灭菌验证中生物指示剂阳性结果的成因分析与应对策略

Root Cause Analysis and Countermeasures for Positive Results of Biological Indicators in Sterilization Validation

马恒元，黄丽玲 *

（江苏恒瑞医药股份有限公司，江苏连云港 222047）

MA Hengyuan, HUANG Liling*

(*Jiangsu Hengrui Pharmaceuticals Co., Ltd., Lianyungang 222047*)

摘要：在无菌药品生产的质量保障体系中，生物指示剂（BI）验证结果判读是灭菌工艺确认与产品无菌保证的关键。然而，当前行业实践中常将单一 BI 阳性结果简单等同为灭菌失败，从而触发生产中断与复杂的偏差调查。文章揭示了该现象背后的科学本质：湿热灭菌后 BI 处于阴阳共存区，出现少量阳性结果具有统计学必然性；汽化过氧化氢（VHP）灭菌中的个别阳性可能源于异常抗性 BI，未必是工艺失控的直接证据。针对上述问题，该文提出：在湿热灭菌高风险区，可采用多份 BI 布点与最大可能数统计评估；在 VHP 灭菌验证关键位点，可部署多份 BI 以降低单一样本变异带来的误判风险；建议引入快速指示剂技术，结合实时监测手段，推动参数放行，构建主动预防型灭菌验证体系。

关键词：生物指示剂；灭菌验证；湿热灭菌；汽化过氧化氢；阴阳共存区；异常抗性生物指示剂

中图分类号：R953；TQ460.8^{+}2　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2026)06-0710-08

引用：马恒元, 黄丽玲. 灭菌验证中生物指示剂阳性结果的成因分析与应对策略[J]. 中国医药工业杂志, 2026, **57**(6): 710-717. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.06.013

在灭菌工艺验证中，生物指示剂（biological indicator，BI）阳性结果常被简单等同为灭菌失败，继而引发严重的连锁反应，包括生产中断、复杂的偏差调查、产品放行延迟等。目前，行业内普遍倾向于将 BI 阳性结果归咎于工艺参数（如温度、时间、灭菌剂浓度）的偶然偏离或操作失误。然而，BI 阳性与微生物统计学特性、固有变异性及化学灭菌动力学特点密切相关。在部分湿热灭菌工艺中，即使按照美国注射剂协会（Parenteral Drug Association，PDA）技术报告 TR1 2007 年版《湿热灭菌验证：灭菌程序的设计、开发、确认和日常监控》选择 BI，其经灭菌后仍可能处于阴阳共存区，有一定的统计学概率出现阳性结果。在汽化过氧化氢（vaporized hydrogen peroxide，VHP）灭菌过程中，受到芽孢团块、多层分布、载体材料特性，以及芽孢群体内罕见的抗性亚群等因素的影响，个别 BI 在经历完全、有效的灭菌循环后仍可能呈现阳性。这并非工艺失效，而是异常抗性 BI 响应的结果[1]。研究[2]表明，在 VHP 灭菌条件下，载体光洁度和芽孢纯度均会影响 BI 抗性；载体光洁度越差（表面粗糙、有凹陷），芽孢抗性越强。本文旨在通过系统分析湿热灭菌与 VHP 灭菌中 BI 阳性问题的根源，构建相应的科学应对框架，以推动灭菌验证体系由被动合规向主动预防的转变。

1　湿热灭菌过程中出现 BI 阳性结果的分析与预防

湿热灭菌是机制明确、应用广泛的终端灭菌方式。其微观机制为高温导致蛋白质分子内氢键断裂、空间构象不可逆重排，从而触发微生物死亡。在宏观动力学中，可把活芽孢视为“反应物”、死亡芽孢视为“生成物”，其杀灭过程符合质量作用定律；在实验中，微生物灭活过程遵循对数规律，可用阿伦尼乌斯方程定量表征。

在无菌药品生产中，终端灭菌验证通常采用过度灭菌工艺。该法通过验证其对高抗性微生物的杀灭能力，间接确保对实际微生物负载的灭活效果，

收稿日期：2026-01-28

作者简介：马恒元，高级工程师，从事药品生产质量管理工作。

通信作者：黄丽玲，高级工程师，从事药品生产质量管理工作。

适用于热稳定产品。通常，验证需同时满足物理杀灭时间（F_{phy}）与生物杀灭时间（F_{bio}）的要求。因此，当企业在验证过程中发现 BI 阳性结果时，不仅要质疑灭菌过程的有效性，还需面对产品召回、监管审查以及患者安全性风险等问题。由此可见，理解 BI 阳性的原因、制定调查及预防策略，对保障产品质量与合规性至关重要。

