

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.08.10

关于兽药制剂无菌检查法几个问题的探讨

李应超,刘佳,高婷,王亚芳,张小飞

(北京市兽药饲料监测中心,北京 102299)

[收稿日期] 2023-02-24 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 08-0072-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 无菌检查法是无菌兽药制剂重要的质量检查方法。根据目前国内外相关文献的研究报道,分别从无菌检查法的特点、替代方案以及兽药制剂特殊性等方面进行论述,以期最大程度降低无菌检查法缺点的影响,规范我国兽药制剂的无菌检查方法,为兽药无菌检查的研究提供参考和依据。

[关键词] 兽药制剂;无菌检查;局限性;替代方法;参数放行

Discussion on Problems of Sterility Test Method for Veterinary Drug Preparations

LI Ying - chao, LIU Jia, GAO Ting, WANG Ya - fang, ZHANG Xiao - fei

(Beijing Veterinary Drug and Feed Monitoring Center, Beijing 102299, China)

Abstract: Sterility test is an important method of quality inspection for sterile veterinary drug preparations. According to the domestic and foreign literatures, this paper summarized the characteristics, alternatives of sterility test method and the particularity of veterinary drug preparations, to minimize the impact of the sterility test method and standardize the sterility test method of veterinary drug preparations in China. The purpose is to provide reference and basis for the study of sterility test in veterinary drug.

Key words: veterinary drug preparations; sterility test; limitations; alternative methods; parametric release

无菌检查法系用于检查兽药典要求无菌的兽药、原料、辅料、兽医医疗器具及其他品种是否无菌的一种方法,是作为无菌兽药制剂放行检验或监督管理部门对无菌产品质量监督中的一个重要方法^[1]。无菌检查最早出现在上世纪三十年代英国药典中^[2],我国最早收载于 1953 年版的药典及 1990 年版兽药典,历经数次修订,我国现行兽药典中无菌检查试验方法与药典基本一致,与欧美药典

大体相似。其主要依靠所捕获回收的微生物在培养基上自然生长,通过肉眼观察培养基浑浊的方法来判定产品的无菌状况^[3-5]。虽然方法沿用至今,但这种无菌检查法天生存在一定的局限性。

1 无菌检查法的局限性

1.1 统计学理论分析^[6-8] 有学者采用二项式展开法分析了无菌检查的局限性。其主要表现为:一是无菌检查的可信度很低(假设通过无菌检查(即

没有取得染菌样)的概率为 $P^n = (1 - Q)^n$, 检出批污染(即取得染菌样)的概率为 $1 - P^n = 1 - (1 - Q)^n$, 其中 Q 为批产品的染菌率, n 为取样数)。当染菌率为 2%、样本数为 2 时, 该批药品通过无菌检查的概率为 96%; 即使将样本数增至 10, 取不到污染品的概率仍高达 81.7%。二是批产品的污染率越低, 根据无菌检查结果来判定批药品是否无菌的风险就越大, 如染菌率为 30%, 而样本数为 2 时, 误判合格的概率为 49%; 当染菌率为 1% 而样本数不变时, 误判合格的概率为 98%。三是取样数量越小, 染菌样检出的概率越小, 无菌检查误判的可能性越大; 同一污染水平条件下, 增加无菌检查的取样数, 在一定程度上可以提高无菌检查的可信度, 但在产品实际污染比较低的情况下, 取样数增大, 对检出污染品的概率改观不大。

