附件1

**北京市医疗器械病毒灭活工艺验证检查指南**

**（征求意见稿）**

同种异体植入性医疗器械和动物源性医疗器械作为高风险医疗器械，其质量至关重要。其与普通的无菌医疗器械的主要区别在于病毒是否已被完全灭活，未灭活的产品应用到人体则会增加病毒传播和免疫原性等方面的安全风险，且存在材料表征上的困难，因此医疗器械病毒灭活工艺控制显得尤为重要。《医疗器械生产质量管理规范》及其配套附录、现场检查指导原则中均对医疗器械病毒灭活提出了明确的要求。

本检查指南归纳了医疗器械生产过程中特定病毒灭活工艺的效果进行验证的一般要求，旨在帮助北京市医疗器械监管人员增强对病毒灭活知识的了解和学习，提高全市医疗器械监管人员对医疗器械病毒灭活过程的监督检查水平。同时，为医疗器械生产企业加强对医疗器械病毒灭活的管理提供参考。医疗器械生产企业应当依据具体产品的特性明确所采用的病毒灭活工艺及相关参数等要求的适宜性，如果有能够满足相关法规要求的其他方法，也可以采用，但是需要提供详细的研究资料和验证资料。

当国家相关法规、标准、监管要求等发生变化时，应当重新修订以确保本检查指南持续符合要求。

一、适用范围

本检查指南可作为北京市药品监督管理局组织、实施医疗器械注册质量管理体系现场核查、《医疗器械生产许可证》现场核查、医疗器械生产监督检查等涉及医疗器械病毒灭活过程检查的参考资料。

二、检查要点

（一）原则要求

我国目前对同种异体植入性医疗器械产品组织供体的病毒筛选多采用检测血清中病毒特异性抗体或抗原的方法，其中对人免疫缺陷病毒（HIV）还要求检测血液中的病毒核酸。但是，尽管对供体进行了严格的筛选，仍然存在漏检和未知病毒存在的风险，以及生产过程中带入外源病毒的风险。因此，要求同种异体植入性医疗器械产品在生产过程中采用有效的病毒灭活工艺，并对病毒灭活工艺的有效性进行科学的验证。

动物源性医疗器械对于感染病毒和传染性因子的风险控制也需至少从源头控制和工艺过程控制两方面着手，企业应按照医疗器械生产质量管理规范的相关要求在生产质量体系中建立一套专门针对动物源性风险因素的控制和追溯体系。在动物源性材料或医疗器械的生产工艺中需考虑设置病毒灭活的相关步骤，企业应对病毒灭活工艺的有效性进行科学的验证。

灭活和去除病毒和/或传染性因子的处理步骤有可能是以牺牲材料本身的使用性能或增加新的风险为代价的，生产企业需充分评估其对产品的不利影响，以保证产品最终能够安全有效地使用。

（二）现场检查关注点

1. 查看病毒灭活的确认报告，报告是否采用有效的方法灭活、去除病毒和其他传染性病原体，并对其工艺过程的有效性进行确认。需要关注开展病毒灭活确认研究单位的资质，以及所选择的指示病毒的适宜性和灭活效果的判定。

2.查看病毒灭活工序的标准操作规程，重点关注该标准操作规程中的灭活方法和过程参数与病毒灭活确认报告相关要求是否一致。

3.查看病毒灭活工序的记录，重点关注记录中病毒灭活的步骤和参数执行是否与病毒灭活标准操作规程一致。包括查看参数范围及数值等是否与经验证的工艺一致，是否对验证过的关键参数（如pH、温度、反应时间等）进行监控及记录，监控及记录的数值是否有偏差，如有偏差是否有对病毒灭活效果影响的分析与评估，是否有经验证过工序相关的其他记录，即工序有关的所有信息（如深冷监测、冷冻监测、环境监测、水质监测、清场监测等），信息记录内容是否完整，如有偏差是否有对病毒灭活效果影响的分析与评估。

