预灌装注射器 VHP 灭菌下容器密封完整性的挑战研究

李玉立，江志杰，牛振东，王　君，张光华*

（北京市药品检验研究院（北京市疫苗检验中心），国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室，
中药成分分析与生物评价北京市重点实验室，北京 102206）

摘要：考察了预灌装注射器在隔离系统汽化过氧化氢（VHP）灭菌过程中的容器密封完整性，并对其潜在风险进行探讨。将金黄色葡萄球菌菌液加至预灌装注射器中，按无菌检查的方式置隔离器中，采用已验证的无菌检查 VHP 灭菌方式进行表面灭菌，同时以紫外（UV）灭菌作为对照试验，对经 2 种灭菌方式处理的预灌装注射器内容物进行细菌计数。结果显示，VHP 灭菌方式下，部分企业使用的预灌装注射器容器密封完整性被破坏，内容物中的金黄色葡萄球菌死亡率高达 90%。表明此类预灌装注射器在进行 VHP 灭菌方式的无菌检查时，VHP 会透过包装系统进入内部，灭活待测样品中可能存在的微生物。

关键词：无菌检查；容器密封完整性；VHP 灭菌；预灌装注射器；假阴性

中图分类号：R917；R927　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2022）07-1009-04

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2022.07.012

Challenge Study of Container Closure Integrity for Prefilled Syringes under VHP Sterilization

LI Yuli, JIANG Zhijie, NIU Zhendong, WANG Jun, ZHANG Guanghua*

（*Beijing Key Lab. of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine, NMPA Key Lab. for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Institute for Drug Control*（*Beijing Center for Vaccine Control*）*, Beijing 102206*）

ABSTRACT: The container closure integrity for prefilled syringes under vaporized hydrogen peroxide（VHP）sterilization in isolators was investigated and its potential risks were discussed. The bacterial solution of *Staphylococcus aureus* was added into the prefilled syringe, then the syringe was placed in the isolator according to the method of sterility inspection. The surface sterilization was carried out by the VHP sterilization method which had been verified. The ultraviolet（UV）sterilization was used as the control experiment, and the bacterial counts were performed on the contents of prefilled syringes with two sterilization methods. The results showed that under the VHP sterilization, the sealing integrity of the prefilled syringe containers was damaged, and the mortality rate of *Staphylococcus aureus* in the contents was 90%. It was showed that when the prefilled syringes were subjected to the sterility inspection of VHP sterilization method, VHP would enter the interior through the packaging system, killing the microorganisms might exist in the tested sample.

Key Words: sterility testing; container closure integrity; VHP sterilization; prefilled syringe; false negative

无菌检查隔离器是为无菌检查提供无菌环境的一种设备，通常采用汽化过氧化氢（vaporized hydrogen peroxide，VHP）灭菌的方式进行待检样品的表面灭菌。无菌检查隔离器灭菌完成后，舱体内部环境的微生物负载应符合 A 级空气洁净度要求，对其灭菌效果的评价包括物品表面的灭菌效果、对物品及待测样品内部微生物的影响程度和灭菌残留物对物品及待测样品微生物的影响程度[1]。无菌产品的包装系统具有防止内容物损失、微生物侵入、

收稿日期：2021-09-23

作者简介：李玉立（1987—），女，主管药师，主要从事药品标准研究及生物制品质量控制研究。

通信作者：张光华（1967—），女，主任药师，主要从事药品标准研究及药品微生物检验检测研究。

E-mail：zhangguanghua2014@126.com

影响产品质量的气体（氧气、空气、水蒸气等）或其他物质进入的能力，其包装完整性即容器密封完整性（container closure integrity，CCI）应符合相关规定。

