中间药液生物负载监测中检验量选择的风险研究

A Risk Study on Selecting Sample Volume in the In-process Drug Solution Bioburden Monitoring

王杠杠，王似锦，马仕洪 *

（中国食品药品检定研究院，北京　100050）

WANG Ganggang, WANG Sijin, MA Shihong*

(*National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050*)

摘要：中间药液生物负载监测是无菌药品微生物污染控制策略中非常重要的一部分。该文以除菌过滤前药液为例，基于泊松分布、负二项分布建立数据模型，模拟不同检验量情况下生物负载监测的合格判断概率，并分析检验量对误判概率的影响。结果显示，当除菌过滤前药液生物负载水平为每 100 mL 5 cfu 时，基于泊松分布和负二项分布计算检验量为 10 mL 时的误判概率分别为 9.02%、11.61%，分别是检验量为 100 mL 时误判概率的 6.58 倍、1.96 倍；当除菌过滤前药液生物负载水平为每 100 mL 20 cfu 时，基于泊松分布和负二项分布计算检验量为 10 mL 时的误判概率分别为 40.60%、50.00%，分别是检验量为 100 mL 时误判概率的 37.59 倍、10.12 倍。风险边界为 5%时，基于泊松分布，检验量为 10 mL 时的误判区间为每 100 mL 3 ～ 48 cfu；检验量为 100 mL 时的误判区间为每 100 mL 6 ～ 17 cfu。检验量较大时，结果误判的概率较低，在相同的风险边界下，判为合格药液的最大可能生物负载较低，对下游工艺的挑战性较小。

关键词：过程控制；生物负载；检验量；风险管理

中图分类号：R95；TQ460.7　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)01-0130-06

引用：王杠杠 , 王似锦 , 马仕洪．中间药液生物负载监测中检验量选择的风险研究 [J]．中国医药工业杂志 , 2025, 56(1) : 130-135．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.01.016

生产过程中的微生物监控对于确保药品的质量安全至关重要。尤其对于无菌药品而言，无论是除菌过滤工艺还是最终灭菌工艺，除菌过滤前或灭菌前药液的生物负载监控是微生物污染控制策略的必要组成部分，需要建立合理的监控方案以降低药品的微生物污染风险 [1]。国内外的法规标准 [2—4] 均对过滤前或灭菌前药液的生物负载有一定要求，除菌过滤前药液的生物负载一般不大于每 100 mL 10 cfu，最终湿热灭菌前药液的生物负载一般不大于每 100 mL 100 cfu。生物负载超标可能会对下游的除菌或灭菌工艺形成挑战，影响药品的无菌保证水平。

收稿日期：2024-04-30

基金项目：中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金项目（2022A7）

作者简介：王杠杠（1993—），女，硕士，从事药品微生物检验与控制研究。

通信作者：马仕洪（1972—），男，主任药师，硕士生导师，从事药品微生物检验与控制研究。

E-mail：mash@nifdc.org.cn

虽然法规中已有相关标准，但在实际监测过程中，由于微生物计数结果的可变性，当实际药液的生物负载与标准相当时，计数结果可能会超出标准限值 [5]。一方面，当菌落计数数值较低时，计数结果的相对标准偏差较大，很难准确估计药液的生物负载 [6]；另一方面，微生物在药液中可能分布不均匀，理解生物负载的监测结果时需考虑微生物的分布特点。因此，检验量会影响中间药液生物负载监测结果的准确性。当微生物在药液中均匀分布时，单位体积药液中微生物的分布服从泊松分布模型 [7]。但在实际情况下，药液中微生物的分布通常不均匀，低负载水平时，以负二项分布模型描述微生物在药液的分布情况更为恰当 [8]。

本研究以除菌过滤前药液为例，以泊松分布、负二项分布为基础建立数据模型，模拟不同检验量情况下生物负载监测结果的判定风险，以期从风险管理角度选择恰当的检验量。

1 模型选择与风险定义

1.1 模型选择

以泊松分布、负二项分布作为本研究的模型建立基础。

泊松分布的概率分布函数如式①所示，负二项分布的概率分布函数如式②所示。

$$P(x|\lambda)=\frac{e^{-\lambda}\lambda^{x}}{x!} \quad ①$$

$$P(x|\lambda,k)=\frac{\Gamma(\frac{1}{k}+x)(k\lambda)^{x}}{x!\Gamma(\frac{1}{k})(1+k\lambda)^{\frac{1}{k}+x}} \quad ②$$