4.需关注产品原材料、结构组成、生产工艺、生产场地变更等情况，是否对可能影响病毒灭活的效果进行了评估，确认是否需对病毒灭活工艺的效果进行再验证。

（三）同种异体植入性医疗器械病毒灭活控制要求

1.同种异体植入性医疗器械常用的病毒灭活方法

同种异体植入性医疗器械的病毒灭活有多种方法，企业应根据产品的特性选择合适的病毒灭活工艺。采用病毒灭活工艺应综合考虑病毒灭活效果的验证，病毒灭活工艺对产品性能的影响，病毒灭活工艺本身的公认性、可靠性、重现性、易放大性及经济性。常用的病毒灭活方法举例如下。

（1）巴斯德消毒法（巴氏消毒法）

巴氏消毒法是湿热灭活法之一，利用病毒不耐热的特点，通过适当温度和保温时间处理，灭活病毒。该灭活方法可灭活脂包膜和部分非脂包膜病毒。同种异体植入性医疗器械在充分清洗血液及骨髓成分后，可运用该方法进行病毒灭活。采用该方法时应考虑温度分布的均一性和灭活时间。

（2）γ射线辐照灭活法

γ射线辐照灭活法是主要通过破坏核酸而灭活病毒，其优点包括灭活效率高、穿透力强、剂量易控制、无有害物质残留、无明显温度升高等。由于病毒在不同介质中对射线的抗性不同，该方法用于同种异体植入性医疗器械的病毒灭活时，应去除产品中的宿主组织和细胞，例如同种异体骨应充分清洗血液及骨髓成分。采用该方法时应根据产品的特性确定辐照剂量，考虑辐照剂量的分布和灭活时间。

（3）过氧乙酸-乙醇灭活法

过氧乙酸-乙醇灭活法可灭活脊髓灰质炎病毒、艾滋病病毒、伪狂犬病病毒、牛病毒性腹泻病毒、猪细小病毒等多种病毒。其用于同种异体植入性医疗器械病毒灭活的效果已为实验室和临床试验所证实。过氧乙酸具有极强的病毒灭活能力，乙醇可降低溶液的表面张力，有助于消毒剂完全渗透入同种异体植入性医疗器械中。采用该方法时应严格控制产品过氧乙酸残留量及乙醇残留量，考虑灭活实际浓度和灭活时间。

（4）乙醇灭活法

乙醇是临床上最为常用的表面消毒剂。该方法对多数有包膜病毒，如单纯疱疹病毒、艾滋病病毒等具有灭活作用。在用于同种异体骨的病毒灭活时，应充分清洗血液及骨髓成分。采用该方法时应严格控制乙醇残留量，考虑乙醇浓度和灭活时间。

2.同种异体植入性医疗器械病毒灭活工艺的验证

（1）指示病毒的选择

应选择医疗器械可能污染的病毒，或与该病毒理化性质相似的病毒。病毒选择应具有代表性，需考虑病毒颗粒的大小、核酸类型以及有无包膜等方面，应考虑选择对物理和/或化学处理有明显抗性的病毒。根据产品的特性及所采用的病毒灭活工艺，至少应选择四类指示病毒，包括有包膜RNA病毒、有包膜DNA病毒、无包膜RNA病毒、无包膜DNA病毒，可参照下表选择适宜的指示病毒。注册申请人应结合产品的生产工艺过程，考虑HIV对病毒灭活工艺的灭活抗性，确保相应剩余风险可接受。

表1 可经同种异体植入性医疗器械传播疾病的相关病毒及

可选用的指示病毒（举例）

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 病毒 | 基因组 | 包膜 | 大小（nm） | 指示病毒举例 |
| HAV | RNA | 无 | 20 | 脊髓灰质炎病毒（Polio virus）、脑心肌炎病毒（EMCV） |
| HBV | DNA | 有 | 45 | 鸭乙型肝炎病毒（DHBV）、伪狂犬病毒（PRV） |
| HCV | RNA | 有 | 40-60 | 牛病毒性腹泻病毒（BVDV）、辛德毕斯病毒（Sindbis virus） |
| B19 | DNA | 无 | 20 | 细小病毒（犬、猪）（CPV、PPV） |

（2）染毒方法

由于同种异体植入性医疗器械多为固体形态，应尽量模拟植入材料的病毒负载方式，考虑材料的结构、尺寸和致密性，以及病毒在材料中的分布情况，结合产品特点选择合适的染毒方法，可采用浸泡法染毒（若适用）。病毒灭活零时的滴度应至少≥106TCID50/mL，可根据产品和病毒的特点，选择合适的浸泡温度、时间及其他条件。