为保证无菌产品的质量和安全，各国药监部门和机构组织不断升级更新药品包装完整性的监管要求和法规指南，在产品的国际注册和认证过程中，越来越注重包装完整性对无菌保障的影响，目的是通过科学和先进的技术手段来确保产品整个生命周期的安全有效性[2]。本研究主要关注隔离系统中的VHP灭菌对样品包装完整性的影响情况。《中华人民共和国药典》2020年版（ChP 2020）无菌检查用隔离系统验证和应用指导原则（9206）在关于隔离系统的应用中明确列出“包装完整性验证”，提到灭菌剂对某些包装物会产生不利影响，建议用化学和微生物挑战试验测试包装物对灭菌剂渗透的抵制能力。灭菌剂对包装物产生不利影响的样品，其内部微生物的生长可能会被抑制，存在假阴性风险[3]。现有研究表明，由于VHP具有极强的氧化性，呼吸袋、单层聚乙烯（PE）袋在进行VHP灭菌时均可被穿透[4]。

预灌装注射器通常为小容量注射剂无菌药品的包装密封形式，以专用灌装机将药液直接灌装在针管中，针管前端有预先装好针头和保护针头的塑料针帽，针管灌装入药液后，再用可与推杆配合连接的弹性活塞加塞密封[5]。预灌装注射器在生产过程中进行了严格的CCI检查和控制，但在进行无菌检查时，表面灭菌的循环过程是在一定的舱体压力和强氧化性气体VHP的共同作用下进行的，存在CCI被破坏的可能性[6]。VHP可能会穿透胶塞，进入包装内部，最终影响供试品中低水平微生物污染的检出结果。

因此，本试验选取3家企业使用的预灌装注射器，灌装确定浓度和体积的菌液作为生物指示剂，经VHP灭菌后进行菌落计数以确认微生物的存活情况，以期为此类产品的无菌检查及挑战性试验研究提供参考。

1　仪器与试药

CH-4123型无菌检查隔离器（瑞士SKAN AG公司）；KB720型生化培养箱（德国BINDER公司）；电DMXD-0.36型热脉动真空灭菌器（山东新华制药医疗器械股份有限公司）；1300系列A2型生物安全柜（美国Thermo Fisher Scientific公司）。

胰酪大豆胨液体培养基（批号20200618）和胰酪大豆胨琼脂培养基（批号20200618）均购于美国BD公司；0.9%氯化钠注射液（石家庄四药有限公司，规格500 ml，批号1905033202）；生物指示剂（美国TOOSKA公司，批号G0601）；预灌装注射器（A、B、C，分别来自不同企业）。

金黄色葡萄球菌［*Staphylococcus aureus*，CMCC（B）26003，中国食品药品检定研究院医学微生物菌种保藏中心，菌株传代数为第Ⅲ代］。

2　方法与结果

2.1　无菌检查隔离器VHP灭菌效果的确认

采用SCAN无菌检查隔离器进行VHP灭菌效果确认。灭菌时VHP高浓度约为1.24×10^{-3}，灭菌完成通风结束后，VHP浓度为0。在隔离器的腔体内放入VHP灭菌化学指示卡和生物指示剂（嗜热脂肪地芽孢杆菌，生物指示剂布点位置见图1）。

灭菌过程初始化参数：相对湿度（RH）≤20.0%；温度<40.0 ℃；过氧化氢溶液浓度50.0%～50.7%；过氧化氢每泵投料速率4.0～5.0 g/min。

隔离器参数：时间参数（开始30 s，初始化100 s，补气7 200 s，负压补气7 200 s，紧急模式300 s，检漏保压300 s，泄露测量60 s）；加药参数（主加药70 g，再加药7 g，加药次数11）；隔离器允许泄露值 435 ml/min；综合允许泄露量 435 ml/min。

参照ChP 2020四部通则9207，根据化学指示卡是否变色、生物指示剂灭菌后是否下降3～6个对数值来验证表面灭菌效果。结果显示，灭菌后化学指示卡全部变色；布点位置1～27的生物指示剂经胰酪大豆胨液体培养基（55 ℃）培养7 d后，均无菌生长，符合药典要求；而阳性对照（没有经过灭菌的生物指示剂）有菌生长，即表明设定的灭菌参数能够保证隔离器内的无菌环境。

