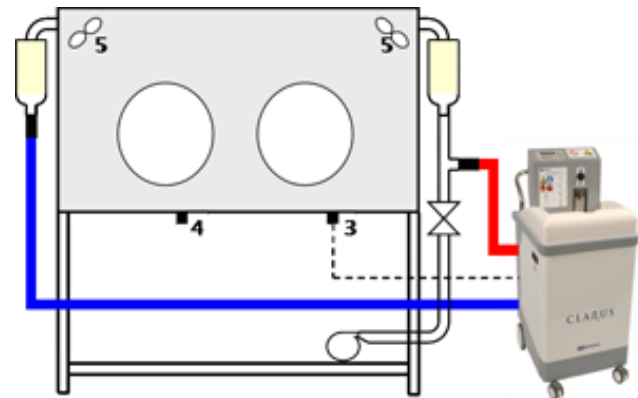
灭菌循环验证

- ◆ 灭菌剂浓度和浓度分布情况：当灭菌剂以气态或蒸汽状态存在时，其浓度可以通过化学指示剂、光谱方法或电极检测。灭菌剂分布情况可以使用化学指示剂测量（注意：化学指示剂仅能够提供定性信息）。
- ◆ 蒸汽灭菌时，隔离器内部使用风机来均匀分布灭菌剂。调节风机的位置和方向，保证适宜的气流分布。
- ◆ 架子、设备、手套、袖子装置和半身衣，会影响气流分配模式，因此必须对隔离器满载状态下的气流分布进行检测，物品的摆放情况进行详细描述并以文件形式记录。



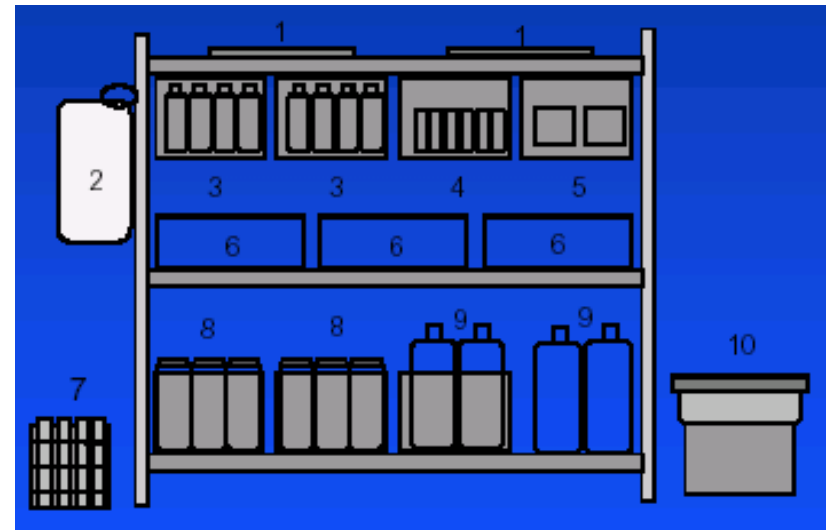
灭菌循环验证

- ◆ 使用传递仓对物料进行灭菌的隔离器，要制定出传递仓中物品和用具的摆放情况，审核摆放图并记录。（注意：化学灭菌剂作用在设备表面，因此，一些被遮盖的设备表面能够残留微生物并存活）。
- ◆ 达到杀菌剂作用时间后，使用无菌的新鲜空气将杀菌剂从隔离器中移走。
- ◆ 如果使用向外开放的排风通道，排放系统的气流和安全性应当被检测。



