

附录XVI 灭菌法

灭菌法系指用适当的物理或化学手段将物品中活的微生物杀灭或除去，从而使物品残存活微生物的概率下降至预期的无菌保证水平的方法。本法适用于制剂、原料、辅料及医疗器械等物品的灭菌。

无菌物品是指物品中不含任何活的微生物。对于任何一批灭菌物品而言，绝对无菌既无法保证也无法用试验来证实。一批物品的无菌特性只能相对地通过物品中活微生物的概率低至某个可接受的水平来表述，即无菌保证水平(Sterility assurance level, 简称 SAL)。实际生产过程中，灭菌是指将物品中污染微生物的概率下降至预期的无菌保证水平。最终灭菌的物品微生物存活概率，即无菌保证水平不得高于 10^{-6} 。已灭菌物品达到的无菌保证水平可通过验证确定。

灭菌产物品的无菌保证不能依赖于最终产品的无菌检验，而是取决于生产过程中采用合格的灭菌工艺、严格的 GMP 管理和良好的无菌保证体系。灭菌工艺的确定应综合考虑被灭菌物品的性质、灭菌方法的有效性和经济性、灭菌后物品的完整性和稳定性等因素。

灭菌程序的验证是无菌保证的必要条件。灭菌程序经验证后，方可交付正式使用。验证内容包括：

- (1) 撰写验证方案及制定评估标准。
- (2) 确认灭菌设备技术资料齐全、安装正确，并能处于正常运行（安装确认）。
- (3) 确认灭菌设备、关键控制和记录系统能在规定的参数范围内正常运行（运行确认）。
- (4) 采用被灭菌物品或模拟物品按预定灭菌程序进行重复试验，确认各关键工艺参数符合预定标准，确定经灭菌物品的无菌保证水平符合规定（性能确认）。
- (5) 汇总并完善各种文件和记录，撰写验证报告。

日常生产中，应对灭菌程序的运行情况进行监控，确认关键参数（如温度、压力、时间、湿度、灭菌气体浓度及吸收的辐照剂量等）均在验证确定的范围内。灭菌程序应定期进行再验证。当灭菌设备或程序发生变更（包括灭菌物品装载方式和数量的改变）时，应进行再验证。

物品的无菌保证水平与灭菌工艺、灭菌前物品被污染的程度及污染菌的特性

相关。因此，应根据灭菌工艺的特点制定灭菌物品灭菌前的微生物污染水平及污染菌的耐受性限度并进行监控，并在生产的各个环节采取各种措施降低污染，确保微生物污染控制在规定的限度内。

灭菌的冷却阶段，应采取措施防止已灭菌物品被再次污染。任何情况下，都应要求容器及其密封系统确保物品在有效期内符合无菌要求。

灭菌方法

常用的灭菌方法有湿热灭菌法、干热灭菌法、辐射灭菌法、气体灭菌法和过滤除菌法。可根据被灭菌物品的特性采用一种或多种方法组合灭菌。只要物品允许，应尽可能选用最终灭菌法灭菌。若物品不适合采用最终灭菌法，可选用过滤除菌法或无菌生产工艺达到无菌保证要求，只要可能，应对非最终灭菌的物品作补充性灭菌处理(如流通蒸汽灭菌)。

一、湿热灭菌法

本法系指将物品置于灭菌柜内利用高压饱和蒸汽、过热水喷淋等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法。该法灭菌能力强，为热力灭菌中最有效、应用最广泛的灭菌方法。药品、容器、培养基、无菌衣、胶塞以及其他遇高温和潮湿不发生变化或损坏的物品，均可采用本法灭菌。流通蒸汽不能有效杀灭细菌孢子，一般可作为不耐热无菌产品的辅助灭菌手段。

