

团 体 标 准

T/ZJPA002—2023

# 注射剂包装密封性检查 微生物挑战：浸入式暴露试验要求

Package Integrity Testing of Parenteral Products - Microbial Challenge Test:  
Requirement for Testing by Immersion

2024-01-23发布

2024-02-01 实施

浙江省医药行业协会 发布

## 目 次

前言	II
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 质量管理体系	2
5 方法原理	3
6 挑战容器	3
7 挑战微生物、培养基及培养条件的选择	4
8 样品准备	4
9 取样原则	4
10 挑战悬液制备	5
11 暴露试验条件	5
12 试验程序概述	6
13 可接受标准及结果判定	7
附录 A（资料性） 方法灵敏度验证试验	8
附录 B（资料性） 样品试验及方法灵敏度验证试验流程示例	12
参考文献	14

## 前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本标准不能取代或替代国家对注射剂包装密封完整性的管理要求，例如药品生产管理规范（GMP）、中国药典和/或部分国家或辖区法规的监管要求。

本标准由浙江省医药行业协会提出并归口。

本标准由浙江省台州市食品药品检验研究院牵头组织制定。

本标准主要起草单位：台州市食品药品检验研究院、浙江泰林医学工程有限公司、正大青春宝药业有限公司、浙江海正药业股份有限公司、金华市食品药品检验检测研究院、绍兴市食品药品检验研究院、温州市食品药品检验科学研究院、浙江华海药业股份有限公司、浙江仙琚制药股份有限公司、浙江医药股份有限公司新昌制药厂、杭州中美华东制药有限公司、浙江普洛得邦制药有限公司、浙江普利药业有限公司、浙江赛默制药有限公司。

本标准主要起草人：洪亮、刘子健、潘映秋、夏晓久、张万峰、徐静、赵振波、郑斓、卢启寰、杨芬、凌明、王建东、倪赞、赵丹娜、李凤敏、李林英、徐莎、金龙、于杰、吴妙兰、熊玉琴、夏厚林

# 注射剂包装密封性检查 微生物挑战：浸入式暴露试验要求

## 1 范围

本标准规定了使用浸入式微生物暴露试验法进行非透气性注射剂包装系统密封性检查或验证时宜满足的通用要求，并为其提供指南。

本标准适用于注射剂及部分无菌制剂（如滴眼剂、烧伤制剂等）非透气性包装容器的密封性及密封工艺的研究和验证，以及微生物侵入的风险评估；其中给出的原则及要求可供药品生产企业、检验机构及科研单位参考。

本标准适用于密封性检测方法的灵敏度对比研究。

本标准不适用于注射剂最终产品的常规放行检查、在线监测及在线检测。

## 2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

本部分没有规范性引用文件。

## 3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

### 3.1 最大允许泄漏限值 Maximum Allowable Leak Limit, MALL

包装容器中允许存在的不会对产品质量造成风险的最大孔隙或泄露率。

### 3.2 促生长试验 growth promotion test

用于证明培养基具备微生物生长促进能力的试验。

### 3.3 人工打孔样品 artificially-defected test article

通过人工手段在包装上引入了一定孔径漏孔（或同等泄漏率）的试验样品，用于方法灵敏度验证试验。

### 3.4 包装密封性 package integrity

包装系统防止内容物损失、微生物侵入以及气体（氧气、空气、水蒸气等）或其他物质进入，保证药品持续符合安全与质量要求的能力，又称容器密封完整性（container-closure integrity）。