灭菌循环验证

- 隔离器内物料装载模式与要求
- 开发与验证最坏装载模式下的循环
- 尽可能利用传递舱以提高效率
- BI的放置位置需标明
利于试验失败时查找原因



BI放置数量要求：

“根据隔离器体积大小，每立方米放置5-10个BI是足够的，均匀分布于内表面，以证实杀菌剂的分布均匀性” PDA TR34

灭菌循环验证

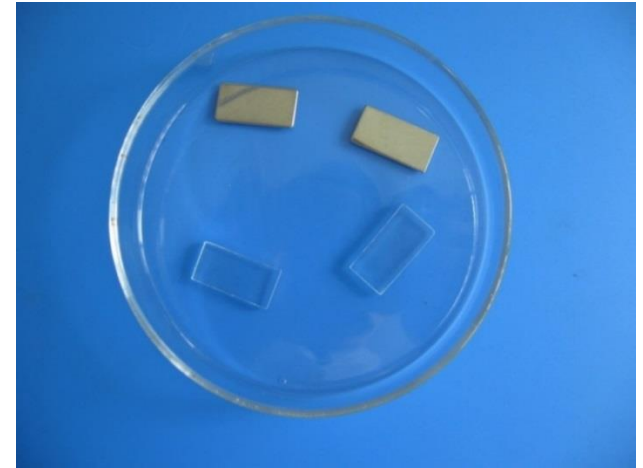
► 汽化过氧化氢灭菌过程采用的生物指示剂（BI）

菌种：嗜热脂肪芽胞杆菌

ATCC12980或ATCC7953

载体：一般选用玻璃片或不锈钢片

（不能选用滤纸片，滤纸片可能会吸收
灭菌剂导致有一定残留）



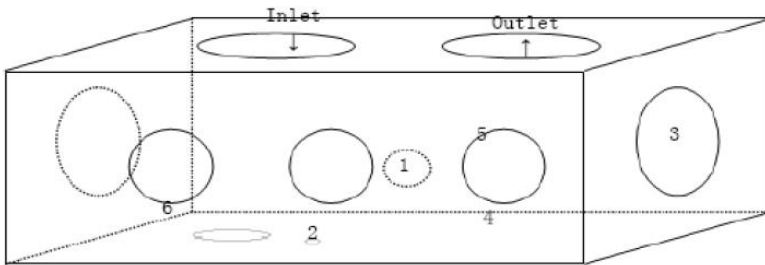
D值：由BI供应商提供的数据是可接受的。

如无准确的D值，同时无法证明灭菌剂浓度的有效性，可以使用半个周期（循环）的方法对整个周期（循环）进行确认。

生物指示剂如何放置？

◆ 指示剂放置于灭菌试剂较难达到的位置，根据气流走向、腔体构造以及初始验证结果制定，具体原则如下：

- (1) 距离进气口最远的位置；
- (2) 由于障碍，气流难以达到的位置；
- (3) 由于连接管路狭长或弯曲，气流难以达到的位置。



位置	取样位置描述	评估意见
1	MD8取样口内	此位置为 MD8取样管路，较狭长
2	排水口内	此位置为排水管路，呈 90℃弯曲
3	传递门中间	根据灭菌剂的气流走向，该位置远离进气口
4	架子底部	有架子障碍
5	架子后部	有架子障碍
6	袖子下部	有袖子障碍



灭菌循环验证注意事项

- 注意灭菌剂浓度较低的地方。
- 隔离器满载时需要用更多的生物指示剂进行试验。
- 灭菌程序的确定：经过三次连续的验证且能使生物指示剂下降超过6个对数值。



隔离器内部洁净度验证

- 隔离器内部的洁净环境应进行验证，其悬浮粒子（静态的）和微生物应达到我国现行GMP 中**A 级**空气洁净度的要求。
- 在灭菌气体灭菌完成后，通过监测灭菌气体的浓度，保证在无菌检测前隔离器内的灭菌气体残留量低于可接受值。



悬浮粒子检测

洁净度级别	悬浮粒子最大允许数/立方米			
	静态		动态 ⁽³⁾	
	$\geq 0.5 \mu m$	$\geq 5.0 \mu m^{(2)}$	$\geq 0.5 \mu m$	$\geq 5.0 \mu m$
A级 ⁽¹⁾	3520	20	3520	20