式中：λ 为该分布的均值；k 为离散系数；负二项分布模型的离散程度可由其方差和均值的比值 $1+k\lambda$ 表示，本研究设定该比值为 2。

1.2 风险定义

假设药液中所有微生物细胞均可以形成单一菌落，基于模型建立需求，定义以下参数：V—检验量（单位：mL）；D—药液的生物负载水平（即每 100 mL 菌落计数）；AL—计数的可接受标准（单位：cfu），超出该限值则认为不合格；X—当检验量为 V 时的菌落计数结果（单位：cfu）。其中，$DV=\lambda$。药液检测结果为合格的概率（AP）如式③所示。

$$AP=Pr[X\leqslant AL|D] \quad ③$$

在确定的统计学分布基础上，设定参数 V、D、AL。针对除菌过滤前药液，限度标准为每 100 mL 10 cfu，AL=(10 cfu/100 mL)×V。根据泊松分布、负二项分布的概率分布函数计算在每 100 mL 药液中的菌落数≤ 50 cfu 的情况下，V=10、30、50、100 mL 时药液被判为合格的概率，并根据计算结果作图，评估发生误判的风险。

2 数据模拟与风险分析

2.1 基于泊松分布模型的模拟结果

假设药液中微生物的分布服从泊松分布模型，当检验量为 10、30、50、100 mL 时，D 与 AP 之间的关系如图 1 所示。随药液生物负载水平的升高，药液被判断为合格的概率降低，但检验量不同时，变化趋势不同。各检验量下所得趋势线的交叉点在每 100 mL 药液菌落数为 10 cfu 附近；当 D 接近 0 时，各检验量条件下 AP 均接近 100%；当 D 无限增大时，各检验量条件下 AP 均接近 0。

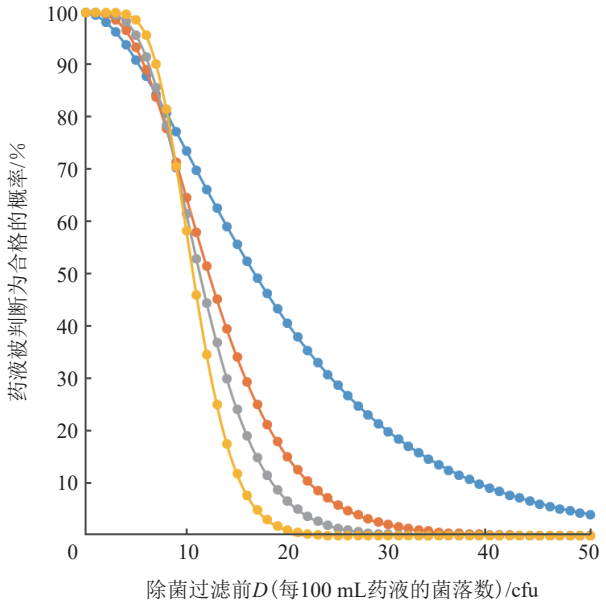


图 1 基于泊松分布时检验量（V）对结果合格概率（AP）的影响

Fig.1 Effect of Sample Volume (V) on Probability of Acceptable Result (AP), Based on Poisson Distribution

当每 100 mL 药液的菌落数分别为 1、5、15、20 cfu 时，药液被判为合格的概率和不合格的概率如表 1 所示。以每 100 mL 药液的菌落数为 5 cfu 的数据为例，在检验量为 10 mL 的情况下，误判概率为 9.02%，是检验量为 100 mL 时误判概率的 6.58 倍。

表 1 基于泊松分布时不同检验量条件下的判断概率/%

Tab.1 Probability Judgments under Different Sample Volume Conditions, Based on Poisson Distribution/%

检验量（V）/mL	判断结果	D（每 100 mL 菌落计数）			
		1 cfu	5 cfu	15 cfu	20 cfu
10	合格	99.53	90.98	55.78	40.60
	不合格	0.47	9.02	44.22	59.40
30	合格	99.97	93.44	34.23	15.12
	不合格	0.03	6.56	65.77	84.88
50	合格	100.00	95.80	24.14	6.71
	不合格	0	4.20	75.86	93.29
100	合格	100.00	98.63	11.85	1.08
	不合格	0	1.37	88.15	98.92

