

BASIC PRINCIPLES OF STERILIZATION
AND
PARAMETRIC RELEASE



灭菌工艺的

基本原理与参数放行

■ 潘友文 邓海根 编著

Youwen Pan Haigen Deng



中国质检出版社
中国标准出版社

灭菌工艺的基本原理与参数放行

BASIC PRINCIPLES OF STERILIZATION

and

PARAMETRIC RELEASE

潘友文 邓海根 编著
Youwen Pan Haigen Deng

中国质检出版社
中国标准出版社

北 京

图书在版编目 (CIP) 数据

灭菌工艺的基本原理与参数放行/潘友文, 邓海根编著. —北京: 中国质检出版社, 2013. 10

ISBN 978-7-5026-3892-4

I. ①灭… II. ①潘…②邓… III. ①医疗器械 - 消毒 - 生产工艺 - 研究
IV. ①TH77

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2013) 第 223298 号

内 容 提 要

本书介绍了多种灭菌工艺的微生物学和工程学基础。参考最新版相关规范 (美国 FDA、欧盟 EMA、ISO 标准) 和美国注射剂协会 (PDA) 的技术报告, 阐述灭菌工艺程序的开发和设计、确认和验证、日常监控与管理维护的程序和方法。讨论了湿热、辐射和环氧乙烷灭菌产品实施无菌参数放行的管理和技术要求。

本书可供制药企业生产质量管理人员、药品研究开发人员、灭菌工艺技术人员、制药设备制造企业及医院药剂人员使用, 也可供药品监管人员、食品灭菌专业人员以及高等院校相关专业师生参考。

ABSTRACT

The book describes the principles of microbiology and engineering of multiple sterilization processes. The procedures of each sterilization process development and design, validation and verification, routine monitoring, management and maintenance are described. The specific technical and management requirements in terms of parametric release are presented and discussed for moist heat, radiation and ethylene oxide sterilization processes. The most current version of related standards, guidelines, requirements and technical reports issued by US FDA, EU EMA, ISO, and PDA (Parenteral Drug Association) are referenced and cited in the book.

The book is applicable to the supervisors in pharmaceutical industry, engineers and scientists in medicinal development and pharmaceutical technology, engineers in development and manufacturing of pharmaceutical processing equipment and systems, and pharmacists in hospitals. The book is a good reference to the inspectors and auditors of pharmaceutical surveillances, food sterilization engineers, and researchers and students in academic entities.

中国质检出版社 出版发行
中国标准出版社

北京市朝阳区和平里西街甲 2 号 (100013)

北京市西城区三里河北街 16 号 (100045)

网址: www.spc.net.cn

总编室: (010)64275323 发行中心: (010)51780235

读者服务部: (010)68523946

中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷

各地新华书店经销

*

开本 1000 × 1400 B5 印张 17.5 字数 350 千字

2013 年 10 月第一版 2013 年 10 月第一次印刷

*

定价 200.00 元

如有印装差错 由本社发行中心调换

版权专有 侵权必究

举报电话: (010) 68510107

前 言

医药用品的有效性和安全性如同一枚钱币的两面，不可分割，它们既是病人的需求，也是相关法律法规的根本要求。微生物污染是威胁药品和其他医疗用品使用安全的主要因素之一。众所周知，处于患病状态的人员，尤其是老年人、婴儿及儿童，其免疫系统一般比较脆弱、免疫功能处于部分或完全丧失状态，任何微生物的入侵都可能导致机体感染，甚至败血症的风险。因此，为保证使用安全，与体内器官组织直接接触的药品和其他医疗用品在使用前均要求处于无菌状态。药品和其他医疗用品的无菌状态是通过适当而有效的灭菌工艺处理和完整的密闭包装来实现的。所采用的灭菌（或无菌）工艺不仅要赋予产品足够的无菌保证水平，而且不得因灭菌而影响或改变产品的性质和医疗功能。无菌产品的包装材料和包装方式还应确保产品经灭菌后在有效期内的质量稳定性并且免遭微生物污染。

成功地开发灭菌程序至少需要满足三个基本要求：一是所有被灭菌物品均达到一定的无菌保证水平；二是经灭菌后被灭菌物品的各项质量指标和稳定性均符合规定要求；三是灭菌程序的运行要满足操作人员安全、节能和环境保护等方面的要求。开发和应用灭菌工艺依赖于对多个交叉学科知识的熟练掌握和运用。它不仅需要微生物学知识来了解和掌握被灭菌物品在灭菌前的污染水平以及污染菌对灭菌工艺的耐受性，还需要物理学和化学方面的专业知识来理解灭菌介质的性质、杀菌原理以及对被灭菌物品破坏性的影响程度、辐射灭菌等。只有娴熟地掌握相关学科的工程技术知识，包括机械、电子、化学和制药工程等，才能成功地开发灭菌工艺并将其应用于商业化生产。同时，熟悉和精通与药品和其他医疗用品相关的法律法规也是成功开发和使用灭菌工艺的重要前提条件。因此，灭菌工艺是一项集多个交叉学科于一体的综合性技术。目前，在医药用品领域广泛应用的灭菌工艺主要包括湿热灭菌、辐射灭菌、环氧乙烷灭菌和过滤除菌等。