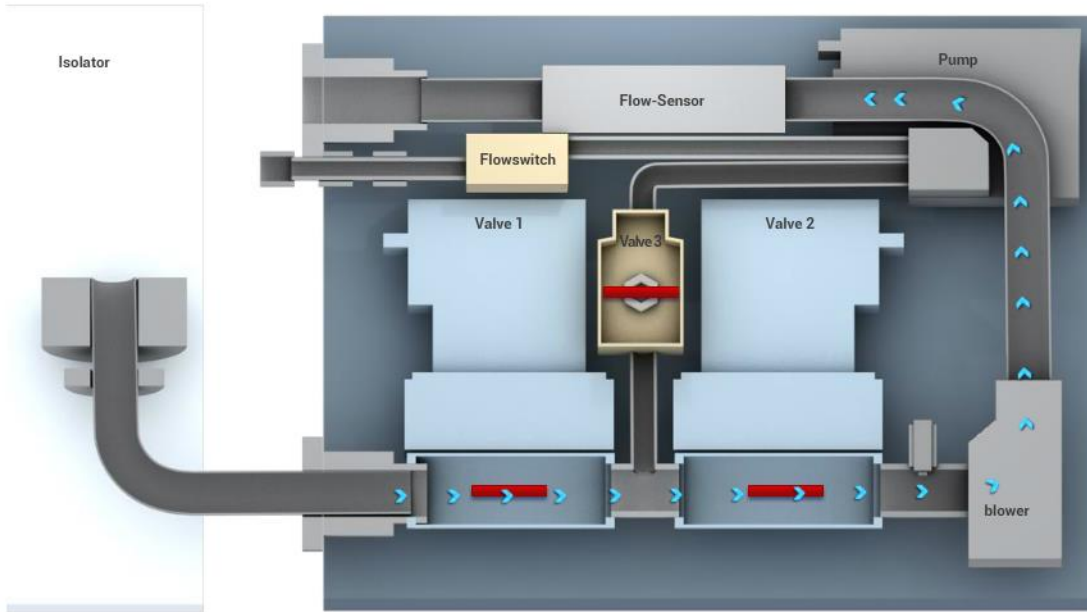


电磁阀

微生物检测

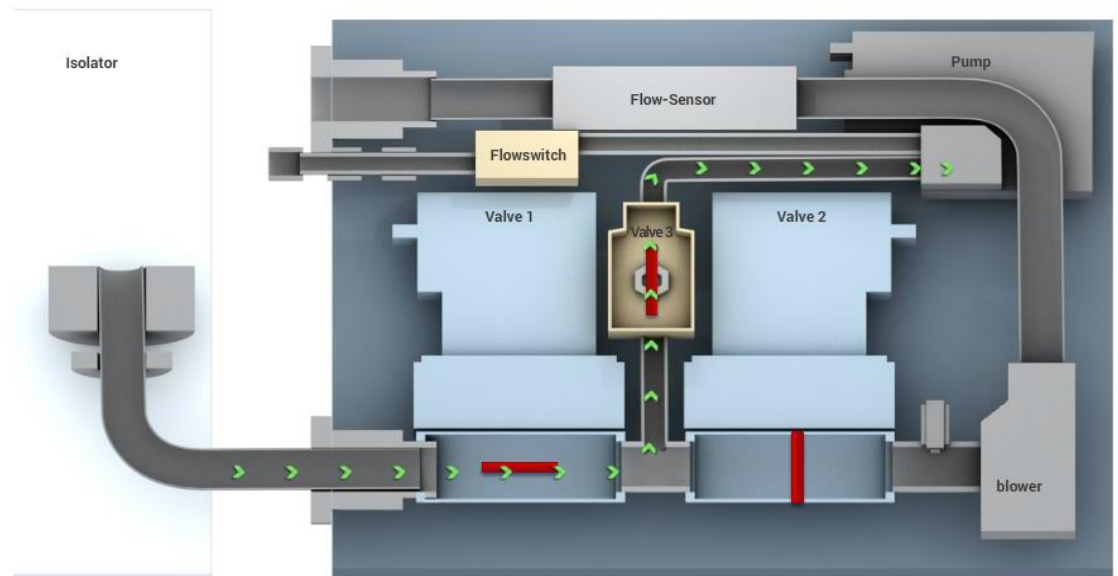
洁净度 级别	浮游菌 cfu/m ³	沉降菌 (φ90mm) cfu /4 小时 ⁽²⁾	表面微生物	
			接触 (φ55mm) cfu /碟	5 指手套 cfu /手套
A 级	<1	<1	<1	<1





