

**附件：9209 制药用水微生物监测和控制指导原则公示稿（第二次）****9209 制药用水微生物监测和控制指导原则**

本指导原则为药品生产企业加强制药用水全过程的微生物控制提供指导。

制药用水的质量和应范围应满足制药用水（通则 0261）的要求。药品生产企业应选择符合现行法规标准且质量稳定的原水，制药用水系统的设计、运行、消毒、监测和维护应能够防止微生物污染和繁殖，保证所使用的制药用水符合预期用途要求。

本指导原则的内容包括制药用水中微生物的特点、微生物监测及微生物控制与风险提示。

**1 制药用水中微生物的特点****1.1 微生物的来源**

制药用水中微生物的来源包括外源性污染和内源性污染。

外源性污染主要来自原水、设备、介质（填料、药剂）、维护和取样过程等，例如系统故障或防护缺失、消毒措施不当、活性炭、离子交换树脂的原始生物负载较高、取样和使用等操作技术不规范等。外源性污染可能不是常见的水系统微生物，而是土壤、空气甚至是人员来源的微生物。检出此类微生物更可能表明取样、检测过程存在污染或系统组件故障，应根据需要进行评估或调查，并依据评估或调查结果采取相应的措施。

内源性污染主要来自制备系统和分配系统本身。不恰当的设计和与维护可能导致存在于原水中的微生物吸附在活性炭床、离子交换树脂、滤膜和其他制备单元表面并形成生物膜，也可能吸附在悬浮颗粒上，例如活性炭床细颗粒或破裂的树脂颗粒。当生物膜脱落或微生物呈浮游状态时，可能污染下游制备单元及分配系统。分配系统中的管道表面生成的红锈、粗糙的焊缝、排列不齐的法兰、阀门和管道死角处均可能发生微生物附着、繁殖并形成生物膜，从而成为微生物污染的持续来源。

**1.2 微生物的类群**

药品中主要的污染微生物为细菌、霉菌和酵母菌。革兰阳性菌、霉菌和酵母菌通常不适合水系统中生存和定殖，如果存在于原水中，可能影响制药

28 用水制备系统的早期阶段。制药用水中检测到革兰阳性菌、霉菌或酵母菌，  
29 通常与取样或检测过程等外源性污染有关。

30 革兰阴性菌是水系统中存在的主要微生物，因其能够产生内毒素且可在  
31 水系统中繁殖，需要重点关注和控制。常见的革兰阴性菌包括假单胞菌属  
32 (*Pseudomonas*)、罗尔斯通菌属 (*Ralstonia*)、伯克霍尔德菌属  
33 (*Burkholderia*)、窄食单胞菌属 (*Stenotrophomonas*)、丛毛单胞菌属  
34 (*Comamonas*)、甲基杆菌属 (*Methylobacterium*)、鞘氨醇单胞菌属  
35 (*Sphingomonas*)、莫拉菌属 (*Moraxella*) 和许多其他类似假单胞菌的微生  
36 物~~（假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) 的成员~~。这些细菌可以在水系统  
37 制备和分配系统的表面定殖，如果不加以控制，可能会影响制备单元的功能  
38 并扩散到下游，在分配系统表面（例如储罐、管道、阀门、软管和其他表面）  
39 形成生物膜，或进入工艺用水和配制用水中。部分能够形成生物膜的革兰阴  
40 性菌属于条件致病菌，可在寡营养的条件下生存和繁殖，且可能对药品生产  
41 中常用的防腐剂和消毒剂具有抗性。这些革兰阴性菌可能在某些药品或原辅  
42 料、中间产品中繁殖，增加产品质量风险，威胁患者健康。

43 埃希氏菌属 (*Escherichia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏菌属  
44 (*Shigella*)、沙雷氏菌属 (*Serratia*)、变形杆菌属 (*Proteus*)、肠杆菌  
45 属 (*Enterobacter*) 和克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 等肠道致病菌，可能会  
46 污染饮用水源。若当地的污水和水源控制不到位，必要时需要对此类细菌进  
47 行控制，以使原水的质量符合要求。