（3）方案设计

3.1试验分组：应进行合理分组，注意设置全面的对照组，对照组的设计应能够用于判定病毒灭活效果，以确保结果的科学性。建议包括细胞空白对照组、病毒对照组、样品细胞毒性对照组（或滴定前进行细胞毒性试验）、病毒灭活方法终止对照组及试验组。其中，病毒对照组的滴度是计算灭活量的基础，应证实其病毒的零时滴度≥106TCID50/mL。病毒灭活方法终止效果对照组需采用稀释、中和或其他适宜方法终止病毒灭活方法的作用，其病毒滴度应与病毒对照组相当或接近，以证实病毒灭活方法能够在设定的时间终止作用。试验组至少应有适宜的时间点（包括零时），以阐明病毒灭活的动力学，包括病毒灭活动力学曲线。

3.2观察指标：

3.2.1灭活病毒的滴度，采用细胞病变或其他适宜的指标。

3.2.2病毒灭活速率、灭活曲线。以列表和做图的形式报告验证结果。

3.3病毒灭活效果的判定

应综合判断病毒灭活的有效性，除了考虑病毒灭活的量以外，还必须考虑如下因素，审慎评价每次验证结果。

3.3.1所选择的指示病毒是否适宜，验证的设计是否合理。

3.3.2病毒滴度降低量：病毒灭活零时的滴度为污染了病毒的组织释放的病毒量，通过与病毒灭活后测定的残留病毒量比较，计算出该方法实际灭活病毒量。病毒滴度降低量≥4 logs，表示该方法灭活病毒有效。如因检测方法的灵敏度造成检测出的病毒降低量接近但小于4 logs时，应盲传三代，如无病毒检出，亦可认为是有效的去除/灭活病毒步骤。病毒去除/灭活有效性验证的目的是为了确定生产工艺去除/灭活病毒的能力，因此需获得生产全过程中估计去除/灭活病毒的总降低量。一般每种指示病毒的总降低量为各步骤降低数量的总和。但是由于验证方法的局限性，如分步骤中指示病毒降低量≤1 log，则不宜将其计算在总量中。

3.3.3病毒灭活动力学：病毒灭活通常不是简单的一级反应，评价验证结果不能仅考虑病毒降低量，同时也要考虑病毒灭活动力学。需以作图的形式报告灭活动力学验证结果。如果指示病毒残留量很快降到最低检出限度值，则说明此方法灭活病毒效果较好；如果指示病毒灭活速率缓慢，在灭活结束时才达到最低检出限度值，则不能认为是一个有效的病毒灭活方法，或者残留的指示病毒对该灭活方法有抵抗力，说明该步病毒灭活方法无效。

（4）病毒灭活工艺验证原则

4.1若采用一步病毒灭活工艺，应同时对有包膜RNA病毒、有包膜DNA病毒、无包膜RNA病毒、无包膜DNA病毒等四类病毒或其指示病毒（参见表1）的灭活效果均达到4 logs以上，可认为是有效病毒灭活工艺；若采用多步不同灭活原理的病毒灭活工艺，应分别进行病毒灭活效果验证，并保证上述每类病毒灭活工艺至少有一步的灭活效果可达到4 logs以上。

4.2若采用的病毒灭活/去除工艺将导致医疗器械产生不可接受的性能改变，则需要根据产品来源、采集及过程控制情况以及对患者的风险/受益分析来判断其可接受性，但其单一去除/灭活病毒步骤的降低量仍需达到4 logs以上。

5.举例说明病毒灭活效果的判断

5.1初始病毒负载量为6 logs ，检测到剩余病毒量为4 logs，则该病毒灭活工艺不是有效工艺，只能说明具有一定的病毒灭活作用。

5.2初始病毒负载量为6 logs ，但由于产品本身的细胞毒作用使得检测灵敏度限值为4 logs ，仅能证明灭活2 logs 的病毒。此种情况需改变试验设计重新进行验证，或者应盲传三代，如仍无病毒检出，可认为是有效的病毒灭活方法。