采样

消毒



沉降菌取样

沉降菌检测的注意点：

- 摆放位置和高度（防止抑制物质的引入）
- 加入必要的中和剂（中和过氧化氢等消毒剂）
- 培养基的脱水问题（摆放时间的验证）



接触皿取样



- 接触碟水平采样方法：培养基表面应与采样点接触不少于 10s，向整个接触表面施加恒定均匀的压力（如施加的质量约为 $25\text{g}/\text{cm}^2$ ），不得有环形或线性运动。装置有接触并拿开后，要加盖并尽快用适当的培养条件培养

——ISO 14644



擦拭取样

- ◆ **棉签擦拭法**是接触碟法的补充，用于不规则表面的微生物监测，特别是设备的不规则表面。
- 棉签擦拭法是采用合适尺寸的无菌模板确定擦拭的面积，取样后，棉签置合适的缓冲液或培养基中，充分振荡，再用平皿涂布法或平皿浇注法计数。
- 每个棉签取样面积为约25 cm²，微生物计数结果以CFU/棉签报告。



隔离器的清洁能力

通过适当的隔离器设计来提高隔离器的清洁能力。

考虑的方面包括：

- 清洁是手动完成还是自动完成？
- 不和产品接触的表面是否要清洁，以及清洁到什么程度？
- 在清洁过程中如何保护过滤器？
- 如何更换可能污染的过滤器？
- 如何清洁非一次性物件？
- 如何清洁不和产品接触的表面？

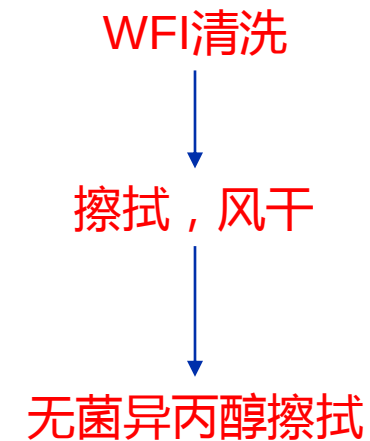
隔离器清洁

隔离器设计点：

- 可用清洁剂的光滑表面
- 没有平坦的凸起和表面
- 尽量少使用易吸收的物料
- 有保护过滤器的设计
- 容易进入所有要清洁的场所
- 在不暴露的情况下可以检查内表面的清洁度