据统计, 70% 以上的药品质量问题始于研发与设计, 人们对质量的认识经历了三个主要阶段, 即质量依赖检验、生产保证质量、质量源于设计。不难理解, 有效地控制了产品的工艺过程, 也就控制了产品的质量。20 世纪 70 年代, 欧、美等地区和国家发生大容量注射剂的污染促使严重的药难事件以后, 人们对药品质量控制的不懈努力促使了药品灭菌工艺、灭菌设备制造、灭菌工艺的开发、确认及验证等方面的长足进步, 它同时也促进了生产管理程序的相应变更。具有划时代意义的变化始于美国食品和药品管理局 (FDA) 对最终灭菌产品的无菌参数放行。最终灭菌产品无菌参数放行的大部分经验来自两家大公司, 即美国百特医疗用品有限公司 (Baxter Healthcare) 和美国雅培制药有限公司 (Abbott) 所做的大量工作。FDA 在 1981 年收到第一批参数放行的申请, 申请品种属大容量注射剂。这些申请于 1985 年初获得批准。取消作为产品无菌放行标准的无菌检查, 这无疑曾是一个史无前例的变更。

在国际上, 制药界曾将参数放行定义为“一个可确保产品达到预计质量并以生产过程中收集的数据来决定放行的系统”。这一广义定义所体现的哲理收录于国际制药法规协调委员会 (ICH) 的 Q6A 的第 2. 6 节参数放行中, 该节明确地提到: 在某些情况下, 经主管部门批准后, 参数放行可作为成品常规放行检验的可选方法, 最终灭菌产品的无菌检查即是其中的一个例子……参数放行方案中还可包括取消适当的化学或物理检验项目。

欧盟人用药品委员会于 2012 年 3 月 29 日发布了“实时放行指南”。这个文件换了一种提法, 此提法影射了参数放行具有即时提供工艺信息及缩短生产周期的重要作用。文件指出, 实时放行是一个放行系统, 它通过对工艺的理解和控制, 根据生产工艺中收集的信息, 推断并保证产品具有预期的质量。文件强调, 在一些特定的条件下, 将对工艺 (关键工艺参数) 的各种控制与预定物料特性相结合, 比最终产品的测试更能保证产品的质量, 它是质量控制策略必不可少的组成部分。实时放行的原则已批准作为最终灭菌产品日常无菌检查的可选替代方案。对产品知识及工艺的深入了解, 应用质量风险管理原则以及 ICH Q8、Q9 及 Q10 所定义的适当药品质量体系, 为实时放行在其他方面 (如新产品及已批准上市的产品) 的应用确立了平台。产品的

放行可以采用某些关键质量属性的实时放行与其他关键质量属性的常规评估相结合的方法（部分工艺/项目实时放行）。

欧盟药品管理局（EMA）及 FDA 已将最终灭菌的参数放行，从原先的湿热灭菌扩大到辐射灭菌和环氧乙烷灭菌。此外，它还包括（但不局限于）非无菌药品的片重、混和均匀度、孔隙度、颗粒大小、表面积、松/紧密度以及溶出度等项目，甚至可应用于生物/生物技术产品中的纯化。

应当指出，实时放行目前在国际上尚不是强制要求，实时放行的实施需要经过主管部门批准。然而，它的应用有利于生产企业，有助于以反馈或前馈形式实时控制和调整工艺，以便根据更充分的工艺数据评估质量并缩短整个生产周期。它的实施也与监管部门期望企业深化对产品工艺的理解和控制要求相吻合，企业可以此为目标去改善管理。此外，从质量风险管理的两大原则来看，减少无实际意义或重复性的最终检验项目，既优化了资源的利用，又因深化了对工艺的理解并强化对工艺过程的控制，降低了药品安全的风险，体现了我国 GMP 2010 版引入风险管理的初衷。就最终灭菌的无菌检查而言，药典规定的培养时间为 14 天，无菌参数放行的实施可明显缩短产品放行的周期，减少库存，加快资金周转，这无疑是大容量注射剂生产管理期望的目标之一。通俗地说，无菌参数放行，即是“无菌免检”，即便一些企业一时还达不到这个管理水平，但保证产品符合注册标准既是法规的要求，也是企业责无旁贷的责任，它应是无菌药品企业努力的方向。