湿热灭菌条件的选择应考虑灭菌物品的热稳定性、热穿透力、微生物污染程度等因数。湿热灭菌条件通常采用 $121^{\circ}\text{C} \times 15\text{min}$ 、 $121^{\circ}\text{C} \times 30\text{min}$ 或 $116^{\circ}\text{C} \times 40\text{min}$ 的程序，也可采用其他温度和时间参数，但无论采用何种灭菌温度和时间参数，都必须证明所采用的灭菌工艺和监控措施在日常运行过程中能确保物品灭菌后的 $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ 。当灭菌程序的选定采用 F_0 值概念时 (F_0 值系当采用非 121°C 的灭菌条件时，该灭菌程序致死微生物的效果与 121°C 的灭菌效果相同，在 121°C 下的灭菌时间)，应采取特别措施来确保灭菌物品能得到足够的无菌保证，此时，除对灭菌程序进行验证外，还必须在生产过程中对微生物进行监控，证明污染的微生物指标低于设定的限度。对热稳定的物品，灭菌工艺可首选过度杀灭法，以保证灭菌物品获得足够的无菌保证值。热不稳定性物品，其灭菌工艺的确定依赖于在一定的时间内，一定的生产批次的灭菌物品灭菌前微生物污染的水平及其耐

热性污染的情况。因此，日常生产全过程应对产品中污染的微生物进行连续地、严格地监控，并采取各种措施降低物品微生物污染水平，特别是防止耐热菌的污染。热不稳定性产品的 F_0 值一般不低于 8min。

采用湿热灭菌，被灭菌物品应有适当的装载方式，不能排列过密，以保证灭菌的有效性和均一性。

湿热灭菌法应确认灭菌柜在不同装载时可能存在的冷点。当用生物指示剂进一步确认灭菌效果时，应将其置于冷点处。本法常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*)。

二、干热灭菌法

本法系指将物品置于干热灭菌柜、隧道灭菌器等设备中、利用干热空气达到杀灭微生物或消除热原物质的方法。适用于耐高温但不宜用湿热灭菌法灭菌物品的灭菌，如玻璃器具、金属制容器、纤维制品、固体试药、液状石蜡等均可采用本法灭菌。

干热灭菌条件一般为 $160\sim 170^{\circ}\text{C}\times 120\text{min}$ 以上、 $170\sim 180^{\circ}\text{C}\times 60\text{min}$ 以上或 $250^{\circ}\text{C}\times 45\text{min}$ 以上，也可采用其他温度和时间参数。无论采用何种灭菌条件，应保证灭菌后的产品的 $\text{SAL}\leq 10^{-6}$ 。采用干热过度杀灭的物品一般无需进行灭菌前污染微生物的测定。 $250^{\circ}\text{C}\times 45\text{min}$ 的干热灭菌也可除去无菌产品包装容器及有关生产灌装用具中的热原物质。

采用干热灭菌时，被灭菌物品应有适当的装载方式，不能排列过密，以保证灭菌的有效性和均一性。

干热灭菌法应确认灭菌柜中的温度分布符合设定的标准及确定最冷点位置等。常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*)。细菌内毒素灭活验证试验是证明除热原过程有效性的试验。一般将不小于 1000 单位的细菌内毒素加入待去热原的物品中，证明该去热原工艺能使内毒素至少下降 3 个对数单位。细菌内毒素灭活验证试验所用的细菌内毒素一般为大肠杆菌内毒素 (*Escherichia coli* endotoxin)。

三、辐射灭菌法

本法系指将灭菌物品置于适宜放射源辐射的 γ 射线或适宜的电子加速器发生的电子束中进行电离辐射而达到杀灭微生物的方法。本法最常用的为 $^{60}\text{Co}-\gamma$

