

无菌检查常见问题讨论

默克密理博 李峰

无菌检查基本概念

➤ GMP/EP/USP/中国药典



对于每一批认为是无菌/无热源的药品，生物制品、医疗器具、原料、辅料、及其他品种需要通过适当的实验室检查来确定。

➤ 什么是无菌检查

- 通过实验室方法检测所取标本中是否有微生物的存在，定型试验
- 参考性测试，代表一组数据，仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染
- 并不作为唯一的产品放行检查的标准

➤ 无菌检查的原理

- 无菌性通过生长和繁殖来证明（基于生长实验）
- 可替代方法（开发和实施中）



问题

无菌检测应该在什么环境下进行

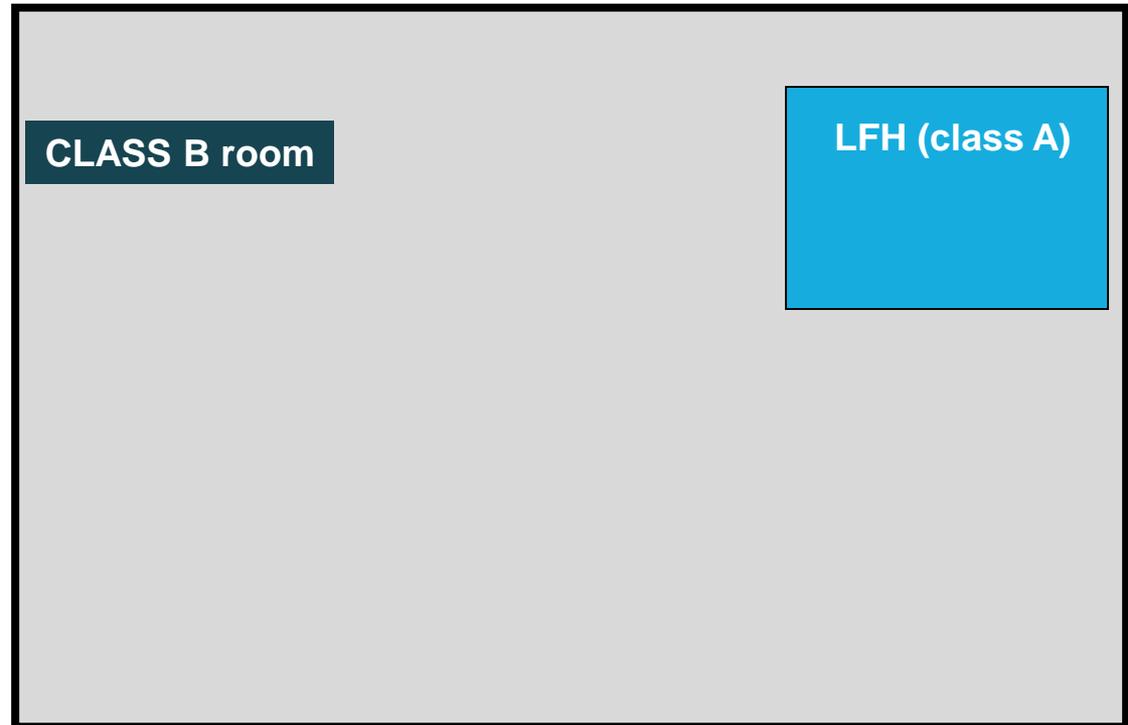
无菌检查环境

- 中国药典2010版
 - 无菌检查应在环境洁净度 10 000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内或隔离系统中进行

- USP/EP/中国药典 (2015版药典征求意见稿)
 - 无菌检查应在环境洁净度B 级背景下的局部A 级洁净度的单向流空气区域内或隔离系统中进行

洁净室

- 人员
- 物料
- 洁净室的灭菌
- 洁净室的日常维护



洁净室

- 无菌检测应该在一个可提供足够的空间，物料按照没有扰乱层流的方式放置的工作区域内进行。
- 进入洁净室的人员必须经过无菌穿衣验证，只有有资质的人员才可以进入洁净室。
- 在进行无菌测试前，操作人员必须熟练无菌操作，经过专门的培训并被记录在案。
- 实验人员应更换无菌衣（包括全身无菌服，头套，面罩，鞋套，手套，口罩）进入洁净室。
- 每次进入工作区都需要更换新的无菌服。
- 实验过程中操作表面和操作人员的手套要定期用消毒剂消毒。
- 洁净室需要定期消毒灭菌和日常维护。