1.2 日常实验操作 首先, 无菌检查周期较长(14 ~ 17 d), 增加了产品的生产和使用成本; 其次, 具有破坏性, 该方法为破坏性试验, 对于抽检的产品, 检验之后不能再使用, 造成不必要的产品报废; 再者, 不能代表整体, 无菌检查不可能对同一个批次的所有产品做检查。所以, 即使被称为无菌产品, 往往不是绝对无菌而是有可能存在某种程度的微生物污染。此外, 重现性差, 无菌兽药本身是“无菌”的, 其污染率极低、且污染水平极低、微生物分布不均匀的特点使得无菌检查不需进行复试。除非断为“试验结果无效”的结果则需复试, 但其复试结果未必与首次试验一致或真实反映污染的情况, 也就是说有将已经发现的阳性结果当作“试验结果无效”进行复检从而错失检出污染品的机会; 最后, 该方法检测过程操作繁琐、劳动量大、自动化程度低^[9]; 并且需人工逐日观察培养基变化, 受检测人员的经验影响较大, 灵敏度低且具有一定的主观性, 影响结果判断的准确性。

2 无菌检查的替代方案

鉴于传统无菌检查法的上述局限性, 近年来有许多新的检查方法及理论应用于药品无菌检查中,

并且《中国兽药典》(2020 年版)收录的“兽药微生物检验替代方法验证指导原则”中也对替代方法需验证的参数进行了明确的规定。这些替代方案主要包括两类。

2.1 基于微生物生长的方法 该类方法基于微生物培养生长后进行检测, 主要有检测气体变化的测定法^[10]、三磷酸腺苷(ATP)发光检测技术^[11]和微量量热技术^[12]。

检测气体变化的测定法是通过传感器检测微生物的生长及响应、气体气压或成分的变化, 或通过传感器的比色响应生长介质中的物理化学变化, 检测下限为 1 ~ 10 CFU, 检测周期需要 2 ~ 7 d, 代表性产品有 BacTALERT(BTA)系统和 Bactec 系统等。有研究者^[13-14]采用 BTA 系统对多种剂型生物制品进行快速无菌检查方法验证, 并采用 BTA 双温系统进行注射剂无菌检查研究, 所有样本验证结果显示该方法均等同或者优于标准方法, 在所有样本中, BacT/ALERT®系统在 2.5 ~ 5.77 d 内检测到所有被检测的微生物, 最低检测水平在 1 ~ 2 CFU 范围内, 其等效性、耐用性、灵敏度、检测时间和重复性与药典标准相当或更好, 且 BTA 双温系统比较适用于无抑菌性且装量低于 10 mL 的注射剂产品。同时 BTA 快速无菌检查系统作为无菌检查法的替代技术在 2004 年被 FDA 批准可用于赛诺菲 Genzyme 公司生产的细胞疗法药物的无菌检查^[15-17]。此外, 厉高愨等^[18]运用 VersaTrek®快速微生物检测系统对细胞制品开展无菌检查研究, 10 种菌株(包括 6 种药典规定菌株在内)均能检出, 其最长周期小于 7 d, 方法专属性、检测限等性能与药典方法相当, 其可作为药典无菌检查的替代方法用于特定细胞产品的快速放行。李珏等^[19]运用 BacTALERT®3D 微生物检测系统作为替代技术, 对无抑菌性水溶性注射剂、抑菌性水溶性注射剂及油性注射剂等不同特性注射剂产品进行了无菌检查的可行性研究, 发现该方法对无抑菌性水溶性注射剂时, 检测限小于 5 CFU, 检测周期为 72 h, 其专属

性、检测限、重复性以及耐用性方面与药典方法基本相当或更好;而对于具有抑菌性水溶性注射剂和油性注射剂时则可产生假阴性和假阳性的可能。

三磷酸腺苷(ATP)发光检测技术是利用存在于生物体中的 ATP 与虫荧光素-虫荧光素酶反应,产生的荧光被高灵敏度的检测器检测,并利用光的强度定量分析样品中的含菌量。该法快速简便,但其检测下限为 1000 CFU,为了提高灵敏度,通常需要预培养 2~7 d 以提高样品中微生物的数量。代表性产品有 Pallchek 微生物快速分析系统和 Milliflex 快速微生物检测系统等。Pallchek 系统于 2004 年被 FDA 批准可以应用于 GSK 公司生产的鼻喷雾剂产品的检查,是最早获得批准应用于制药行业质量管理的快速微生物检测方法^[20];Milliflex 系统作为无菌检查替代技术在 2010 年被欧洲药物管理局(EMA)批准用于诺华制药公司的无菌检查^[21]。