1.1 阳性偏差的根本原因调查及响应机制

BI 阳性是灭菌工艺验证与日常监控中的关键偏差，其产生原因可归纳为设备工艺、装载与操作、BI 自身质量缺陷等，需开展系统分析并采取针对性措施。在设备性能方面，需关注蒸汽质量（如使用缺乏潜热的超热蒸汽）、空气排除效果、温度分布均匀性及公用系统状态。在装载与操作方面，装载过密或固体材料堆积可能阻碍热穿透而导致灭菌不充分；操作程序偏差（如排气不彻底、升温速率过快）也会造成同样缺陷。BI 自身质量缺陷包括批次芽孢数超标、芽孢抗性标定错误或贮存不当等。此外，在复核检验过程中也存在操作污染风险，如检验阶段的洗脱方式不当会造成芽孢回收率偏低，或在灭菌后的取样、转移及培养环节引入污染。若阳性是由培养过程污染或操作失误所致，可通过菌种鉴定加以甄别。

BI 阳性事件触发后，应立即启动系统响应机制。首先，隔离相关批次产品并启动质量风险评估，追溯已放行产品的潜在影响。其次，同步开展 BI 复核，以及同批次产品阴性和阳性对照测试，必要时将同批次 BI 送实验室复核其 D 值，以评估其是否存在抗性漂移或标定问题。最后，全面回顾设备性能数据（如热分布图、维护记录等），结合鱼骨图、5 Why 分析法等工具锁定根本原因，并实施针对性整改和预防措施。

1.2 BI 选择的法规框架与阴阳共存区的科学认知

1.2.1 中美欧监管要求与 BI 计算模型

FDA 检查员指导手册《无菌制剂工艺检查》中规定，无菌产品最终灭菌工艺应参照 PDA TR1 2007 年版。BI 选择时应满足 F_{phy} 与 F_{bio} 的一致性（即 F_{bio} 不低于设计要求且与 F_{phy} 基本匹配）。D 值是表征微生物抗性的定量指标（按式①计算），数值越大表明芽孢抗性越强。

$$\log N_0=\log N_F+F/D \quad ①$$

式中：D 为在特定灭菌条件下，芽孢数量减少 1 个对数周期所需的时间；F 为灭菌程序的期望效力时间；N_0 为 BI 的初始含菌量；N_F 为灭菌后的活菌量。若 BI 被完全杀灭，可认为 N_F<1。为方便计算，式①中 N_F 可用 10^0 表示。PDA TR1 2007 年版第 5.3 节详细列出了 N_0 的计算过程，可据此选择合适的 BI。

NMPA 在《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）》中也提出了相同的 BI 选择要求。开展灭菌验证时，通常期望所有 BI 经灭菌后均呈现阴性，即实现完全杀灭。在理想情况下，灭菌后的 N_F 应为 10^{-1} ～ 10^{-2}，甚至更低。为提高灭菌过程的安全性，通常设定 N_F=1。特殊情况下，若选取 N_F<1 用于计算 N_0，则需提供充分的合理性依据。EMA 于 2019 年发布的《药品、活性物质、辅料和内包材灭菌指导原则》中也包含 BI 选择的相关要求，但未明确规定采用 N_F=10^0 这一取值。综上所述，建议依据灭菌程序设计 F 值，并以 N_F=10^0 为依据开展计算，选用匹配的 BI，以确保验证结果的稳健性。

1.2.2 阴阳共存区的统计学特征

过度灭菌工艺（标准灭菌时间 F_0 ≥ 12 min）可为无菌保障提供较高的可靠性，但 F_0 值过高可能会增加产品降解风险。对于 F_0 值略高于 12 min 的过度灭菌工艺，若按 N_F=10^0 选择 BI，其经灭菌后必然落入阴阳共存区。ChP 2025 年版四部通则 9208“生物指示剂耐受性检查法指导原则”与 EP 12.2 版通则 5.1.2“无菌药品生产中使用的生物指示剂及相关微生物制品”均规定，BI 存活时间按 N_F=10^2 计算、杀灭时间按 N_F=10^{-4} 计算。在这两个边界之间，根据行业实践，当 10^{-2}<N_F<10^1 时，BI 检测结果即处于阴阳共存区[3]。例如，某 BI（嗜热脂肪地芽孢杆菌芽孢条，每条 1×10^6 cfu，D 值 =2 min）在 121.1 ℃纯蒸汽下暴露 10 min 时全部呈阳性；暴露 11 min 时平行样品开始出现阴性结果；随暴露时间延长，阳性率持续下降，至 17 min 时全部转为阴性（表 1）。