### 3.5 包装密封性检查 package integrity test

用于检测包装容器中是否存在泄漏缺陷的试验。

### 3.6 确定性泄漏检测法 deterministic leak test method

根据一系列连续的可预知事件最终导致的结果来检测或测量泄漏的方法。此类泄漏检测手段以易于控制并监测的理化技术为基础，能得出客观的量化数据。

### 3.7 概率性泄漏检测法 probabilistic leak test method

与确定性泄漏检测法相对的具有随机性的泄漏检测方法。概率性检测法依赖于一系列连续和/或同时发生的事件，这些事件产生的随机结果可用概率分布描述。

### 3.8 挑战悬液 challenge solution

选定用于浸入式暴露试验的微生物悬液。

### 3.9 微生物活性阳性对照 viability-based positive control

直接接种有挑战微生物的试验样品，用于确认整个试验过程中的挑战微生物的活性。

### 3.10 泄漏缺陷阳性对照 defect-based positive control

方法灵敏度验证中设置的具有较大泄漏孔径的对照样品。孔径尺寸可通过预实验确定，保证挑战微生物能通过该漏孔侵入包装容器。

### 3.11 阴性对照 negative control

包装密封性完整并因此不会发生微生物侵入的预设试验样品。

## 4 质量管理体系

包装容器密封性是保障注射剂产品质量、安全性及稳定性的关键因素。为确保浸入式暴露法测试在应用于注射剂包装容器开发、验证及常规检测时始终满足本标准要求，宜建立适用的可认证的试验规程或质量管理体系。与本标准相关的程序包括但不限于：

- 文件及记录的控制；
- 适当资源的供应，包括合格人力资源和基础设施；
- 外部机构供应产品的控制；

- 整个过程中产品的识别及可追溯性；
- 不合格品控制及处置；
- 试验仪表仪器的校准；
- 人员的培训；
- 环境及污染的控制。

## 5 方法原理

浸入式暴露试验通过将灌装有适当培养基的注射剂包装容器浸至挑战微生物悬液，使微生物能沿着容器潜在的漏路进入容器内的培养基中，然后将该容器移入适当培养条件，并在该条件下进行规定时长的培养；培养结束后，观察容器内部培养基是否出现微生物生长，从而判定该包装容器是否存在可允许微生物侵入的漏路（即包装完整性）。试验过程中，可对实验参数（如试验压力/真空度、浸没暴露时长、试验温度）进行调节，以模拟包装容器在运输、储存或工艺中实际可能出现的不同条件。

本方法为概率性泄漏检测方法。与无菌检测方法一样，限定数量的样品的阴性检测结果并不能保证同一批次所有产品都为阴性；因此，本方法在应用于产品检测前，必须进行验证。

## 6 挑战容器

用于浸入式暴露挑战的挑战容器应至少满足以下要求：

- 挑战容器宜能提供充足的挑战悬液及样品的容纳空间，保证样品的漏路位置能完全浸没于挑战悬液中。
- 挑战容器宜能保证挑战悬液分布均匀性，并能保持适当的挑战温度。
- 挑战容器宜具备良好的密封性能及压力耐受性，可施加并保持试验所需的压差条件。
- 挑战容器宜配置可限制样品活动或可定位样品的固定装置，以保证样品潜在的漏点能完全暴露于微生物悬液中。

注：为防止因挑战微生物扩散而污染环境，宜将挑战容器设置在独立的实验室或试验区的密闭环境中进行试验，如生物安全柜（BSC）。

## 7 挑战微生物、培养基及培养条件的选择

### 7.1 挑战微生物的选择

微生物侵入能力很大程度上取决于其运动性和细胞粒径，因此选择挑战微生物时应考虑使用体积较小且有较强运动活力的微生物。常用的挑战微生物包括缺陷短波单胞菌（*Brevundimonas diminuta*）、黏质沙雷菌（*Serratia marcescens*）、萎缩芽孢杆菌（*Bacillus atrophaeus*）等，也可根据实际情况选用其他适用的替代挑战微生物。

### 7.2 培养基及培养条件的选择

应根据选定的挑战微生物来确定适用的培养基及培养条件。所选培养基及培养条件应能满足挑战微生物的充分生长，以便能在阳性对照样品中检出挑战微生物。缺陷短波单胞菌（*Brevundimonas diminuta*）、黏质沙雷菌（*Serratia marcescens*）和萎缩芽孢杆菌（*Bacillus atrophaeus*）通常使用胰酪大豆胨液体培养基（TSB）进行培养。也可使用其他适当的培养基，但无论选择何种培养基和培养条件，都必须通过促生长试验确认所选培养体系的适用性。

