

附件 1：药品污染菌耐受性检查指导原则公示稿（第 1 次）

1

药品污染菌耐受性检查指导原则

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

无菌物品是指物品中不含任何活的微生物，其无菌特性一般通过物品中活微生物的概率来表述，即非无菌概率（PNSU）或无菌保证水平（SAL）。在药品灭菌中，污染菌的耐受性是指微生物抵抗灭菌作用的能力，可以用 D 值来表示。D 值是指将微生物杀灭 90%所需的灭菌时间或灭菌剂量。在药品生产时，应关注污染菌的耐受性对灭菌工艺的挑战，以保证所采用的灭菌工艺能够彻底杀灭可能存在的微生物，并达到预期的无菌保证水平。

本指导原则主要用于指导湿热灭菌物品中的污染菌的耐受性检查，其它灭菌或除菌方法亦应关注微生物的耐受性并开展相关研究和评估工作，以保证灭菌工艺的有效性。

被灭菌物品的 PNSU 由公式（1）计算（以湿热灭菌为例）。

$$\lg N_F = \lg N_0 - \frac{F_{(T,Z)}}{D_T} \tag{1}$$

(1)式中，

N_F : 灭菌后的微生物数量

N_0 : 灭菌前的微生物数量

$F_{(T,Z)}$: 假设温度系数为 Z，在 T 温度下的等效灭菌时间

D_T : 微生物在温度 T 下的耐受性

经最终灭菌工艺处理的无菌物品的 PNSU 不得高于 10^{-6} 。已灭菌物品的 PNSU 与灭菌后的微生物数量 N_F 相对应。如公式（1），PNSU 的值与灭菌时间、灭菌前的微生物数量以及微生物的耐受性相关。因此，在进行灭菌工艺研究、灭菌验证或日常监控时，需要对生产或检验过程中分离的污染微生物进行耐受性的

监测和评估,从而证明采用的灭菌工艺能够杀灭可能存在的微生物并有一定的冗余,使被灭菌物品的 PNSU 达到预期。

药品污染菌的耐受性评估包括芽孢筛查、沸水浴耐热性评估以及 D 值测定,可以根据实际情况选择上述一种或多种方法。

芽孢筛查

芽孢筛查是通过一定程度的热处理,杀灭细菌营养体后进行培养,从而判断是否有芽孢存在于样品中。

参考非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则 1105)制备供试液(液体供试品可直接使用供试品原液)置于适当的容器内,70℃加热 30min 后迅速冷却,采用薄膜过滤法处理,将滤膜接种至胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基,或将热处理后的供试液直接接种至适宜体积的胰酪大豆胨液体培养基中(接种量不得超过培养基总体积的 10%),30~35℃培养 5~7 天。也可使用其它经确认的热处理和培养方法。

在进行芽孢筛查之前,应考虑待测样品抗菌活性,如有必要,参考非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则 1105)和控制菌检查法(通则 1106),采用枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63 501]或其它耐热性芽孢开展方法适用性试验。

枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B)63 501]的芽孢悬液制备照药品微生物实验室消毒剂效力评估指导原则(指导原则 9210)。

经过培养后如有菌生长,应进行分离纯化,并进行适当水平的鉴定,如判断为含芽孢的细菌,应进行沸水浴耐热性评估或 D 值测定。

沸水浴耐热性评估

进行沸水浴耐热性评估试验时,可以直接对供试液进行沸水浴处理,也可以采用薄膜过滤法对供试液处理后,取滤膜置液体培养基(或其他溶液)中再进行沸水浴处理。

在进行沸水浴评估试验之前,应考虑待测样品抗菌活性,如有必要,参考非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法(通则 1105)和控制菌检查法(通则

1106), 采用枯草芽孢杆菌 [CMCC(B)63 501] 或其它耐热性芽孢开展方法适用性
试验。芽孢悬液制备同芽孢筛查。

以下沸水浴耐热性评估法可以根据实际情况进行适当调整,也可以使用其它
经过验证的方法。

沸水浴耐热性评估法一

取被灭菌物品制备成供试液 (或直接取待测溶液) 经过沸水浴 (95~100℃)
加热一定时间后, 采用胰酪大豆胨琼脂培养基或胰酪大豆胨液体培养基于
30~35℃ 培养 5~7 天。建议进行系列时间的沸水浴处理, 选取呈阳性结果最长的
时间, 按照表 1 估算其 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 值。

一般情况下, 该方法得到的 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 值高于其实际值。这一情况考虑到了灭菌
工艺的冗余, 为灭菌工艺验证或灭菌工艺监测提供了安全保障。

表 1 沸水浴评估法一的 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 估计值 (min)

呈阳性结果的沸水浴 (95~100℃) 处理 时间 (min)	$D_{121^{\circ}\text{C}}$ 估计值 (min)
10	≥ 0.1
20	≥ 0.2
30	≥ 0.3
40	≥ 0.4
50	≥ 0.5
60	≥ 0.6
70	≥ 0.7
80	≥ 0.8
90	≥ 0.9
100	≥ 1.0