2.2 基于负二项分布模型的模拟结果

假设药液中微生物的分布服从负二项分布模型，当检验量为 10、30、50、100 mL 时，D 与 AP 之间

的关系如图 2 所示。随药液生物负载水平升高，药液被判断为合格的概率降低。各检验量下所得趋势线的交叉点也在每 100 mL 药液菌落数为 10 cfu 附近；当 *D* 接近 0 时，各检验量条件下 *AP* 均接近 100%；当 *D* 无限增大时，各检验量条件下 *AP* 均接近 0。

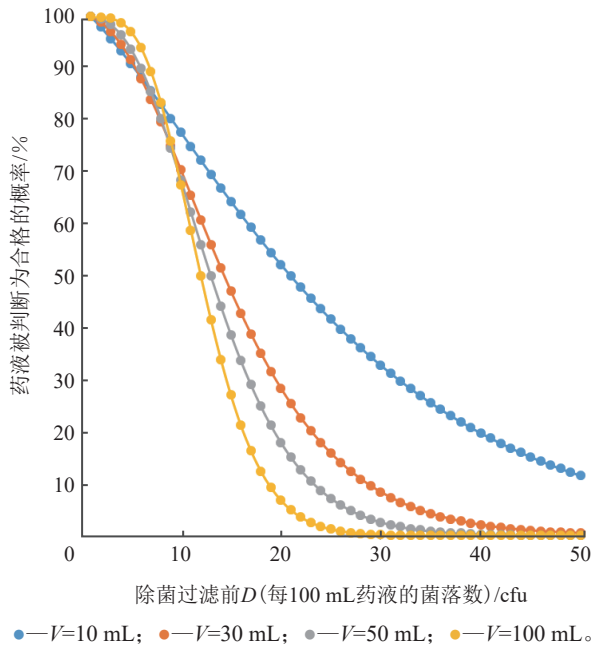


图 2　基于负二项分布时检验量（*V*）对结果合格概率（*AP*）的影响

Fig.2　Effect of Sample Volume (*V*) on Probability of Acceptable Result (*AP*), Based on Negative Binomial Distribution

当每 100 mL 药液的菌落数分别为 1、5、15、20 cfu 时，药液被判为合格的概率和不合格的概率如表 2 所示。以每 100 mL 药液的菌落数为 5 cfu 的数据为例，在检验量为 10 mL 的情况下，误判的概率为 11.61%，是检验量为 100 mL 时误判概率的 1.96 倍。

2.3　风险分析

当每 100 mL 药液的菌落数≤ 10 cfu 时，判断结果为药液合格的结论为正确，反之则为误判，此时结果误判概率为 1 - *AP*；当每 100 mL 药液的菌落数 > 10 cfu 时，判断结果为药液不合格的结论为正确，反之则为误判，此时结果误判概率为 *AP*。依据上述原则可获得微生物计数在服从泊松分布、负二项分布规律时，不同检验量情况下发生误判的概率趋势，如图 3 所示。

表 2　基于负二项分布时不同检验量条件下的判断概率 /%

Tab.2　Probability Judgments under Different Sample Volume Conditions, Based on Negative Binomial Distribution/%

检验量（*V*）/mL	判断结果	*D*（每 100 mL 菌落计数）			
		1 cfu	5 cfu	15 cfu	20 cfu
10	合格	97.97	88.39	61.87	50.00
	不合格	2.03	11.61	38.13	50.00
30	合格	98.89	88.11	42.85	25.39
	不合格	1.11	11.89	57.15	74.61
50	合格	99.53	90.06	33.66	15.09
	不合格	0.47	9.94	66.34	84.91
100	合格	99.95	94.08	21.22	4.94
	不合格	0.05	5.92	78.78	95.06

由图 3 可见，微生物分布不论是服从泊松分布还是服从负二项分布，检验量越大，结果误判的概率越小。同时，可见在各种情况下误判概率的最高点均在每 100 mL 药液的菌落数约为 11 cfu 处，提示药液的实际生物负载水平距离标准限值越近，越容易发生误判。

