

VHP空间消毒灭菌验证要点 及常见问题

1

黄伟

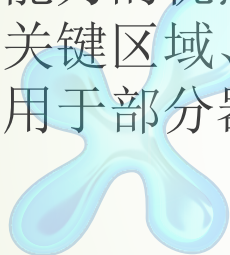
2020.03.16

- VHP相关知识
- VHP灭菌/消毒工艺流程
- VHP灭菌/消毒工艺的历史
- VHP灭菌消毒的一些原理特征
- VHP程序验证原则及要点
- 密封相关注意事项
- 清洁与干燥
- BI相关注意事项
- HVAC及HEPA相关注意事项
- 腐蚀问题
- VHP程序验证失败的常见原因
- MPN
- 酶指示剂
- 结语

HARMONY
biotechnology
汉尼生物技术

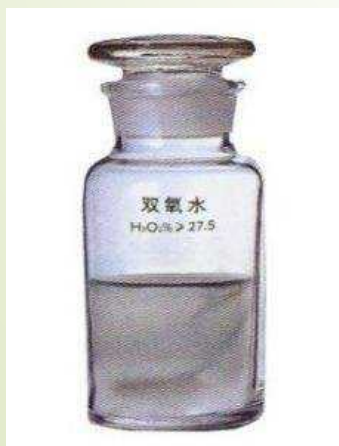
VHP相关知识

气化过氧化氢VHP (Vaporized Hydrogen Peroxide) 是指利用高温闪蒸技术将液体过氧化氢瞬间完全气化, 完全去除溶液中的水分, 形成的气态过氧化氢。过氧化氢在常温下气体状态比液体状态更具杀灭细菌芽孢能力的优点, 而且最终降解为水和氧, 无残留。制药行业里常用于关键区域、传递腔的消毒, 隔离器的灭菌等, 医疗器械行业还可能用于部分器械的终端灭菌。

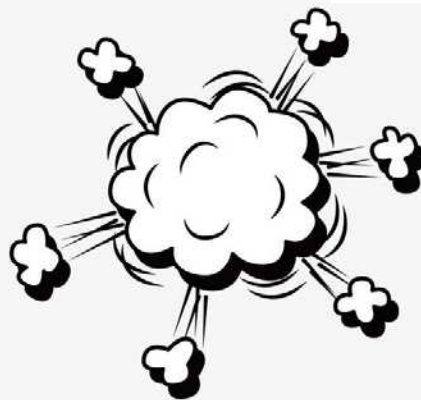


biotechnology
汉尼生物技术

VHP[®]



高温闪蒸



VHP相关知识

过氧化氢在pH值为 3.5~4.5时最稳定，在碱性溶液中极易分解，在遇强光，特别是短波射线照射时也能发生分解。

过氧化氢温度越高越容易分解，当加热到100℃以上时，开始急剧分解。气化过程温度越高，分解越多。过氧化氢水溶液会发生缓慢降解，气体状态过氧化氢不稳定，易分解有半衰期。

过氧化氢与许多无机化合物或杂质接触后会迅速分解。大多数、**金属**（如铜、银、铅、汞、锌、钴、镍、铬、锰等）及其氧化物和盐类都是活性催化剂，**尘土**、香烟灰、碳粉、铁锈等也能加速分解。

气态过氧化氢的腐蚀较双氧水弱很多，但渗透性更强，如存在多孔物质，去除残留需要更多时间。

目前常用30%~35%的双氧水做为母液。

VHP相关知识

洁净室内常用的材质，基本都耐VHP

铝	PTFE
不锈钢	PET
钛合金	POM
聚碳酸酯	PFA
玻璃	氯橡胶
ABS	橡胶
PVC	聚氨酯
PP	硅胶
PVDF	墙面乳胶
HDPE	HEPA

参考:

Hydrogen peroxide: Is material compatibility a real challenge for this decontamination technology, white paper ,Telstar
 Room decontamination with Hydrogen Peroxide Vapor, Steris
 Hydrogen Peroxide material compatibility chart, Jan, 2019 , ISM

VHP相关知识

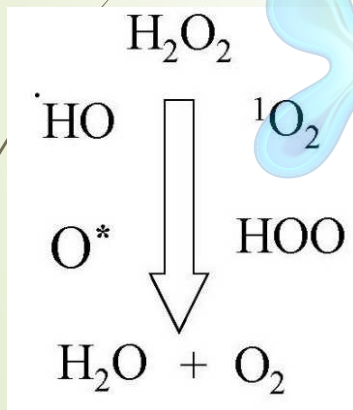
洁净室内常用的材质，基本都耐VHP

Poor	Moderate to Acceptable	Very Good	Excellent
Brass, Copper, Silver (Decompose Peroxide)	Soft Anodized Aluminium (Dye bleaching)	Polycarbonates (Mild outgassing)	Aluminium, 300 Series Stainless
Cellulosics	Some Polyurethanes (Ether-based), Some Polyamides (Nylon 6/6)	Acrylates (Outgassing)	Glass, Quartz
	Polysulfones, Polystyrene(Outgassing)	Polytherimide (ULTEM)	Polyphenylene Oxide (NORYL)
	Some Polyamides (Polyaramid, Kevlar)	Most Medical Grade Silicones	Teflon (PTFE, PFA, FEP), Viton
	Natural Rubber, Polyacetal (Delrin)	ABS	Polyethylene (LLPE, LD, HD, UHMW)
	Carbonate Filled Epoxy Some Silicones	PVC, CPVC, Polyvinylidene Fluoride (PVDF)	Polypropylene (LD, HD) Spun-bonded olefin (Tyvek™)

VHP相关知识

过氧化氢的抗菌作用源于其形成强氧化剂的能力，如羟基自由基和超氧阴离子等。

这些活性氧对细胞成分如酶、膜成分和DNA造成不可逆损伤。



可以杀灭芽孢、真菌、朊病毒等



参考

VHP technical Data Monography 2003,

Investigations of a prion infectivity assay to evaluate methods of a decontamination.,2007, Journal of Microbiological Methods

Regulation (EU) No 528/2012 concerning the making available on the market and use of biocidal products -Evaluation of active substances Assessment Report

VHP杀菌谱

Bacteria + spores

Aeromonas sp.; *Acholeplasma laidlawii*; *Acinetobacter baumannii*; *Acinetobacter calcoaceticus*; *Anaerobic cocci*; *Aspergillus* spores; *Bacillus anthracis* (antrax illness); *Bacillus alvei*; *Bacillus cereus*; *Bacillus circulans*; *Bacillus firmus*; *Bacillus licheniformis*; *Bacillus megaterium*; *Bacillus pumilus*; *Bacillus sphaericus*; *Bacillus* (resp. *Geobacillus*) *stearothermophilus*; *Bacillus subtilis*; *Bacillus thuringiensis*; *Bacteroides fragilis*; *Campylobacter* sp.; *Clostridium botulinum*; *Clostridium difficile*; *Clostridium perfringens*; *Clostridium piliforme*; *Clostridium sporogenes*; *Clostridium tetani*; *Deinococcus radiodurans*; *Enterobacter cloacae*; *Enterococcus faecium/faecalis*; *Escherichia coli*; *Fusobacterium* sp.; *Lactobacillus caesei*; *Legionella pneumoniae*; *Listeria monocytogenes*; *Klebsiella pneumoniae*; *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (MRSA); *Micrococcus* sp.; *Moroxelia osloensis*; *Mycobacterium bovis*; *Mycobacterium chelonae*; *Mycobacterium smegmatis*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Pseudomonas aeruginosa*; *Pseudomonas cepacia*; *Salmonella choleraesuis*; *Salmonella typhimurium*; *Shigella* sp.; *Staphylococcus*

Viruses (family; type of virus)

Adenoviridae: Adenovirus, Canine adenovirus; *Caliciviridae*: Feline calicivirus, Vesicular exanthema virus; *Coronaviridae*: Infectious bronchitis virus; *Flaviviridae*: Dengue virus; Hog cholera virus; *Herpesviridae*: Herpes simplex Type 1, Pseudorabies virus; *Iridoviridae*: African swine fever virus; *Orthomyxoviridae*: Influenza A2, Avian influenza virus; *Paramyxoviridae*: Newcastle disease virus; *Parvoviridae*: Parvovirus, Canine parvovirus, Feline parvovirus; *Picornaviridae*: Rhinovirus 14, Polio type 1, Swine vesicular disease; *Poxviridae*: Vaccinia; *Reoviridae*: Bluetongue virus; *Rhabdoviridae*: Vesicular stomatitis virus

Fungi

Alternaria; *Aspergillus niger*; *Aspergillus* sp., *Blastomyces dermatitidis*; *Botrytis cinerea*; *Candida albicans*; *Candida parapsilosis*; *Coccidioides immitis*; *Histoplasma capsulatum*; *Penicillium* sp.; *Trichophyton mentagrophytes*

Other microorganisms

Caenorhabditis elegans; *Cryptosporidium parvum*, *Lactococcal bacteriophage*; *Syphacia muris*

VHP相关知识

测试菌	D值 (min)	
	液体	气体
测试条件	H ₂ O ₂ 浓度: 370 mg/L	H ₂ O ₂ 浓度: 1-2 mg/L
	温度24-25°C	温度24-25°C
<i>B. stearothermophilus</i>	1.5	1-2
<i>B. subtilis</i>	2.0-7.3	0.5-1
<i>C. sporogenes</i>	0.8	0.5-1

过氧化氢在常温下气体状态比液体状态更具杀灭细菌芽孢能力
VHP的杀灭能力相当于200倍以上浓度的液体过氧化氢的杀灭能力

B. Stearothermophilus VHP最难杀灭

B. Subtilis 液体过氧化氢最难杀灭

G.Stearothermophilus 经典D值

温度	浓度 (mg/L)	浓度 (ppm)	经典 D值
4	0.1-0.5	350	8-12 mins
25	1-2	700-1500	1-2 mins
37	3-4	2000-3000	0.5-1 min
55	10-12	7000+	1 sec

VHP灭菌/消毒工艺的历史

1818年法国化学家 Louis Jacques Thenard首先发现的过氧化氢（液体和气体状态）。

1980中后期美国AMSCO（后被Steris收购）首先发现气体过氧化氢相对于液态过氧化氢，仅需较低浓度即可达到同样灭菌效果，并应法国公司La Calhene的要求，制造提供了第一台VHP-1000。