隔离器环境

- 无菌实验用隔离器
 - 空气处理系统
 - 传递接口及传递门
 - 灭菌设备
 - 配套设备与辅助设施



- 2015版中国药典9206 无菌检查用隔离系统验证指导原则。

隔离器环境

- 对于无菌实验的计划性。
- 每次实验的Check List。
- 隔离器灭菌记录。
- 隔离器厂家的定期维护保养。
- 隔离器验证实验
 - 操作验证
 - 完整性验证
 - 灭菌验证
 - 灭菌循环验证
 - 内部洁净度验证
 - 仪器仪表的验证



问题

无菌检测实验室应如何做环境监控

洁净室/隔离器环境监控

- 单向流空气区、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度确认。隔离系统应定期按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。日常检验还需对试验环境进行监控。
- 人员，空气，设备
- 检测方法
 - 浮游菌
 - 沉降菌
 - 表面微生物
 - 尘埃粒子

洁净室/隔离器环境监控

- 2015版中国药典（9205）药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则
 - 药品洁净实验室的洁净级别按空气悬浮粒子大小和数量的不同参考现行“药品生产质量管理规范”分为A、B、C、D 4 个级别。

受控区域	洁净度级别	采样频次	监测项目
无菌隔离系统	内部	每次实验	空气悬浮粒子、浮游菌、或沉降菌、表面微生物（含手套）
	相邻外部	每半年一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物
微生物洁净室	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	每季度一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物
	D 级	每半年一次	空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、表面微生物

洁净室/隔离器环境监控



洁净室浮游菌



隔离器浮游菌



洁净室尘埃粒子



隔离器尘埃粒子

注意：雾化的过氧化氢或其他消毒剂会残留在洁净室空气内或隔离器内，并抑制收集在琼脂表面的微生物生长导致空气微生物采样实验的困难。使用含中和剂的培养基以避免假阴性结果。

隔离器环境监控

洁净室人员和设备以及隔离器内表面可使用接触碟或棉签监控



洁净室/隔离器环境监控

- 2015版中国药典（9205）药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则
 - 尘埃粒子

各洁净级别空气悬浮粒子的标准				
洁净度级别	悬浮粒子最大允许数/立方米			
	静态		动态	
	≥0.5μm	≥5.0μm	≥0.5μm	≥5.0μm
A 级	3520	20	3520	20
B 级	3520	29	352000	2900
C 级	352000	2900	3520000	29000
D 级	3520000	29000	不作规定	不作规定

洁净室/隔离器环境监控

- 2015版中国药典（9205）药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则
 - 微生物

各洁净级别环境微生物监测的动态标准				
洁净度级别	浮游菌cfu/m ³	沉降菌(φ90mm) cfu/4h	表面微生物	
			接触(φ55mm) cfu /碟	5 指手套 cfu /手套
A 级	<1	<1	<1	<1
B 级	10	5	5	5
C 级	100	50	25	-
D 级	200	100	50	-

问题

如何选择无菌检查方法

无菌检查方法

药典规定的两种方法:

➤ 薄膜过滤法

- 开放式无菌检查法
- 封闭式无菌检查法
- **薄膜过滤法应采用封闭式薄膜过滤器。无菌检查用的滤膜孔径应不大于0.45 μ m。直径约为50mm。（2015版药典征求意见稿）**

➤ 直接接种法

- 直接接种法适用于无法用薄膜过滤法进行无菌检查的供试品，即取规定量供试品分别等量接种至两周培养基中。

无菌检测方法

➤ 无菌检查方法必须在方法适应性验证之前得到确认

- 过滤性
- 化学兼容性，膜的兼容性
- 冲洗液类型及体积
- 潜在抑制问题



➤ 无菌检查方法方法适用性试验

- 当进行产品无菌检查法时，应进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该产品的无菌检查。若检验程序或产品发生变化可能影响检验结果时，应重新进行方法适用性试验。