早在 2005 年 3 月 1 日，国家食品药品监督管理局即批准无锡华瑞制药有限公司及广州百特医疗用品有限公司实施参数放行试点，体现了企业及主管部门在药品现代化管理方面的协同努力。多年来企业和主管部门积累了宝贵的经验，新版 GMP 规范的出台，为此创造了更好的条件。

作者翻阅了大量与湿热、辐射和环氧乙烷灭菌工艺原理相关的原始文献资料以及国际上参数放行的最新指南和要求，将这三大灭菌工艺的基本原理和参数放行实施策略的精华浓缩于本书。在参数放行从一国走向世界之时，希望本书有助于我国制药业深化对无菌药品质量风险管理的理解，缩短与国际间的差距。

本书首先介绍了与灭菌相关的微生物学基础、微生物的死亡规律和评价

方法、无菌产品无菌保证水平的原理与应用、细菌芽孢对灭菌介质的耐受性原理和评价方法、灭菌用生物指示剂的制备与对灭菌介质耐受性的标准测定和评价方法等；接着阐述以湿热灭菌工艺为主体的工程学原理、设备从开发设计、验证到日常使用的质量保证体系、与灭菌物品相适应的工艺程序的设计开发、验证和日常监控与维护的质量保证体系、用灭菌参数取代无菌检查结果的最终灭菌放行程序等；然后分别介绍辐射灭菌工艺和环氧乙烷灭菌工艺的原理、程序开发、验证和日常监控与维护的质量管理系统，以及参数放行程序的特别要求。

虽然过滤除菌产品尚未实行参数放行，但因过滤除菌工艺被日益广泛地应用于传统制药和生物制药领域，本书第 15 章特别阐述液体过滤灭菌的基本原理、验证和日常监控的质量管理系统。将干热灭菌及去热原放在最后一章（第 16 章），因为此工艺过程事实上没有应用于实际产品参数放行的先例，而设备制造及制药企业在应用中，尚有一些需要澄清的情况才考虑增加此章节。

书中与灭菌工艺原理相关的内容参照了相关原始文献资料和权威工具书编写；与灭菌工艺相关的质量管理体系是在参照最新颁布的行业指南（如 PDA 技术报告、美国药典、ISO 标准）、相关官方指南（如 FDA、EMA、WHO 的相关工艺指南）的基础上编写而成。由于时间关系和笔者对相关知识理解的局限性，书中有偏颇之处也在所难免。如果遇到有疑问的内容，敬请查考原文献资料释疑。

本书在编写过程中得到了姚艳平（百特广州）、崔强（华瑞制药）、尹广庆（百特广州）和吴昌振（辉瑞）等同仁的大力支持和帮助，他们为书稿的校对和复核花费了大量的时间和精力并且提出了许多宝贵意见，我们在此一并感谢他们辛苦而卓越的工作。

潘友文 邓海根

2013 年 8 月

目 录

第 1 章 微生物概述	(1)
1.1 微生物的特性和分类	(1)
1.2 微生物对人类的影响	(7)
第 2 章 微生物的生长与控制	(8)
2.1 影响细菌生长的因素	(8)
2.2 影响细菌存活的因素	(11)
2.3 单细胞微生物的死亡	(13)
2.4 微生物死亡半对数残存曲线呈直线的理论基础	(16)
第 3 章 微生物学数据分析与处理	(23)
3.1 引言	(23)
3.2 事件的相对性	(23)
3.3 差异性	(24)
3.4 概率	(25)
3.5 数据分析	(25)
3.6 原始数据和分析方法决定统计分析结果的质量	(25)
3.7 微生物存活概率背后的逻辑	(25)
3.8 无菌保证标准的理解与应用	(27)
3.9 灭菌后产品的污染率与无菌检查结果的相关性计算	(29)
第 4 章 细菌芽孢与生物指示剂	(31)
4.1 细菌芽孢的形成、结构及其对胁迫条件的耐受特性	(31)
4.2 细菌芽孢的制备、保存与萌发	(37)
4.3 灭菌用生物指示剂的特性及其使用	(41)
第 5 章 生物指示剂的生产和质量测定	(44)
5.1 生物指示剂生产的总体要求	(44)
5.2 生物指示剂生产的技术性要求	(46)