3　风险决策

3.1　不同检验量情况下的误判风险

在实际的药品生产过程中，对除菌过滤前药液的误判可能引发两类危害：一是药液生物负载低于标准限值，但被误判为不合格，以此引发偏差或不符合事件；二是药液生物负载高于标准限值，但被误判为合格，对下游的除菌过滤工艺形成挑战，可能影响终产品的无菌保证水平。前者会增加成本，后者则会导致产品质量安全问题，甚至威胁患者健康。

设定不同的风险边界，可估计不同检验量情况下误判风险的严重性。此处的风险边界可认为是药液发生误判的概率。风险边界为 1%、5%、10% 时，不同检验量对应结果的生物负载估计范围如表 3 所示。例如，风险边界为 5%，即要使结果误判概率不大于 5%，基于泊松分布，当 *V*=10 mL 时，每 100 mL 药液菌落数应≤ 3 cfu 或≥ 48 cfu；*V*=100 mL 时，每 100 mL 药液菌落数应≤ 6 cfu 或≥ 17 cfu。可见，在相同的风险边界条件下，增加检验量可增大能够进行准确估计的生物负载范围。

3.2　风险决策示例

假设过滤前药液体积较大，每 100 mL 药液的菌

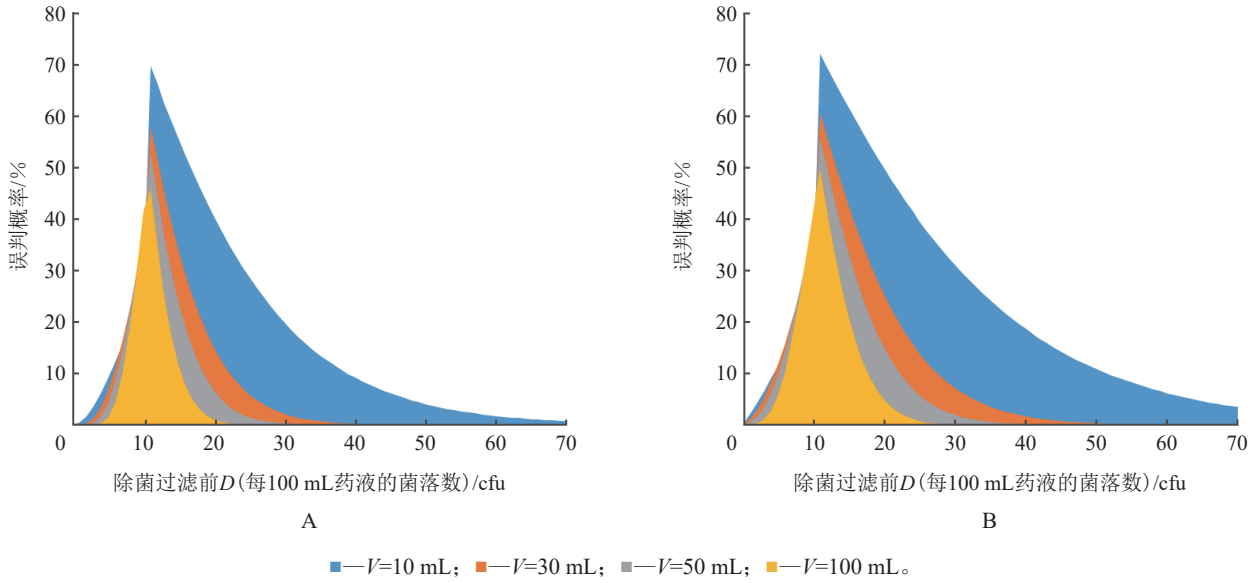


图 3 基于泊松分布（A）和负二项分布（B）时检验量（*V*）对结果误判概率的影响

Fig.3 Effect of Sample Volume (*V*) on Probability of Wrong Judgment, Based on Poisson Distribution (A) and Negative Binomial Distribution (B)

表 3 风险边界不同时检验量对生物负载估计范围的影响

Tab.3 Effect of Sample Volume on Estimation Range of Bioburden under Different Risk Bound Conditions