薄膜过滤法vs直接接种法

- 样品的抑菌性成分可通过冲洗步骤去除
- 避免产品和培养基的交互反应
- 可进行大容量产品的测试（从100ml到数升）
- 实验方法较直接接种法更灵敏
- 较直接接种法使用的更少培养基
- 油性物质可用乳化剂进行处理

Avoid false
negative

抑菌样品无菌检查的黄金原则

- 选择正确的过滤设备和正确的操作程序
- 样品充分溶解
- 预润洗滤膜；特定情况下在滤膜上留存一定液体
- 充分溶解稀释产品，可以选择样品预先溶解装置
- 加快样品过滤速度，最小化滤膜接触时间，降低冲洗速度
- 使用低吸附滤膜如PVDF膜
- 选择适当的冲洗液，优化冲洗条件，增加冲洗次数
- 优化排液（带额外排水环设计的正确过滤装置）

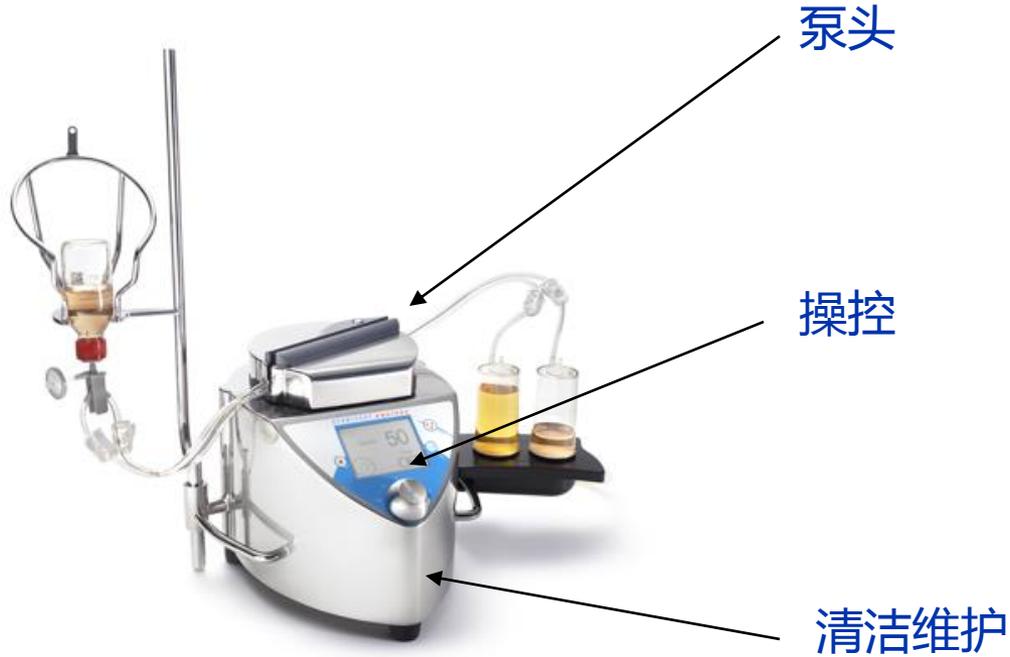
Avoid
False Negative

问题

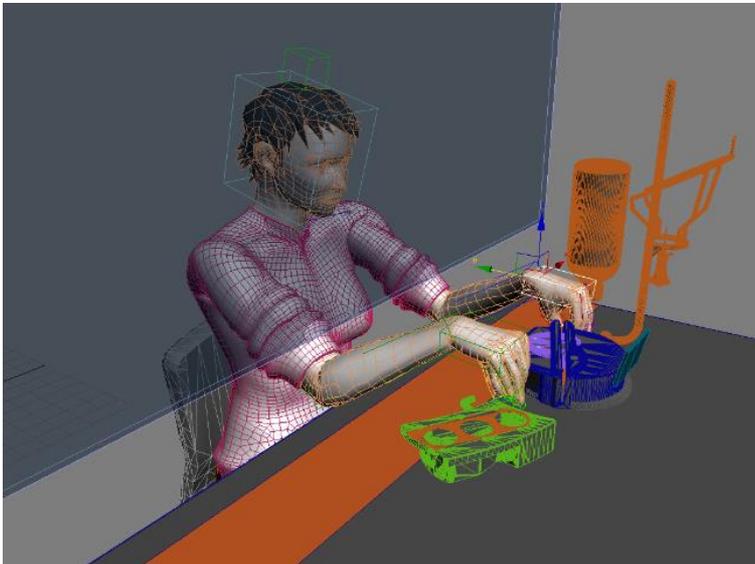
如何选择无菌检查设备及实验器材

无菌检测设备

➤ 硬件----集菌仪