5.3初始病毒负载量为6 logs ，但仍可检测到2 logs 的剩余病毒，且清除病毒的量可重复，应认为是有效的灭活病毒的方法。

5.4初始病毒负载量为6 logs ，之后未检测出病毒。但是由于检测灵敏度限值为2 logs ，仅能认为大约灭活了4 logs 病毒。事实上可能等于或大于4 logs ，因此应判定此方法为有效的灭活病毒的方法。

6.其他需考虑的问题

6.1如果样品必须做进一步处理，或不同时间取出的样品要在同一时间进行测定，应考虑这些处理方法对病毒检测结果的影响。

6.2模拟的生产工艺参数应尽可能与实际的生产工艺相一致，如pH、温度、反应时间等。应分析生产工艺中各种参数的偏差对病毒灭活效果的影响。

6.3病毒灭活工艺对某些类型病毒灭活效果的局限性。

（四）动物源性医疗器械病毒灭活控制要求

为了提高动物源性医疗器械的安全性，生产过程中需存在特定的灭活/去除病毒工艺步骤。为确认这些工艺步骤对于灭活/去除病毒的有效性，需进行相应的验证工作。对这些工艺的灭活/去除病毒有效性的验证，需至少遵循以下原则：

1.验证研究的设计

（1）病毒灭活/去除有效性验证研究通常是将已知量的指示用活病毒，加入到待验证的工艺步骤处理前的模拟原材料或中间品中，然后定量测定经工艺步骤处理后指示病毒数量下降的幅度，由此评价生产工艺的去除/灭活病毒效果。需合理设计与实际生产工艺相关的病毒去除/灭活研究试验方案。一般只对可能或预期具有病毒去除/灭活效果的工艺步骤进行验证，不必对每个生产工艺步骤都进行验证。

为达到有效地去除/灭活效果，生产工艺中通常会联合使用灭活与去除步骤，甚至多个从机制上能够互补的去除和/或灭活步骤。如果产品的生产工艺中包含了采用不同病毒去除/灭活方法（这里指不同机制的方法）的灭活/去除工艺步骤，需对这些步骤分别进行病毒去除/灭活效果验证。每一灭活/去除工艺步骤的病毒降低系数计算公式如下：

降低系数 R = log10 [（V1×T1）/（V2×T2）]

其中，V1为步骤开始前材料的体积，V2为步骤完成后的材料的体积，T1为步骤开始前材料中的指示病毒滴度，T2为步骤完成后材料中的指示病毒滴度。

注意：降低系数计算时要基于样品中可检测的指示病毒量，而不是基于所加入的指示病毒量。

（2）为避免将任何病毒人为的引入实际生产设施，验证工作应在单独的实验室中进行，因此通常采用缩小规模的生产工艺来模拟实际生产工艺。采用缩小规模生产工艺的方法，需尽可能模拟真实生产过程，按照能代表去除和/或灭活病毒能力最差情况的条件进行设计。需分析生产工艺中各种参数的偏差对病毒去除/灭活效果的影响。

（3）病毒灭活/去除的有效性同材料的结构、尺寸和形状以及病毒在材料中的分布有关，在研究设计中宜对此予以考虑。当验证样品为固体材料时，需尽量模拟生物材料的病毒负载方式，使负载指示病毒充分而且均匀地浸入到材料的内部。若此法不可行，则需尽可能采用对于去除/灭活效果更为不利的指示病毒负载方式。

（4）要获得对每个灭活/去除工艺步骤的准确评价，必须保证每个步骤在起始时加入了足够多的指示病毒负载量。然而，所加入的指示病毒悬液的体积不宜超过试验样品总体积的10%，以使试验样品在成分方面与生产材料保持相近。

（5）如果可能，含有指示病毒的试验样品除所验证的病毒灭活/去除步骤之外不宜再经过进一步的处理（如超速离心、透析）或储存而直接进行检测。在进一步处理或储存无法避免时，宜采用适当的对照，以确定这些处理和储存过程对研究结果的影响。需详细说明样本制备及验证试验的过程并论证其合理性。