5.3	生物指示剂质量测试的总体要求	(47)
5.4	生物指示剂活性微生物含量的测定	(48)
5.5	载体和内包装材料对恢复生物指示剂生长抑制作用的检测	(49)
5.6	生物指示剂 D 值的测试——残存曲线法	(50)
5.7	生物指示剂残存数的测定——阴性分数法	(53)
5.8	D 值测定——Stumbo-Murphy-Cochran 法(简称 SMC 法)	(58)
5.9	D 值测定——Holcomb-Spearman-Karber 法(简称 HSK 法)	(62)
5.10	生物指示剂的存活(survival)/灭活(kill)特性测定	(68)
5.11	生物指示剂耐受性测定仪(Resistometer)的技术要求	(69)
第6章	热力灭菌中温度系数 z 值的测定与应用	(75)
6.1	用实验数据直接确定 z 值	(75)
6.2	用 D 值确定 z 值	(76)
6.3	z 值	(78)
6.4	等效灭菌值(时间) F_T	(78)
6.5	z 值的应用	(80)
6.6	热灭菌工艺对灭菌物品的特性和稳定性影响考察	(81)
第7章	灭菌值 F_T 的概念和计算方法	(85)
7.1	背景介绍	(86)
7.2	数值积分的目的和意义	(87)
7.3	几个重要概念	(88)
7.4	灭菌工艺程序的灭菌值(F)计算	(90)
7.5	用生物指示剂评价和计算灭菌程序的灭菌效果	(92)
7.6	讨论	(93)
第8章	湿热灭菌中的热力学原理和蒸汽质量	(95)
8.1	温度与热量	(95)
8.2	热传递的方式	(97)
8.3	热转移速率和加热介质的热容量比较	(98)
8.4	蒸汽	(99)
8.5	纯蒸汽的质量测试	(100)
第9章	湿热灭菌设备的设计确认、试车和设备确认	(102)
9.1	灭菌系统的设计确认(DQ)	(103)

9.2	设备试车	(109)
9.3	设备确认(安装确认 IQ 和运行确认 OQ)	(111)
9.4	文件要求	(113)
9.5	附录	(114)
第 10 章	湿热灭菌工艺设计与程序开发	(124)
10.1	湿热灭菌工艺的设计方法	(125)
10.2	灭菌物品的种类	(128)
10.3	灭菌工艺概述	(129)
10.4	灭菌程序的开发	(134)
10.5	灭菌产品的质量稳定性考察	(143)
第 11 章	灭菌工艺程序的性能确认和日常监控	(145)
11.1	灭菌工艺程序的性能确认(PQ)	(145)
11.2	日常工艺控制	(151)
第 12 章	最终湿热灭菌产品的无菌参数放行	(155)
12.1	参数放程序的关键控制要素	(155)
12.2	FDA 对实施无菌参数放行的申报指南	(167)
第 13 章	辐射灭菌	(170)
13.1	辐射灭菌的基本原理	(170)
13.2	灭菌辐射剂量的建立、确认和审计	(180)
13.3	辐射灭菌工艺的质量管理体系	(193)
第 14 章	环氧乙烷灭菌	(202)
14.1	环氧乙烷的基本性质	(202)
14.2	环氧乙烷对微生物的杀灭效应	(203)
14.3	环氧乙烷灭菌	(207)
14.4	医疗产品的环氧乙烷灭菌要求	(210)
14.5	环氧乙烷的安全监控	(217)
第 15 章	液体的除菌过滤	(221)
15.1	前言	(221)
15.2	过滤的基本原理与孔径分级	(221)

15.3	滤器的特性与选择	(223)
15.4	过滤器的设计和使用注意事项	(227)
15.5	除菌过滤器验证/细菌截留挑战试验	(232)
15.6	过滤器的完整性检查	(238)
15.7	过滤器的灭菌	(250)
第 16 章	干热灭菌和去热原	(253)
16.1	前言	(253)
16.2	干热灭菌和去热原的基本原理	(253)
16.3	干热灭菌/去热原工艺的验证	(256)
16.4	干热灭菌/去热原工艺的生物学验证	(264)
16.5	实验室研究与工艺开发与设计	(267)

第 1 章 微生物概述

灭菌工艺是指采用某种工程技术将物品内和（或）外所带有的微生物灭活或清除。为了便于理解灭菌工艺的原理，灭菌工艺技术人员有必要了解和掌握一些相关微生物的基本概念和原理。对有微生物学知识背景的读者可略过本章。

1.1 微生物的特性和分类

微生物（microorganism）是以单个细胞或聚集细胞形式独立存在于自然界的微小生物。因其广泛性、多样性和易变性，微生物几乎存在于地球上的每个角落。除大型真菌（蘑菇、霉菌）和藻类外，只有借助于显微镜（放大至少 40×10 倍）才能观察到微生物的形态及其他特征。微生物与动物和植物的主要区别在于，它们主要是以单个细胞生存；而动物细胞或植物细胞只能作为多细胞生物体的一部分，无法单个在自然界生存。根据微生物个体的结构和生理特性，微生物通常被分为三大类别，即原核微生物（细菌和古细菌）、真核微生物和病毒。图 1.1 表示了不同生物细胞间的相对大小。