48 人类致病病毒（例如粪便来源病毒）可能存在于水源中，一般可被一些  
49 特定的净化单元去除，如反渗透 (RO)、一定强度的紫外灯等，且由于没有  
50 宿主细胞，通常人类致病病毒不太可能在制药用水系统中生存或定殖。

### 51 1.3 生物膜

52 生物膜是细菌分泌胞外聚合物 (EPS) 基质附着于物体表面而形成的一种  
53 由细菌群体组成的三维结构化群落。生物膜形成和传播途径通常为黏附、表  
54 面聚集、增长、释放。在水系统中，生物膜形成的场所包括各种接触水或潮  
55 湿的表面，常见于原水系统、热交换器、RO 膜、离子交换树脂、流速慢或内  
56 壁粗糙的管道、O 形圈、垫圈等。

57 定殖在水系统的生物膜为群体内微生物获得营养物质提供了条件，也增  
58 强了微生物对外界不良因素的抵抗能力。生物膜的检测和去除十分困难。生  
59 物膜可通过结晶紫染色法、ATP 荧光检测法、电子扫描显微镜或激光共聚焦显  
60 微镜等进行检测。对于生物膜应进行有效的预防控制，结合生产过程进行风  
61 险评估并制定可行的控制方案。一旦发现生物膜，除了对生物膜中的微生物  
62 进行杀灭外，还应考虑有效去除生物膜的碎片，因为这些脱落的碎片会导致  
63 水系统中细菌内毒素水平升高，并且成为水系统中微生物的营养来源。可选  
64 择适当的清洁剂（例如含氢氧化钠或氢氧化钾的复合配方清洁剂）进行管道  
65 清洁，增加水流速度，并配合适当的消毒剂去除生物膜。必要时可考虑更换  
66 管道等部件。应基于安全和毒性数据来制定清洁剂和消毒剂的残留可接受标  
67 准，并考虑对应的残留检测方法和方法学验证。

#### 68 1.4 细菌内毒素

69 细菌内毒素是革兰阴性菌细胞壁的组分之一，其主要化学成分是脂多糖  
70 (LPS)，在细菌死亡后自溶或裂解时释放。因内毒素是热原，某些特定用途的  
71 制药用水需严格控制内毒素含量。

72 内毒素可能由原水引入，也可能由在水系统中的细菌释放，形成生物膜  
73 的革兰阴性菌是制药用水中细菌内毒素的重要来源。由于细菌内毒素会在细  
74 菌死亡后释放，消毒后可能会出现内毒素的激增。

75 控制潜在革兰阴性菌污染以及水中的游离内毒素对于制药用水的内毒素  
76 控制至关重要。控制措施包括使用上游净化单元来降低进水的生物负载、工  
77 艺控制（例如，设备设计、热消毒、紫外线消毒、过滤器、材料表面粗糙度  
78 和流速）等，以尽量减少系统内表面生物膜的形成和水系统中浮游微生物的  
79 产生。去除内毒素的方法主要包括活性炭、超滤、反渗透、离子交换、蒸馏  
80 等工艺。

#### 81 2 微生物监测

82 现有的检测方法主要针对水系统中的浮游微生物，以浮游微生物的数量  
83 来反映水系统中微生物控制是否处于稳定和良好的状态。检测结果只能反映  
84 取样时水系统中浮游微生物的数量，并不能完全说明水系统中微生物的污染  
85 程度。因此，需要基于风险制定微生物监测方案，对水系统中的微生物数量

86 和类群进行持续监测，根据趋势变化情况评估水系统的运行状态。

## 87 2.1 取样

88 建立适当的取样方案对于制药用水的质量控制十分关键。取样方案应经  
89 过验证。取样点应具有足够代表性，能够覆盖关键的控制点、所有的使用点  
90 以及潜在的最差情况。不同取样点的取样频率应基于风险评估和验证数据设  
91 定。一般来说，取样方案应覆盖所有分配系统的循环管路，关注循环管路中  
92 的代表点和风险点，例如送水点和回水点。在循环管路中，储罐的送水点和  
93 回水点通常会提供该回路的重要信息，一般应作为取样点。典型的取样方案  
94 是对各个水点进行轮流取样，尽可能达到时间和空间的平均分配。例如在生  
95 产阶段，保证每天每一个回路均有取样点进行检验；每一个取样周期（例如  
96 每周）能覆盖该周期内所有的取样点。