射线辐射灭菌。医疗器械、容器、生产辅助用品、不受辐射破坏的原料药及成品等均可用本法灭菌。

采用辐射灭菌法灭菌的无菌物品其 SAL 应 $\leq 10^{-6}$ 。 γ 射线辐射灭菌所控制的参数主要是辐射剂量(指灭菌物品的吸收剂量)。该剂量的制定应考虑灭菌物品的适应性及可能污染的微生物最大数量及最强抗辐射力,所使用的剂量事先应验证不影响被灭菌物品的安全性、有效性及稳定性。常用的辐射灭菌吸收剂量为 25kGy。对最终产品、原料药、某些医疗器材应尽可能采用低辐射剂量灭菌。灭菌前,应对被灭菌物品微生物污染的数量和抗辐射强度进行测定,以评价灭菌过程赋予该灭菌物品的无菌保证水平。对于已设定的剂量,应定期审核,以验证其有效性。

灭菌时,应采用适当的化学或物理方法对灭菌物品吸收的辐射剂量进行监控,以充分证实灭菌物品吸收的剂量是在规定的限度内。如采用与灭菌物品一起被辐射的放射性剂量计,剂量计要置于规定的部位。在初安装时剂量计应用标准源进行校正,并定期进行再校正。

^{60}Co - γ 射线辐射灭菌法常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus pumilus*)。

四、气体灭菌法

本法系指用化学消毒剂形成的气体杀灭微生物的方法。常用的化学消毒剂为环氧乙烷、气态过氧化氢、甲醛、臭氧(O_3)等,本法适用于在气体中稳定的物品灭菌。采用气体灭菌法时,应注意灭菌气体的可燃可爆性、致畸性和残留毒性。

本法中最常用的气体是环氧乙烷,一般与 80%~90%的惰性气体混合使用,在充有灭菌气体的高压腔室内进行。该法可用于医疗器械,塑料制品等不能采用高温灭菌的物品灭菌。含氯的物品及能吸附环氧乙烷的物品则不宜使用。

采用环氧乙烷灭菌时,灭菌柜内的温度、湿度、灭菌气体浓度、灭菌时间是影响灭菌效果的重要因数。可采用下列灭菌条件:

温度	$(54 \pm 10) ^\circ\text{C}$
相对湿度	$(60 \pm 10) \%$
灭菌压力	$8 \times 105\text{Pa}$
灭菌时间	90min

灭菌条件应予验证。灭菌时，将灭菌腔室先抽成真空，然后通入蒸汽使腔室内达到设定的温湿度平衡的额定值，再通入经过滤和预热的环氧乙烷气体。灭菌过程中，应严密监控腔室的温度、湿度、压力、环氧乙烷浓度及灭菌时间。必要时使用生物指示剂监控灭菌效果。本法灭菌程序的控制具有一定难度，整个灭菌过程应在技术熟练人员的监督下进行。灭菌后，应采取新鲜空气置换，使残留环氧乙烷和其他易挥发性残渣消散。并对灭菌物品中的环氧乙烷残留物和反应产物进行监控，以证明其不超过规定的浓度，避免产生毒性。

采用环氧乙烷灭菌时，应进行泄漏试验，以确认灭菌腔室的密闭性。灭菌程序确认时，还应考虑物品包装材料和灭菌腔室中物品的排列方式对灭菌气体的扩散和渗透的影响。生物指示剂一般采用枯草芽孢杆菌孢子（Spores of *Bacillus subtilis*）。

五、过滤除菌法

本法系利用细菌不能通过致密具孔滤材的原理以除去气体或液体中微生物的方法。常用于气体、热不稳定的药品溶液或原料的除菌。

除菌过滤器采用孔径分布均匀的微孔滤膜作过滤材料，微孔滤膜分亲水性和疏水性两种。滤膜材质依过滤物品的性质及过滤目的而定。药品生产中采用的除菌滤膜孔径一般不超过 $0.22\ \mu\text{m}$ 。过滤器的孔径定义来自过滤器对微生物的截留，而非平均孔径的分布系数。所以，用于最终除菌的过滤器必须选择具有截流实验证明的除菌级过滤器。过滤器对滤液的吸附不得影响药品质量，不得有纤维脱落，禁用含石棉的过滤器。过滤器的使用者应了解滤液过滤过程中的析出物性质、数量并评估其毒性影响。滤器和滤膜在使用前应进行洁净处理，并用高压蒸汽进行灭菌或作在线灭菌。更换品种和批次应先清洗滤器，再更换滤芯或滤膜或直接更换滤器。