当 BI 出现部分阴性结果时，可采用 Halvorson-

表 1　阴性分数法的样品测定结果示例

Tab.1　An Example of Sample Test Results Using the Negative Scoring Method

样品组号	121.1 ℃暴露时间 / min	平行 BI 数量	培养后 BI 阴性结果数量	备注
1	9	10	0	全部阳性区
2	10	10	0	
3	11	10	1	阴阳共存区
4	12	10	3	
5	13	10	5	
6	14	10	7	
7	15	10	8	
8	16	10	9	
9	17	10	10	全部阴性区
10	18	10	10	

Ziegler 方程计算最大可能数（most probable number，MPN）进行评价。计算公式如式②所示。

$$\bar{N}=\ln\left(\frac{n}{r}\right) \qquad ②$$

式中：$\bar{N}$ 代表每个平行样品内被估测的平均微生物数量；n 表示用于测定的平行样品数量；r 表示培养结果呈阴性的样品数量。

例如表 1 中的第 6 组样品，经过 121.1 ℃高温灭菌 14 min 后，10 个样品中有 7 个样品结果为阴性，那么 $\bar{N}=\ln\left(\frac{10}{7}\right)=0.357$，即该批 BI 经过 121.1 ℃灭菌 14 min 后，每个 BI 内残存的活性芽孢数量平均约为 0.357 个。此时计算得 $F_{bio}=D\times(\log N_0-\log N_F)=2\times(\log 10^6-\log 0.357)=12.89$，表明该 BI 对应的灭菌工艺 F_{bio} 为 12.89 min。

1.2.3　基于 MPN 法的高风险位点评估策略

以湿热灭菌柜再验证为例。依据中国 GMP 2010 年版附录 1、EU GMP 2022 年版附录 1 及美国 2026 年修订的 21 CFR 211.113(b) 要求，采用 121 ℃、12 min 过度杀灭程序时，需每年开展再验证。验证布点应遵循均匀性与代表性原则，在灭菌腔室的 12 个关键位点各同步放置 1 支 BI 和独立温度探头。其中，腔室底部的排水口易积聚冷凝水，蒸汽穿透难度大，属于典型的高风险区域，需重点监控。排水口处的位点受局部温度波动、蒸汽接触不充分等因素影响，若按 $N_F=10^0$ 原则选择 BI，所得结果极易落入阴阳共存区。因此，该区域出现 BI 阳性结果时，不应直接判定灭菌验证失败，需考虑阴阳共存区带来的统计学可能性。当灭菌后残存微生物载量处于极低水平时，微生物存活概率符合泊松分布特征。当 $N_F=10^0$ 时，单支 BI 出现阳性的概率 $p=1-e^{-1}\approx 63\%$。为将全部 BI 同时阳性的概率控制在 5% 以内，需满足公式 $(63\%)^n<5\%$，经计算可得布设数量 $n\geqslant 7$。据此，建议在高风险位置（如排水口）布置 7 支 BI，以确保灭菌工艺合格状态下至少出现 1 支阴性 BI 的概率高于 95%，从而有效规避由阴阳共存区导致的假阳性误判。在实际生产过程中，受升温、降温阶段及工艺控制冗余的影响，F_{phy} 通常高于 12 min，此时 $N_F<10^0$，单支 BI 阳性的检出概率进一步降低，因此在高风险位点布置 3 支 BI 即可大幅降低误判风险，兼顾验证结果可靠性与现场操作可行性。若出现阴阳共存结果，可采用式②计算灭菌后残留微生物数量，其中 n 为 BI 总数，r 为阴性 BI 数量，进而计算 F_{bio} 是否符合要求。

2　VHP 灭菌过程中 BI 阳性的成因分析与监管考量

2.1　VHP 灭菌工艺的特殊性与监管挑战

湿热灭菌以热力学驱动的全局性能量输入为基础，灭活动力学过程严格遵循一级反应模型 [4]。VHP 灭菌则依赖于化学扩散与表面反应机制，其灭活动力学过程对局部微环境参数高度敏感，导致对数线性模型在特定条件下的预测准确性受限 [5]。湿热灭菌和 VHP 灭菌方式的差异如表 2 所示。VHP 灭菌工艺的稳定性较差 [6-7]，行业内通常将其归为去污工艺而非严格灭菌工艺。尽管 ChP 2025 年版通则 1421“灭菌法”及 USP 参考性通则 1229.11“汽化灭菌法”均将 VHP 纳入灭菌工艺范畴，但 EU GMP 2022 年版附录 1 及 FDA 检查员指导手册《无菌制剂工艺检查》等国际监管文件均明确将其定义为去污工艺。基于上述监管差异及工艺特性，VHP 灭菌适用于表面除菌处理，而不建议用于隔离器内与产品直接或间接接触部件的灭菌。