2.2　金黄色葡萄球菌挑战试验

2.2.1　菌液制备

使用0.9%氯化钠注射液制备一定浓度的金黄色葡萄球菌菌液，使每1 ml菌液中的含菌量为

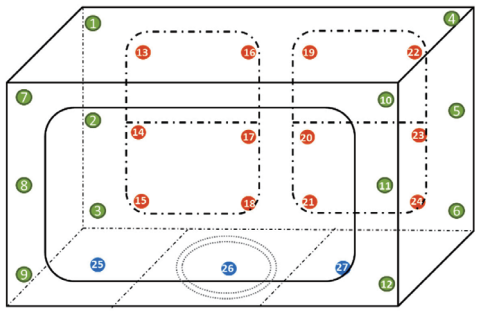


图 1 生物指示剂布点图

Fig.1 Positions of Biological Indicators

30 ～ 100 cfu。

2.2.2 培养基的适用性检查

所有培养基均在验证合格的灭菌程序下灭菌，并按 ChP 2020 四部通则 1105 微生物计数法进行培养基的适用性检查，结果均符合要求。

2.2.3 微生物计数

选取 A、B、C 3 种不同的预灌装注射器，每种 10 支。将制备好的菌液以抽吸的方式定量灌入注射器。根据预灌装注射器的刻度标识，灌装不同体积的菌液，其中注射器 A 每支灌装菌液 0.8 ml，注射器 B 和注射器 C 每支灌装菌液 1 ml。灌装完成时，取 A、B、C 3 种预灌装注射器各 10 支进行零时计数，结果显示，A、B、C 3 种预灌装注射器零时的微生物计数结果平均值（n=10）分别为 65、82、76 cfu，RSD 分别为 10.4%、7.8%、9.9%。

2.3 VHP 对预灌装注射器中菌液的影响

取 A、B、C 3 种预灌装注射器各 40 支，随机选取 A、B、C 3 种预灌装注射器各 20 支作为第 1 组（A-1、B-1、C-1），另外 20 支作为第 2 组（A-2、B-2、C-2）。将第 1 组放入隔离器进行 VHP 灭菌；同时将第 2 组置生物安全柜中，紫外（UV）照射灭菌 30 min，作为对照组。6 h 后 VHP 灭菌过程结束，将 2 组分别计数。结果显示，A-1、B-1、C-1 组的微生物平均值（n=20）分别为 52、83、8 cfu，RSD 分别为 13.6%、14.8%、161%，总数分别为 1 038、1 668、171 cfu；A-2、B-2、C-2 组的微生物平均值（n=20）分别为 55、82、80 cfu，RSD 分别为 13.0%、13.2%、10.5%，总数分别为 1 093、1 644、1 597 cfu。

根据上述结果，绘制微生物计数结果的均值对比图（图 2），观察到 A 和 B 2 种预灌装注射器在经 VHP 灭菌循环后，菌液计数结果的总数和平均值与零时数据及对照组均无显著差异。但是，预灌装注射器 C 在经历 VHP 灭菌循环后，微生物计数结果的总数和平均值与零时数据及对照组相比，显著降低，绝对值约为零时和对照组的 1/10，其内部微生物致死率约为 90%。表明预灌装注射器 C 的容器密封完整性与预灌装注射器 A 和 B 存在显著性差异。A、B 2 种预灌装注射器在该 VHP 灭菌循环条件下，菌液计数结果显示灭菌前后的菌液浓度基本无变化，说明在此过程中 VHP 未能穿透胶塞，或穿透较少，未影响其内部微生物活性。而预灌装注射器 C 在该表面灭菌循环条件下，菌液计数结果显示灭菌后的菌液浓度显著降低，表明在该表面灭菌循环过程中，VHP 穿透了包装系统，预灌装注射器 C 的容器密封完整性被破坏，最终影响了内部微生物的状态。

