

无菌检查——环境要求

默克生命科学

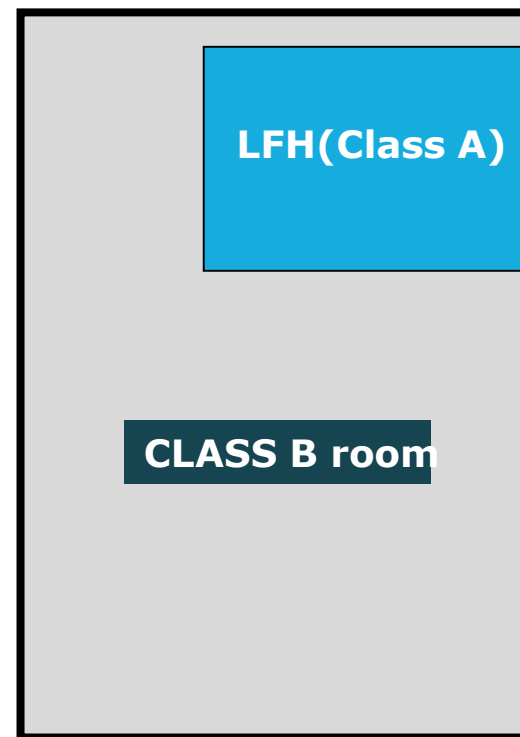
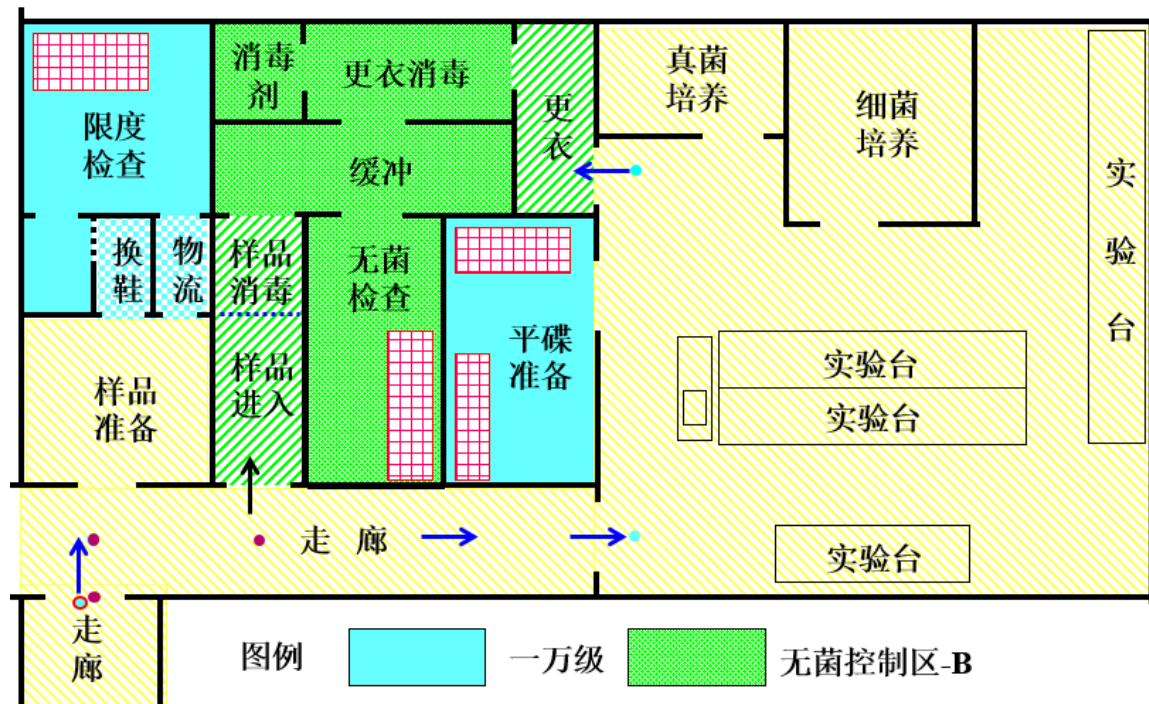
MERCK

无菌检查 环境要求

- **中国药典2015版 4部 通则1101无菌检查法**：无菌检查应在无菌条件下进行，试验环境必须达到无菌检查的要求，检验全过程应严格遵守无菌操作，防止微生物污染，防止污染的措施不得影响供试品中微生物的检出。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。
- **中国药典2015版 4部 通则9203药品微生物实验室质量管理指导原则**：无菌检查应在B级背景下的A级单向流洁净区域或隔离系统中进行。
- 无菌检查环境至少应不低于无菌生产环境（无菌工艺）