VHP 的灭菌效能高度依赖于灭菌剂的均匀分布与相态控制；该工艺的核心难点在于相态复杂、分布不均、表面效应及材料吸附效应（如硅胶和橡胶可吸收 15%～25% 的 VHP）等。这些因素构成了

表 2 湿热灭菌与 VHP 灭菌的物理化学机制对比

Tab.2 Comparison of Physical and Chemical Mechanisms between Moist-heat Sterilization and VHP Sterilization

对比项	灭菌方法	
	湿热灭菌	VHP 灭菌
作用介质	饱和水蒸气（热传导快）	汽化的过氧化氢、过氧乙酸等（扩散受限）
穿透能力	强（可穿透织物、管腔）	弱（受几何遮蔽、材料吸附影响）
载体 / 微环境的影响	较小（热传递均匀）	大（载体光洁度、材料亲疏水性等因素会影响局部微环境浓度与接触效率）[6]
有机物干扰	小（高温可降解蛋白）	大（血清成分 / 盐可淬灭自由基）
反应均一性	高（热平衡快）	低（高度依赖气体分布、温度、湿度及冷凝均匀性）[7]
BI 响应一致性	高（*D* 值稳定）	低（异常抗性 BI 现象常见）

VHP 灭菌动态体系，工艺参数与局部微环境难以精准测定[8]，导致 *D* 值无法准确定量。目前尚无稳定、可重现的标准 VHP 灭菌工艺，无法用确定 *D* 值的 BI 预测杀灭率[9]。在实际应用中，BI 在 VHP 灭菌条件下的 *D* 值仅为特定条件下的经验估值，用于同系统批次间的比较，以评估验证结果的一致性与去污趋势，不可用于循环时间计算、跨设备对比或绝对灭活时间预测[10]。但若以 BI 完全灭活作为判定终点，仍可有效保证验证结果的可靠性。ChP 2025 年版四部通则 9207“灭菌用生物指示剂指导原则”规定，VHP 表面灭菌验证中 BI 芽孢数需达 3 ～ 6 个对数级，但未明确适用的洁净区级别；洁净度较低的场景（如开放式 B 级、C 级及 D 级洁净区）可在此区间按需选择。而对于无菌要求较高的隔离器内部表面，FDA 检查员指导手册《无菌制剂工艺检查》中要求，必须实现微生物 6 个对数级的灭活降幅效果。

2.2 工艺性能不足导致的阳性

针对 BI 阳性结果的调查应首先排查工艺性能不足的原因，即 VHP 在 BI 布置位置无法维持有效浓度和充足的作用时间。此类系统性失败可通过物理参数监测和复现性研究进行识别。

造成 BI 阳性的可能原因如下。①关键工艺参数失控。VHP 灭菌效果依赖于过氧化氢浓度、温度及相对湿度（relative humidity，RH）的协同控制。RH 高于 75%时，过氧化氢易在物体表面冷凝成液滴，降低渗透与杀菌效率，并干扰芽孢萌发。因此，适宜 RH 为 45%～ 65%。温度的微小偏差即可影响过氧化氢的蒸发、扩散效率，以及 BI 的芽孢抗性[9]。过氧化氢浓度波动（如偏离验证范围）或空间分布不均，会导致有效暴露剂量（concentration-time value，CT 值）不足，导致芽孢杀灭不充分而出现 BI 阳性。②装载效应、几何遮蔽和材料吸附。隔离器内部的复杂结构、物料摆放密度及 BI 布置位置可能形成 VHP 分布冷点。例如，镀锌钢表面会催化过氧化氢分解，且分解率达 30%～ 50%，这将导致管路系统下游 VHP 浓度大幅衰减[11]。③设备完整性缺陷。隔离器气密性是维持 VHP 浓度和正压环境的关键。门封、手套口、传递舱接口等部位的微小泄漏都会导致 VHP 浓度下降，引发灭菌失败。因此，需定期开展压力衰减测试等密封性确认工作。

2.3 BI 响应变异的发生机制

2.3.1 *D* 值的非线性动力学特征与尾端效应

在 VHP 灭菌验证中，BI 的 *D* 值缺乏统一的法定标准，且该数值会随存活芽孢数量的减少而显著增大，呈现出非线性灭活动力学特征（图 1）：在处理早期符合一级动力学模型，此时杀灭速率快，*D* 值较小；处理后期 *D* 值增大，出现尾端效应。