微量量热法主要基于生命体系的热力学过程和化学反应所产生热量变化的生物热反应^[22],而这些能量能够被微量量热系统所检视。Brueckner 等^[23]通过等温微量量热法对多种单克隆抗体药物进行无菌评价,结果表明该法速度快且灵敏度、稳定性高。国内研究者^[12,24]建立的微量量热无菌检查法,能够在 10 h 内检出无菌检查方法学要求的各阳性菌,检出限度均小于 100 CFU,并能够快速检出模式药物未灭菌样品与灭菌不彻底样品,并能实现自动在线监测;同时,发现不同微生物的生物热活性曲线具有典型的特征图谱性及生物热动力学曲线,可以作为微生物污染物追踪认定的有效手段。

2.2 直接测定微生物法 该类方法主要依靠染色和荧光底物来区分细胞的死活,然后对活细胞进行计数,主要有固相细胞计数法和流式细胞计数法。

固相细胞计数法是运用激光扫描技术对样品过滤截留的、并经过荧光标记的微生物进行计数的方法,检测下限为 1~10 CFU,检测时间为 2~3 h,

代表性产品有 ScanRDI 系统和 MuScan 系统等。FDA 和 EMA 分别于 2007 和 2011 年批准 ScanRDI 用于爱尔康公司生产隐形眼镜的无菌检查^[25]。Smith 等^[4]采用 ScanRDI 系统与美国药典、欧洲药典、日本药局方中无菌检查方法对水溶液中低浓度活的 8 种微生物进行比较检测和评估,结果显示,采用 ScanRDI 系统得到的数值和统计结果均不低于传统药典 MPN 方法的检测结果。

流式细胞计数法是通过光学或电子检测器对悬浮于流体中的微小颗粒进行多参数计数和分选,检测下限为 10~100 CFU,代表性产品有 FACSanalysis 系统和 Bact-Flow 系统等^[26]。卢昕等^[26]采用流式细胞技术对接触镜护理液进行快速无菌检查研究,结果显示该方法的检出限均 < 100 CFU。当污染量在 1~10⁹ CFU 范围时,可直接得出含菌量,检出时间比常规方法缩短 40%~70%。宋光艳等^[27]采用流式细胞技术对溶液型注射液和注射用无菌粉末两种类型的药品开展无菌检查研究,结果表明溶液型注射液和注射用无菌粉末两种类型的药品采用流式细胞技术检测检出限均 < 10 CFU,当规定检验量的样品中微生物污染量 > 10⁵ CFU 时采用流式细胞技术可直接检出,当污染量在 < 10 CFU~10⁴ CFU 范围时检出时间比常规方法缩短 40%~70%。

3 参数放行理论

根据美国 FDA 规定参数放行即作为一种基于对已通过验证的灭菌程序的有效质量控制、监测和系统文件管理的,替代依赖于最终产品检验的无菌放行程序。欧洲质量组织规定参数放行的概念为:基于药品生产过程中采集的数据信息以及与 GMP 中参数放行的相关规定的符合程度,能够提供保证一批药品符合预定质量标准的放行系统。我国参考美国、欧盟等发达国家的参数放行的原则要求,对参数放行的定义是:根据有效的控制、监测以及灭菌工艺验证的数据资料,对产品的无菌保证进行评价,以替代根据成品无菌检查结果的放行系统^[28]。参数放行的实质就是控制生产全过程,是将无菌药

品的质量控制从以前的“事后控制”转为“事前控制”和“事中控制”,将药品质量控制的重心放在生产全过程的管理和控制上,以此来克服无菌检查的局限性,确保产品达到最终无菌的目的。它是药品质量管理核心思想的最佳体现,也是其发展的新方向和必然趋势。