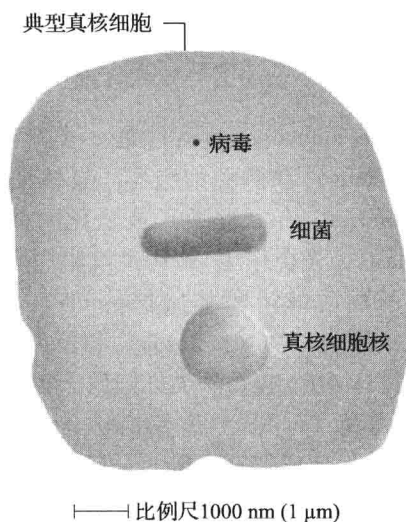


图 1.1 真核细胞、细菌和病毒大小比例示意图

1.1.1 病毒

病毒 (virus) 是一类不具备生物细胞基本特性但带有特定遗传信息的微生物, 它们往往兼具活性和非活性的特点。病毒没有完整的细胞结构, 无法独立进行新陈代谢活动。所有的生命细胞均含有 DNA 和 RNA, 而病毒往往只含其中一项。病毒缺乏蛋白质合成系统, 包括核糖体和酶。病毒的最大特点是其寄生性。只有寄生于生命细胞, 才能显示其活性。病毒寄生于生物细胞 (宿主), 利用细胞内的复制、转录和翻译系统来对病毒自身的遗传物质进行复制和扩增。与大多数微生物一样, 病毒具有多样性、广泛性和易变性。由于病毒所含遗传信息特别少 (约 5000 ~ 20 万个碱基对), 结构相对简单 (一般仅含核酸和蛋白质外壳), 发生基因突变的概率异常高而易于产生新种。这也是流行性感冒病毒疫苗需要每年更新、艾滋病难以控制和治愈的主要原因。绝大多数病毒不耐热 (可在 100℃ 以下被灭活)、对其他的物理和化学消毒手段也较敏感, 对胁迫条件的耐受性和敏感度与常规的细菌细胞相似。但导致疯牛病的朊病毒 (prions) 对物理性或化学性恶劣条件却具有超强耐受性。病毒对宿主细胞具有专一性。如细菌病毒只攻击或寄生于细菌细胞, 因此被称为噬菌体。植物病毒一般也不会攻击或寄生于细菌、真菌或动物细胞。同样, 人细胞病毒与动物细胞病毒之间通常也不交叉寄生, 由于宿主细胞的相似性以及病毒的易变性, 提高了人细胞病毒与动物细胞 (不同宿主) 病毒交叉传染的概率, 因此某些禽流感病毒能从鸟类传染给人类。在现代制药工业, 特别是生物制药领域, 由于病毒颗粒 (直径一般在 0.03 μm ~ 0.3 μm 之间) 能穿过除菌过滤系统, 对于非最终灭菌的药品或生物制品易被病毒污染。

1.1.2 真核微生物

真核微生物 (eukaryotic microorganisms) 是一类具有真核细胞结构的微生物, 具有成型细胞核 (nucleus) 和多种细胞器。真核细胞的细胞器主要包括产生能量的线粒体 (mitochondria, 有氧呼吸) 或氢化酶体 (hydrogenosome, 厌氧呼吸)、叶绿体 (chloroplasts, 光合作用), 协助细胞内生化活动的内质网和高尔基体; 降解细胞内大分子物质的溶酶体 (lysosome) 等。真核微生物以真菌 (fungi) 为主体, 同时包括原生动物 (protozoa) 和藻类 (algae)。因分类方法的不同, 原生动物有时也划归动物范畴, 藻类亦归属于植物界。真菌包括单细胞酵母 (yeasts)、多细胞丝状霉菌 (molds) 和多细胞丝状并能形成大型子实体的蘑菇 (mushrooms)。霉菌的分生孢子 (conidia)、子囊孢子 (ascospore) 和蘑菇的担孢子 (basidiospores) 均不耐热 (在 100℃ 下易被杀灭), 因其体积大而易于被滤除。在制药和食品工业, 真核微生物会导致原料污染并产生真菌毒素。真菌孢子在空气中具有漂浮性, 往往需要用熏蒸法 (雾状过氧化氢、臭氧等) 才能将

其清除。

1.1.3 原核微生物

与真核细胞相比,原核微生物 (prokaryotic microorganisms) 细胞没有成型细胞核, DNA 双链聚缩成拟核 (nucleoid), 也没有固定形态的细胞器。根据进化路线的不同, 原核微生物被分为细菌 (bacteria) 和古细菌 (archaea) 两大类。作为原核微生物的主体, 细菌种类繁多、形态结构多样, 生理特性也各不相同, 因此它们能在不同的环境条件下生存。古细菌的数量和种类相对较少, 多为化能营养型生物 (chemotroph) 即通过氧化无机化合物获取能量。古细菌主要包括一些嗜极性细菌 (extremophiles) 如嗜盐菌 (halophiles) 和在极端温度或极端酸性或碱性条件下生长的细菌, 以及产甲烷菌 (methanogens) 等。