## 8 样品准备

### 8.1 样品及材料要求

- a) 样品及材料应可耐受浸入式暴露挑战过程。
- b) 试验前，非固定或可活动产品组件宜使用固定装置来限制扩张或移动。

注：固定装置应能减少柔性包装封口在试验时所承受的压力，并使整个包装封口处压差保持一致。

8.2 试验样品及对照样品可按照供应商的建议进行灭菌。样品所采用的灭菌条件应能代表实际生产工艺中使用的条件。

8.3 应至少设置一组阴性对照样品及微生物活性阳性对照样品（见 3.9）。

8.4 宜按照生产工艺要求通过无菌灌装技术对样品容器进行培养基灌装（关于灌装量的建议见 11, b）。采用最终灭菌工艺的产品，可在灌装完成后进行灭菌。

## 9 取样原则

9.1 由于浸入式微生物挑战试验为概率性泄漏检测法，选择用于试验的样品（包括方法灵敏度验证中使用的人工打孔样品，见附录 A）的样本量宜满足统计分析要求，并足以代表整个产品批次（或分批次）的包装性能。样本量的选择依据宜进行记录。

9.2 试验前宜对样品进行标识，以便操作人员在必要时定位具体的试验样品。信息记录方式应可将测试结果及异常情况追溯至单个样品。

## 10 挑战悬液制备

10.1 使用选定的挑战微生物制备适量的挑战微生物培养液。

注：挑战微生物宜处于对数生长期，以保证其生长及运动活力。

10.2 可将适量挑战微生物加至适量无菌生理盐水（或其他适用的稀释液）中，最终得到预定浓度（见 11, a）的挑战悬液。悬液制备体积应能完全浸没所有待测样品的漏路位置。

浸入式暴露试验开始前及结束后，宜对挑战悬液的微生物浓度进行测定，以确认试验过程中悬液的微生物浓度及生长活力。

## 11 暴露试验条件

暴露试验条件对于方法的灵敏度至关重要。因此，暴露试验条件宜通过对产品实际使用、运输或工艺过程进行风险分析后确定，或者采用实际运输、使用及工艺中可能遇到的最不利条件。其中宜至少包括以下因素：

- a) 挑战悬液微生物浓度：在整个暴露试验过程中，挑战悬液的微生物浓度宜维持预定浓度水平（一般不少于  $10^5$  CFU/mL，通常约为  $10^6$  CFU/mL）。该预定浓度水平宜基于风险评估确定，并在方法验证中加以确认。
- b) 培养基灌装量：样品中培养基的灌装量宜能保证在所有潜在漏点形成液路。同时也宜考虑适当的包装顶空成分及体积，以促进挑战微生物的生长。
- c) 真空/压力条件：试验时宜将样品暴露于与环境存在压差的条件，以：
  - 排除漏路中滞留的空气，保证漏点与培养基之间形成液路。
  - 模拟产品运输过程中可能出现的压力变化。试验压差条件可根据具体产品运输条件信息及风险评估结果进行调整。

注：具体绝对压力条件与不同运输海拔之间的关系可参考 ASTM D6653/D6653M。

- 模拟产品灭菌过程中可能出现的压力波动。

- d) 暴露时长：长时间暴露可提高微生物侵入存在泄漏缺陷样品的机率。但是，暴露时间过长也可能影响培养基的促生长能力。因此，宜考虑：
- 压差条件（真空或过压）暴露时长；
  - 常压暴露时长。
- e) 暴露温度：暴露温度宜能充分促进挑战微生物的生长，同时不会对其运动活力造成影响。此外，试验时也可考虑对温度进行周期性调整，以促进消除潜在滞留在挑战悬液中的气泡，同时保证在包装封口处充分与培养基接触。

注：某些微生物的运动活力会受到温度的影响；例如，黏质沙雷菌的运动活力在32° C（或以上）时会受到抑制。

## 12 试验程序概述

- a) 将待测样品（方法灵敏度验证实验中为人工打孔样品）浸入装有适量制备悬液的挑战容器中；浸没暴露时长宜基于实际使用条件进行风险评估确定，或者通过验证研究确定（可参考 11, d））。

注：样品浸没时可能会发生上浮或移动，因此宜考虑设置固定装置。（见7.1）

- b) 若待测样品体积过大导致无法完全浸没，也可将挑战悬液直接加至样品表面，但在采用该方式前需先证明其合理性。
- c) 为保护设备及试验人员，在挑战试验结束后但未开始样品培养前，宜用无菌水清洗样品外壁残留的挑战悬液，并宜将测试样品及对照样品放入保护容器或无菌袋中，防止挑战微生物及培养基在培养过程中污染培养箱。
- d) 将测试样品及对照样品放入培养箱并在适宜条件下进行培养。
- e) 在培养结束后，将适量挑战微生物（接种量宜为 10-100 CFU）接种至阴性对照样品中并进行培养（即促生长试验），以确认培养体系的促微生物生长能力。
- f) 检查样品内的培养基是否出现浑浊。若试验样品本身不易透光，或者因体积过大导致不易观察，可将测试样品内的部分或全部培养基转移至独立的透明容器中进行检查。