1990年气化过氧化氢正式通过美国EPA核准，作为灭菌剂，并很快在各个工业领域运用。

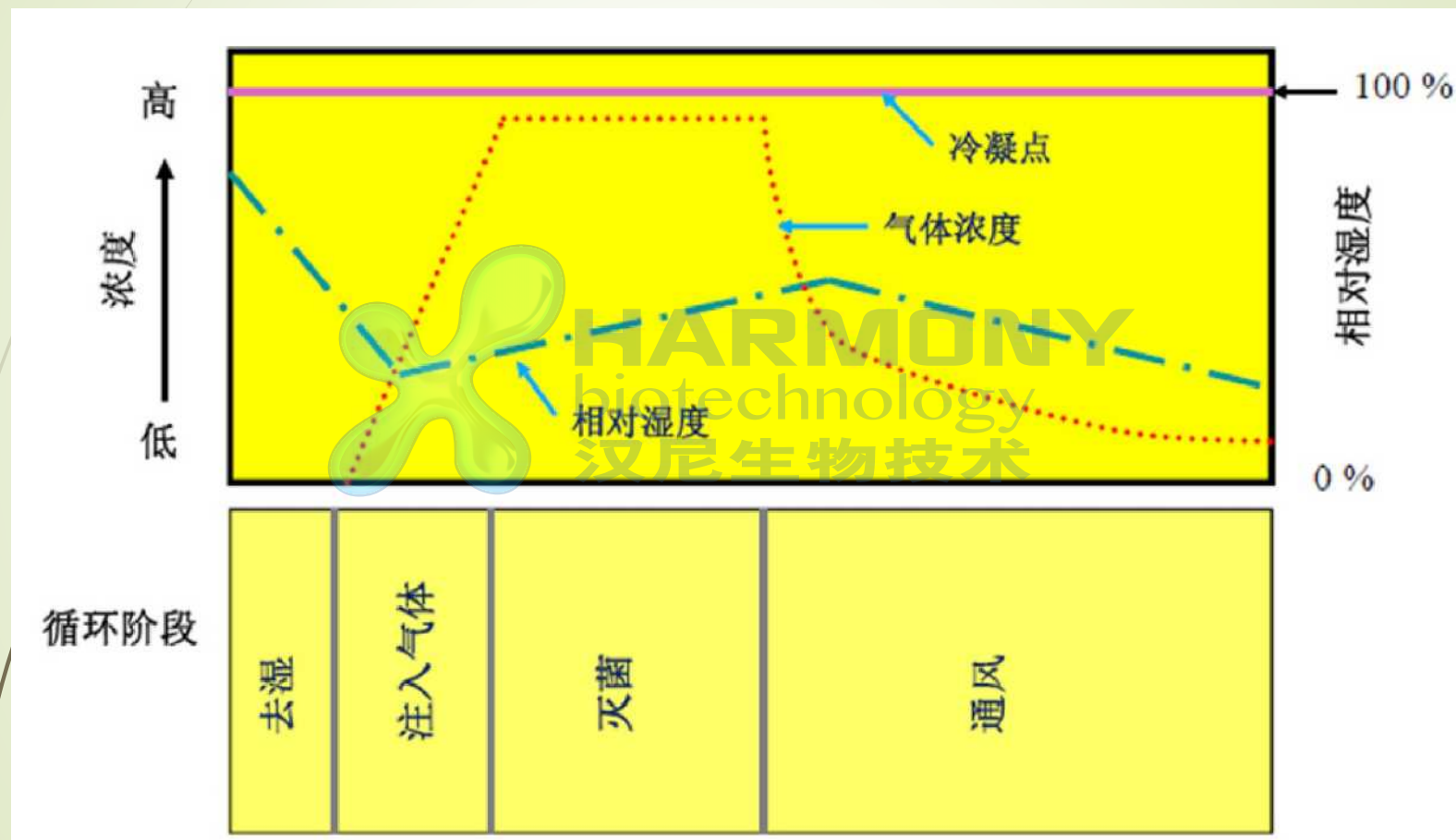
其他公司也推出相应的VHP设备：Bioquell HPV (Hydrogen Peroxide Vapor)；BOSCH VPHP (Vapor-Phase Hydrogen Peroxide) 以及iHP等

VHP用于灭菌要求的是6log的杀灭和湿热的12log不一样。一般用Decontamination 而不用sterilization。

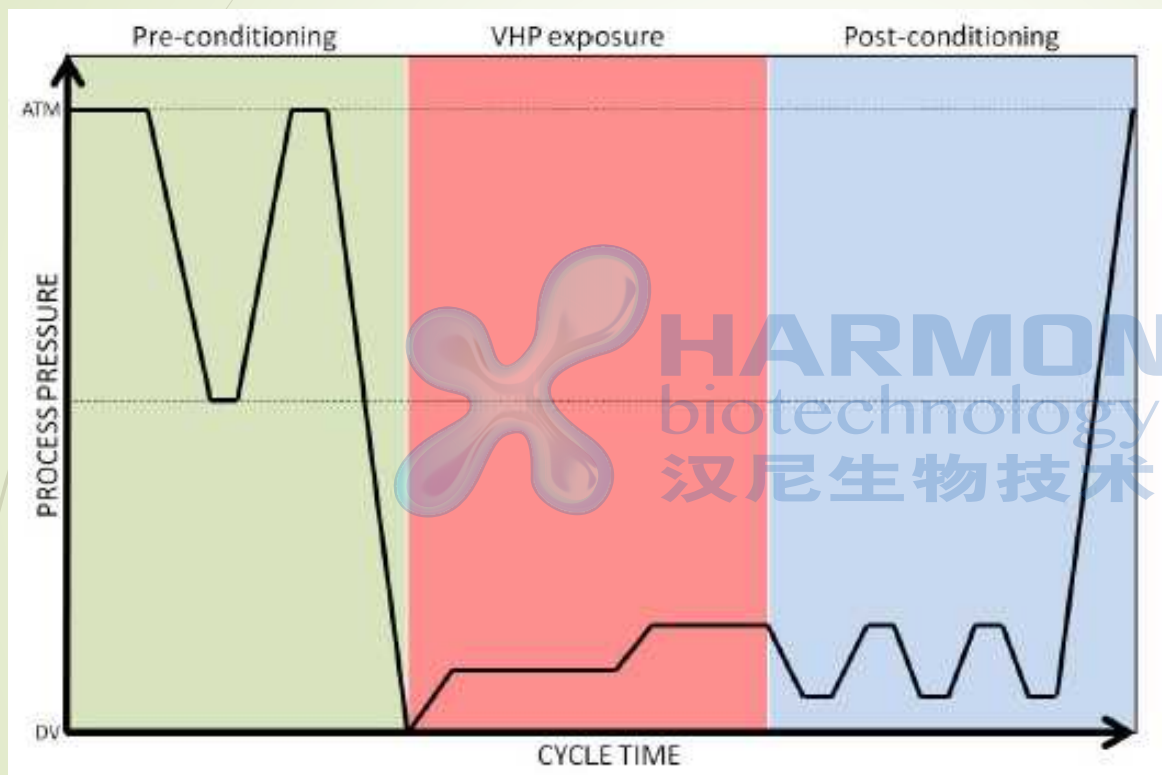
参考：

Real World Vapor Phase Hydrogen Peroxide Decontamination, Jan 2020, Pharmaceutical Technology, Volume 44, Issue 1
Vapor Phase Hydrogen Peroxide – Method for Decontamination of Surfaces and Working Areas from Organic Pollutants