隔离器清洁流程

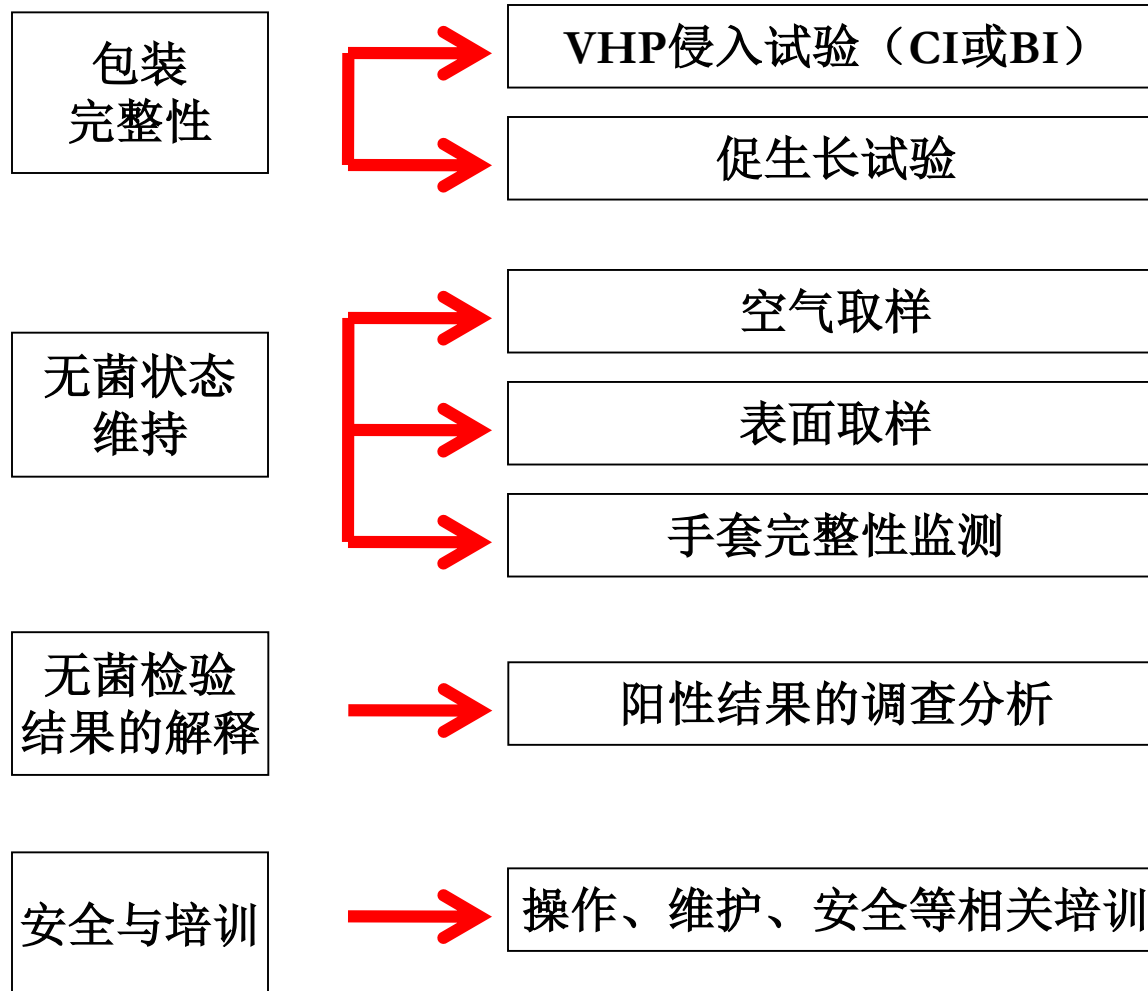
1. 将所有产品物料和一次性物品保存在封闭容器中
2. 清洁操作设备，将任何要清洁的部件保存在容器中
3. 在隔离器关闭状态下清洁隔离器内表面和容器外表面
4. 将容器移走
5. 额外的内部清洁
6. 重新安装已清洁的设备和部件



隔离器的应用



隔离器的应用



包装完整性验证

- 灭菌气体在灭菌循环过程中对某些透析包装物会产生不利影响，可能造成对微生物生长的抑制。
- 操作人员应证实暴露于灭菌气体中的供试品包装容器及无菌检查过程中所用的器材、稀释剂、培养基，不会由于灭菌气体的渗透而影响供试品中低水平微生物污染的检出。

假阴性



包装完整性验证

- 当灭菌气体存在渗入产品容器、实验辅助材料、培养基或稀释液的潜在风险时，操作人员可采取适当的措施，尽量减少灭菌剂进入包装或向容器中渗透，如：选用耐渗透的包装材料或将物料放入无菌的密闭容器中，但所采取的措施应避免造成灭菌死角。
 - 带旋转帽的管状容器、胶塞密封的小瓶、卷曲的褶皱已经被证明能够降低杀菌剂的穿透力。
 - 金属箔包装并且密封的容器能够防止杀菌剂的进入。