2.3.2 影响 BI 抗性的因素

影响 BI 抗性的关键因素，贯穿芽孢悬液制备[12-13]、芽孢悬液保存、载体与接种工艺、包装贮存、质量标定全过程。依据 2010 年发布的 PDA 技术报告 TR51《气体和汽化去污工艺用生物指示剂：规范、制造、控制和使用》所述，这些因素共同决定了 BI 的最终抗性、均一性和可靠性（表 3）。

2.3.3 微环境效应与异常抗性 BI 的成因剖析

异常抗性 BI 是 VHP 灭菌验证中的关键挑战，其成因并非单一因素所致，而是芽孢群体异质性、

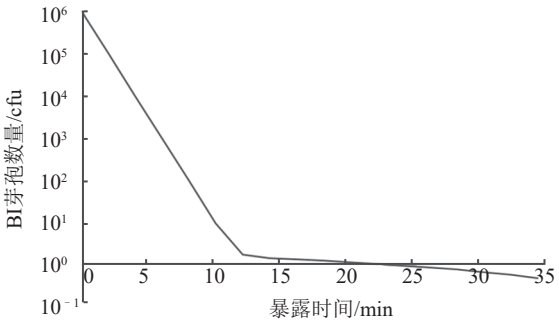


图 1　VHP 灭菌过程中 BI 芽孢死亡曲线的尾端效应

Fig.1　Tailing Effect of BI Spore Death Curve in VHP Sterilization

微环境效应、载体特性及制造缺陷等多因素耦合作用的结果。

关键微环境参数可直接影响 BI 的灭菌响应特征。RH 具有双重影响：适度提高 RH 可增强过氧化氢在芽孢表面的吸附，降低 *D* 值；但 RH>75% 则会导致过氧化氢过度稀释甚至冷凝，反而削弱灭菌效果[14]。BI 载体材料的性质也至关重要：疏水性材料（如聚四氟乙烯）会阻碍过氧化氢的均匀分布，使对应的 *D* 值显著高于亲水性材料[15]。载体表面的微米级孔隙可截留芽孢并形成保护性生物膜，加剧尾端效应。此外，镀锌钢等材料可催化过氧化氢分解，导致局部浓度下降。基质干扰是另一重要影响因素，如血清成分、盐分等复杂有机基质可通过物理包裹和化学淬灭双重作用显著降低 VHP 灭菌效果，这说明有效的预清洁是保证 VHP 灭菌成功的前提。

当各类影响因素发生波动并相互叠加时，该类效应会在特定条件下持续放大，这是造成 BI 抗性异常的主要诱因。例如，芽孢表面附着的微量污染物，以及载体上的微裂缝，均可为芽孢提供物理庇护；局部 RH 异常、材料催化分解或有机物残留会改变微环境的过氧化氢浓度；个别芽孢也可因生理状态或遗传因素表现出内在高抗性。因此，将这些控制理念融入 BI 选择、工艺开发及验证的全流程，是制定有效控制策略、提升验证科学性的关键。

2.4　基于统计学的 BI 布局与风险评估方案

参考 PDA 于 2020 年发布的《隔离器内无菌药品无菌加工考量要点》，可将 VHP 灭菌工艺分为灭菌循环开发与灭菌循环验证两大阶段。同一位点放置多份 BI 的策略，同时适用于上述两个阶段的应用

表 3　影响 BI 抗性的关键因素

Tab.3　Key Factors Affecting the Resistance of BI

阶段	关键因素	对 BI 抗性的潜在影响
芽孢悬液制备	菌种纯度与代次控制	菌种污染或遗传漂变可能导致抗性异常
	培养基成分与培养条件	培养基中的二价阳离子（Mn^{2+}，Ca^{2+}）浓度、产孢温度、pH 值会影响芽孢的衣壳厚度与化学结构，直接决定其抗性[12]
	芽孢清洗不彻底	残留培养基、无机盐、细胞碎片会包裹芽孢，形成理化屏障；使用溶菌酶溶液清洗，相比无菌水可显著提升芽孢纯净度[13]
芽孢悬液保存	保存温度	温度波动会持续降低芽孢抗性，推荐于 2 ～ 8 ℃密封保存
	悬浮液 pH 值	pH 值偏离适宜范围会破坏芽孢稳定性，需搭配缓冲体系，维持环境稳定
	悬浮液的化学成分	化学成分降解会降低对芽孢的保护效果，应定期更换
载体与接种工艺	载体材料与表面特性	光滑的不锈钢载体可使芽孢均匀分散；粗糙载体易造成芽孢嵌留藏匿，形成物理屏蔽，导致抗性异常升高、灭菌效果不稳定
	接种均一性	接种不均匀可导致部分 BI 芽孢密度过高、存活率升高，以及批次内差异
	芽孢团块	干燥过程中芽孢团聚，会阻碍 VHP 穿透，导致灭菌不彻底，培养后出现假阳性
包装贮存	包装材料选择不当	包装材料若吸附 VHP 或透气性差，会阻碍灭菌剂进入；密封不严则易引发污染或芽孢失活
	封装过程中的污染	引入其他可能具有更高 VHP 抗性的杂菌，导致假阳性结果
	贮存与运输条件	温度和湿度管控不当，会造成芽孢提前萌发、失活或抗性下降，缩短 BI 有效期，破坏其稳定性
质量标定	*D* 值测定方法与设备	不同的 *D* 值测定仪及操作方式可能引发标定结果的系统性偏差，报告标注的 *D* 值无法完全反映其实际灭菌表现
	芽孢计数的准确性	传统的平板计数法存在固有误差，可能会低估或高估实际芽孢载量