注：试验结束后，应通过适用的灭活方法（如热力、化学或辐照杀菌）对剩余挑战悬液进行处理，防止对实验环境造成污染。

### 13 可接受标准及结果判定

- a) 暴露试验结束后，挑战悬液的最低微生物浓度应满足预定的目标浓度（如  $10^6$  CFU/mL）。
- b) 阴性对照必须未出现微生物生长。
- c) 阳性对照必须出现微生物生长。
- d) 若测试样品出现微生物生长，那么宜在后续调查中采用适当的方法进行鉴定，确定其是否为挑战微生物。
- e) 促微生物试验必须出现挑战微生物生长。
- f) 若测试样品无微生物生长，样品密封性完整。

## 附录 A

(资料性)

### 方法灵敏度验证试验

由于浸入式微生物挑战试验为概率性方法，并且试验结果高度依赖于试验条件，因此试验方法的灵敏度需在确定试验条件后进行验证试验。进行验证试验时，需设置一系列具有一定标称孔径（或泄漏率）的人工打孔样品，来确认试验所能检出的最小泄漏缺陷（即方法灵敏度）。

#### A.1 人工打孔样品

##### A.1.1 制备方法

宜根据注射剂包装系统容器的类型及材料，来确定人工打孔样品的制备方法。

常见的包装标准漏孔可通过激光钻孔、玻璃微管、金属丝等方式来制备。

- a) 激光钻孔法可通过调整波长在包装容器壁形成不同尺寸的漏孔，同时适用于玻璃容器（如西林瓶、卡式瓶、预充针）和柔性包装容器。激光钻孔是目前应用最为广泛同时也最为可控的人工漏孔制作手段。通过该法制备的样品漏孔在使用前宜通过确定性方法对其泄露率进行确认，以防止出现假阴性或不准确结果。
- b) 玻璃微管的孔径一般介于 0.1-10  $\mu\text{m}$ 。其优势在于能相对一致地制作微小孔径的漏孔。制作 5  $\mu\text{m}$  及以下孔径的漏孔可选用该法。
- c) 金属丝可模拟密封区异物（如头发）引起的泄漏，一般可模拟 10  $\mu\text{m}$  及以上孔径的泄漏缺陷。金属丝可插至注射剂预充针或卡式瓶的柱塞和玻璃针筒之间，或插至西林瓶的瓶塞和玻璃瓶壁之间来模拟泄漏。

关于以上三种人工打孔样品制备方式的更详细信息见表A.1。

表 A.1 人工打孔样品制备方法总结

方式	可制备最小漏孔孔径 ( $\mu\text{m}$ )	优势	劣势
激光钻孔	$2 \pm 0.5 \mu\text{m}$	可最接近模拟注射剂容器（裂缝、针孔）实际状态下产生的缺陷。激光钻孔是模拟柔性包装泄漏缺陷的有效方法。	成本高；孔径必须通过校准与泄露率确定关系；实际制得的漏孔尺寸可能与标称孔径（或微观测量法测得的孔径）不一致。
玻璃微管	$0.1 \mu\text{m}$	可制备极小孔径的泄露缺陷；制得的液路较为明晰。	易碎；微管插入位置较难密封；微管尖端断裂较难检测；使用微生物挑战法检测时需事先用培养基对微管进行处理。
金属丝直接插入	$10 \mu\text{m}$	操作简单，成本较低；可用于试验方法可行性研究来确定方法检出范围。	形成的泄漏缺陷的气体、流体或微生物泄漏动力学可能与实际缺陷存在很大不同。
注：本表引自PDA TR 76。本表信息仅供参考。			

### A.1.2 孔径及样本量选择

方法灵敏度验证时，人工打孔样品组的标称孔径的范围宜包括预期检出限或MALL值。人工打孔样品的孔径必须通过规定方法(如气体泄漏率测试)进行校准。关于气体泄漏率与漏孔孔径之间的对应关系，可参考表A.2。人工打孔样品灭菌后，宜使用确定性方法确认灭菌工艺对孔径及泄漏率的影响。