—— USP 1208

包装完整性验证

- 通过降低灭菌剂浓度及缩短灭菌周期，来降低灭菌剂浸入包装和容器内。
- 无菌检验前，使用杀菌剂处理产品包装表面，来减少物品表面微生物的负荷量。使用杀菌剂处理产品包装时，应证明该过程不会对产品中低水平污染的微生物造成影响，不会影响检验结果。
- 用化学和微生物挑战试验来检测包装物对污染的抵制能力。经隔离器全部的灭菌过程后，需进行杀菌剂抑制细菌和真菌情况的验证（参照无菌检查法（通则1101））。



包装完整性验证怎么做？

套筒：

- 1、最大灭菌次数：将套筒放在隔离器中进行两个90min的过氧化氢消毒，平行做一个放在密闭容器中能够防止过氧化氢渗透的套筒作为对照。
- 2、保持时间：1套立即进行促生长能力测试，1套放置7个月后进行促生长能力测试
- 3、促生长能力测试：加入100ml TSB到套筒中，然后转移至阳性室，加入含10 ~ 100CFU的菌液， $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 培养观察。

试验菌株：参照无菌检查，也可选择对过氧化氢比较敏感的表皮葡萄球菌。

培养基：

操作同套筒，消毒结束后拿到阳性室接种10 ~ 100CFU的菌悬液，培养观察。

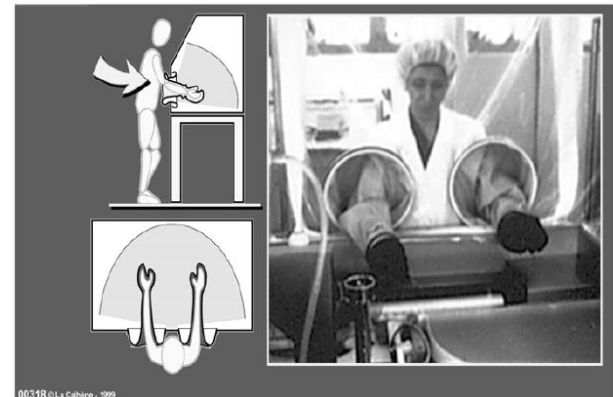
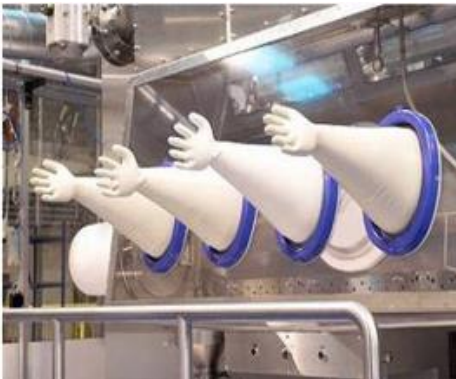


隔离器内部环境的无菌维持

- 隔离器内部环境在操作周期内的无菌维持需要经过验证。
- 隔离器内的微生物监控，可通过对灭菌后的第一天和无菌保持期的最后一天的采样，并对采样进行培养，通过周期性的采样分析，实现隔离器内无菌保持情况的验证。
- 隔离系统出现故障或者由于偶然因素引起的微生物污染必须进行检测。
- 隔离器内部表面可采用平面接触碟、不规则的表面可采用拭子擦拭进行微生物监控，由于培养基残留会使隔离器产生染菌的风险，因此，最好在检验完成后进行微生物监测，如果试验中有培养基残留，应清理干净。

无菌维持

- 检验用具和样品进入隔离器的过程最可能造成微生物的污染，所有进入的物品要进行无菌验证，另外，垫圈应定期检查，确保其完整，避免微生物的进入。
- 微生物污染源：手套和半身衣，尤其是用于处理无菌检验物品的手套
- 试验用的手套应保持其完整性，使用时，在拉伸情况下，即可发现手套上微小的破损；如果使用检测仪对手套进行检测，检测条件要尽可能与手套使用时的条件一致。