需求。在开发阶段，该策略可识别出最难灭菌位点，为参数优化提供依据；在验证阶段，于难灭菌位点布置多份 BI，可更准确地判断工艺有效性。对于已验证合格的灭菌工艺，同点多份 BI 可抵消芽孢团聚、分布不均或 BI 自身质量波动的干扰，有效识别并排除因单个异常抗性 BI 导致的假阳性结果。此策略通过增加样本数量来提高数据统计显著性，从而避免将单一异常抗性 BI 阳性事件误判为系统失效[16]。采用多份 BI 时，可运用 Halvorson-Ziegler 方程计算 MPN，从而在合理置信水平下对单次阳性结果进行统计学解释，减少不必要的重复验证。

在实际应用中，大型隔离器的监测点位可多达 200 个。开展 3 次 VHP 灭菌循环验证时，可接受标准为：所有监测点位均不得出现 BI 全阳性（全阳性时无法计算 MPN）。应基于不同异常抗性 BI 概率来计算验证成功概率。结果（表 4）表明，增加单点位 BI 数量可显著提高整体的验证成功率，将偶然异常抗性 BI 阳性事件导致验证失败的风险控制在可接受水平。

由表 4 可知，当 3 次验证均成功的概率≥ 95% 时，可认为在 95% 置信区间内，异常抗性 BI 干扰

表 4 VHP 灭菌验证中 BI 布局方案的风险概率

Tab.4 Risk Probability of BI Placement Strategies in VHP Sterilization Validation

异常抗性 BI 概率 (p)[1]/%	每点位 BI 数量 (n)	单点位失败概率[2]/%	单点位成功概率[3]/%	单次验证成功概率[4]/%	3 次验证均成功概率[5]/%	风险概率[6]/%
0.3	1	0.30	99.70	54.83	16.49	83.51
	2	0	100.00	99.82	99.46	0.54
	3	0	100.00	100.00	100.00	0
1	1	1.00	99.00	13.40	0.24	99.76
	2	0.01	99.99	98.02	94.18	5.82
	3	0	100.00	99.98	99.94	0.06
3	1	3.00	97.00	0.23	0	100.00
	2	0.09	99.91	83.52	58.26	41.74
	3	0	100.00	99.46	98.39	1.61

注：[1] 不同材质及质量控制水平的 BI，其异常抗性发生概率存在显著差异，优质不锈钢载体 BI 的异常抗性发生率为 0.3%[17]。统计学分析表明，需至少连续检测的 998 支 BI 均为阴性，才能以 95% 置信水平确认该批次异常抗性 BI 比例 <0.3%。[2] 单点位失败概率为 p^n。[3] 单点位成功概率为 $(1-p^n)$。[4] 单次验证成功概率为 $(1-p^n)^{200}$。[5]3 次验证均成功概率为 $(1-p^n)^{200\times3}$。[6] 风险概率为 $1-(1-p^n)^{200\times3}$。

测试结果的概率已降至可忽略水平。对于首次验证或新 BI 引入，建议按 3% 的保守异常抗性概率估算，各监测点放置 3 个 BI，3 次验证均合格的概率可达 98.39%；对于成熟工艺的年度再验证，可按 0.3% 的异常概率估算，各监测点放置 2 个 BI，可使 3 次验证均合格的概率达到 99.46%。

在已验证的灭菌循环验证中采用多份 BI，可为偶发的 BI 假阳性结果提供判断依据。若所有监测点位均为阴性，仅单个点位偶现部分阳性，可参考 2010 年发布的 PDA TR51 进行排查，包括灭菌循环参数、阳性点位是否为灭菌难点、BI 质量稳定性、工艺执行记录、设备校准维护状态及历史数据趋势等。若该现象在同位点无法复现，则阳性结果可能由异常抗性 BI 引发。若随机阳性结果持续出现，则必须全面排查灭菌工艺是否存在系统性缺陷。