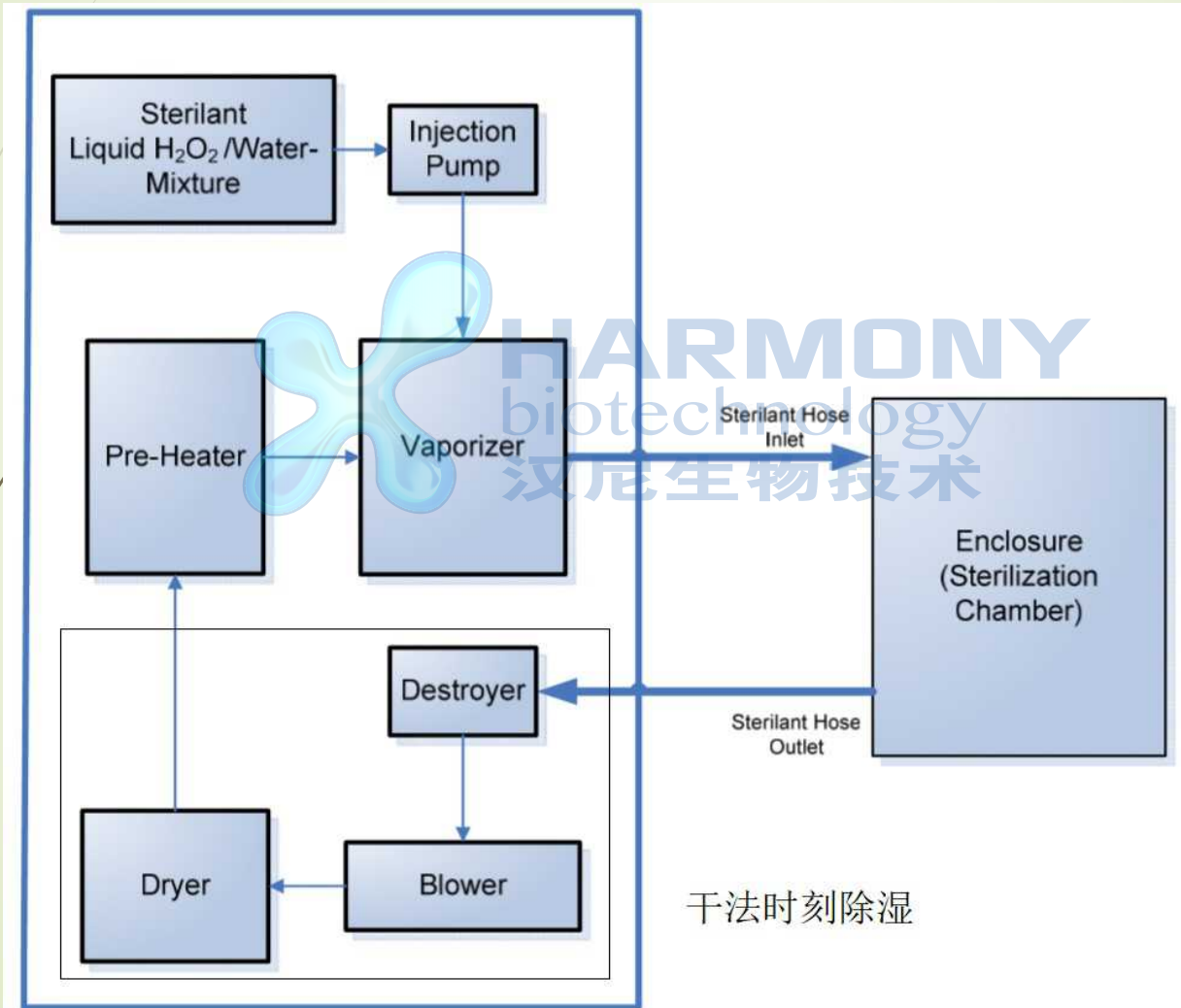
VHP灭菌/消毒工艺程序



VHP 灭菌/消毒工艺程序



VHP灭菌/消毒工艺程序

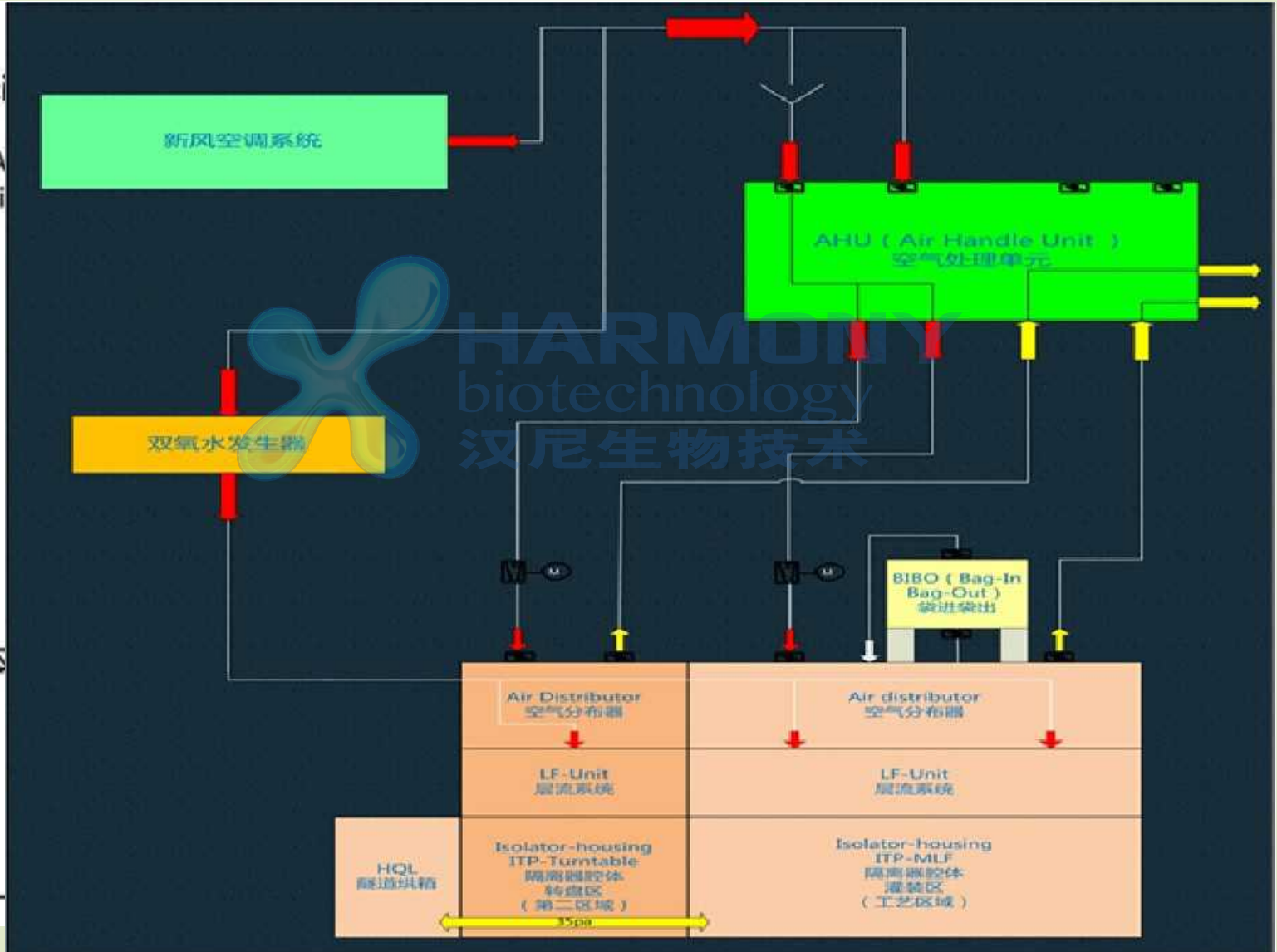


VHP灭菌/消毒设备分类

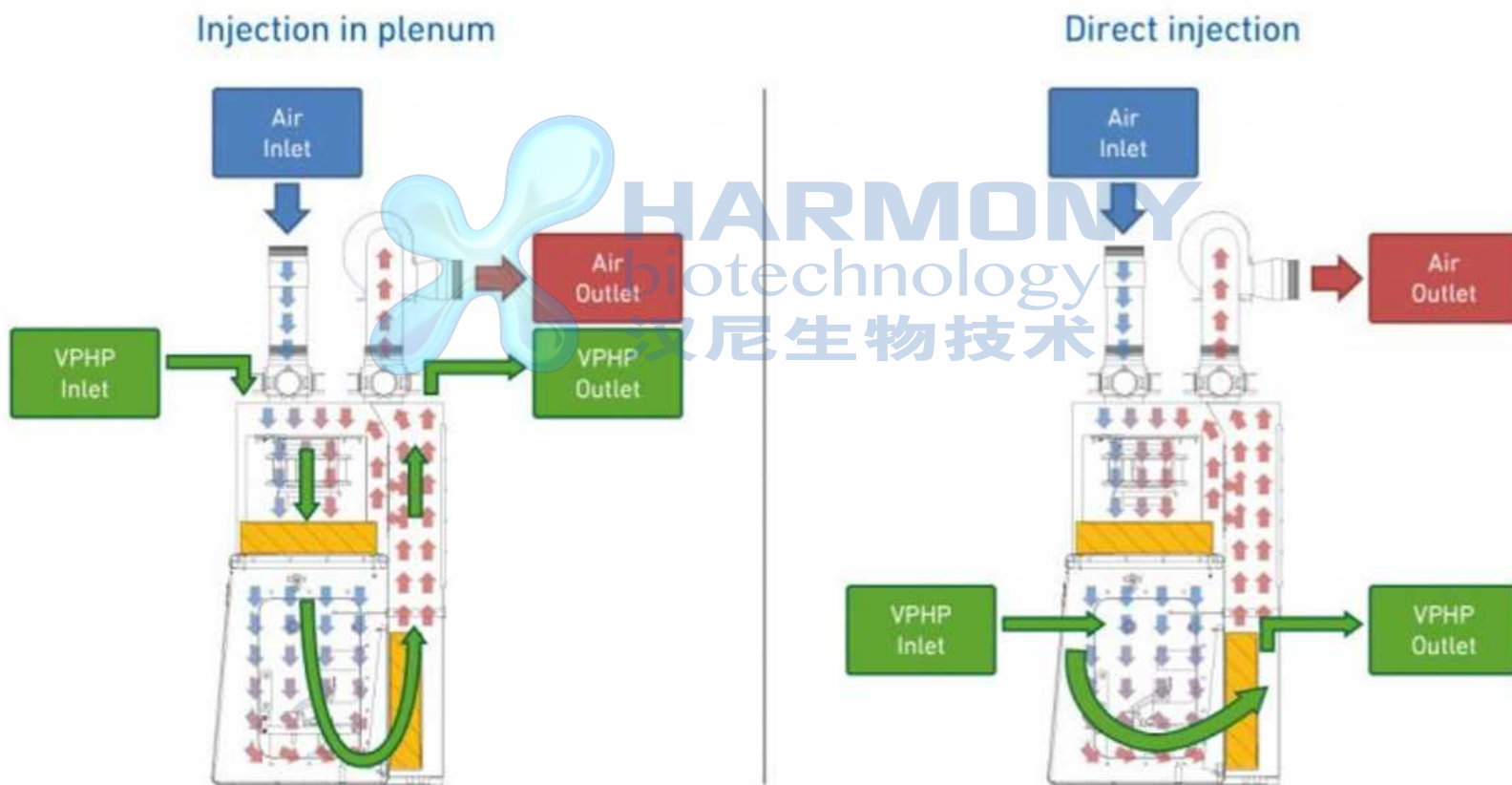
VHP灭菌消毒设备主要分两类：移动式和集成式。移动式通常又分为两种使用方法，一种是熏蒸，一种是循环。

	优点	缺点
集成式/ 固定式	<ol style="list-style-type: none">1. 可以对大空间进行整体消毒2. 可对风管等进行消毒3. 可利用空调系统，实现各区域独立送风，分布更均匀。	<ol style="list-style-type: none">1. 成本较高2. 使用区域相对固定3. 往往需要集成到其他控制系统，进行联动4. 需要配置独立的管道
移动式	<ol style="list-style-type: none">1. 可多个自由组合2. 可灵活运用于各密闭空间3. 性价比高	<ol style="list-style-type: none">1. 多台联用于大体积空间时，需要考虑位置摆放2. 用于多个房间消毒时需要打开所有房间的门3. 分布主要靠气体的布朗运动，存在不均匀的情况

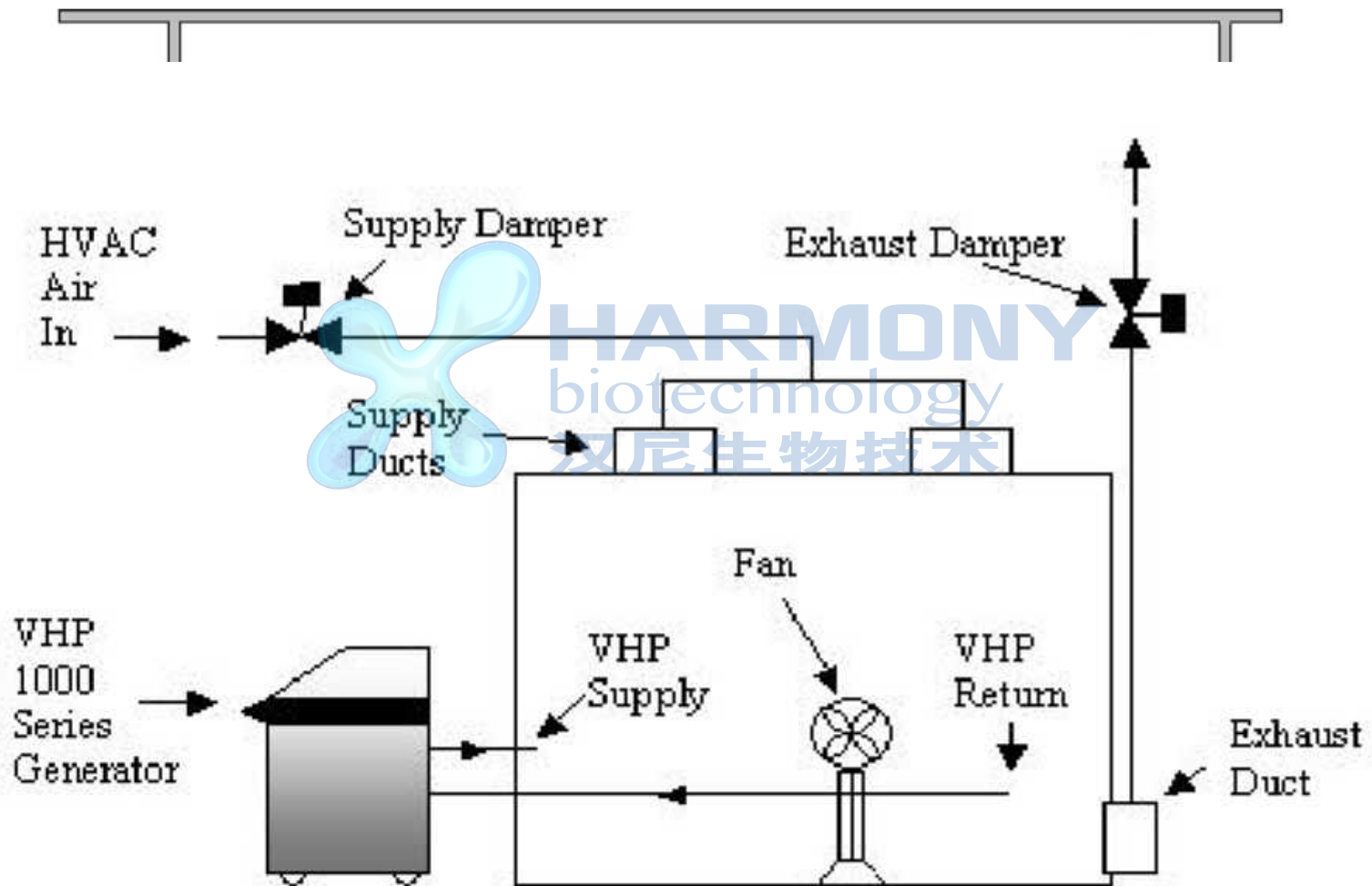
VHP灭菌/消毒设备分类



VHP 灭菌/消毒设备分类



VHP灭菌/消毒设备分类



干法和湿法:

物质有三种基本状态——固态、液态和气态。“蒸汽”一词有多种定义。从科学上讲，蒸汽是一种温度低于其临界点的气体；蒸汽是一种气相，同样的物质也可以以液体的形式存在。大气中的水蒸气就是一个例子。在露点以上的温度下，大气中的水是气体。当温度通过露点降低时，气态水凝结成雾或薄雾，或者在寒冷的表面凝结成液态水。蒸汽的另一种定义是空气中可见的湿气，如雾或蒸汽，一种液体悬浮在气体中的系统

如图所示：显示不同状态的水，液体的湖水，湖面上的雾，空气中气态水。云和雾是水液体和气体的混合物。温度越低相对湿度越高浓度越大。



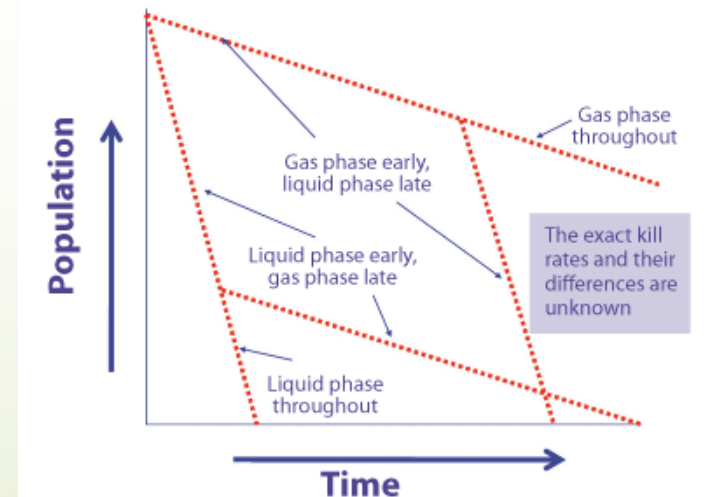
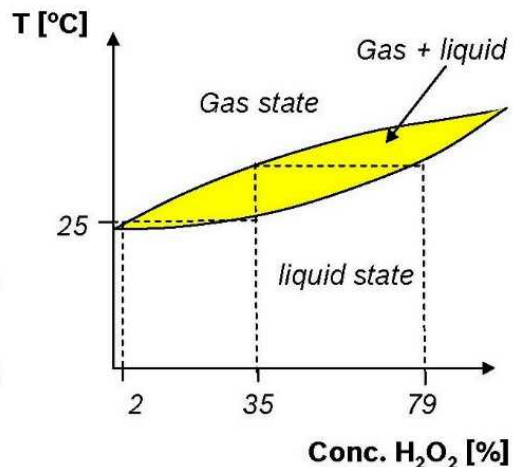
VHP灭菌消毒的一些原理特征