人体工程学设计



泵头高度符合最佳操作位置



人体工程学设计



- 直线安装管路更方便安全
- 自动闭合/开启泵头更安全



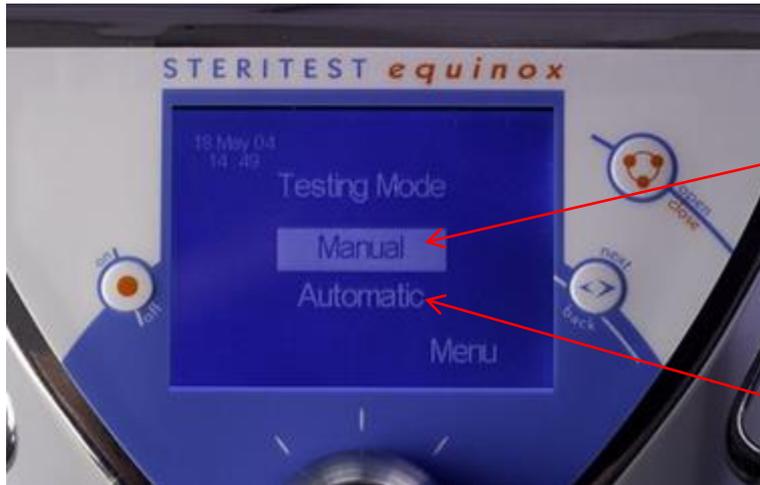
速度调节 / 过压报警

- 泵头比以往型号系统大 30%
- 更大的速度调节范围

- 当压力到达套筒内的最大压力时
泵会自动降低泵速
- 保证泵在最高泵速时安全运行
- 帮助粘性产品的过滤



手动/自动模式



手动设置程序

自动设置程序，输入SOP

- 标准化操作流程
- 避免人为操作失误

完整的IQ/OQ文件

- 完整的 & 可即用的 IQ, OQ, PQ 文本
对所有证明测试方法的适宜性和撰写测试方法的SOP所必需的工作的详尽描述。
- 降低验证时间
对于繁忙的 QC/QA 部门是非常理想的解决方案。
- 符合国际要求
该验证文本符合美国，欧洲和中国药典。以及GMP要求。
- 正确的，专业的建议
该验证文本是由，在无菌检验和成功帮助客户在微生物测试方法上有着40年经验的 Millipore公司撰写的。