2.5 VHP 灭菌的未来趋势

新型快速指示剂技术是当前重要的发展方向。药品监管机构鼓励企业采用酶指示剂（enzyme indicator，EI）和化学指示剂等快速检测技术，以缩短反馈周期并降低误判风险。EI 通过检测耐热酶（如腺苷酸激酶）活性，可提供连续、定量的灭菌评价数据，其读数变异通常小于 30%[18]，显著优于传统 BI，且酶的灭活动力学规律与芽孢的杀灭动力学规律高度一致，已成功应用于工艺开发、周期优化、日常监控及异常 BI 结果分析。此外，化学指示剂能通过颜色变化实现即时判定，有效降低异常抗性 BI 的干扰，提升验证效率、节约成本[19]。

随着实时监测与智能传感技术的不断突破，集成气体、温度和湿度等多参数传感器的监测平台，以及基于固定化芽孢的生物传感器，已经可实时、动态监测 VHP 浓度与相态的变化，再结合计算流体动力学模拟，可为 VHP 灭菌过程的在线实时监测提供可行的技术方案[20]。

参数放行是未来发展的重要方向，其核心是建立关键工艺参数与微生物杀灭效果间的稳健关联模型[21]。VHP 灭菌工艺具备实现参数放行的潜力。正

向分数杀灭时间（fractional kill time，FKT）研究通过确定 BI 在气化开始后的完全灭活时间点，揭示灭活速度；反向分数杀灭时间（reverse fractional kill time，RFKT）研究则可在饱和阶段后逐步暴露指示剂，评估暴露时间对灭活的影响。两者的相关研究已可为科学标准的确定提供依据[22]。欧盟 GMP 附录 1 等法规强调应基于对灭菌工艺的深度理解，实施参数放行。随着标准体系的不断完善，参数放行在 VHP 灭菌中的应用将更具可行性。

3　结语

本文系统剖析了湿热灭菌与 VHP 灭菌中 BI 假阳性结果的科学本质，纠正了行业内“单一 BI 阳性即灭菌失效”的惯性认知。对于 F_0 值略高于 12 min 的湿热灭菌工艺，若按常规 N_F=10^0 为依据选用 BI，其灭菌后必然落入阴阳共存区，出现少量阳性结果具有统计学必然性。而在 VHP 灭菌中，部分 BI 阳性结果可能源于异常抗性 BI，与工艺本身的有效性无直接关联。针对两类灭菌工艺的不同特点，本文提出差异化控制策略：湿热灭菌过程中的高风险点位采用多支 BI 布点，再结合 MPN 法进行统计和评估；在 VHP 灭菌过程中，通过多点位、多支 BI 布局，也可将异常抗性 BI 所致的误判风险控制在 5%以下。

建议药品研发与生产企业建立并完善灭菌验证与日常监控的标准操作规程，规范多支 BI 的使用、布点及结果评估方法；建议药品监管机构与行业协会加强协同，出台更具实操性的技术指导原则，推动行业灭菌验证水平整体提升。展望未来，灭菌验证体系需从“被动合规”向“主动预防”转变。通过技术创新、监管完善与体系升级协同发力，实现无菌保障水平与生产效率的双重提升。

参考文献：

[1] AGALLOCO J P. Ridding the world of ‘Rogues’: improving vapor-phase H_2O_2 sterilization and decontamination processes [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2023, **77**(5): 412-419.

[2] 叶项宇, 邢倩倩, 周　婷, 等. 影响汽化过氧化氢灭菌生物指示剂抗力的因素研究[J]. 中国医药工业杂志, 2024, **55**(11): 1572-1577.

[3] 潘友文, 邓海根. 灭菌工艺的基本原理与参数放行[M]. 北京: 中国质检出版社, 2013: 53-57.

[4] FEURHUBER M, NEUSCHWANDER R, TAUPITZ T, *et al*. Mathematically modelling the inactivation kinetics of *Geobacillus stearothermophilus* spores: effects of sterilization environments and temperature profiles [J]. *Phys Med*, 2022, **13**: 100046.

[5] SAWALE M, SINGH A, BENYATHIAR P, *et al*. Inactivation kinetic parameters of hydrogen peroxide application in commercial sterility of aseptic processing systems [J]. *J Food Eng*, 2024, **378**: 112105.