无菌维持

- 微生物检测：将手套浸入 0.1%的蛋白胨水溶液中，然后采用薄膜过滤法过滤0.1%的蛋白胨水溶液，取出滤膜进行培养，根据是否生长微生物判定检测手套的完整性。
- 隔离器内部可进行连续的尘埃粒子检测，快速检测到过滤器的泄露，也可使用便携式的尘埃粒子检测器进行周期检测。



无菌状态维持与环境监测

建立隔离器内部空间的监测系统和程序：

环境物理监测：尘埃微粒、压差等

环境微生物监测：

- 1) 主动空气取样 (浮游菌)
- 2) 被动空气取样 (沉降菌)
- 3) 表面取样 (棉签、接触碟)
- 4) 手套测试 (棉签、指印)

环境物理监测

1) 尘埃粒子检测

确认HEPA的有效性，非层流隔离器注意自净方法；

计数器不能放入舱内，应通过采样管采样。

2) 压差

3) 换气量、风速（有要求时）

4) 温度、湿度

系统内环境微生物监测

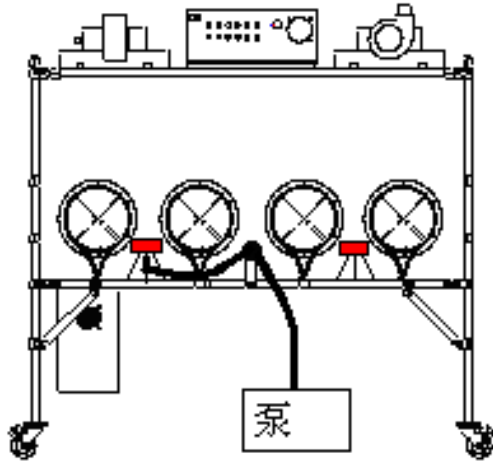
培养基要求：

- 一般采用广谱培养基TSA
- 最好含卵磷脂等抗VHP的中和剂；所用平板最好用抗VHP包装的经辐射灭菌，以避免VHP残留对培养基灵敏度造成的不良影响。

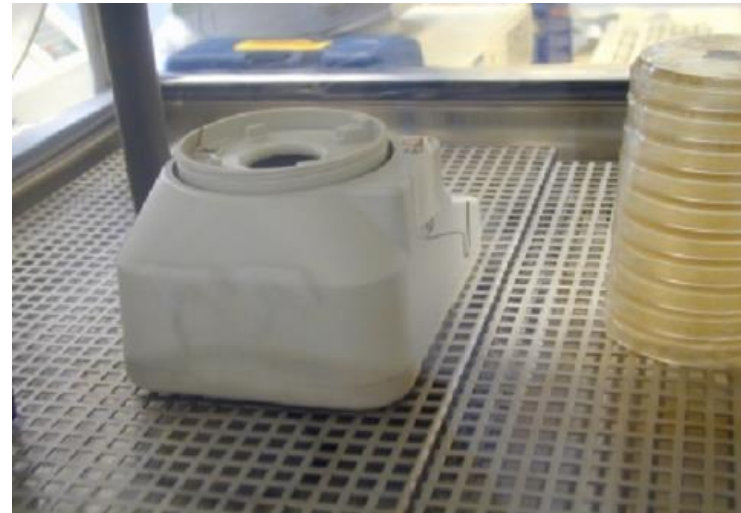
注意：灵敏度有限，监测结果要求不得有微生物生长。



系统内环境微生物监测



适用



不适用

取样点如何选择？

- 容易遭受微生物污染，最有可能对试验结果造成负面影响；
- 微生物最容易繁殖；
- 清洁、灭菌或者消毒的过程中最难以达到的区域；
- 有助于污染的扩散的活动；
- 关键操作点



Thank You!