沸水浴耐热性评估法二

本方法考虑到了初始芽孢数量, 根据沸水浴处理后阳性和阴性结果的数量对
121℃ 下的 D 值进行估算。以下给出计算公式 (2)、一定条件下的估算结果 (表
2) 以及试验步骤。

沸水浴处理一定时间后对应的 121℃ 下的 D 值估算使用公式 (2)。

82 管数计算得到 $D_{121^{\circ}\text{C}}$ 估计值。

83 D 值测定

84 将分离的含芽孢细菌制备芽孢悬液，置于适当的容器中。按照生物指示剂耐
85 受性检查法指导原则（指导原则 9208）的阴性分数法或残存曲线法进行 D 值测
86 定。根据需求选择测试温度，通常可以选择低于 121°C 的温度。

87

88 起草单位：中国食品药品检定研究院 联系电话：010-67095695

89 参与单位：上海市药品检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、广西壮族
90 自治区药品检验研究院、四川省药品检验研究院、陕西省食品药品检验研究院、
91 宁夏回族自治区药品检验研究院、新疆维吾尔自治区药品检验研究院、广州市药
92 品检验所、苏州市药品检验检测研究中心、苏州百特医疗用品有限公司、费森尤
93 斯卡比华瑞制药有限公司、四川科伦药业股份有限公司

附件 2：药品污染菌耐受性检查指导原则起草说明

94 **药品污染菌耐受性检查指导原则起草说明**

95 **一、目的意义**

96 药品污染菌耐受性的研究和评估直接影响灭菌工艺的有效性,对达到一定的
97 无菌保证水平至关重要。被灭菌物料中污染的微生物（包括芽孢）来源广泛，其
98 对灭菌工艺的耐受性未知。以湿热灭菌为例，根据灭菌工艺的杀灭程度不同，应
99 制定灭菌前料液中生物负载的耐热性研究策略。目前国内外标准法规都要求在灭
100 菌工艺开发、验证和日常监控时应考虑污染菌的耐受性，但是具体的检测和评估
101 方法仅有美国药典 2025 年第 3 版通则 56 “灭菌工艺过程中微生物的耐受性检测
102 方法”收载。因此，为了指导行业开展微生物的耐受性研究和评估工作，保证灭
103 菌工艺的有效性，国家药典委员会微生物专业委员组织起草了《药品污染菌耐受
104 性检查指导原则》。

105 **二、起草过程**

106 本指导原则起草依托 2024 年药品标准提高项目“药品污染菌耐受性检测指
107 导原则的研究（课题编号：2024Y17）”，由中国食品药品检定研究院牵头，上
108 海市药品检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、广西壮族自治区药品检验研
109 究院、四川省药品检验研究院、陕西省食品药品检验研究院、宁夏回族自治区药
110 品检验研究院、新疆维吾尔自治区药品检验研究院、广州市药品检验所、苏州市
111 药品检验检测研究中心、苏州百特医疗用品有限公司、费森尤斯卡比华瑞制药有
112 限公司、四川科伦药业股份有限公司等单位参与起草。课题组通过开展药典标准、
113 文献法规比对研究；对药品生产企业进行调研；开展芽孢筛查、沸水浴耐热性评
114 估以及 D 值测定的试验研究，确定了指导原则的总体框架和具体试验方法参数，
115 形成了指导原则草稿，进一步根据行业专家的意见进行了修改，形成本指导原则

116 公示稿。

117 三、总体思路

118 根据制药工业和检验机构的实际需求,参考美国药典 2025 年第 3 版通则 56,
119 本指导原则分为四个部分:前言、芽孢筛查、沸水浴耐热性评估和 D 值测定。

120 前言部分强调污染菌耐受性研究和评估的意义和重要性,明确药品污染菌的
121 耐受性评估范围,包括芽孢筛查、沸水浴耐热性评估以及 D 值测定。

122 芽孢筛查部分给出了供试液处理方法、培养基、培养时间以及结果判定,同
123 时,提醒需要考虑供试液抑菌性的去除和开展方法适用性试验。

124 沸水浴耐热性评估包括法一和法二。法一采用制药工业普遍采用沸水浴加热
125 的方法,该方法与美国药典通则 56 收载的方法一致。法二同样是采用沸水浴加
126 热的方法,与法一的不同之处是考虑到了初始芽孢数量,可以通过查表或公式计
127 算得到更准确的数据。通过试验数据确认,当初始芽孢数量小于 10^3cfu 时,法二
128 与法一结果一致。当初始芽孢数量大于等于 10^3cfu 时,法二较法一的估算结果更
129 为准确。

130 D 值测定参考生物指示剂耐受性检查法指导原则(指导原则 9208)进行。