[6] ESCHLBECK E, SEEBURGER C, KULOZIK U. Spore inactivation on solid surfaces by vaporized hydrogen peroxide—influence of carrier material surface properties [J]. *J Food Sci*, 2020, **85**(5): 1536-1541.

[7] PRUSS K, STIRTZEL S, KULOZIK U. Influence of the surface temperature of packaging specimens on the inactivation of *Bacillus* spores by means of gaseous H_2O_2 [J]. *J Appl Microbiol*, 2012, **112**(3): 493-501.

[8] AGALLOCO J P, AKERS J E. Overcoming limitations of vaporized hydrogen peroxide: hydrogen peroxide is highly potent and highly problematic [J]. *Pharm Technol*, 2013, **37**(9): 46-56.

[9] AGALLOCO J P. Biological indicators, process lethality and vapor phase hydrogen peroxide processes [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2025, **79**(5): 556-563.

[10] AGALLOCO J P. Real-world vapor phase hydrogen peroxide decontamination [J]. *Pharm Technol*, 2020, **44**(1): 53-57.

[11] VERCE M F, JAYARAMAN B, Ford T D, *et al*. Minimizing decomposition of vaporized hydrogen peroxide for biological decontamination of galvanized steel ducting [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, **42**(15): 5765-5771.

[12] STIER P, MAUL S, KULOZIK U. Effect of sporulation conditions following solid-state cultivation on the resistance of *Geobacillus stearothermophilus* spores for use as bioindicators testing inactivation by H_2O_2 [J]. *LWT*, 2021, **151**: 112078.

[13] LI L, JIN J, HU H, *et al*. Optimization of sporulation and purification methods for sporicidal efficacy assessment on *Bacillus* spores [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2022, **49**(4): kuac014.

[14] UNGER-BIMCZOK B, KOTTKE V, HERTEL C, *et al*. The influence of humidity, hydrogen peroxide concentration, and condensation on the inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* spores with hydrogen peroxide vapor [J].

J Pharm Innov, 2008, **3**(2): 123-133.

[15] ESCHLBECK E, SEEBURGER C, KULOZIK U. Influence of spore and carrier material surface hydrophobicity on decontamination efficacy with condensing hydrogen peroxide vapour [J]. *J Appl Microbiol*, 2018, **124**(5): 1071-1081.

[16] DRINKWATER J. Biological indicators (BIs) strategy to use in VHP/vH_2O_2 bio-decontamination cycle development, performance qualification and ongoing re-qualification [J/OL]. *Eur J Parenter Pharm Sci*, 2025. https://www.ejpps.online/post/biological-indicators-bis-strategy-to-use-in-vhp-vh2o2-bio-decontamination-cycle-development-perf. https://doi.org/10.37521/ejpps30302.

[17] DRINKWATER J, CHEWINS J, STEELE G. Biological indicators don't lie, but in sporicidal gassing disinfection cycles do they sometimes confuse the truth? [J]. *Eur J Parenter Pharm Sci*, 2009, **14**(1): 5-10.

[18] SCHACHTSCHNEIDER A, KLEIN S, MARSHALL K. Application of enzyme indicators in hydrogen peroxide biodecontamination cycle development: a critical evaluation of indicator variability and correlation to biological indicator results [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2022, **76**(1): 34-51.

[19] JONES I A, EDWARDS W, GEORGE-OLAPADE M, *et al*. A practical methodology to assess VHP cycle effectiveness during routine qualification [J/OL]. *Eur J Parenter Pharm Sci*, 2021. https://www.ejpps.online/post/a-practical-methodology-to-assess-vhp-cycle-effectiveness-during-routine-qualification.

[20] JILDEH Z B, KIRCHNER P, OBERLÄNDER J, *et al*. Development of a package-sterilization process for aseptic filling machines: a numerical approach and validation for surface treatment with hydrogen peroxide [J]. *Sens Actuators A Phys*, 2020, **303**: 111691.

[21] MCLEOD N P, CLIFFORD M, SUTTON J M. Evaluation of novel process indicators for rapid monitoring of hydrogen peroxide decontamination processes [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2017, **71**(5): 393-404.

[22] FRANKE A, SCHARF B, MITTMANN K, *et al*. Enzymatic indicators in vaporized hydrogen peroxide decontamination cycles: application-related research focusing on fractional kill time (FKT) and reverse fractional kill time (RFKT) studies [J/OL]. *Eur J Parenter Pharm Sci*, 2023. https://www.ejpps.online/post/enzymatic-indicators-in-vaporized-hydrogen-peroxide-decontamination-cycles-application-related. https://doi.org/10.37521/ejpps.28403.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

633、639 页：公益广告