干法和湿法:

$H_2O = 100\text{ }^\circ\text{C}$, $H_2O_2 = 150.2\text{ }^\circ\text{C}$, 30-35% H_2O_2 水溶液=约 $108\text{ }^\circ\text{C}$ 。

闪蒸时热空气的温度通常超过 $100\text{ }^\circ\text{C}$ ，在此温度下， H_2O_2 和 H_2O 都以气体的形式存在，并与热空气一起进入目标环境，是 $H_2O_2/H_2O/$ 空气混合物的形态。如果浓度没有达到饱和点， H_2O_2 和 H_2O 都以气体的形式存在，当遇到冷空气时，温度低于露点时， H_2O_2 和 H_2O 将有部分冷凝，在冷表面则会形成液滴。由于 H_2O_2 的蒸气压低于水（或者说露点较低）， H_2O_2 会先于 H_2O 冷凝下来。因此冷凝液的 H_2O_2 的浓度总是比较高。35% H_2O_2 混合物气相平衡浓度为2%和冷凝时可达79%，因此到达冷凝点时杀灭能力最强。

VHP是个气液相共同杀灭的过程。由于目前并不清楚气相 H_2O_2 主要杀灭是在哪个阶段，很有可能就是在这个冷凝阶段实现的。



参考

Overcoming Limitations of Vaporized Hydrogen Peroxide, Sep 2013, Pharmaceutical Technology, Volume 37, Issue 9

The Relationship between Saturated Hydrogen Peroxide, Water Vapour and Temperature, Mar 2004, Pharmaceutical Technology, Volume 16, Issue 13

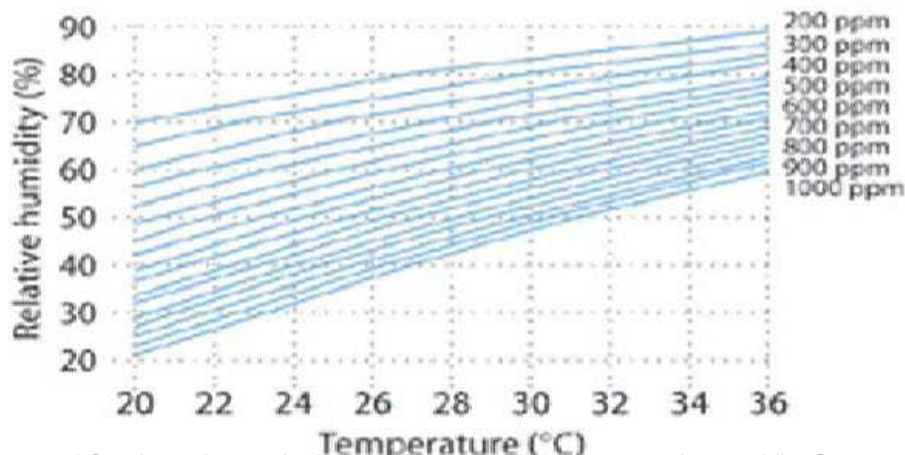
Vapor Phase Hydrogen Peroxide – Method for Decontamination of Surfaces and Working Areas from Organic Pollutants

VHP灭菌消毒的一些原理特征

干法和湿法：

VHP在实际消毒灭菌过程其实都是湿的，是多相体系。干法和湿法最大的区别在多相体系的选择。高温VHP进入到低温的目标环境中，冷凝不可避免。每个位置的微生物失活的主要参数是表面水和过氧化氢的分子分布，而过氧化氢的浓度仅起次要作用。循环中适当的冷凝是必须的，但是应该是微冷凝状态过量的冷凝一方面可能增加对材质的腐蚀，需要更长的置换时间，同时因系统的不均一性，也可能使大量水达到露点，形成非均相的冷凝。另一方面过氧化氢由于其性质更接近有机溶剂而不是水，水和过氧化氢的竞争性吸附明显减缓了减缓杀灭能力。同理湿法更适用于表面比较简单的系统。对于复杂表面的系统，高浓度的干法更有保障。同时干法的可重复性或可定量性更好。

Gas? Vapor?



参考：

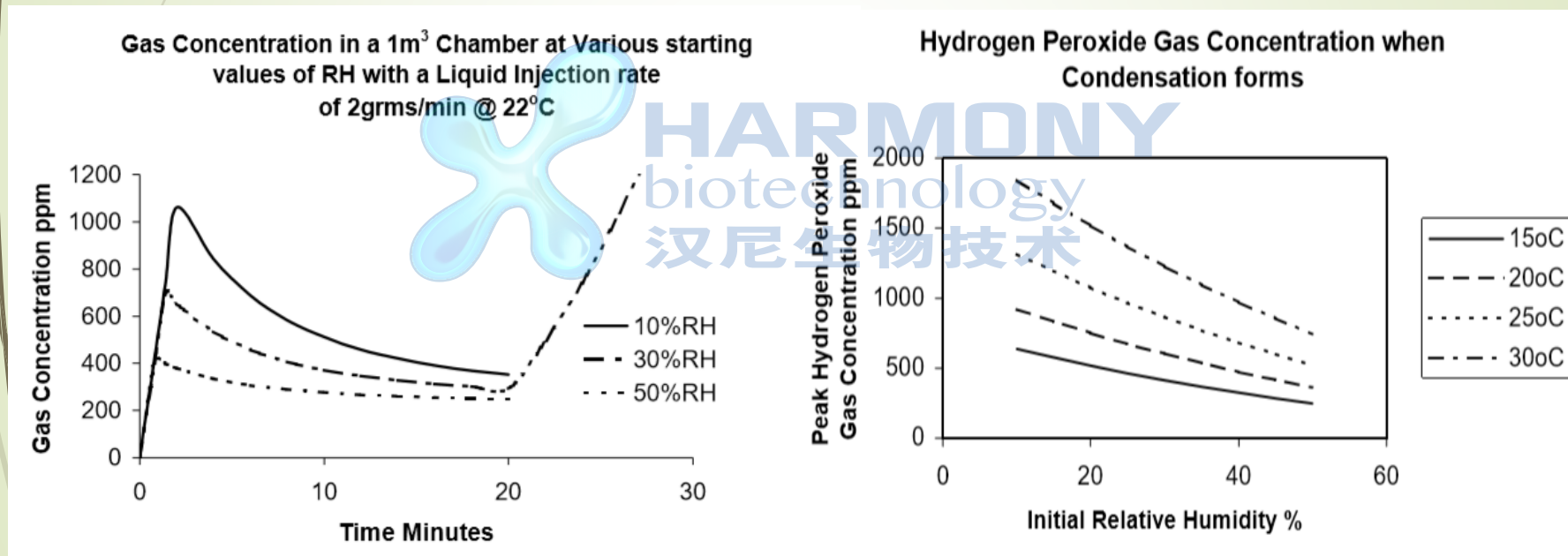
The Influence of Humidity, Hydrogen Peroxide Concentration, and Condensation on the Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores with Hydrogen Peroxide Vapor, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, June 2008, Volume 3, Issue 2, p123-133

The Relationship between Saturated Hydrogen Peroxide, Water Vapour and Temperature, Mar 2004, *Pharmaceutical Technology*, Volume 16, Issue 13

Real-World Vapor Phase Hydrogen Peroxide Decontamination, Jan 2020, *Pharmaceutical Technology*, Volume 44, Issue 1

VHP灭菌消毒的一些原理特征

浓度与湿度： 初始阶段控制湿度可以提升VHP浓度。温度越高，冷凝时的所需的浓度越高，冷凝点越往后。



参考：

The Influence of Humidity, Hydrogen Peroxide Concentration, and Condensation on the Inactivation of *Geobacillus stearothermophilus* Spores with Hydrogen Peroxide Vapor, *Journal of Pharmaceutical Innovation*, June 2008, Volume 3, Issue 2, p123-133

Theoretical Analysis of the Condensation of Hydrogen peroxide Gas and Water Vapor as used in Surface Decontamination

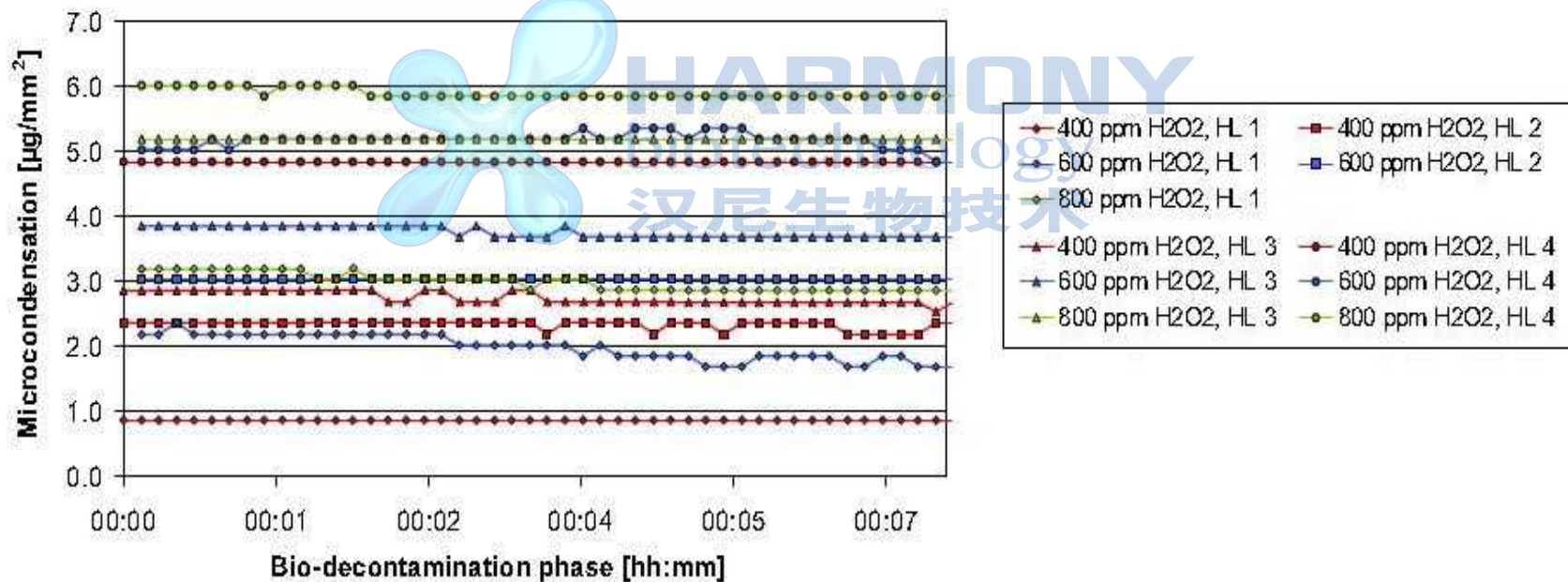
VHP灭菌消毒的一些原理特征

浓度与湿度：初始湿度越低，冷凝浓度越高，杀灭效果越好。初始湿度对浓度的影响大于温度。

初始相对湿度 RH%	冷凝浓度%w/w		
	10°C	20°C	30°C
10	75.1	74.4	73.6
20	68.9	68.4	67.8
30	62.7	62.3	61.8
40	56.3	56	55.7
50	49.7	49.5	49.2