检验量（*V*）/mL	概率分布模型	*D*（每 100 mL 菌落计数）下限 /cfu			*D*（每 100 mL 菌落计数）上限 /cfu		
		风险边界 1%	风险边界 5%	风险边界 10%	风险边界 1%	风险边界 5%	风险边界 10%
10	泊松分布	1	3	5	67	48	39
	负二项分布	0	2	4	92	64	52
30	泊松分布	2	4	5	34	26	23
	负二项分布	0	2	4	44	33	28
50	泊松分布	3	5	6	27	22	19
	负二项分布	1	3	5	34	26	23
100	泊松分布	4	6	7	21	17	16
	负二项分布	2	4	5	25	20	18

落数监测历史数据多为 0 ～ 1 cfu，下游除菌工艺验证的冗余量为 200%，即限量标准为每 100 mL 不大于 10 cfu 时，工艺验证可接受的生物负载为每 100 mL 不大于 30 cfu。此时以负二项分布作为模型基础更为恰当。设定风险边界为 5%，由表 3 可见，当 $V \geqslant 10$ mL 时，若生物负载均值为每 100 mL 药液菌落数 <1 cfu，此时将合格药液误判为不合格的概率小于 5%，符合要求；$V \geqslant 50$ mL 时，判为合格药液的最大可能生物负载为每 100 mL 26 cfu，在下游工艺验证的冗余范围内（即每 100 mL 不大于 30 cfu），符合要求。因此，风险边界为 5%时，药液的检验量至少应为 50 mL。若风险边界设定为 1%，则药液的检验量至少应为 100 mL。风险边界的选择取决于产品的风险承受能力，如药液有抑菌性、下游工艺中有其他除菌或灭菌的工艺步骤，则产品的风险承受能力较高；如工艺尚不稳定、药液适宜微生物生长、生产过程中引入微生物污染的可能性高，则产品的风险承受能力较低，需选择较为严格的风险边界。

4 讨论

中间药液生物负载监测是无菌药品微生物污染控制策略中非常重要的一部分。对于法规标准中有所要求的中间药液（如除菌过滤前的药液），生产企业通常按法规标准中的要求选择检验量，而对于其他未在法规标准中明确要求的中间药液（如生物

制品原液），企业通常根据批产量、生产工艺自行制定限度标准并选择检验量。国外已有研究[8]讨论检验量对于除菌过滤前药液生物负载检测结果、终产品无菌保证水平的影响，重点探讨该场景下降低检验量的可行性。本研究虽以除菌过滤工艺为例，但应用范围不仅仅局限于除菌过滤前药液，也可应用于其他中间药液的生物负载监测。以泊松分布、负二项分布为基础模拟检验量对生物负载监测误判概率的影响，以及计算不同检验量、风险边界情况时药液生物负载的估计范围，能更直观地展示不同检验量情况下的结果判断风险。由结果可见，选择更大的检验量，可以更准确地估计药液实际的生物负载水平，发生误判的概率较低，既能够减少将合格药液误判为不合格带来的成本浪费，又能够降低将不合格药液误判为合格药液引起的药品质量安全风险。相同的风险边界下，选择更大的检验量，判为合格时药液的最大可能生物负载更低，对于下游工艺的挑战性更小。例如，对于除菌过滤工艺而言，相同的除菌过滤器可过滤的药液体积更大。同样的，应用于最终灭菌工艺时，对于灭菌工艺的挑战性也更小，终产品的无菌保证水平更高。

对于除菌过滤前的药液，通常会选择≥ 100 mL的检验量进行生物负载监测，但对于很多生物制品原液而言，总体积较小，生物负载标准又相对严格，部分企业采用与除菌过滤前药液相同的标准，即每100 mL 不大于 10 cfu，但考虑到总体积较小，检验量仅选择 10 或 20 mL[9]。此时，虽然检验量对于总体的代表性足够，但由于微生物计数可变性的特点，其检验结果受随机误差的影响非常大。参考本研究的结果（表 1、2），当每 100 mL 药液菌落数为 5 cfu，基于泊松分布和负二项分布模型计算检验量为 10 mL 时的误判概率分别为 9.02%、11.61%，分别是检验量为 100 mL 时误判概率的 6.58 倍、1.96 倍；当每 100 mL 药液菌落数为 20 cfu，基于泊松分布和负二项分布模型计算检验量为 10 mL 时的误判概率分别为 40.60%、50.00%，分别是检验量为 100 mL 时误判概率的 37.59 倍、10.12 倍。无论是合格还是不合格的药液，降低检验量均会导致更高的误判概率，对生产成本和药品质量都是不小的挑战。针对此种情况，建议在制定标准时，综合考虑微生物计数误差、下游工艺除菌能力以及可接受的风险水平，建立适当的标准，同时选择适宜的检验量和检验方法。