无菌检查环境要求 洁净室

- 人员
- 物料
- 洁净室的灭菌
- 洁净室的日常维护



无菌检查环境要求 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。
- 保持空调系统的良好运行状态，对设施进行良好维护
- 洁净室内人员应严格遵守良好的行为规范，并定期进行环境监控，减少人员干预比监测更有效。
- 通过有效控制人员和物品的移动，适当的控制温度和湿度。
- 微生物控制措施还包括良好的清洁和卫生处理，应定期对药品洁净实验室进行清洁和消毒，应当监测消毒剂和清洁剂的微生物污染状况，并在规定的有效期内使用，
- A /B 级洁净区应当使用无菌的或经无菌处理的消毒剂和清洁剂。所采用的化学消毒剂应经过验证或有证据表明其消毒效果，其种类应当多于一种，并定期进行更换以防止产生耐受菌株。
- 不得用紫外线消毒代替化学消毒。必要时，可采用熏蒸等适宜的方法降低洁净区的卫生死角的微生物污染，并对熏蒸剂的残留水平进行验证。
- 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。

无菌检查环境要求

隔离器

无菌实验用隔离器

- 无菌检查用隔离器是为产品无菌检查试验提供无菌环境的一种设备。封闭式隔离器不直接与外界环境相连，使用无菌接口或快速转移通道进行物质传递，一般用于无菌检查；放式隔离器允许材料通过舱门进入，舱门内有一定的压力阻止微生物的进入。物品可通过无菌传递进入隔离器，整个传递过程中可保持隔离器内部空间和外部环境完全隔离。
- 隔离器内部能够反复进行灭菌，内壁可用灭菌剂处理，以去除所有的生物负载，灭菌完成后，隔离器通过高效空气过滤器(HEPA)或更高级别的空气过滤器向其内部输送洁净空气来维持内部的无菌环境。



无菌检查环境要求 隔离器

无菌实验用隔离器的验证

- 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
 - 仪器仪表的验证



无菌检查环境要求 环境监测

中国药典2015版 4部 通则9205药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则：

- 药品洁净实验室是指用于药品无菌或微生物检验用的洁净实验室、隔离系统及其他受控环境。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。为维持药品洁净实验室操作环境的稳定性、确保药品质量安全及检测结果的准确性，应对药品洁净实验室进行微生物监测和控制，使受控环境维持可接受的微生物污染风险水平。
- 包括人员要求、初次使用的洁净实验室参数确认、**微生物监测方法、监测频次及监测项目、监测标准**、警戒限和纠偏限、数据分析及偏差处理、微生物鉴定和微生物控制。
- 药品洁净实验室应定期进行微生物监测，内容包括非生物活性的空气悬浮粒子数和有生物活性的微生物监测，其中微生物监测包括环境浮游菌和沉降菌监测，及关键的检测台面、人员操作服表面及5 指手套等的微生物监测。
- 当洁净区有超净工作台、空气调节系统等关键设备发生重大改变时应重新进行监测；当微生物监测结果或样品测定结果产生偏离，经评估洁净区可能存在被污染的风险时，应对洁净区进行清洁消毒后重新进行监测。

无菌检查环境要求 环境监测

中国药典2015版 4部 通则9205药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则：推荐的药品洁净实验室的监测频次及监测项目

	受控区域	采样频次	监测项目
无菌隔离系统		每次试验	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	每次试验	空气悬浮粒子，浮游菌，沉降菌，表面微生物（含手套）
	B	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	每季度一次	空气悬浮粒子，浮游菌，沉降菌，表面微生物
	D	每半年一次	空气悬浮粒子，浮游菌，沉降菌，表面微生物

无菌检查环境要求

环境监测

监测方法

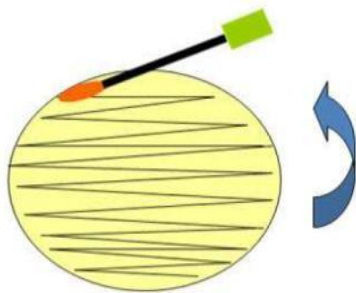
- 悬浮粒子：按照《医药工业洁净室(区)悬浮粒子的测试方法》
- 沉降菌：按照《医药工业洁净室(区)沉降菌的测试方法》
- 浮游菌：按照《医药工业洁净室(区)浮游菌的测试方法》



无菌检查环境要求 环境监测

监测方法

- 表面微生物：是对环境、设备和人员的表面微生物进行监测，方法包括接触碟法和擦拭法。



无菌检查环境要求 环境监测

- 环境浮游菌、沉降菌及表面微生物监测用培养基一般采用胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)，必要时可加入适宜的中和剂，当监测结果有疑似真菌或考虑季节因素影响时，可增加沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)。
- 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。
- 培养温度和培养时间
 - 可在30-35℃，20 - 25 °C下分别培养48-72小时
- 培养基质量控制
 - 培养基的无菌性（预培养）
 - 培养基的促生长性
- 自制培养基和商品化培养基