97 制药用水的微生物监测可分为过程控制（Process Control）和质量控制  
98 （Quality Control）两种目的。过程控制监测的目的是确认制药用水的制备、  
99 分配系统运行是否稳定且处于受控状态，质量控制监测的目的是确认所使用  
100 的制药用水质量是否符合要求。过程控制监测取样时，取样点设置应尽可能  
101 覆盖整个系统，以反映系统的运行状态，并在出现问题时确定具体位置。过  
102 程控制监测取样可使用专用取样接口、取样前冲洗，避免操作、取样口引入  
103 的污染，尽可能反映管道内制药用水中浮游微生物的污染水平。质量控制监  
104 测取样则应尽量在使用点进行，取样过程尽可能与实际用水时保持一致，以  
105 获得实际用水时的真实微生物污染水平。

106 取样应有详细的操作规范，取样人员应经过培训和考核。取样应使用无  
107 菌容器，并注意取样后转运和保存过程中容器的密封性。如使用外接管取样，  
108 应在取样后立即拆除。取样时应记录取样人、取样时间、取样点、取样量等  
109 信息。取样量应能够满足检验需求。取样后应尽快进行检验（一般在 2h 内），  
110 若不能立即检验，则应置于 2~8℃ 保存，保存时间一般在 12h 内，最多不超  
111 过 24h。不能满足上述条件时需要进行风险评估。

## 112 2.2 检测方法

113 水系统中能够存活的微生物主要以能够形成生物膜的革兰阴性菌为主，  
114 这类细菌对碳源利用广泛，对营养要求低，因此一般更适合在寡营养的培养

115 基（例如 R2A 琼脂培养基）中生长，最适生长温度一般不超过 35℃，部分微  
116 生物生长缓慢。因此，制药用水（通则 0261）中推荐的微生物检测方法为经  
117 薄膜过滤法处理，采用 R2A 琼脂培养基，30~35℃培养不少于 5 天。

118 由于不同制药用水系统中的微生物类群存在差异，使用不同的计数方法、  
119 培养基、培养温度和培养时间可能会影响检出微生物数量和种类。例如，慢  
120 生根瘤菌（*Bradyrhizobium*）使用薄膜过滤法检测时，菌落较小不易观察，  
121 需培养 7 天或更长时间，如水系统中存在该菌，使用平皿法更有助于观察计  
122 数。因此，药品生产企业可根据自身水系统中微生物类群的特点在制药用水  
123 （通则 0261）推荐检测方法的基础上进行适当调整。一般情况下，选择在较  
124 短时间内可检出较多微生物数量和种类的检测方法，并需要对所使用的方法  
125 进行验证，以证明所选用的方法优于或等同于药典推荐方法。

126 若日常监测结果均为小于 1cfu 或计数水平较低，可考虑增加检验量，以  
127 获取更多水系统中的微生物数量和种类信息，反映水系统中的微生物水平和  
128 变化趋势。

129 为了更快速地获得检测结果，及时发现和处理不良趋势，药品生产企业  
130 可选择快速微生物检测方法进行制药用水的微生物监测，包括在线的微生物  
131 检测方法。

### 132 2.3 监测标准

133 药品生产企业应在满足制药用水（通则 0261）中微生物限度标准的基础  
134 上，根据制备和分配系统特点、取样环节、水的预期用途以及历史数据等设  
135 定合理的日常微生物监测标准，包括警戒限度和纠偏限度。