本研究以泊松分布和负二项分布为理论基础，模拟计算不同检验量情况下的误判概率，并列出以1%、5%和 10%为风险边界时生物负载的估值范围，上述结果可为药品生产企业在对除菌过滤 / 灭菌前药液以及其他中间药液的生物负载进行监测时选取合适的检验量提供参考。本文的数据并不能比较 2 种分布模型的优劣，而是基于文献中应用较多的 2 种分布模型分别计算数据，以说明检验量对结果判断的影响。哪种分布模型更为适用，取决于供试品的特点，需要收集实际样品的生物负载数据进行数据检验和分析。另外，本研究只讨论了由微生物分布所造成的计数结果判断风险，在实际的生物负载监测中，尤其是低生物负载水平的药液，还需要注意在取样、检验过程中避免引入微生物污染，以免发生由环境、人员、取样器具等造成的不符合事件[10]。

参考文献：

[1] EU. GMP Annex 1: manufacture of sterile products［S］. 2022.

[2] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品注射剂灭菌和无菌工艺研究及验证指导原则（试行）［EB/OL］.（2020-12-30）［2024-02-12］. https://www. cde. org. cn/main/news/viewInfoCommon/8a1c258dea8798a6c6d6c1e0a14d1c1f.

[3] FDA. Guidance for industry sterile drug products produced by aseptic processing-current good manufacturing practice［EB/OL］.（2020-04-05）［2024-02-12］. https://www. fda. gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/sterile-drug-products-produced-aseptic-processing-current-good-manufacturing-practice.

[4] EMA. Guideline on the sterilisation of the medicinal product, active substance, excipient and primary container［EB/OL］.（2019-03-06）［2019-05-07］. https://www. ema. europa. eu/en/human-regulatory-overview/research-development/

scientific-guidelines.

[5] JORNITZ M W, AKERS J E, AGALLOCO J P, *et al*. Considerations in sterile filtration. Part Ⅱ: the sterilizing filter and its organism challenge: a critique of regulatory standards [J]. *PDA J Pharm Sci and Technol*, 2003, **57**(2): 88-96.

[6] 王杠杠, 王似锦, 马仕洪. 试验平皿数对低微生物负荷水平药品计数结果准确性的影响 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(1): 96-100.

[7] 邓通洋, 程 琮, 冯维良, 等. 稀菌液细菌数服从泊松分布及其在菌落计数方面的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, **24**(9): 1255-1256.

[8] YANG H, LI N, CHANG S. A risk-based approach to setting sterile filtration bioburden limits [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2013, **67**(6): 601-609.

[9] BAIN D, HARDY D, BELL B L, *et al*. Microbial monitoring for biological drug substance manufacturing: an industry perspective [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2015, **69**(3): 451-460.

[10] SANDLE T. Improving microbiological assurance for bioburden tests [J]. *Eur Pharm Rev*, 2016, **21**(3): 41-44.

（上接第 112 页）

terminal low pH incubation [J]. *Biologicals*, 2012, **40**(5): 345-352.

[8] 梁 婧, 张潇文, 李策生, 等. 低 pH 孵放病毒灭活效果回顾性验证评价 [J]. 中国输血杂志, 2016, **29**(9): 915-917.

[9] 张 航, 容新宗, 黄 琰, 等. 狂犬病人免疫球蛋白低 pH 孵放工艺的病毒灭活验证 [J]. 中国生物制品学杂志, 2020, **33**(11): 1312-1316.

[10] ICH. ICH Q7, good manufacturing practice guidance for active pharmaceutical ingredients [EB/OL]. (2015-01-10) [2024-06-06]. https://database. ich. org/sites/default/files/Q7_Q%26As_Q%26As. pdf.