VHP灭菌消毒的一些原理特征

浓度与湿度： 每个位置的浓度越高，湿度越高，杀灭效果越好。当浓度到达800ppm时，湿度对于杀灭效果影响就很小了。对于小体积灭菌如隔离器通常供应商选择800ppm以上，80%湿度以上的杀灭条件，并保持一定的微冷凝量。对于大空间简单表面的洁净室，150ppm-400ppm就可以满足要求了



VHP灭菌消毒的一些原理特征

浓度与湿度： 每个位置的浓度越高，湿度越高，杀灭效果越好。当浓度到达800ppm时，湿度对于杀灭效果影响就很小了。对于小体积灭菌如隔离器通常供应商选择800ppm以上，80%湿度以上的杀灭条件，并保持一定的微冷凝量。对于大空间简单表面的洁净室，150ppm-400ppm就可以满足要求了

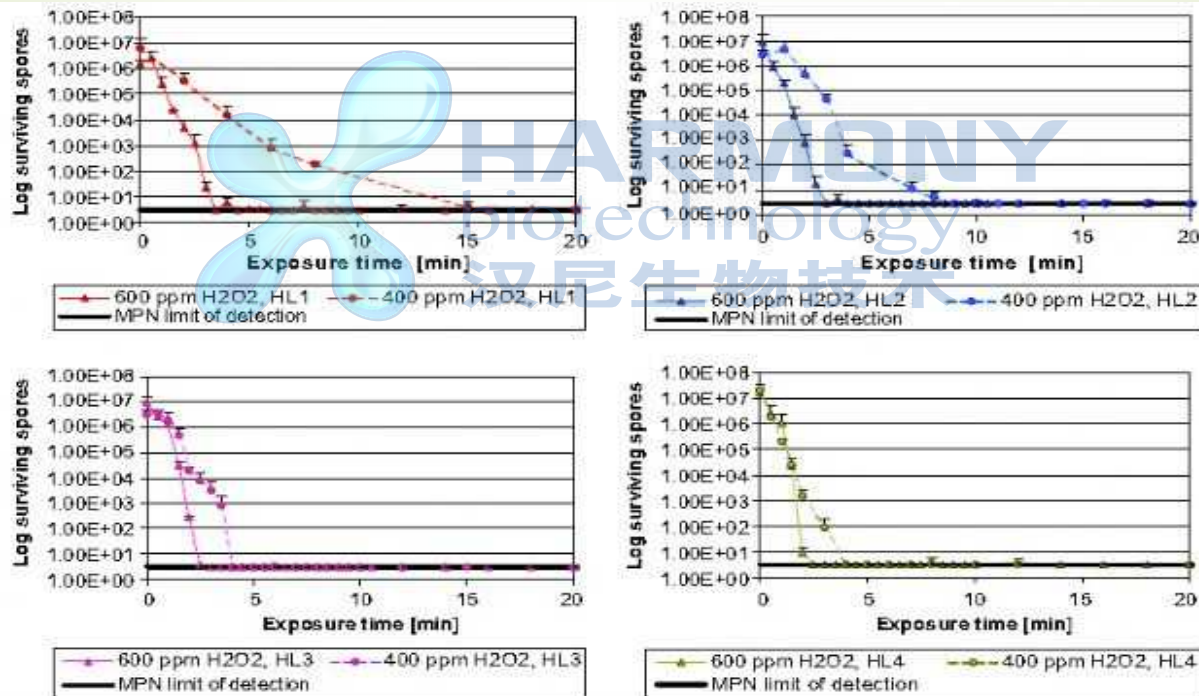


Fig. 14 Inactivation kinetics for humidity levels 1 to 4 for 400 and 600 ppm hydrogen peroxide (limit of detection=3.00E+00 spores)

VHP灭菌消毒的一些原理特征

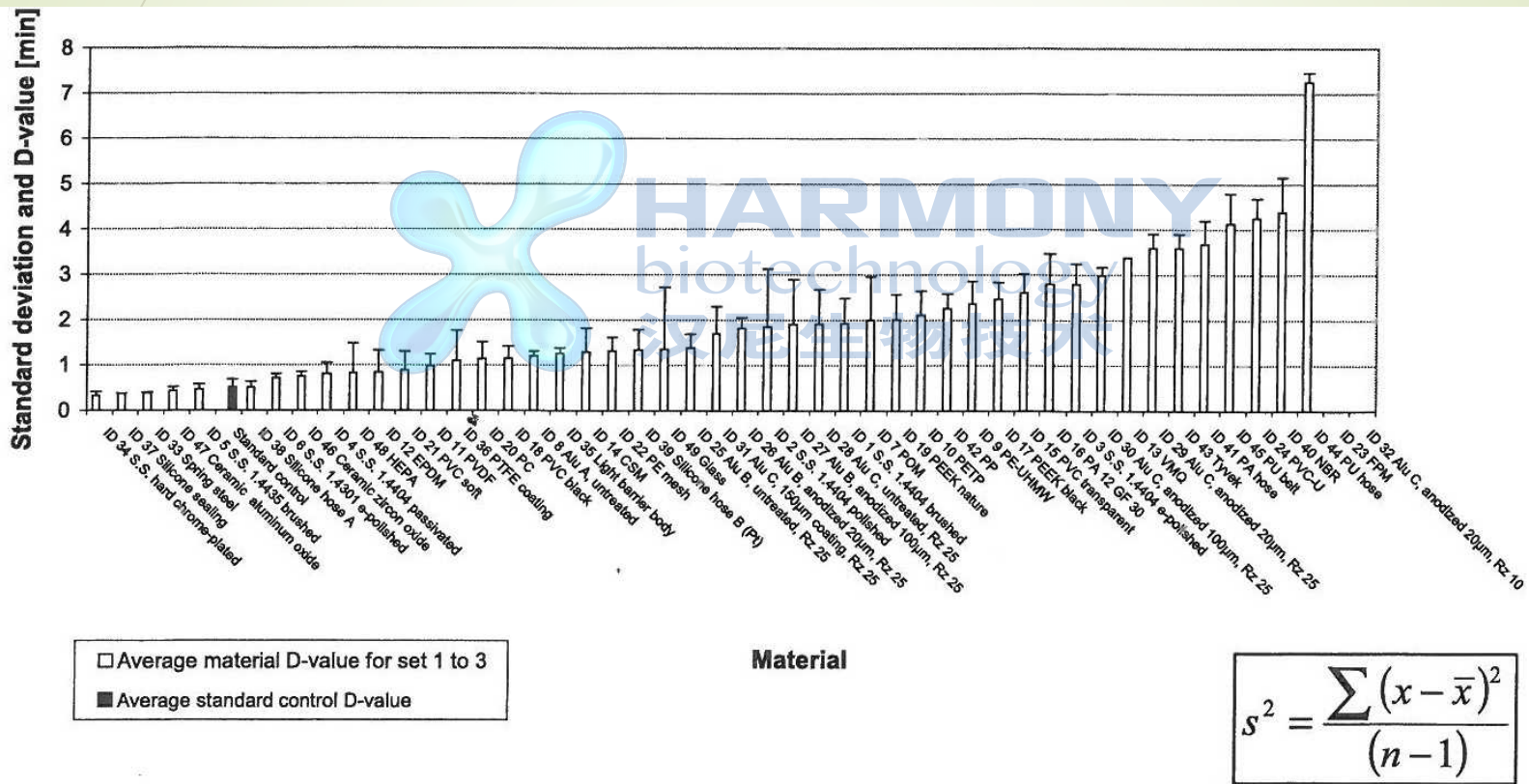
浓度与湿度： 每个位置的浓度越高，湿度越高，杀灭效果越好。当浓度到达800ppm时，湿度对于杀灭效果影响就很小了。对于小体积灭菌如隔离器通常供应商选择800ppm以上，80%湿度以上的杀灭条件，并保持一定的微冷凝量。对于大空间简单表面的洁净室，200ppm-300ppm就可以满足要求了

Table 2 *D* values and average water concentration for decontamination cycles with 400, 600, and 800 ppm hydrogen peroxide during bio-decontamination phase

	HL1 <i>D</i> value (min)	<i>c</i> (water) (ppm)	HL2 <i>D</i> value (min)	<i>c</i> (water) (ppm)	HL3 <i>D</i> value (min)	<i>c</i> (water) (ppm)	HL4 <i>D</i> value (min)	<i>c</i> (water) (ppm)
400 ppm H ₂ O ₂	14.83	3,612	4.27	10,177	1.38	13,588	0.68	18,151
	14.33	3,919	4.27	10,081	1.13	13,880	0.78	17,469
	14.70	3,919	3.14	10,109	1.43	13,880	0.93	17,469
	—	—	—	—	—	—	0.88	18,383
	—	—	—	—	—	—	0.78	18,383
600 ppm H ₂ O ₂	2.87	6,414	0.87	10,413	0.75	13,924	0.75	18,272
	2.56	5,518	0.83	11,497	0.53	12,898	0.35	18,126
	2.14	7,349	0.88	11,497	0.58	12,898	0.45	18,126
	—	—	1.13	9,992	—	—	0.58	20,052
	800 ppm H ₂ O ₂	0.56	6,741	0.48	11,250	0.25	14,046	0.38
	0.53	7,213	0.65	9,550	0.28	14,525	0.48	17,378
	0.53	8,633	0.65	9,550	0.28	14,525	0.43	17,378
	—	—	0.45	9,386	—	—	0.43	17,378

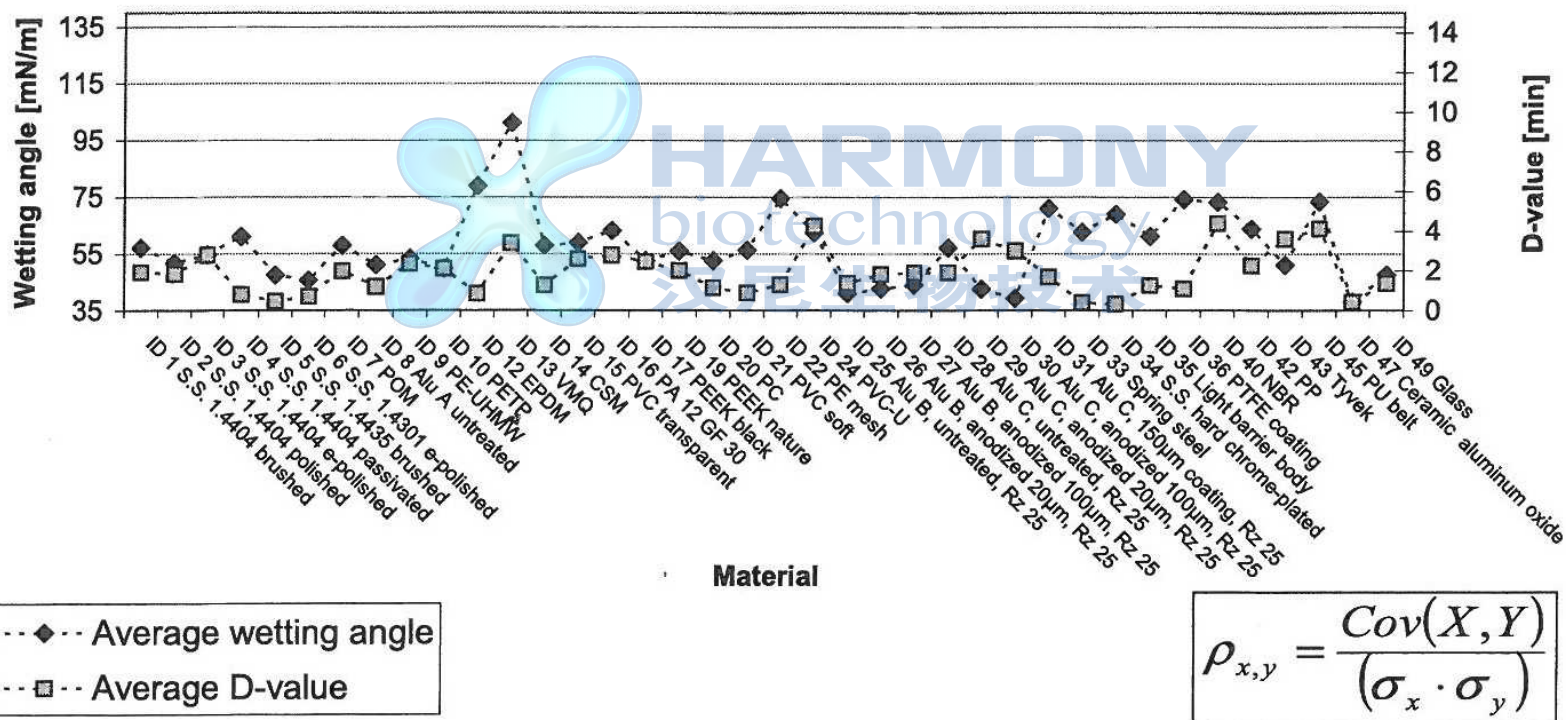
VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。