过滤过程中无菌保证与过滤液体的初始生物负荷及过滤器的对数下降值 LRV（Log reduction value）有关。LRV 系指规定条件下，被过滤液体过滤前的微生物数量与过滤后的微生物数量比的常对数值。即：

$$\text{LRV} = \lg N_0 - \lg N$$

式中 N_0 为产品除菌前的微生物数量。

N 为产品除菌后的微生物数量。

LRV 用于表示过滤器的过滤除菌效率，对孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的过滤器而言，要求每 1cm^2 有效过滤面积的 LRV 应不小于 7。因此过滤除菌时，被过滤产品总的污染量应控制在规定的限度内。为保证过滤除菌效果，可使用两个除菌级的过滤器串连过滤，或在灌装前用过滤器进行再次过滤。

在过滤除菌中，一般无法对全过程中过滤器的关键参数(滤膜孔径的大小及分布，滤膜的完整性及 LRV)进行监控。因此，在每一次过滤除菌前后均应作滤器的完整性试验，即气泡点试验或压力维持试验或气体扩散流量试验，确认滤膜在除菌过滤过程中的有效性和完整性。完整性的测试标准来自于相关细菌截留实验数据。除菌过滤器的使用时间应进行验证，一般不应超过一个工作日。

过滤除菌法常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)。

通过过滤除菌法达到无菌的产品应严密监控其生产环境的洁净度，应在无菌环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其他物品应采用适当的方法进行灭菌，并防止再污染。

六、无菌生产工艺

无菌生产工艺系指必须在无菌控制条件下生产无菌制剂的方法，无菌分装及无菌冻干是最常见的无菌生产工艺。后者在工艺过程中应采用过滤除菌法。

无菌生产工艺应严密监控其生产环境的洁净度，并应在无菌控制的环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其他物品应采用适当的方法进行灭菌，并防止被再次污染。

无菌生产工艺过程的无菌保证应通过培养基无菌灌装模拟试验验证。在生产过程中，应严密监控生产环境的无菌空气质量、操作人员的素质、各物品的无菌性。

无菌生产工艺应定期进行验证，包括对环境空气过滤系统有效性验证及培养基模拟灌装试验。

生物指示剂

生物指示剂系一类特殊的活微生物制品，可用于确认灭菌设备的性能、灭菌程序的验证、生产过程灭菌效果的监控等。用于灭菌验证中的生物指示剂一般是细菌的孢子。

1、制备生物指示剂用微生物的基本要求

不同的灭菌方法使用不同的生物指示剂，制备生物指示剂所选用的微生物必须具备以下特性：

- (1) 菌种的耐受性应大于需灭菌产品中所有可能污染菌的耐受性。
- (2) 菌种应无致病性。
- (3) 菌株应稳定。存活期长，易于保存。
- (4) 易于培养。若使用休眠孢子，生物指示剂中休眠孢子含量要在 90% 以上。

2. 生物指示剂的制备

生物指示剂的制备应按一定的程序进行，制备前，需先确定所用微生物的特性，如 D 值（微生物的耐热参数，系指一定温度下，将微生物杀灭 90% 所需的时间，以分表示）等。菌株应用适宜的培养基进行培养。培养物应制成悬浮液，其中孢子的数量应占优势，孢子应悬浮于无营养的液体中保存。

生物指示剂中包含一定数量的一种或多种孢子，可制成多种形式，通常是将一定数量的孢子附着在惰性的载体上，如滤纸条、玻片、不锈钢、塑料制品等；孢子悬浮液也可密封于安瓿中；有的生物指示剂还配有培养基系统。D 值除与灭菌条件相关外，还与微生物存在的环境有关。因此，一定形式的生物指示剂制备完成后，应测定 D 值和孢子总数。生物指示剂应选用合适的材料包装，并设定有效期。载体和包装材料在保护生物指示剂不致污染的同时，还应保证灭菌剂穿透并能与生物指示剂充分接触。载体和包装的设计原则是便于贮存、运输、取样、转移接种。