表 A.2 气体泄漏率与泄漏孔径尺寸关系

气体泄漏率 (std·cm <sup>3</sup> /s)	泄漏孔径尺寸 (μm)
<1.4 × 10 <sup>-6</sup>	< 0.1
1.4 × 10 <sup>-6</sup> ~ 1.4 × 10 <sup>-4</sup>	0.1 ~ 1.0
>1.4 × 10 <sup>-4</sup> ~ 3.6 × 10 <sup>-3</sup>	> 1.0 ~ 5.0
>3.6 × 10 <sup>-3</sup> ~ 1.4 × 10 <sup>-2</sup>	> 5.0 ~ 10.0
>1.4 × 10 <sup>-2</sup> ~ 0.36	> 10.0 ~ 50.0
> 0.36	> 50.0

注：数据来源于文献报道<sup>[1]</sup>。微生物浸入暴露法的可检孔径一般介于5-10 μm之间。

每个标称孔径应设置充分数量的样品，以满足数据统计功效（即p值）及灵敏度的要求。

除需设置阴性对照样品（不在挑战悬液中暴露）及微生物活性阳性对照样品以外（见8.3），为了提高试验过程的严谨性和可追溯性，还宜增设泄漏孔径较大的对照样品（即“泄漏缺陷阳性对照”，制备方法可参照A.1.1），孔径尺寸应确保能发生微生物侵入。试验时将其与其他试验样品一起浸入挑战悬液进行挑战并培养，以证明微生物可以通过漏孔缺陷侵入包装，并能被试验方法检出。同时，还可增加一组阴性对照样品（密封完整且未接种挑战微生物），将其与试验样品一起浸入挑战悬液进行挑战并培养，以证明样品的制备及封装过程未发生微生物污染。

## A.2 灵敏度验证试验程序概述

试验及对照样品的灭菌及灌装宜分别遵循8.2和8.4中建议的原则。挑战悬液可按第10章规定的程序进行制备及检测。暴露试验条件可按第11章给出的原则确定，其中包括挑战悬液微生物浓度、培养基灌装量、真空/压力条件、暴露时长及温度。验证试验流程可参考本文件“12. 试验程序概述”章节。