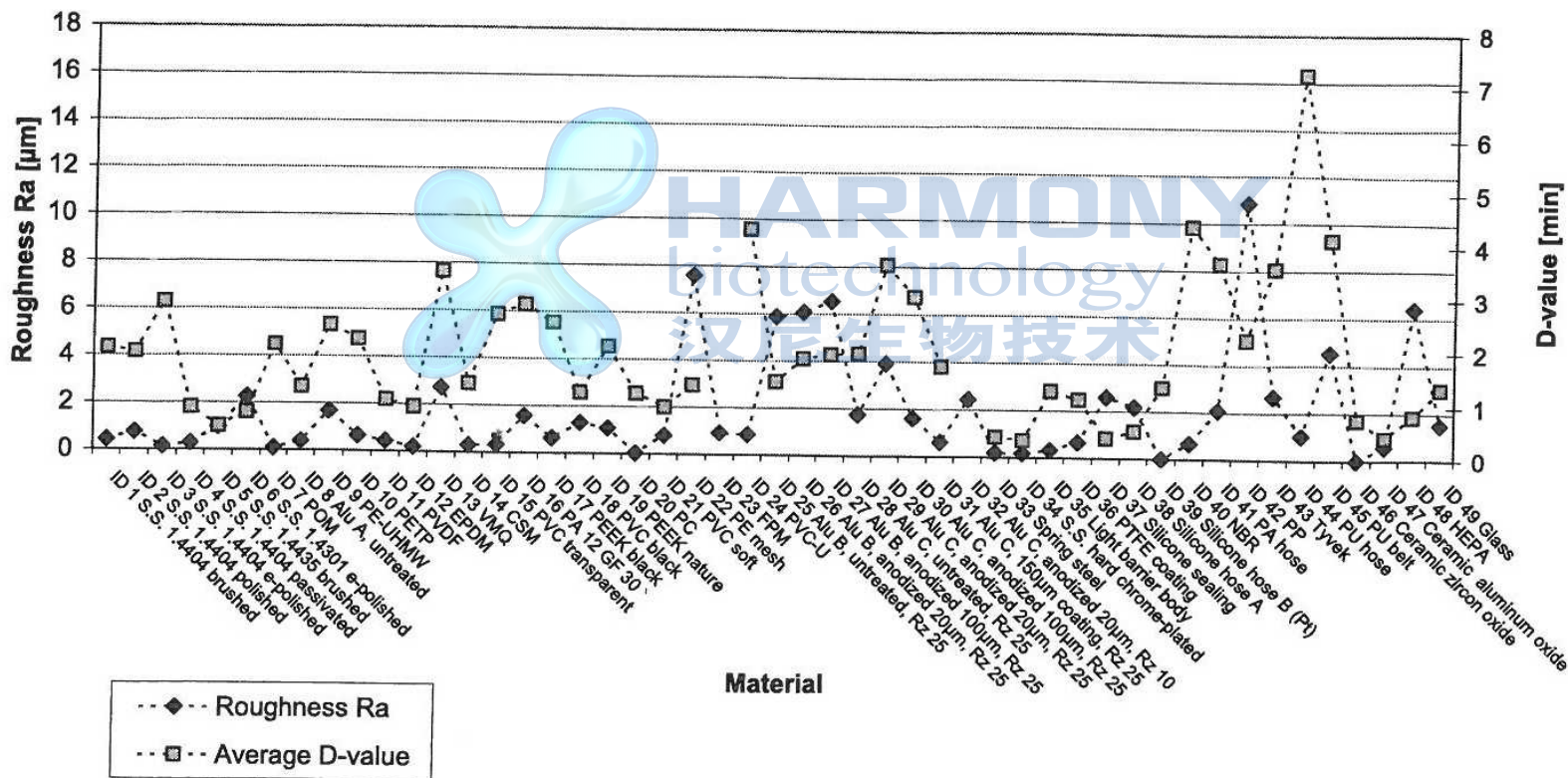
VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。



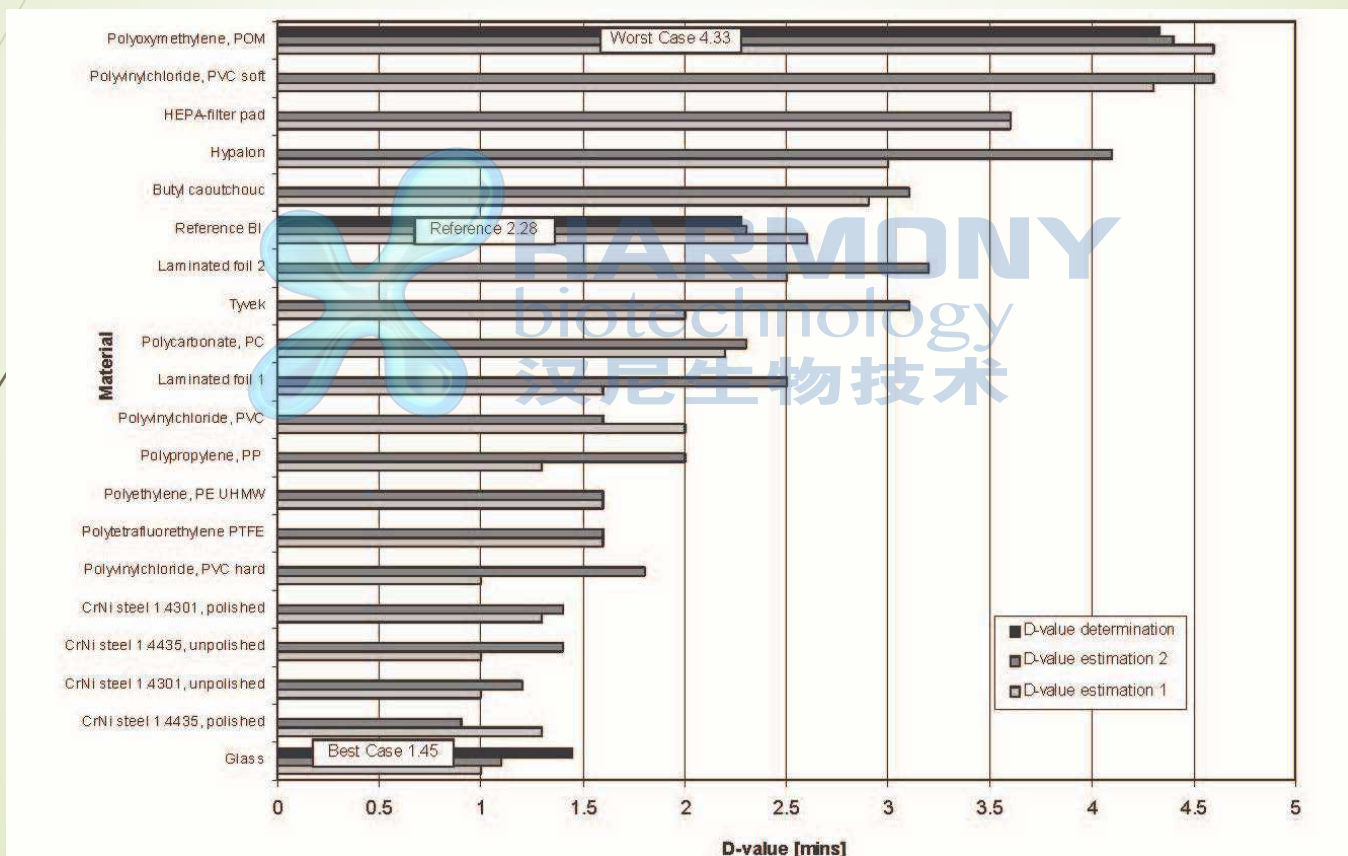
VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。



VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。



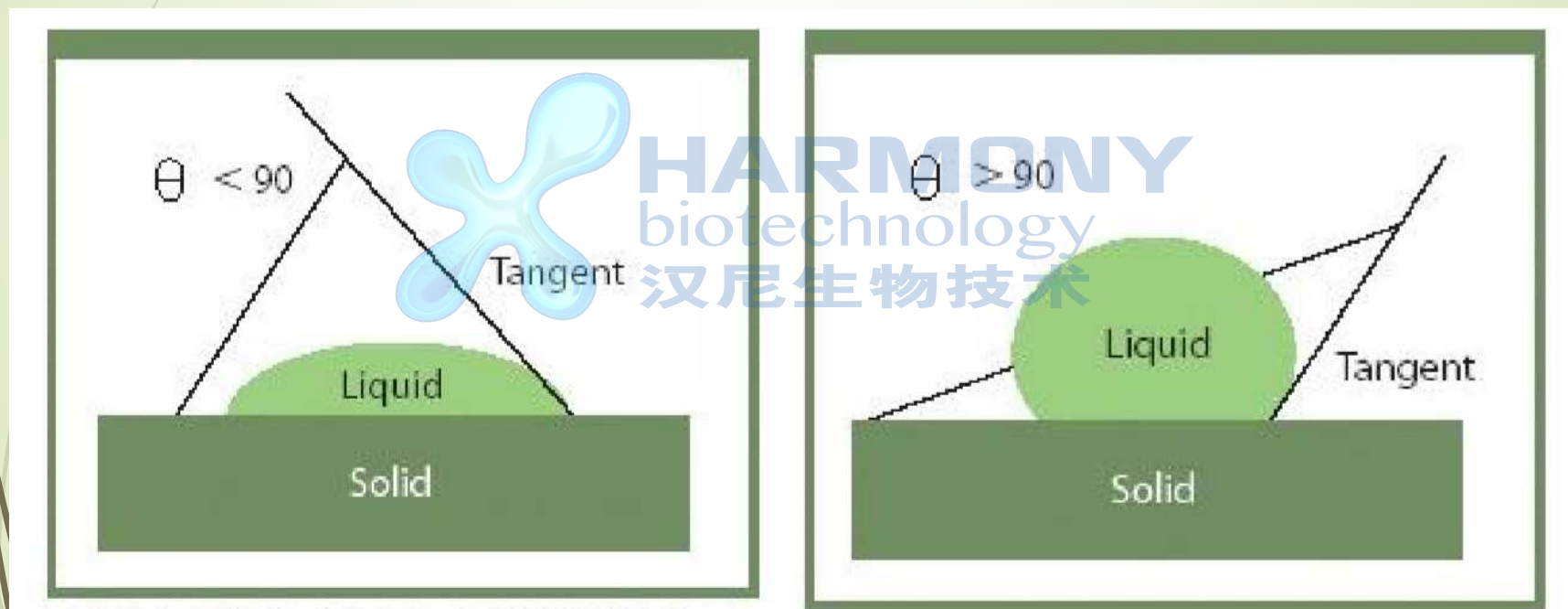
VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。

	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min
不锈钢	<10	0	0	0	0
阳极氧化铝	0	0	0	0	0
光学玻璃	15	12	0	0	0
瓷砖	0	0	0	0	0
山毛榉材	0	0	0	0	0
PET	0	0	0	0	0
LDPE	63	<10	0	0	0
PP	<10	0	0	0	0
硅胶	<10	0	0	0	0
纸张	2.3×10^5	1.2×10^5	86	<10	0
玻纤	18	0	0	0	0
PVC	<10	0	0	0	0
聚氨酯	1.8×10^4	<10	0	0	0
氯丁橡胶	<10	0	0	0	0
氟橡胶	3.7×10^3	<10	80	0	0
EPDM	0	0	0	0	0

VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。



VHP灭菌消毒的一些原理特征

材质： 对不同材质的表面杀灭能力不一样，同时材质表面的接触角，粗糙度，导热性等都会影响到杀灭效果。有时粗糙度越大，杀灭效果越差。

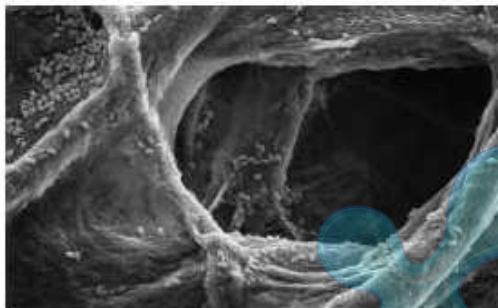


Figure 1: Scanning electron micrographs of spores on a paper carrier.