细菌种类繁多。按能量的摄取方式可分为三种: 化能有机异养型 (chemoorganotrophs)、化能无机自养型 (chemolithotrophs) 和光合细菌 (phototrophs)。按是否需要氧气降解能源物质可分为: 需氧型 (aerobes)、厌氧型 (anaerobes)、微需氧型 (microaerophilic)。按细胞壁结构的不同可分为: 革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌。根据对生长条件的需求, 细菌会分为不同的生长类型。按照进化关系和遗传信息 (核糖体 RNA 16S 的 DNA 序列) 的相似度, 不同细菌间的亲缘关系呈现于图 1.2。

细菌形态多样, 但以球形 (球菌, cocci) 和棒形 (杆菌, bacilli) 为主, 有些杆菌呈弯曲螺旋形 (称为螺旋杆菌, spirilla), 还有少数呈丝状或不规则形状。细菌的形态由细菌细胞壁和胞内骨架结构来维持。每个细菌的形态会因其生活环境而发生改变, 如弧菌 (vibrio) 在对生长不利的胁迫条件下会从棒形转变成球形。细菌多以单个细胞存在 (如大肠杆菌, escherichia), 但有些细菌细胞会两个连在一起 (如奈瑟氏菌, neisseria), 或多个细胞组成链状 (如链球菌, streptococcus) 或聚集成葡萄串状 (如葡萄球菌, staphylococcus)。丝状 (filamentous) 细菌则以放线菌 (actinobacteria) 为代表。还有些细菌呈现像真菌菌丝状的丝状分枝形态, 如诺卡菌属 (Nocardia)。图 1.3 列出了以上所介绍的几种典型形态的细菌。

细菌细胞结构虽然简单, 但不同种间差异非常大。细菌细胞的内部结构主要包括细胞膜、细胞骨架、不被膜包裹的遗传物质、蛋白颗粒、糖元颗粒等。细菌的主要生理生化活动 (如能量物质 ATP 的生成、电子传递等) 在细胞膜上进行。细菌细胞的外结构主要包括细胞壁、细胞外膜 (革兰氏阴性菌特有)、帮助细菌运动的鞭毛 (flagella)、细菌细胞间传递遗传物质用的性菌毛 (pilus) 以及帮助细菌细胞附着到物体表面的纤毛 (fimbria) 等。由于细菌细胞间细胞壁结构的差异, 细菌被分为两大类, 革兰氏阳性 (G^+) 细菌和革兰氏阴性 (G^-) 细菌。