136 警戒限度是指微生物监测结果超出正常范围，但未达到纠偏限度，需要  
137 引起警觉，可能需要采取纠正措施的限度标准。纠偏限度是指微生物监测结  
138 果超出可接受标准，需要进行调查并采取纠正措施的限度标准。警戒限度、  
139 纠偏限度一般基于过去的趋势分析数据并经过合理的风险评估后选择适宜的  
140 方法（例如正态分布法、百分位数法、非参数公差限值法等）建立。例如，  
141 警戒限度设定为历史均值加 2 倍标准偏差，纠偏限度设定为历史均值加 3 倍  
142 标准偏差。不同方法计算得到的警戒限度、纠偏限度不同，可根据实际情况  
143 选择合适方法，并定期动态调整。除微生物数量超过设定好的纠偏限度外，

144 以下情况也应引起关注并按需采取纠正措施：同一取样点连续多次超过警戒  
145 限度；不同取样点同时超过警戒限度；检出不可接受微生物对工艺或产品具  
146 有潜在危害的微生物；历史数据均为零，但连续出现非零结果等。除采取必  
147 要的纠正措施和预防措施外，还需调查事件原因，并评估事件的影响，采取  
148 必要的补救措施。

149 一般来说，注射用水中应没有微生物存活，但考虑到取样过程中可能引  
150 入的微生物污染，制药用水（通则 0261）中注射用水微生物限度标准为不大  
151 于 10cfu/100ml。因此，注射用水系统中一旦检出微生物，即使没有超出警戒  
152 限度或纠偏限度，也应予以关注并进行评估或调查。

#### 153 2.4 微生物鉴定

154 制药用水微生物监测除进行微生物计数外，还应关注某些可能对产品或  
155 生产工艺具有潜在危害的微生物。可定期对制药用水中分离微生物进行适当  
156 水平的鉴定，有助于掌握菌群结构和开展微生物污染溯源分析，评估水系统  
157 来源的微生物污染风险。注射用水检出微生物一般应进行鉴定。当制药用水  
158 微生物监测结果异常或出现新的菌落形态、其他微生物污染偏差有可能关联  
159 制药用水时，也建议对微生物展开鉴定。鉴定分离得到的微生物可用于消毒  
160 剂效力评估、培养基促生长能力试验及微生物方法适用性试验等。微生物鉴  
161 定参照微生物鉴定指导原则（指导原则 9204）进行。

#### 162 2.5 数据分析与偏差处理

163 应定期对制药用水微生物监测数据进行回顾和分析，通过对收集的数据  
164 开展趋势分析，总结和评估制药用水系统运行状态，有助于发现系统性问题。  
165 定期的趋势分析可用于制定合理的警戒限度、纠偏限度和监测方案，当出现  
166 异常趋势时能尽早采取纠正措施和预防措施。

167 日常微生物监测数据、异常监测结果以及实验室发生的偏差等均应进行  
168 趋势分析，趋势分析不局限于微生物监测结果的数据分析，还需要正确评估  
169 微生物污染风险，包括微生物污染数量、种类和特定微生物污染检出的频率，  
170 并结合实际情况，进行系统综合性评估，如系统确认和验证状态、预防性维  
171 护和相关变更等。

172 当微生物监测结果超出纠偏限度或出现异常情况时，应当按照偏差管理

173 程序文件在规定时间内进行记录、报告、调查、处理以及采取纠正措施和预防  
174 措施，并对相关措施的有效性进行评估。

## 175 2.6 快速微生物检测方法

176 制药用水在药品生产过程中广泛使用，在制备系统、储罐以及分配系统  
177 中以动态循环流动的形式存在。制药用水的微生物过程控制监测更适合使用  
178 快速微生物检测方法（RMM），尤其是在线、近在线的方法，从而更快速、更  
179 准确地监测水系统的运行状态，在出现异常情况时及时采取措施。