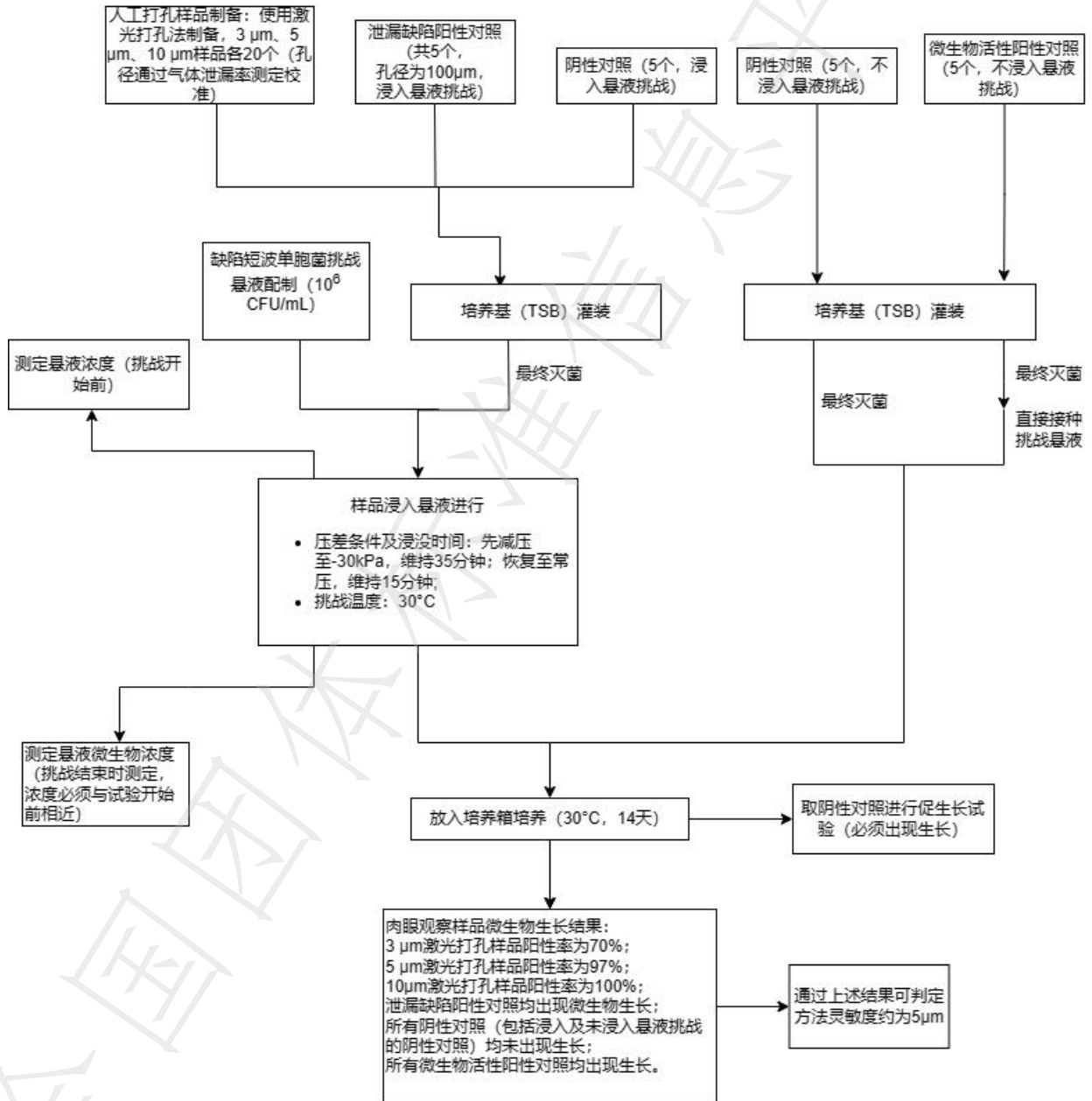
### A.3 结果分析

灵敏度验证试验结果必须满足“13. 可接受标准及结果判定”中给出的要求。此外，如果试验增设了泄漏缺陷阳性对照样品和浸入悬液挑战的阴性对照样品（分别见A.1.2），那么前者在培养后必须出现微生物生长，后者在培养后应无微生物生长。

试验结果宜标明其统计概率。一般在某个孔径（或泄漏率）的检出概率 $\geq 95\%$ （即置信区间 $\geq 95\%$ ）时，才能认定该孔径（或泄漏率）为方法的检出限（即灵敏度）。