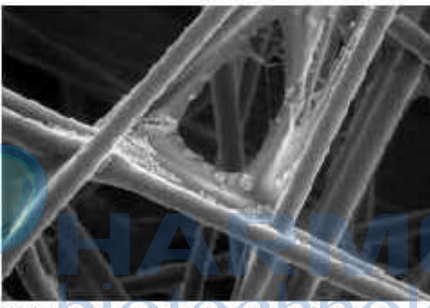


Figure 2: Scanning electron micrographs of spores on a fiberglass carrier.

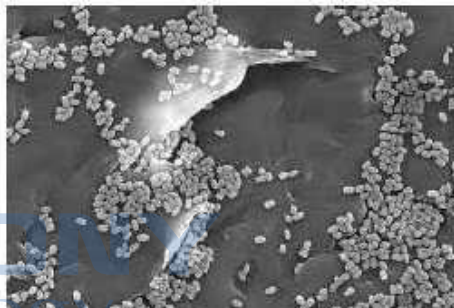


Figure 3: Scanning electron micrographs of spores deposited on a laminated aluminum container.

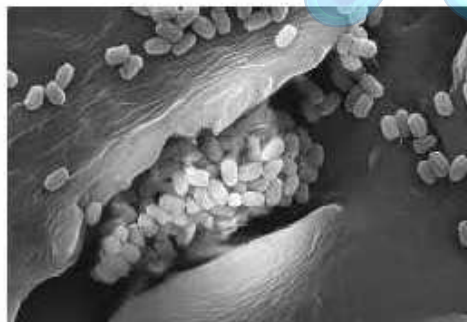


Figure 4: Scanning electron micrographs of spores deposited on a laminated aluminum container.



Figure 5: Scanning electron micrographs of spores in a monolayer on a stainless steel container.

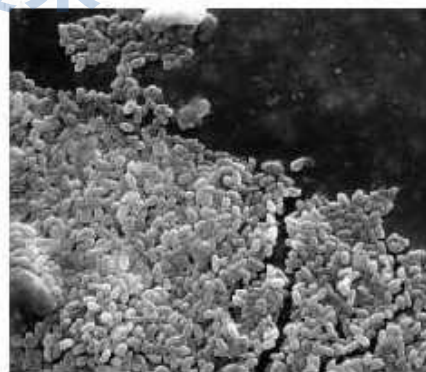
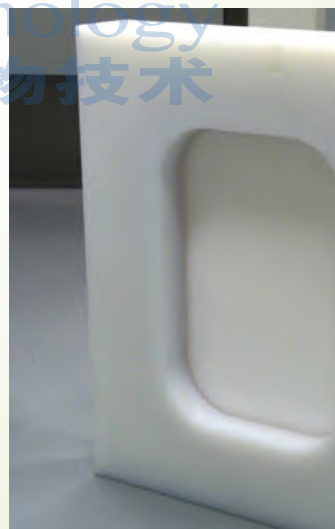
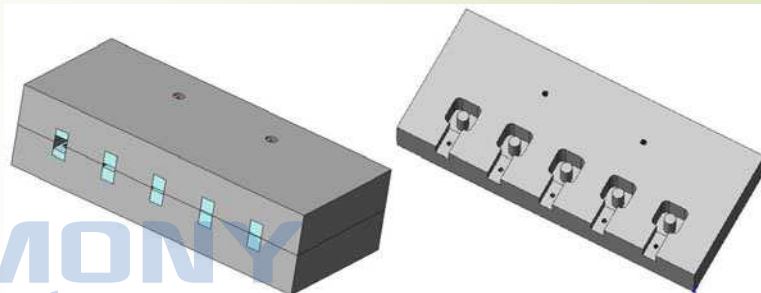


Figure 6: Scanning electron micrographs of spores piled on a rubber stopper.

VHP灭菌消毒的一些原理特征

穿透性: VHP具备一定的穿透性，但能力不强。在CD&CV时部分缝隙可以考虑不进行布点，同时装载布置和生物指示剂的布置一定要注意布置环境，保持足够的间隙。

Cavity depth, 10 mm and cavity height, 1 mm; cavity material PTFE	For 800 ppm H_2O_2 , ≥ 80 min bio-decontamination phase
Cavity depth, 20 mm and cavity height, 3 mm; cavity material PTFE	For 800 ppm H_2O_2 , ≥ 25 min bio-decontamination phase
Cavity depth, 30 mm and cavity height, 9 mm; cavity material SS	For 400 ppm H_2O_2 , ≥ 90 min bio-decontamination phase; for 600 ppm H_2O_2 , ≥ 60 min bio-decontamination phase; for 800 ppm H_2O_2 , ≥ 30 min bio-decontamination phase
Cavity depth, 30 mm and cavity height, 6 mm; cavity material SS	For 800 ppm H_2O_2 , ≥ 90 min bio-decontamination phase
Cavity depth, 30 mm and cavity height, 4 mm; cavity material SS	For VPHP cycles with 800 ppm H_2O_2 and ≤ 90 min bio-decontamination phase: no complete inactivation of $10E6$ inoculated biological indicator possible
Cavity depth, 60 mm and cavity height, ≤ 9 mm; cavity material SS	For VPHP cycles with 800 ppm H_2O_2 and ≤ 90 min bio-decontamination phase: no complete inactivation of $10E6$ inoculated biological indicator possible



VHP灭菌消毒的一些原理特征

对于关键体系而言进行初始阶段的预热和除湿是很有必要的：

- 除湿可以有效提升灭菌消毒阶段的浓度
- 预热可以消除温度差异可能带来的冷凝体系分布不均
- 预热可以保证体系在更高浓度时才开始冷凝
- 更高的温度让气体扩散更容易，让VHP整体分布更均匀更易进入小缝隙（也可能使表面更光滑）
- 预热可降低风管等大面积低温物体表面可能造成的VHP冷凝
- 除湿和预热可有效避免高浓条件初始阶段可能出现的大量冷凝
- 除湿和预热可最大可能保证工艺的可重复性，可定量性。

物理指标

+

化学指标

+

生物指标

HARMONY
biotechnology
汉尼生物技术
循环参数

无菌生产用的隔离器的材质选择，处理由供应商来保障



关键参数：

- H_2O_2 浓度和所需的量
- H_2O_2 浓度分布情况
- 注射率与注射时间
- 空间和双氧水发生器的温度/湿度
- 排气时间
- H_2O_2 残留
- 装载

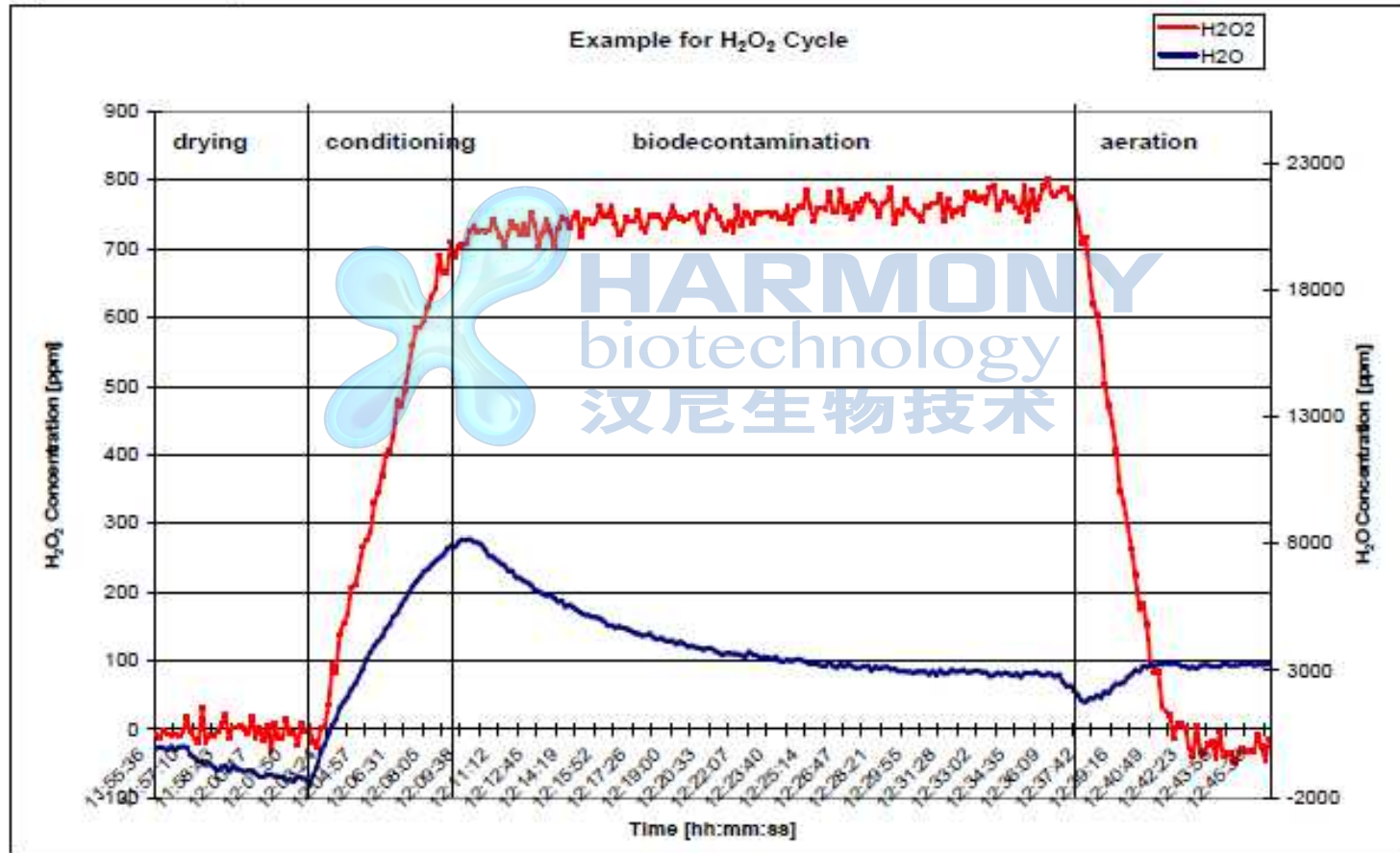


VHP程序验证原则及要点

阶段	程序	事件	
	准备	准备好设计的装载、 在线监控设备、手套	密封相邻区域的门缝， 鼠洞等
I	干燥/预热	泄露测试 相对湿度： $\leq 20\%$ 温度： 20°C 以上 风速	相对湿度：30-50% 温度： 20°C 以上
II	浓度建立	加注速率 加注时间	
III	消毒灭菌	加注速率 加注时间 低风速	400-1000ppm 150-400ppm
IV	通风	足够的时间，目标残留浓度1ppm	