无菌检查器材

- 耗材----套筒
 - 符合各种不同产品的套筒选择
 - 可靠的质量保证
 - 更人性化的设计使操作更简便安全



检测有抑菌影响的样品

- 含抑细菌和抑真菌物质的产品需要进行中和以避免对产品中存在的微生物的抑制作用。
 - 稀释
 - 预润湿，过滤和冲洗
 - 化学中和剂或者酶

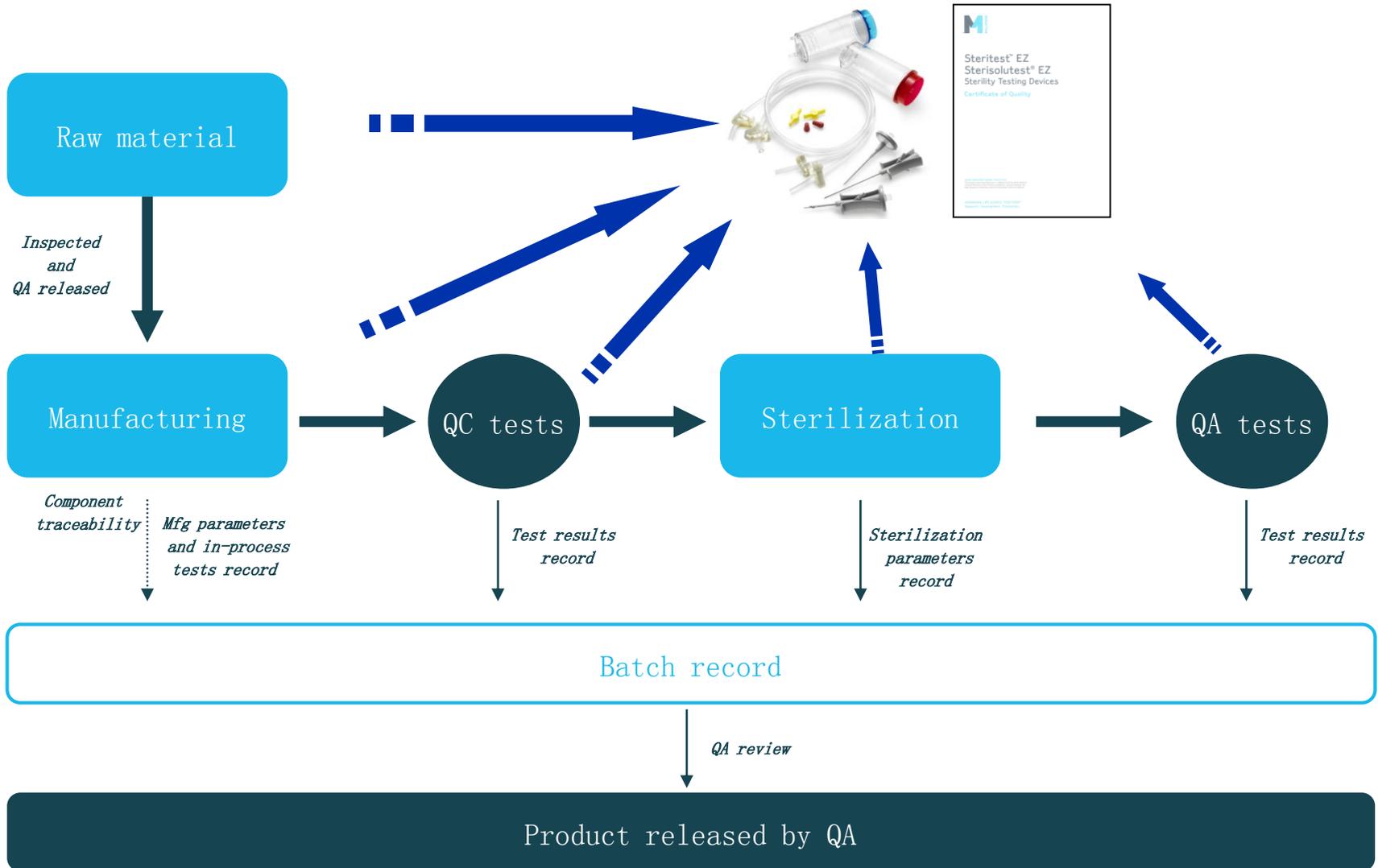
- 使用低吸附性的滤膜材质，如PVDF，能够帮助生长性抑制的最小化。
 - Durapore (PVDF) 膜：非常低的吸附性，更薄以降低产品和滤膜的接触面积

一次性过滤器的选择

- 蓝色底座套筒
 - 不含抑菌成份并且易于过滤的产品
- 红色底座套筒
 - 含抑菌成份的产品
- 绿色底座套筒
 - 难溶性或不易过滤的产品



可靠的质量保证



Steritest EZ 可靠的质量保证

➤ COA证书

Product

This lot of product was 100% air tested during manufacturing and met Millipore's requirements for the canister, membrane and seal integrity.

A Mixed Esters of Cellulose (MCE) membrane with a maximum pore size of 0.45 micrometers, as verified by bubble point, is used in this product.