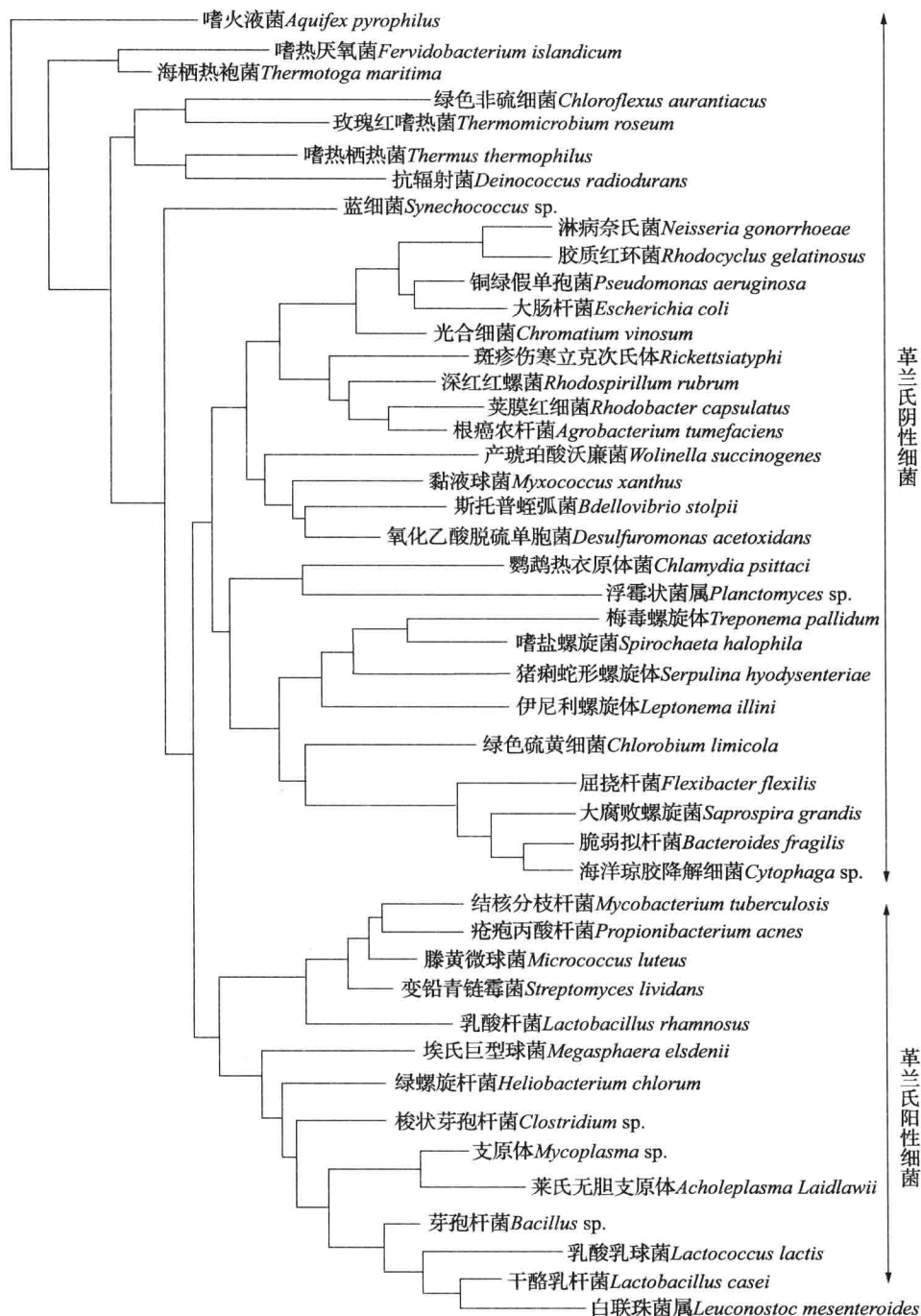


图 1.2 细菌种属间亲缘关系图 (Balows et al., 1992)

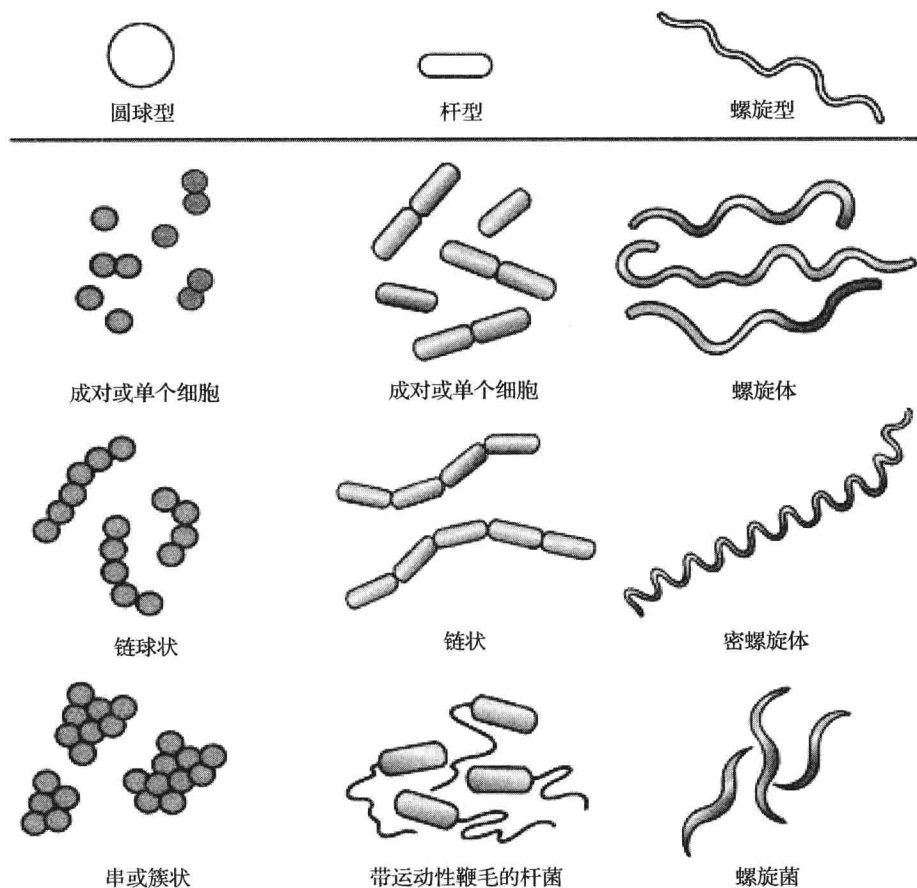


图 1.3 细菌的典型形态特征

图 1.4 表示了革兰氏阳性细菌和革兰氏阴性细菌在细胞外结构上的主要差异。这两类细菌在对细胞外不良条件的耐受能力上有很大差别。革兰氏阳性细菌对物理性胁迫条件（如加热、高渗透压、高压、低水活度等）的耐受性强于革兰氏阴性细菌，但对化学性胁迫条件（如化学物质、溶菌酶、抗生素等）的耐受性弱于革兰氏阴性细菌。