参数放行源于 20 世纪 80 年代的美国,是为了克服成品抽样检查存在的局限性,以保证最终灭菌产品在用药方面的安全。1985 年 1 月, FDA 首次批准百特公司对其输液生产实行参数放行; 1987 年, 美国 FDA 正式颁布了参数放行法规指南。2005 年 3 月 1 日, 我国食品药品监督管理局批准广州百特医疗用品有限公司和无锡华瑞制药有限公司作为为期两年的参数放行试点, 对使用湿热灭菌法进行最终灭菌的大容量注射剂实施参数放行^[8]。

在欧美等国家, 参数放行均是由企业根据药品品种自愿提出申请, 药品监管部门根据相关的指南要求进行资料审核和现场检查后, 决定是否批准企业的申请。已获批准的药品如果发生生产地址等重要因素的变更, 必须重新申请。批准后的日常监督管理, 除了要求相关药品符合 GMP 管理以外, 还必须符合专门的参数放行指南。

运用参数放行法的品种一般是已经批准上市的药品, 因为批准上市的药品已经积累了一定的生产和质量管理经验, 且相当一段时期满意的无菌检查放行结果为其提供了科学完整的验证支持、系统的工艺验证及有效的工艺过程监控, 这些内容也是构成参数放行法获得批准的前提条件。当一个新产品与一个老产品非常相似且测试数据具有相关性时, 也可考虑利用参数放行法。欧洲药典中规定的灭菌方法中的蒸汽灭菌、干热灭菌和射线灭菌法可用于参数放行^[29]。

其次, 对施行参数放行的企业在人、机、料、法、环、测等方面都有严格的要求。企业需要建立一个无菌保证系统, 并确保生产工艺始终处于良好的受

控状态; 对上游企业进行质量审计, 以确保使用的原材料符合质量要求; 在生产现场, 都必须有相应的资历的工程技术人员或专家对生产过程进行监督、管理和指导; 并且要对生产环境进行动态的监控, 确保生产环境符合生产要求。目前, 我国的兽药生产企业经济实力、人才结构、设备自动化等参差不齐, 可能存在生产过程中按照操作标准规程操作的制度执行不到位、未及时对生产过程控制参数进行记录、甚至捏造控制参数的情况, 这也是导致有效数据积累不足, 无法顺利实施参数放行的一大原因。

4 无菌检查方法中的常见问题

4.1 取样不符合要求 部分生产企业在运用薄膜过滤法进行供试品无菌检查时, 往往缺少阳性对照试验所需样品数量, 不符合兽药典中对供试品检验数量的要求。其次, 部分生产企业只遵照抽验产品的数量进行验证, 违背了兽药典中对兽药检验的规定, 应按照出厂产品的最少检验数量而非监督抽样数量进行兽药检验的要求。

4.2 检验方法不规范 部分申报单位申报材料中无菌检查法仅简单的提及“采用薄膜过滤法应符合规定”的描述, 并未详细提供方法验证资料, 如采用薄膜过滤法时, 未注明萃取液种类、冲洗液种类、冲洗量、滤膜种类等, 方法描述不够详细, 缺乏可操作性; 有的申报单位对于无抗菌或抑菌作用的注射液, 如葡萄糖、氯化钠等大输液建立无菌检查方法时, 其冲洗量直接达 1000 mL; 另外, 有些生产企业无论何种兽药无菌检查都使用直接接种法, 而 2020 年版的兽药典中明确指出, 只要供试品性质允许, 应采用薄膜过滤法进行试验。再者, 个别企业在采用直接接种法进行供试品无菌检查过程中, 接种的供试品体积大于培养基体积的 10%, 或培养基的用量和高度同方法适用性试验不一致等; 极个别的申报单位所建立的无菌检查法选择阳性对照菌未按照其抗菌谱进行选择, 而是所有药物均选择金黄色葡萄球菌或大肠埃希菌, 失去了阳性对照菌的意义。