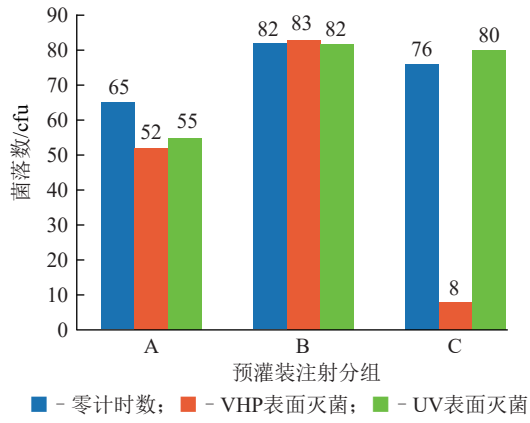


图 2 金黄色葡萄球菌挑战试验的菌落计数对比图

Fig.2 Comparison Chart for Colony Counts in *Staphylococcus aureus* Challenge Test

此外，隔离器 VHP 灭菌过程中，舱体内的压力也会对灭菌剂的渗透有一定影响，压力较大时，VHP 的穿透力较正常压力下会更大。本试验中采用的 SCAN 无菌隔离器在整个表面灭菌循环中，具体的压力值情况为泄露测试 50 ～ 130 Pa，预消毒准备、

预消毒、消毒起效过程、负压补气、补气（通风）均为 50 ～ 70 Pa，整个过程的压力值都处在较高水平，可能在一定程度上促进了灭菌剂的渗透。

3 讨论

3.1 挑战性试验菌的选择

嗜热脂肪地芽孢杆菌对 VHP 的耐受程度较高，常作为灭菌循环验证的生物指示剂。同时，金黄色葡萄球菌是制药生产环境和检验环境的一种常见微生物，具有一定的代表性，因此，选择金黄色葡萄球菌作为挑战性试验菌进行容器密封完整性考察，以区分不同品牌预灌装注射器密封完整性的优劣。

3.2 假阳性和假阴性

在无菌检查过程中，本研究做了大量工作以确保没有假阳性情况的发生，避免样品污染，如采取过度消毒的方式等。但是，在过度追求避免假阳性的同时，会增大假阴性的发生概率，作为安全性检查试验，假阴性的出现比假阳性的风险和产生的危害更大。

在使用无菌检查用隔离器进行无菌检查的过程中，常遇到的假阴性情况包括残留灭菌剂的影响和表面灭菌过程中包装完整性被破坏，试验用培养基过度灭菌使营养被破坏以及方法适用性试验没有充分消除产品的抑菌作用[7]。为避免出现前 2 种假阴性情况，可采取的措施有：①改用密封完好的包装方式或采用耐受性的包装材料；②改变 VHP 灭菌参数，在保证表面彻底灭菌的前提下，降低灭菌剂的浓度或缩短表面灭菌周期。

总之，没有一种“表面灭菌循环”适合所有种类的待测样品，灭菌方法的选择应基于具体情况综合考虑，针对存在二次灭菌风险的样品，应实施“定制方案”，针对每一种样品进行相关的表面灭菌循环的试验设计，并对相应的表面灭菌循环进行充分验证。同时，应评估样品是否适合在隔离器中进行无菌检查，对于不适合的样品可以选择传统的 B+A 洁净室进行无菌检查。

参考文献：

[1] 罗辉艳, 严东珍, 刘家媛, 等. 无菌隔离器灭菌效果研究[J]. 中国设备工程, 2017, (6): 78-79.

[2] 封二飞. 无菌药品包装完整性研究[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(11): 1352-1357.

[3] 厉高憨, 潘伟婧, 陈　钢, 等. 中国药典2020年版无菌检查用隔离系统验证和应用指导原则修订概况[J]. 中国现代应用药学, 2021, **38**(6): 641-645.

[4] 刘向东, 梁开宇, 邓　启, 等. 隔离器VHP灭菌时呼吸袋及储液袋穿透性探究[J]. 中国医药工业杂志, 2018, **49**(11): 1591-1594.

[5] 姚玉成. 预灌装注射器药品生产车间设计若干问题的探讨[J]. 化工与医药工程, 2020, **41**(1): 24-30.

[6] 马骏威, 郭涤亮, 刘　涓, 等. 胶塞/玻璃瓶容器密封完整性研究的探讨[J]. 中国新药杂志, 2021, **30**(5): 394-398.

[7] 国家药典委员会. 中国药典分析检测技术指南[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2017.