（6）所采用的病毒定量检测分析方法需具有充分的灵敏度和可重复性，需设计适宜的重复样本试验和对照，以确保结果具有统计学意义上足够的精确性（同一检测方法内样本组内和组间差异的95%可信限宜达到±0.5log以内，否则需对检测结果的可信度进行充分的论证）。需考虑研究材料中的某些特殊成分可能会对检测的准确度造成干扰，尽量设计采取相应措施避免这些干扰。若无法避免，必要时需对干扰进行定量评估。若采用感染性病毒检测以外的其他方法进行病毒测定，需提供充分的论证依据和理由。

（7）灭活研究宜设计为在不同的时间点（包括零时）采样，从而建立灭活动力学曲线。

（8）在进行去除研究时，如生产工艺中去除病毒的原理是通过将病毒分离为沉淀物或去除某些组分来降低病毒的感染性，则需对被除去的样品也进行研究。宜尽可能给出病毒在不同部分间的对比分布。

2.指示病毒的选择

首先，需要选择与实际生产用的动物源性材料中可能含有的病毒种类相关的指示病毒，不能用相关病毒的，要选择与其理化性质尽可能相似的指示病毒；第二，所选择的指示病毒理化性质需有代表性（病毒大小、核酸类型以及有无包膜），其中至少需包括一种对生产工艺所涉及的物理和/或化学处理有明显抗性的病毒；第三，指示病毒初始滴度需要尽可能高（一般需≥106/mL）。

表2列举了已用于病毒灭活/去除研究的指示病毒。病毒的耐受性与特定的处理方式有关，只有在了解病毒生物特性和生产工艺特定情况下才能使用这些病毒，而且实际结果会随着处理情况的变化而变化。

表2 已用于病毒灭活/去除研究的指示病毒举例

| 病毒 | 科 | 属 | 天然  宿主 | 基因组 | 囊膜 | 大小 （nm） | 形状 | 耐受性 |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 水泡性口炎病毒（VSV） | 弹状病毒 | 水泡性病毒 | 马、牛 | RNA | 有 | 70×175 | 子弹状 | 低 |
| 副流感病毒（PIV） | 副粘液  病毒 | 副粘液病毒 | 多种 | RNA | 有 | 100—200 | 多面体/球形 | 低 |
| 鼠白血病病毒（MuLV） | 逆转录  病毒 | C型肿瘤病毒 | 小鼠 | RNA | 有 | 80—110 | 球形 | 低 |
| 辛德比斯病毒（SbV） | 披盖病毒 | 阿尔发病毒 | 人 | RNA | 有 | 60—70 | 球形 | 低 |
| 牛病毒性腹泻病毒（BVDV） | 披盖病毒 | 瘟病毒 | 牛 | RNA | 有 | 50—70 | 多面体/球形 | 低 |
| 伪狂犬病毒（PRV） | 疱疹病毒 | 水痘  病毒 | 猪 | DNA | 有 | 120—200 | 球形 | 中 |
| 脊髓灰质炎萨宾1型病毒（PV1） | 微小RNA病毒 | 肠道  病毒 | 人 | RNA | 无 | 25—30 | 二十  面体 | 中 |
| 脑心肌炎病毒（EMCV） | 微小RNA病毒 | 心病毒 | 小鼠 | RNA | 无 | 25—30 | 二十  面体 | 中 |
| 呼肠孤病毒3型（Reo-3） | 呼肠孤  病毒 | 正呼肠孤病毒 | 各种 | RNA | 无 | 60—80 | 球形 | 中 |
| 猿猴空泡病毒40（SV40） | 多瘤病毒 | 多瘤  病毒 | 猴 | DNA | 无 | 40—50 | 二十  面体 | 很高 |
| 人类免疫缺陷病毒（HIV） | 逆转录  病毒 | 慢病毒 | 人 | RNA | 有 | 80—100 | 球形 | 低 |
| 甲型肝炎病毒（HAV） | 微小RNA病毒 | 肝炎  病毒 | 人 | RNA | 无 | 25—30 | 二十  面体 | 高 |
| 细小病毒（犬、猪）（CPV、PPV） | 细小病毒 | 细小  病毒 | 犬、猪 | DNA | 无 | 18—24 | 二十  面体 | 很高 |