5 兽药制剂的特殊性

兽药是指用于预防、治疗、诊断动物疾病或者有目的地调节动物生理机能的物质。与人药相比较,虽然基础理论是相同的,但其适用对象的不同及剂型的特殊性决定了其无菌检查方法的特殊性。为了满足局部和群体用药的需求,开发了多种特殊剂型和大包装规格的兽药制剂,如乳房注入剂、子宫注入剂等,这些制剂往往是混悬状的油溶液,其无菌检查方法往往比较复杂^[30-32]。USP 记载的无菌检查法中规定抗生素液体每个容器最少用量为 1 mL^[33],这就降低了该类制剂药物无菌检查的难度及复杂性,并有利于质量标准的统一;而我国对这种特殊制剂药物的无菌检查缺少明确的检验量规定或指导原则而导致该类制剂药物无菌检查检验量各异,特别是同一种药物在不同标准上的检验量不同,甚至是同一种药物,不同企业报批药物的自检报告中检验量也不一致;这就导致了同一种制剂药物、同一包装规格其所采用的无菌检查方法不同,甚至检验结果也可能不同;特别是国内企业仿制进口兽药时,其质量标准往往参考进口兽药的质量标准,这就导致其建立的无菌检查方法及检验结果不符合国内兽药典的要求。同时,为了满足兽药典对检查数量及检验量的要求,对于较大包装规格的制剂就需要提高检验量,从而增大了无菌检查的难度和复杂性。

6 展望

总之,考虑到无菌检查的复杂性和多样性,以及检查方法的不断创新和改善,在进行无菌验证的过程中需结合供试品特性选择合适的方法,采用有效的手段及不同的方法和试验条件进行比较,逐步完善验证方法,并明确样品在前处理过程中的处理步骤、采用的具体方法,以及各个环节的操作,以积累验证数据,提高验证与检验技术水平。

此外,虽然传统的无菌检查法有其自身的缺点及受到多方面的因素的影响,但对于目前国内大部分兽药企业自动化程度还不是很高的现状,实施参

数放行还有一定的困难,因此选择传统的无菌检查作为产品放行的依据也许是目前最为“合情”的一种方式。但随着科技的发展,在不远的将来,关于兽药无菌检查的快速检测方法及先进理论必将在其领域得到充分的发展和应用。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2020 年版[S]. 2020; 附录 1101. 北京: 中国农业出版社, 2020.
- [2] CVPC. CVP 2015[S]. 2020; Appendix 1101. Beijing: China Agricultural Pres, 2020.
- [3] Sutton S. The Sterility Tests. In: Rapid Sterility Testing[M]. Moldenhauer J: PDA and DHI Publishing, 2011: 7-28.
- [4] Hodges N A. Pharmaceutical applications of microbiological techniques[M]. Aulton ME, Ed. Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design. 2nd ed. London: Harcourt Publishers Limited, 2002: 225.
- [5] Smith R, Tress M V, Tubb C, et al. Evaluation of the ScanRDI® as a rapid alternative to the pharmacopoeial sterility test method; comparison of the limits of detection [J]. PDAJ Pharm Sci Technol, 2010, 64(4): 356-363.
- [6] Tan M S, Ren Y S, Yan D, et al. Detection of microorganisms in different growth states based on microcalorimetry [J]. J Therm Anal Calorim, 2012, 109: 1069-1075.
- [7] 国家食品药品监督管理局. 药品生产验证指南[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 209-238.
- [8] China Food and Drug Administration. Pharmaceutical production validation guide[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2003, 209-238.
- [9] 徐林. GMP 的无菌保证[J]. 中国医药工业杂志, 2000, 31(3): 140-142.
- [10] Xu L. On Sterility Promise by GMP [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals, 2000, 31(3): 140-142.
- [11] 王新建, 王凤山, 王海燕. 最终灭菌药品无菌保证体系和参数放行的关键因素探讨 [J]. 齐鲁药事, 2006(03): 186-188.
- [12] Wang X J, Wang F S, Wang H Y. Discussion on key factors of sterility assurance system and parameter release of final sterilization drugs [J]. Qilu Pharmaceutical Affairs, 2006(03): 186-188.
- [13] 刘放, 冯国忠. 浅析无菌药品参数放行的意义和实施要点