热原是导致人体发热的有毒物质。研究发现，热原主要分为两大类，一类是来自革兰氏阴性（ G^- ）细菌的脂多糖类（lipopolysaccharide），俗称为细菌内毒素，它分布于革兰氏阴性（ G^- ）细菌的细胞外膜；另一类是主要来自革兰氏阳性（ G^+ ）细菌的肽聚糖（peptidoglycan）和磷壁酸（teichoic acid），它们是细菌细胞壁的主要组成成分（见图 1.4）。革兰氏阳性细菌的细胞壁层的厚度远大于革兰氏阴性细菌，因此由肽聚糖和磷壁酸引起的热原反应主要由革兰氏阳性细菌

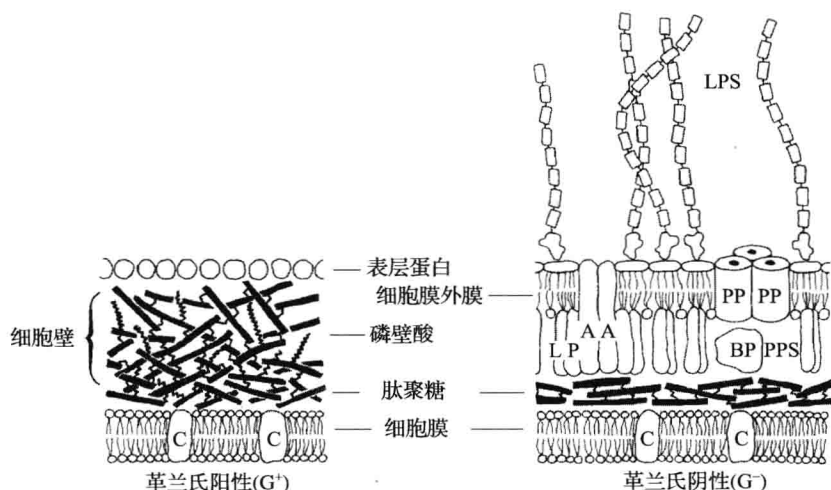


图 1.4 革兰氏阳性细菌(G⁺)和革兰氏阴性细菌(G⁻)在细胞外结构上的差异示意图

注：PP—分布在革兰氏阴性细菌细胞外膜上特有的管状蛋白，是某些大分子物质的传递通道；C—分布在细胞膜上的蛋白，负责大分子物质的搬运和合成等；BP—结合/粘合蛋白；PPS—细胞壁与细胞膜间质；A—分布在革兰氏阴性细菌细胞外膜上的蛋白；LP—磷脂蛋白；LPS—脂多糖（内毒素的主要成分）（摘自 Sikkema 等，1995）。

引起。就致热反映的效价（单位质量物品引起的热原反应程度）而言，细菌内毒素远高于肽聚糖和磷壁酸。因其耐热性强，热原一般不能被常规的湿热灭菌工艺灭活。即使微生物被杀灭，热原物质依然会存在于死的细菌细胞或残留物中。控制热原的有效手段主要包括高温干热、反渗透、控制无菌产品生产的每个环节，防止微生物污染。

细菌芽孢（endospores）是对恶劣环境具有超强抵抗力的分化细胞（differentiated cells）。对芽孢细菌研究的最多的是杆菌属（*Bacillus*）和生孢梭菌属（*Clostridium*）。细菌形成芽孢是对其遭遇不良生活环境时的保护反应。一旦形成芽孢，细菌处于稳定的休眠状态，几乎停止呼吸代谢活动，并且可持续很长时间，直至遇到其适宜的生长环境时萌发而转化到正常的细胞状态。细菌芽孢对外界恶劣环境条件的抵抗性是由以下因素决定的：1）有多层超厚、坚硬、致密且结构复杂的孢壁；2）芽孢内含水量极低，利于保护生命物质；3）遗传物质和其他生化物质由特殊的酸溶性芽孢蛋白（Acid-soluble spore protein）包裹；4）特别的 DNA 修复系统。需要指出的是，芽孢的结构会随着其种类不同而有所变化，因此不同种细菌芽孢对外界的抵抗性也不同。因为细菌芽孢对恶劣环境具有超强抵抗力并且比较稳定，通常选用芽孢作为灭菌用生物指示剂。第 3 章详细介绍芽孢的制备和生物指示剂的制备。