Quality Assurance Lot Release Criteria

This manufacturing lot was sampled, tested and released by Quality Assurance for compliance with the following characteristics:

Physical tests (pre-sterilization)

Following tests were performed in-process on samples of this batch and met Millipore's requirements:

Clean Water Flow Rate

Samples met Millipore's requirements for clean water flow rate of 0.3 L/min at 10 psi (0.7 bar) at 25 °C.

Maximum Pressure

Samples exhibited a maximum canister pressure rating in accordance with specifications.

High Pressure

Samples confirm the integrity of the seal on the Steritest canister ensuring the integrity of the welds between the top and the base, the membrane and the base, and between the tubing and the canister.

Biological tests (post sterilization)

Retention Efficiency and Fertility

Samples demonstrated the required retention and fertility of the following microorganisms:

<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 6538
<i>Clostridium sporogenes</i>	ATCC® 19404
<i>Candida albicans</i>	ATCC® 10231
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC® 16404
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC® 9027
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC® 6633

Sterility

The radio-sterilization process was validated following AAMI guidelines. Each lot met the acceptance criteria for the controlled and validated cycle. Samples passed the sterility tests per the U.S, European and Japanese Pharmacopeias.

Sterilization Process Controls

Each packaging received an irradiation dose between 21.9 and 40 kGy. 40 kGy is not inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Clostridium sporogenes* ATCC 19404, *Candida albicans* ATCC 10231, *Aspergillus niger* ATCC 16404, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Micrococcus luteus* ATCC 9343. Re-validation of the irradiation dose is performed on regular basis following AAMI requirements.

Quality Assurance Audit Release Criteria

Performance of this product is confirmed by performing the following testing on product samples on an audit basis:

Physical tests (post sterilization)

Clean Water Flow Rate

Samples met Millipore's requirements for clean water flow rate of 0.3 L/min at 10 psi (0.7 bar) at 25 °C.

Maximum Pressure

Samples met Millipore's requirements for a maximum canister pressure rating of 45 psi (3.15 bar) after sterilization.

High Pressure

Samples confirm the integrity of the seal on the Steritest canister ensuring the integrity of the welds between the top and the base, the membrane and the base, and between the tubing and the canister.

可靠的质量保证

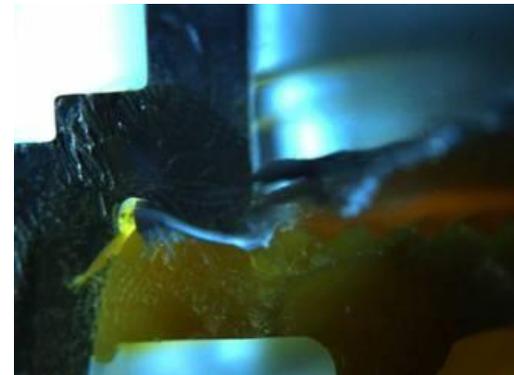
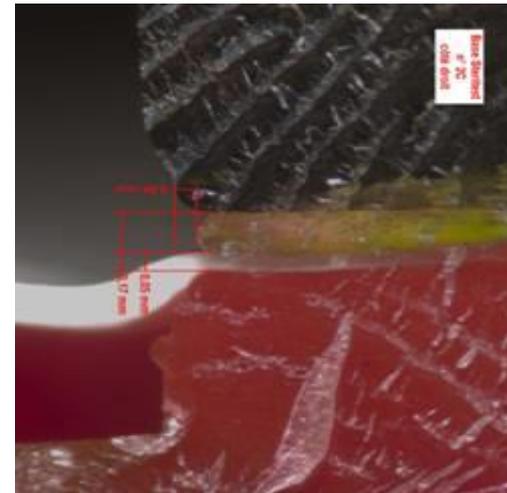
➤ 套筒，滤膜，底座的封装技术:

- 膜同底座以热合方式封装
- 膜和套筒以超声波焊接

➤ 热合膜和压合膜

- 无侧向旁路
- 无空气/产品残留

Avoid
False Negative



可靠的质量保证

在线及QC放行实验

- 物理测试包括：套筒完整性测试
 - 100% 进行的摄像头光学测试底座/呼吸器膜在封装后可能产生的小孔/膜损伤
 - 100% 进行的底座/呼吸器膜在封装后的气体测试
 - 100% 进行的整个 Steritest套筒的完整性测试
- 生物学测试包括:
 - 每个批次进行的Steritest EZ装置无菌性测试
 - 每个批次进行的Steritest EZ装置恢复生长率 & 截留率测试

Avoid false
positive

Avoid
False Negative

问题

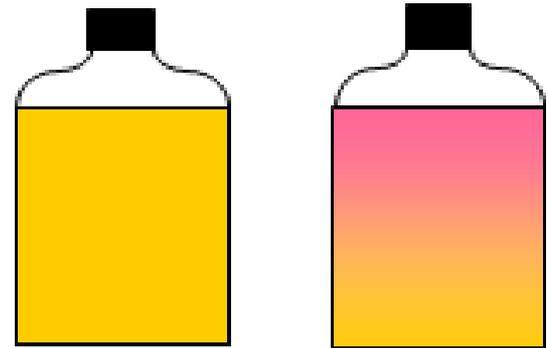
无菌检查培养基的质量控制

无菌检测培养基因素

- 中国药典(2010版)
 - 改良马丁培养基
 - 硫乙醇酸盐培养基FTM

- EP/USP/中国药典(2015版)
 - 胰酪大豆胨液体培养基TSB----用于真菌和需气菌的培养
 - 硫乙醇酸盐培养基FTM----厌氧菌和需气菌培养

分装至适宜的容器中，其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层（粉红色）不超过培养基深度的1/2。在供试品接种前，培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的1/5



培养基



培养基适用性实验（中国药典）

➤ 无菌性检查

- 每批培养基随机取不少于5支（瓶），置各培养基规定的温度培养14天，应无菌生长。

Avoid false
positive

➤ 灵敏度检查

- 取每管装量为12ml的硫乙醇酸盐流体培养基7支，分别接种小于100CFU的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌各2支，另1支不接种作为空白对照，培养3天。
- 取每管装量为9ml的胰酪大豆胨液体培养基7支，分别接种小于100CFU的枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉各2支，另1支不接种作为空白对照，培养5天。

Avoid
False Negative

缓冲液的无菌性检测

➤ 目的

- 确保冲洗液的无菌性
- 无菌检查中避免由于实验材料造成假阳性风险

➤ 方法使用：薄膜过滤

- 过滤之后培养观察14天，没有微生物生长（肉眼判断培养基没有浑浊），冲洗液被认为是无菌的
- 产品无菌检查同步进行阴性对照

Avoid false
positive

小结



结论

Avoid False
Positive

Avoid False
Negative

- 为了得到最可靠的数据，在最佳的无菌条件下验证和实施无菌实验
 - 环境
 - 方法
 - 设备
 - 培养基

结论

- 如何减少假阳性结果
 - A级洁净室/隔离器
 - 使用封闭式无菌检测方法
 - 无菌检查设备的微生物控制
 - 使消毒和清洁更容易
 - 避免检查程序异常
 - 质量保证的仪器和耗材
 - 专业培训

Avoid False
Positive

结论

- 如何减少假阴性结果
 - 选择膜过滤法
 - 选择恰当的滤膜和套筒进行过滤
 - 促生长实验
 - 验证测试/适应性测试
 - 遵循SOP
 - 质量保证的仪器和耗材
 - 专业的培训

Avoid False
Negative

偏差调查

- 当检验结果出现超常或超标时均需要进行偏差调查。
- 调查范围人、机、料、法、环。
- 偏差调查的范围至少包括：
 - 微生物鉴别—初步确定污染源
 - 原始数据以及阴阳性对照回顾。
 - 培养基及所用的其他耗材是否满足质量标准要求。
 - 取样环境是否满足要求。
 - 同期进行检验的其他结果是否正常。
 - 消毒剂是否在有效期内，且消毒是否正确。
 - 必要时进行相应的复试。

默克密理博



THANK YOU!