180 常见的制药用水快速微生物检测方法包括：ATP 生物发光法技术、激光诱  
181 导荧光法技术、微菌落荧光染色法技术、固相细胞计数法技术、流式细胞分  
182 析方法技术、荧光或直接菌落检测技术、核酸扩增法技术等。企业可结合  
183 自身制药用水系统特点（微生物数量、类群等）及实际需求，选择适合的快  
184 速微生物检测方法。可参考药品微生物检验替代方法验证指导原则（指导原  
185 则 9201），按照药品生产过程的质量控制要求对所使用的方法进行开发和验  
186 证。验证时可选取制药用水系统常见的生长缓慢微生物（如慢生根瘤菌）作  
187 为试验菌株，重点关注方法的灵敏度、水系统菌株的适用性及与传统方法的  
188 相关性。鼓励增加使用快速微生物检验方法与传统方法并行，在积累一定数  
189 据并经验证和风险评估后逐渐替代传统方法。

190 许多快速微生物检测方法，尤其是实时或近实时的检测方法，所产生的  
191 信号单位不同于传统方法的菌落形成单位（cfu）。例如对微生物细胞进行直  
192 接检测的方法产生的信号是细胞数量，结果可能高于传统方法所产生的 cfu  
193 结果。因此，当应用快速微生物检测方法时，其结果与传统方法相比某些参  
194 数如准确度等可能存在差异，但二者应有明确的相关性，关注对微生物监测  
195 数据的趋势分析，确保快速微生物检测方法对微生物污染风险的监测效果优  
196 于或等同于传统方法。

## 197 3 微生物控制与风险提示

198 制药用水的微生物控制应符合药品生产质量管理规范及相关指南的要求，  
199 在制药用水系统的全生命周期予以考虑，并基于风险建立微生物污染控制策  
200 略，包括原水的控制、系统设计、设备安装调试和系统确认、系统持续监控  
201 和运行维护、其他微生物控制措施及风险提示等，并根据监测数据及运行情

202 况，持续改进控制策略。

### 203 3.1 原水控制

204 用于制备制药用水的原水质量至关重要。原水的污染微生物有可能进入  
205 后续制备的制药用水中，因此，应根据制备工艺、预期用途制定合理的可接  
206 受标准（例如微生物指标、细菌内毒素、不可接受微生物等），对原水进行  
207 适当的检验以确认符合相应标准。根据原水的质量控制水平可采取一定的处  
208 理和控制措施，例如消毒、过滤、调整运行参数等，从而保证后续制药用水  
209 的质量符合要求。同时，应关注环境、季节和供应变化引起的原水质量变化。

### 210 3.2 系统设计

211 水系统的设计，应考虑生产所需水的质量要求、用水量、原水的供应和  
212 质量情况、预处理及纯化工艺、清洁、消毒灭菌方式、取样点的设计以及能  
213 耗和厂房条件等。根据水的预期用途，选择适宜的工艺流程（包括预处理工  
214 艺和进一步的纯化工艺）。根据预估的用水量，选择合适的预处理和纯化设  
215 备、管道和储罐尺寸，保证一定的循环和置换次数。应考虑清洁、消毒灭菌  
216 方式及其控制微生物的有效性、系统材料对清洁、消毒灭菌方式的耐受性以  
217 及消毒剂残留的去除。对取样点进行适当的设计，以避免污染和方便操作。

218 某些预处理单元（例如多介质过滤器、保安过滤器、活性炭过滤器、软  
219 化器、陶瓷过滤器等）和分配系统管道可能发生微生物富集和增殖。应采取  
220 适当的化学或热消毒措施，并定期更换滤材。

### 221 3.3 系统确认

222 制药用水系统应进行确认以保证生产、供应的水的质量符合预期用途的  
223 要求。在水系统确认初期，应尽可能增加微生物监测的取样点和取样频次，  
224 随着系统稳定和数据积累，根据运行和使用情况逐步减少取样点和检验频次，  
225 形成日常运行时的取样方案。水系统确认还应包括微生物检测方法的研究，  
226 包括培养基、培养温度和时间、接种方式的选择等。应对系统确认期间检出  
227 的微生物进行适当的鉴定，建立水系统微生物分布数据库，便于后期的异常  
228 情况调查。起草和制定清洁、消毒和维护程序，并进行验证。