- [J]. 机电信息, 2011(20): 23-27.
- Liu F, Feng G Z. Brief comments on the significance and implementation guidelines of parametric release [J]. Mechanical and Electrical Information, 2011(20): 23-27.
- [10] 洪小翔, 冯震, 许华玉, 等. 分子生物学技术用于药品质量控制国家标准核酸数据库的建设规划研究[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(5): 651-655.
- Hong X X, Feng Z, Xu H, *et al.* Program of national standard nucleotide sequence database used in quality control of pharmaceutical products by molecular biology technology [J]. Chin J Pharm, 2016, 47(5): 651-655.
- [11] Decool A, Goury V, Tibi A, *et al.* Detection of bacterial adenosine triphosphate through bioluminescence applied to a rapid sterility test of injectable preparations [J]. Analytica Chimica Acta, 1991, 255(2): 423-425.
- [12] 郜丹, 任永申, 鄢丹, 等. 基于生物热力学的注射剂无菌检查新方法研究[J]. 药学学报, 2014, 49(3): 385-391.
- Gao D, Ren Y S, Yan D, *et al.* A novel method for testing sterility of injections based on biothermodynamics [J]. Acta Pharm Sin, 2014, 49(3): 385-391.
- [13] Luis J, Narendra R, Joseph A, *et al.* Validation of the BacTALERT® 3D system for rapid sterility testing of biopharmaceutical samples [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2012, 66(1): 38-54.
- [14] Kaiser S J, Mutters N T, Backhaus J, *et al.* Sterility testing of injectable products: evaluation of the growth based BacTALERT® 3D™ Dual T culture system [J]. PDAJ Pharm Sci Technol, 2016, 70(6): 568-576.
- [15] Parveen S, Kaur S, David S A W, *et al.* Evaluation of growth based rapid microbiological methods for sterility testing of vaccines and other biological products [J]. Vaccine, 2011, 29(45): 8012-8023.
- [16] Kielbinski G, Prinzi S, Duguid J, *et al.* Roadmap to approval: use of an automated sterility test method as a lot release test for carticel, autologous cultured chondrocytes [J]. Cytotherapy, 2005, 7(6): 531-541.
- [17] Murray L, Megowan N, Fleming J, *et al.* Use of the BacTALERT® system for rapid detection of microbial contamination in a pilot study using pancreatic islet cell products [J]. J Clin Microbiol, 2014, 52(10): 3769-3776.
- [18] 厉高懋, 潘伟婧, 陈鑫, 等. 呼吸信号检测的快速微生物方法应用于细胞制品无菌检查的研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(21): 2594-2598.
- Li G M, Pan W J, Cheng X, *et al.* Study of respiration signal based rapid microbiological method for sterility testing of cell therapy products [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2020, 37(21): 2594-2598.
- [19] 李珏, 王知坚, 郑小玲. Bactalert®3D 微生物检测系统作为无菌检查替代方法可行性的探讨[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(4): 474-478.
- Li J, Wang Z J, Zheng X L. Discussion on feasibility of alternative sterility test of Bactalert® 3D microbial detection system [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2015, 32(4): 474-478.
- [20] 魏树源, 杨京生, 陈晓琦, 等. 三磷酸腺苷生物发光快速微生物检测法在疫苗中间品无菌试验中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(10): 1120-1124.
- Wei S Y, Yang J S, Chen X Q, *et al.* Application of rapid determination of microorganisms by ATP bioluminescence assay to sterility test of intermediate product of vaccine [J]. Chin J Biol, 2010, 23(10): 1120-1124.
- [21] Michael J. The implementation of rapid microbiological methods [J]. Eur Pharm Rev, 2010, 6: 27-31.
- [22] 高誉珊, 郑丰杰, 李鑫, 等. 基于微量量热法的寒热中药对大肠杆菌生长热谱曲线的影响[J]. 云南中医学院学报, 2014, 37(2): 10-13, 33.
- Gao Y S, Zhen F J, Li X, *et al.* Effect of traditional Chinese medicine with cold and heat on the growth of *Escherichia coli* by microcalorimetry [J]. J Yunnan Univ Tradit Chin Med, 2014, 37(2): 10-13, 33.
- [23] Brueckner D, Krähenbühl S, Zuber U, *et al.* An alternative sterility assessment for parenteral drug products using isothermal microcalorimetry [J]. J Appl Microbiol, 2017, 123(3): 773-779.
- [24] 任永申, 张萍, 吕宏宇, 等. 基于微量量热法的无菌制剂快速无菌检查方法研究[J]. 第三军医大学学报, 2015, 37(20): 2047-2052.
- Ren Y S, Zhang P, Lv H Y, *et al.* Rapid detection of microbial contamination of sterile preparation based on microcalorimetry [J]. Acta Acad Med Mil Tert, 2015, 37(20): 2047-2052.
- [25] 郑小玲, 王银环, 陈君豪, 等. 药品微生物检验替代方法国内外研究进展[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(04): 577-582.
- Zhang X L, Wang Y H, Chen J H, *et al.* Progress on alternative microbiological methods for pharmaceuticals [J]. Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis, 2020, 40(04): 577-582.