无菌检查环境要求 环境监测

中国药典2015版 4部 通则9205药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则：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	
	$\geq 0.5\mu\text{m}$	$\geq 5.0\mu\text{m}$	$\geq 0.5\mu\text{m}$	$\geq 5.0\mu\text{m}$
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

无菌检查环境要求 环境监测

中国药典2015版 4部 通则9205药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则：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(φ 90mm) cfu/4 小时 ^②	表面微生物	
			接触(φ 55mm)	5 指手套
			cfu/碟	cfu/手套
A 级	<1	<1	<1	<1
B 级	10	5	5	5
C 级	100	50	25	—
D 级	200	100	50	—

注：①表中各数值均为平均值；②单个沉降碟的暴露时间可以少于4 小时，同一位置可使用多个沉降碟连续进行监测并累积计数。

无菌检查环境要求

环境监测

警戒线/纠偏限

- 药品洁净实验室应根据历史数据，结合不同洁净区域的标准，采用适宜的方法，制定适当的微生物监测警戒限和纠偏限。限度确定后，应定期回顾评价，如历史数据表明环境有所改善，限度应作出相应调整以反映环境实际质量状况。
- 各级别洁净环境微生物纠偏限参考值。

洁净度级别	浮游菌纠偏限 ^① (cfu/m ³)	沉降菌纠偏限 ^② (φ 90mm, cfu/4 小时)
A 级	<1 ^③	<1 ^③
B 级	7	3
C 级	10	5
D 级	100	50

注：①数据表示建议的环境质量水平，也可根据检测或分析方法的类型确定微生物纠偏限度标准；② 可根据洁净区域用途、检测药品的特性等需要增加沉降碟数；③ A 级环境的样本，正常情况下应无微生物污染。

无菌检查环境要求

环境监测

➤ 数据分析

应当对日常环境监测的数据进行分析和回顾，通过收集的数据和趋势分析，总结和评估洁净实验室是否受控，评估警戒限和纠偏限是否合适，评估所采取的纠偏措施是否合适。应当正确评估微生物污染，不仅仅关注微生物数量，更应关注微生物污染检出的频率，往往在一个采样周期内同一环境中多点发现微生物污染，可能预示着风险增加，应仔细评估。几个位点同时有污染的现象也可能由不规范的采样操作引起，所以在得出环境可能失控的结论之前，应仔细回顾采样操作过程。在污染后的几天对环境进行重新采样是没有意义的，因为采样过程不具有可重复性。

➤ 偏差处理

当微生物监测结果超出纠偏限度时，应当按照偏差处理规程进行报告、记录、调查、处理以及采取纠正措施，并对纠正措施的有效性进行评估。

➤ 微生物鉴定

建议对受控环境收集到的微生物进行适当水平的鉴定，微生物菌群信息有助于预期常见菌群，并有助于评估清洁或消毒规程、方法、清洁剂或消毒剂及微生物监测方法的有效性，尤其当超过监测限度时，微生物鉴定信息有助于污染源的调查。关键区域分离到的菌落应先于非关键区域进行鉴定。

无菌检查环境要求

环境监测

➤ 数据分析

应当对日常环境监测的数据进行分析和回顾，通过收集的数据和趋势分析，总结和评估洁净实验室是否受控，评估警戒限和纠偏限是否合适，评估所采取的纠偏措施是否合适。应当正确评估微生物污染，不仅仅关注微生物数量，更应关注微生物污染检出的频率，往往在一个采样周期内同一环境中多点发现微生物污染，可能预示着风险增加，应仔细评估。几个位点同时有污染的现象也可能由不规范的采样操作引起，所以在得出环境可能失控的结论之前，应仔细回顾采样操作过程。在污染后的几天对环境进行重新采样是没有意义的，因为采样过程不具有可重复性。

➤ 偏差处理

当微生物监测结果超出纠偏限度时，应当按照偏差处理规程进行报告、记录、调查、处理以及采取纠正措施，并对纠正措施的有效性进行评估。

➤ 微生物鉴定

建议对受控环境收集到的微生物进行适当水平的鉴定，微生物菌群信息有助于预期常见菌群，并有助于评估清洁或消毒规程、方法、清洁剂或消毒剂及微生物监测方法的有效性，尤其当超过监测限度时，微生物鉴定信息有助于污染源的调查。关键区域分离到的菌落应先于非关键区域进行鉴定。

LI FENG

Mobile: +86-13917280549

Email: lance.li@merckgroup.com

Thank you for your attention