### 229 3.4 系统持续监控和维护

230 经验证的制药用水系统应通过持续的监测、控制和维护保证水质稳定。



231 随着系统验证完成以及系统的逐渐稳定，根据制水工艺、监控数据和运行状  
232 况，确定微生物取样方案、检测方法、微生物指标的警戒限度和纠偏限度、  
233 清洁消毒和维护程序等。在后续的运行和预防性维护过程中定期进行风险评  
234 估并采取改进措施。持续对运行过程进行监控，对监测数据定期进行回顾和  
235 分析，根据历史数据调整警戒限度和纠偏限度。按照程序采取控制微生物和  
236 防止微生物生长繁殖的措施，例如温度控制（高温或低温）、清洁、消毒或  
237 灭菌、定期更换滤材、正反冲洗、再生等。

238 对于异常结果（超趋势、超警戒限度、超纠偏限度或发现新的微生物种  
239 属、不可接受微生物对工艺或产品具有潜在危害的微生物等），应进行评估、  
240 调查和根本原因分析，根据需要采取纠正措施和预防措施。

241 制定系统回顾的周期。回顾系统运行以来的微生物监测方案的合理性（取  
242 样点的选择、取样频次的确定、取样方式的防污染措施等）、微生物数量和  
243 种类变化情况、警戒限度和纠偏限度制定的合理性、异常结果的调查情况、  
244 清洁、消毒和或灭菌程序的有效性、系统维护的执行情况、纠正措施和预防  
245 措施的有效性等。

### 246 3.5 其它微生物控制措施及风险提示

247 制药用水系统的设计、运行和维护的微生物控制措施还包括：保证管道  
248 内壁、连接处光滑，材质防腐蚀；与外界联通的阀门等处注意防污染设计；  
249 避免存在死角；预处理单元定期采用反冲、化学或热消毒、再生、更换滤材  
250 等；保证原水质量；保证一定的水流量，防止水流停滞；控制系统内温度；  
251 适当位置安装紫外灯消毒；定期进行热消毒或灭菌；进行适当的化学清洁和  
252 消毒；定期检查、维护、更换 O 型圈、垫圈等零部件等。

253 制药用水的微生物监测具有一定局限性。药品生产企业应对制药用水系  
254 统中存在的微生物类群特点、检验方法进行充分的研究和验证，同时考虑制  
255 药用水的类别、预期用途与可接受标准，基于风险确定微生物监测方案，配  
256 合合理的微生物污染控制措施，保证生产、供应的水质量稳定且符合要求。

257 另外，寡养型微生物一旦进入无菌产品，在无菌检查的培养体系中可能无法  
258 检出，存在漏检的可能，因此，无菌产品生产用水应关注这类微生物的监测  
259 和控制。

起草单位：中国食品药品检定研究院

联系电话：010-67095695

参与单位：上海市食品药品检验研究院、浙江省食品药品检验研究院、陕西省食品药品检验研究院

## 9209 制药用水微生物监测和控制指导原则

### 第二次公示稿修改说明

根据 2024 年 4 月 9209 制药用水微生物监测和控制指导原则首次公示稿的反馈意见和建议，国家药典委员会微生物专业委员会进行了研讨，在第一次公示稿的基础上修订了部分内容，主要为：

1. 取样部分表述调整。将取样方案表述调整为：“一般来说，取样方案应覆盖所有分配系统的循环管路，关注循环管路中的代表点和风险点，例如送水点和回水点。典型的取样方案是对各个水点进行轮流取样，尽可能达到时间和空间的平均分配。”并增加取样注意事项：“如使用外接管取样，应在取样后立即拆除。”

2. 将“不可接受微生物”修订为“对工艺或产品具有潜在危害的微生物”，并删除原水可接受标准示例中的“不可接受微生物”。

3. 删除鉴定分离微生物用途示例中的“消毒剂效力评估”。

4. 将常见的制药用水快速微生物检测方法修订为：“常见的制药用水快速微生物检测方法包括：ATP 生物发光法、激光诱导荧光法、微菌落荧光染色法、固相细胞计数法、流式细胞分析方法、核酸扩增法等。”

5. 删除异常结果示例中的“超警戒限度”。