3.效果的判定

对于病毒去除/灭活效果的判断，应考虑同时达到以下两个要求：

（1）去除/灭活降低系数的要求

病毒去除/灭活有效性验证的目的是为了确定生产工艺去除/灭活病毒的能力，因此需获得生产全过程中估计去除/灭活病毒的总降低系数。一般每种指示病毒的总降低系数为各步骤降低系数的总和。但是由于验证方法的局限性，如分步骤中指示病毒降低系数≤1 log，则不宜将其计算在总量中。在分析试验结果时需注意，如果将多步骤的去除/灭活病毒降低系数相加（特别是将去除/灭活效果不明显的步骤相加）或者将工艺过程中重复采用的同样或者类似去除/灭活机制形成的去除/灭活效果累加，可能会高估工艺实际能达到的效能。需考虑有效步骤对指示病毒的去除/灭活效果可能与实际生产工艺中使用的效果有一定偏差。

一般来说，医疗器械的生产过程中去除/灭活病毒的总降低系数宜达到6 logs以上（即病毒数量下降到进行去除/灭活前数量的百万分之一以下），并且原则上需至少有一个病毒去除/灭活步骤的降低系数达到4 logs以上（如因检测方法的灵敏度造成检测出的病毒降低系数接近但小于4 logs时，应盲传三代，如无病毒检出，亦可认为是有效地去除/灭活病毒步骤）。如果采用总降低系数达6 logs的病毒灭活/去除工艺将导致医疗器械产生不可接受的性能改变，则需要根据动物源性材料的来源、采集及处理过程控制情况以及对患者的风险/受益分析来判断其可接受性，但其单一去除/灭活病毒步骤的降低系数仍需达到4 logs以上。

即使验证研究证明了去除/灭活病毒工艺的有效性，这仅说明动物源性材料中残留病毒的感染性大幅度降低，但其数值永远不可能降至零。

（2）病毒灭活动力学要求

评价验证结果不能仅考虑病毒降低量，同时也要考虑病毒灭活动力学。需以作图的形式报告灭活动力学验证结果。如果指示病毒残留量很快降到最低检出限度值，则说明此方法灭活病毒效果较好；如果指示病毒灭活速率缓慢，在灭活结束时才达到最低检出限度值，则不能认为是一个有效的病毒灭活方法。

4.关于朊蛋白

由于目前尚难以采用致病性朊蛋白（如传染性海绵状脑病因子）的指示因子对去除朊蛋白的工艺进行验证，因此对牛、羊源性材料制品的传染性海绵状脑病安全性还主要是对源头进行控制。基于目前对朊蛋白去除/灭活工艺验证的认知程度，对于牛、羊源性医疗器械，可以按照本指南阐述的原则进行的病毒去除/灭活有效性验证。随着对朊蛋白研究水平的不断提高，相应的要求也将随时调整。

三、名词术语

病毒灭活工艺：是指生产企业采用特定的病毒灭活方法对其产品进行病毒灭活。

同种异体植入性医疗器械：是指以人体来源组织为原料加工或组成的产品，例如同种异体骨、肌腱、脱细胞异体真皮等。

动物源性医疗器械：是全部或部分采用无生命动物组织制成的或取材于动物组织的医疗器械产品（体外诊断用医疗器械除外），这些材料是多种多样的，可以构成该器械的主要部件（例如牛/猪源心脏瓣膜、羊肠缝合线、止血材料等）、涂层或者浸渗剂（例如肝素、明胶、胶原等），也可成为生产过程中所用的辅助材料（例如牛脂等）。

参考文献：

1.《关于发布医疗器械生产质量管理规范的公告》（国家食品药品监督管理总局公告2014年第64号）

2.《关于发布医疗器械生产质量管理规范附录无菌医疗器械的公告》（国家食品药品监督管理总局公告2015年第101号）

3.《关于发布医疗器械生产质量管理规范附录植入性医疗器械的公告》（国家食品药品监督管理总局公告2015年第102号）

4.《关于印发医疗器械生产质量管理规范现场检查指导原则等4个指导原则的通知》（食药监械监〔2015〕218号）

5.《同种异体植入性医疗器械病毒灭活工艺验证技术审查指导原则（2020年修订版）》

6.《动物源性医疗器械注册技术审查指导原则（2017年修订版）》

7.《血液制品去除／灭活病毒技术方法及验证指导原则》（国药监注〔2002〕160号）

8. YY 0771动物源医疗器械系列标准