有些生物指示剂可直接将孢子接种至液体灭菌物或具有与其相似的物理和化学特性的替代品中。使用替代品时，应用数据证明二者的等效性。

3. 生物指示剂的应用

在灭菌程序的验证中，尽管可通过灭菌过程某些参数的监控来评估灭菌效果，但生物指示剂的被杀灭程度，则是评价一个灭菌程序有效性最直观的指标。可使用市售的标准生物指示剂，也可使用由日常生产污染菌监控中分离的耐受性最强的微生物制备的孢子。在生物指示剂验证试验中，需确定孢子在实际灭菌条件下的 D 值，并测定孢子的纯度和数量。验证时，生物指示剂的微生物用量应比日常检出的微生物污染量大，耐受性强，以保证灭菌程序有更大的安全性。在最终灭菌法中，生物指示剂应放在灭菌柜的不同部位。并避免指示剂直接接触到的被

灭菌物品。生物指示剂按设定的条件灭菌后取出，分别置培养基中培养，确定生物指示剂中的孢子是否被完全杀灭。

过度杀灭产品灭菌验证一般不考虑微生物污染水平，可采用市售的生物指示剂。对灭菌手段耐受性差的产品，设计灭菌程序时，根据经验预计在该生产工艺中产品微生物污染的水平，选择生物指示剂的菌种和孢子数量。这类产品的无菌保证应通过监控每批灭菌前的微生物污染的数量、耐受性和灭菌程序验证所获得的数据进行评估。

4. 常用生物指示剂

(1) **湿热灭菌法** 湿热灭菌法最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*, 如 NCTC 10 007、NCIMB8157、ATCC 7953)。D 值为 1.5~3.0min，每片(或每瓶)活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个，在 121℃、19min 下应被完全杀灭。此外，还可使用生孢梭菌孢子 (Spores of *Clostridium sporogenes* 如 NCTC 8594、NCIMB 8053、ATCC 7955)，D 值为 0.4~0.8min。

(2) **干热灭菌法** 干热灭菌法最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*, 如 NCIMB 8058、ATCC 9372)。D 值大于 1.5min，每片活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个。去热原验证时使用大肠埃希菌内毒素 (*Escherichia coli* endotoxin)，加量不小于 1000 细菌内毒素单位。

(3) **辐射灭菌法** 辐射灭菌法最常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus pumilus*, 如 NCTC 10 327、NCIMB10 692、ATCC 27142)。每片活孢子数 $10^7 \sim 10^8$ ，置于放射剂量 25kGy 条件下，D 值约 3kGy。但应注意灭菌产品中所负载的微生物可能比短小芽孢杆菌孢子显示更强的抗辐射力。因此短小芽孢杆菌孢子可用于监控灭菌过程，但不能用于灭菌辐射剂量建立的依据。

(4) **气体灭菌法** 环氧乙烷灭菌最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus subtilis*, 如 NCTC 10 073、ATCC 9372)。气态过氧化氢灭菌最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (Spores of *Bacillus stearothermophilus*, 如 NCTC10 007、NCIMB 8157、ATCC 7953)。每片活孢子数 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个。环氧乙烷灭菌中，枯草芽孢杆菌孢子 D 值大于 2.5min，在环氧乙烷浓度为 600mg / L，相对湿度为 60%，温度为 54℃下灭菌，60min 应

被杀灭。

(5) **过滤除菌法** 过滤除菌法最常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*, 如 ATCC19 146), 用于滤膜孔径为 0.22 μm 的滤器; 黏质沙雷菌 (*Serratia marcescens*) (ATCC14 756), 用于滤膜孔径为 0.45 μm 的滤器。