- [26] 卢昕, 陈靖云, 胡美丽, 等. 流式细胞技术在接触镜护理液无菌检查中的应用研究[J]. 工业微生物, 2018, 48(06): 57-63.
- Lu X, Chen J Y, Hu M L, *et al.* Application of flow cytometry in sterility test of contact lens care solution [J]. Industrial Microbiology, 2018, 48(06): 57-63.
- [27] 宋光艳, 冯震, 潘盈盈, 等. 流式细胞技术在药品无菌检查中的应用研究[J]. 中国药师, 2018, 21(02): 342-345.
- Song G Y, Feng Z, Pan Y Y, *et al.* Application of flow cytometry in drug sterility test [J]. China Pharmacist, 2018, 21(02): 342-345.
- [28] 梁毅. 浅析无菌药品的参数放行[J]. 医药工程设计, 2007(04): 1-4.
- Liang Y. Brief comments on parametric release of axenic medicine [J]. Pharmaceutical & Engineering Design 2007(04): 1-4.
- [29] 苏洁, 刘楚漪, 梁毅. 最终灭菌无菌药品实施参数放行的关键控制点研究[J]. 机电信息, 2017(08): 1-5.
- Su J, Liu C Y, Liang Y. Study on the key control points for the parametric release of final sterile [J]. Mechanical and Electrical Information, 2017(08): 1-5.
- [30] 李应超, 王亚芳, 魏镭, 等. 苄星氯唑西林乳房注入剂无菌检查方法研究[J]. 中国畜牧兽医, 2015, 42(01): 209-214.
- Li Y C, Wang Y F, Wei L, *et al.* Study on the sterility test method for cloxacillin benzathine intramammary infusion [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 42(01): 209-214.
- [31] 李应超, 吕涛, 王亚芳, 等. 苄星氯唑西林原料药的无菌检查方法研究[J]. 畜牧与兽医, 2015, 47(04): 40-43.
- Li Y C, Lv T, Wang Y F, *et al.* Study on the sterility test method for cloxacillin benzathine bulk drugs [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2015, 47(04): 40-43.
- [32] 戴青, 韩宁宁, 赵晖, 等. 盐酸头孢噻唑乳房注入剂无菌检查方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(02): 629-636.
- Dai Q, Han N N, Zhao H, *et al.* Establishment of sterility test method for ceftiofur hydrochloride Intramammary Infusion [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(02): 629-636.
- [33] United States Pharmacopoeia (41) [S]. 2018.

(编辑:李文平)