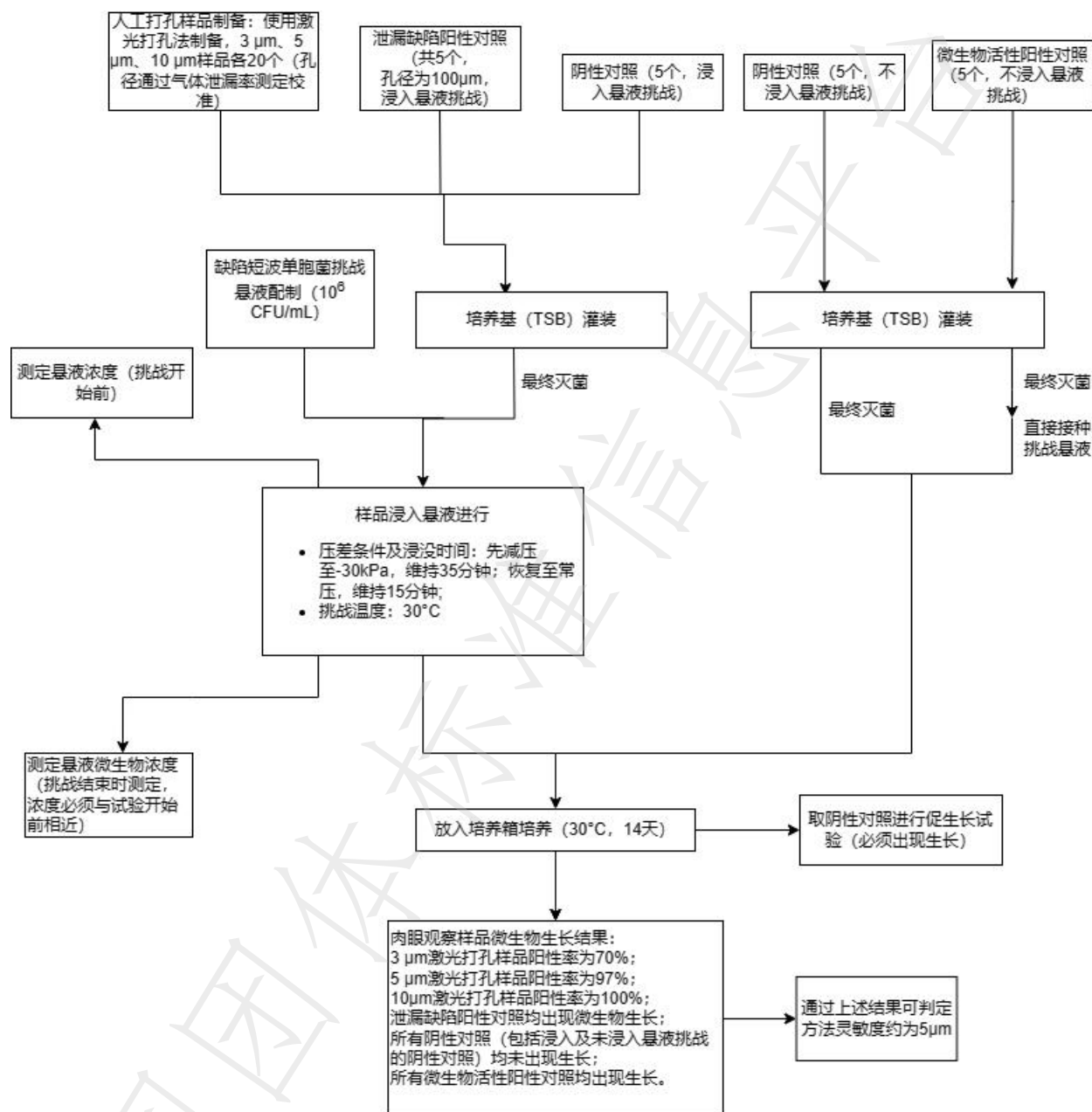
附录 B  
(资料性)  
样品试验及方法灵敏度验证试验流程示例

图 B.1 样品试验示例



注: 本示例中给出的样本量及其他试验参数仅供演示之用, 并不代表其适用于所有产品和情况。挑战试验时, 也可将微生物活性阳性对照与试验样品一起浸入挑战悬液。

图 B.2 方法灵敏度验证试验流程



注: 本示例中给出的样本量及其他试验参数仅供演示之用, 并不代表其适用于所有产品和情况。在验证试验研究中, 还宜使用确定性检查方法确认灭菌工艺对人工打孔样品的孔径及泄漏率的影响。

## 参 考 文 献

- [1] 国家药监局药审中心.《化学药品注射剂包装系统密封性研究技术指南（试行）》
- [2] 药品生产质量管理规范（2010 年修订）（卫生部令第 79 号）
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心.《化学药品注射剂仿制药质量和疗效一致性评价技术要求》（2020 年第 2 号）
- [4] 《药品 GMP 指南 无菌药品》中国医药科技出版社, 2011.
- [5] ISO 15747:2018 Plastic containers for intravenous injections
- [6] USP <1207> Package integrity evaluation-sterile products.
- [7] USP <1207.1> Package integrity testing in the product life cycle-test method selection and validation.
- [8] USP <1207.2> Package Integrity Leak Test Technologies.
- [9] PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Technical Report No. 27. Pharmaceutical package integrity. 1998.
- [10] PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, Technical Report No. 86. Industry Challenges and Current Technologies for Pharmaceutical Package Integrity Testing. 2021.
- [11] ASTM D6653/D6653M Standard Test Methods for Determining the Effects of High Altitude on Packaging Systems by Vacuum Method.
- [12] Saeedeh Aliaskarisohi, Marc Hogreve, Carole Langlois, et al. Single-Use Container Closure Integrity I: Using Microbial Ingress Test Method to Determine the Maximum Allowable Leakage Limit (MALL)
- [13] Saeedeh Aliaskarisohi, Marc Hogreve, Carole Langlois, et al. Ensuring the Integrity of Single-Use Containers, Providing Robustness, Science, and Helium-Based Technology with a Detection Limit of 2  $\mu\text{m}$ .