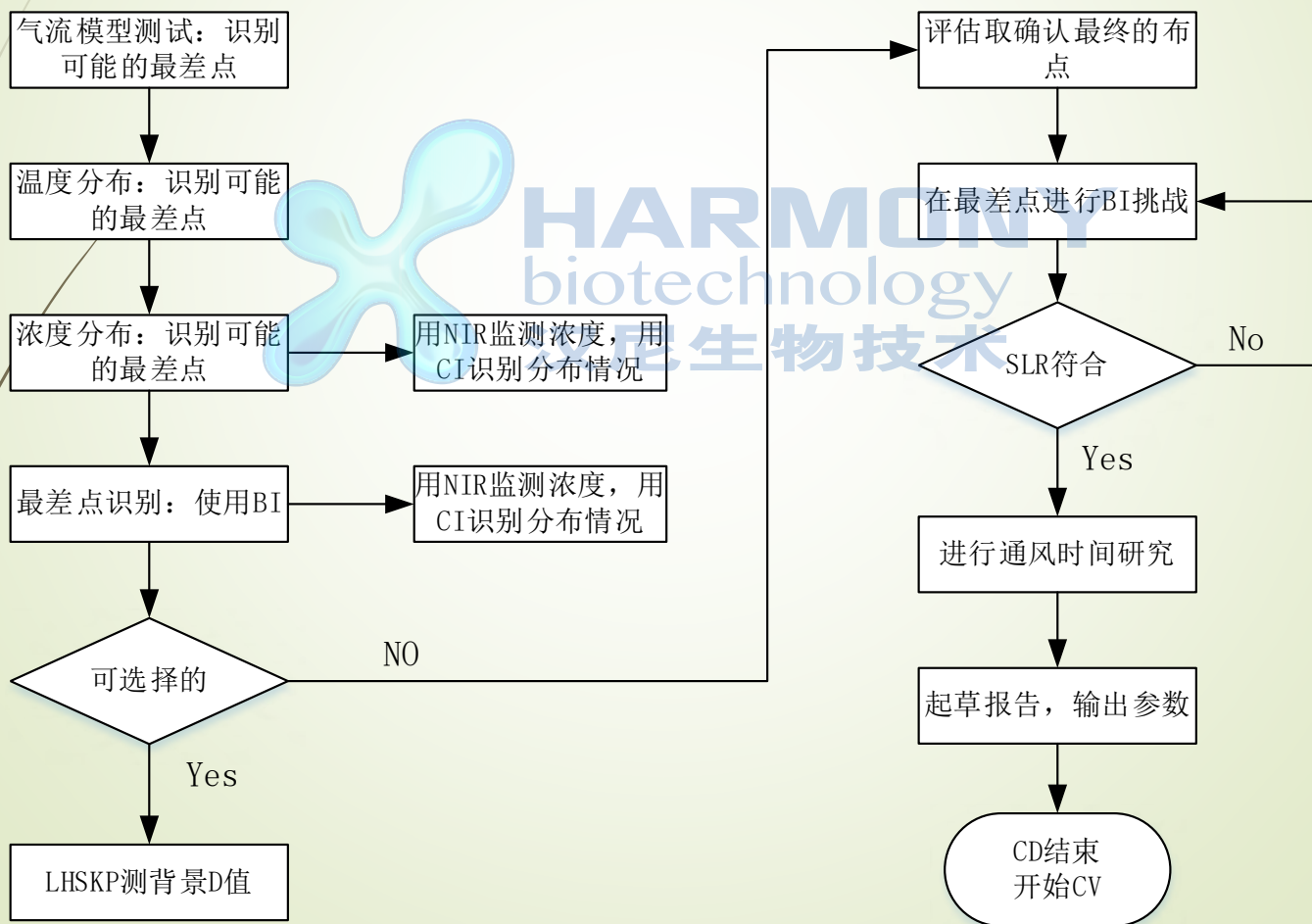
VHP程序验证原则及要点

Figure 1: NIR Spectrum



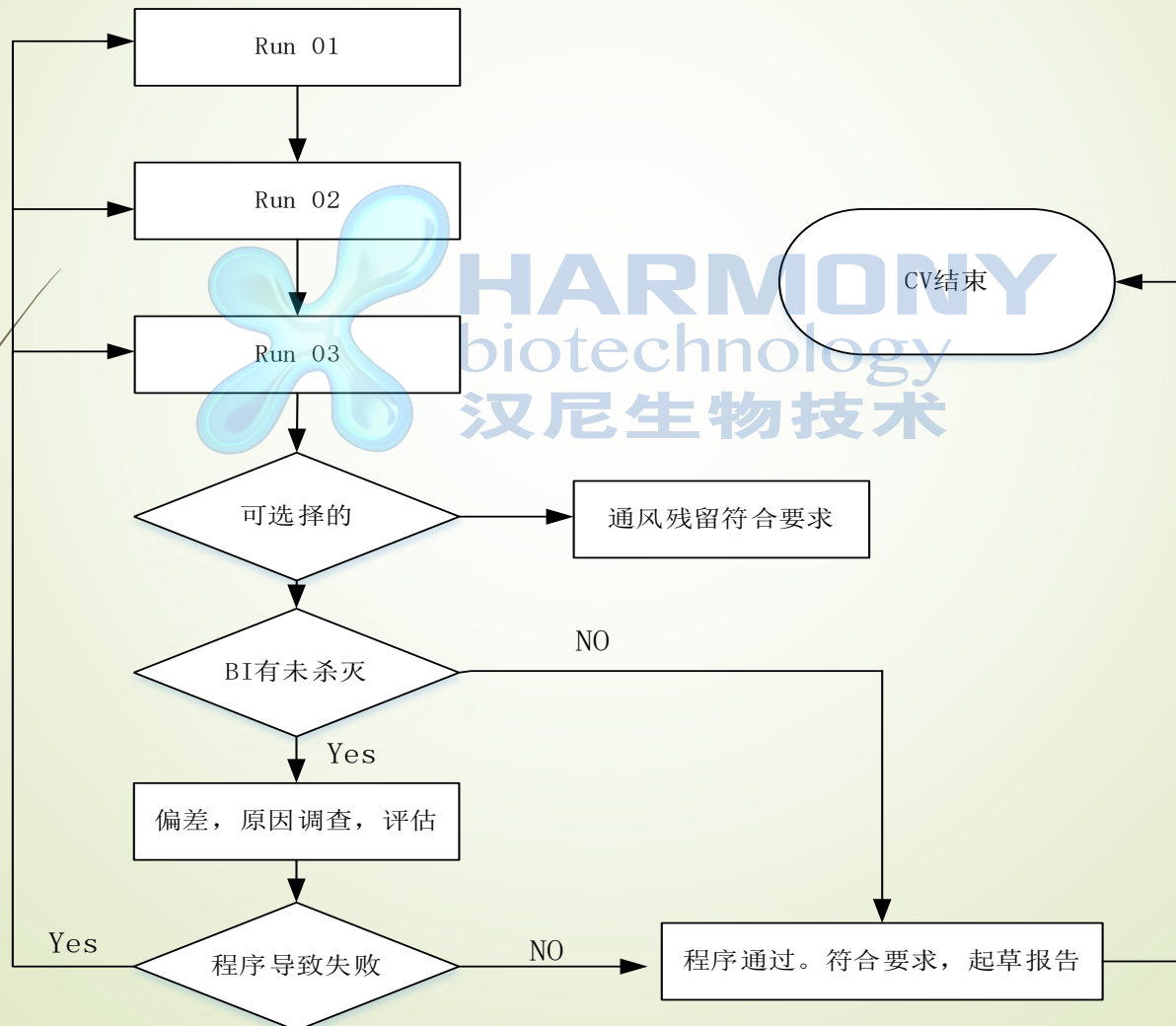
VHP程序验证原则及要点

CD流程



VHP程序验证原则及要点

CV流程



气流模型



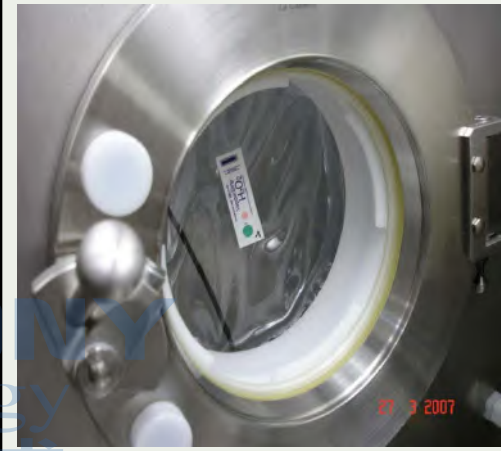
1. 可结合烟雾试验和风速测试
2. 风速较大, 和风速较低都可能是较差情况
3. 应关注特殊形状的物体, 及物体的背风面, 回风夹道, 在线监控点附近工作区域

温度分布



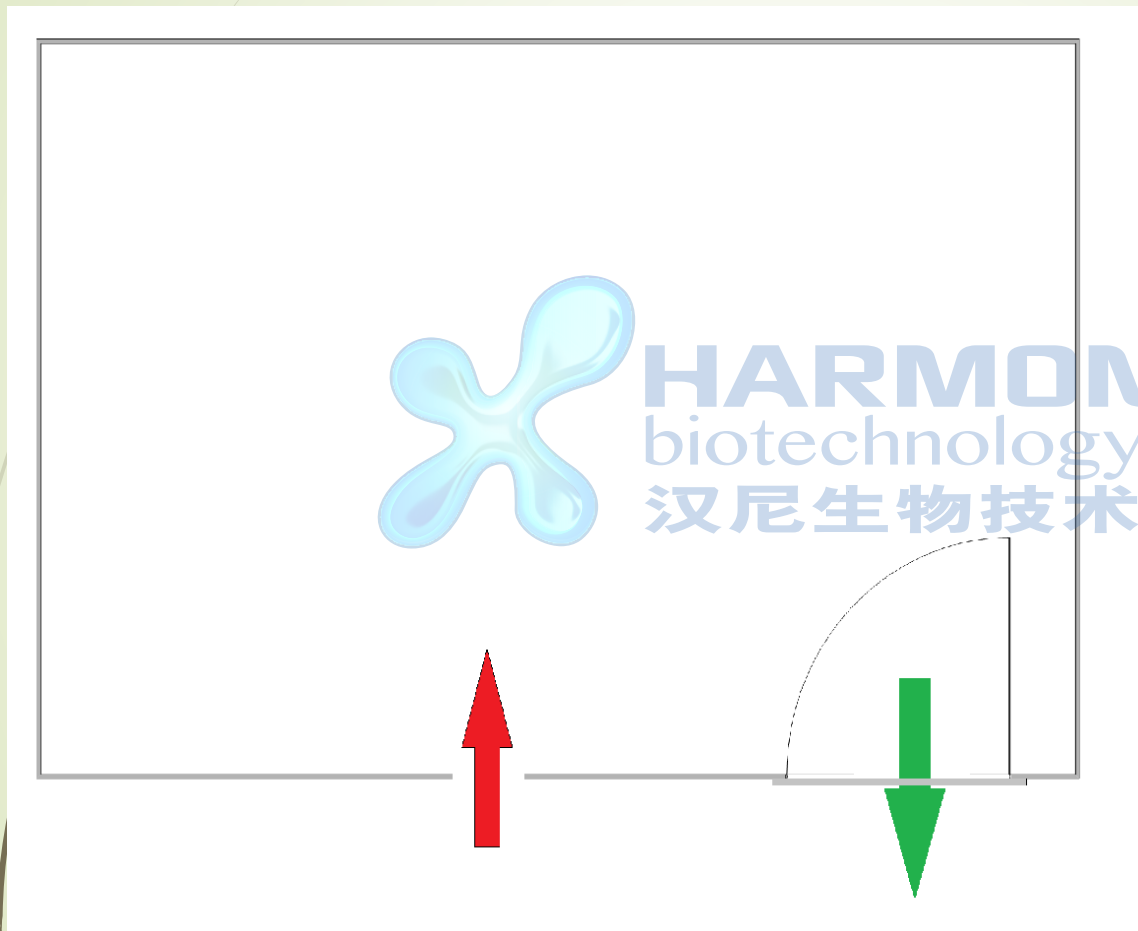
1. 不同物体的升温速率不一
2. 高温和低温都可能是较差情况
3. 灭菌程序运行过程, 有电机运行的、SIP程序加热的表面, 大体积溶液、金属的表面, 背景温度需要关注

浓度分布

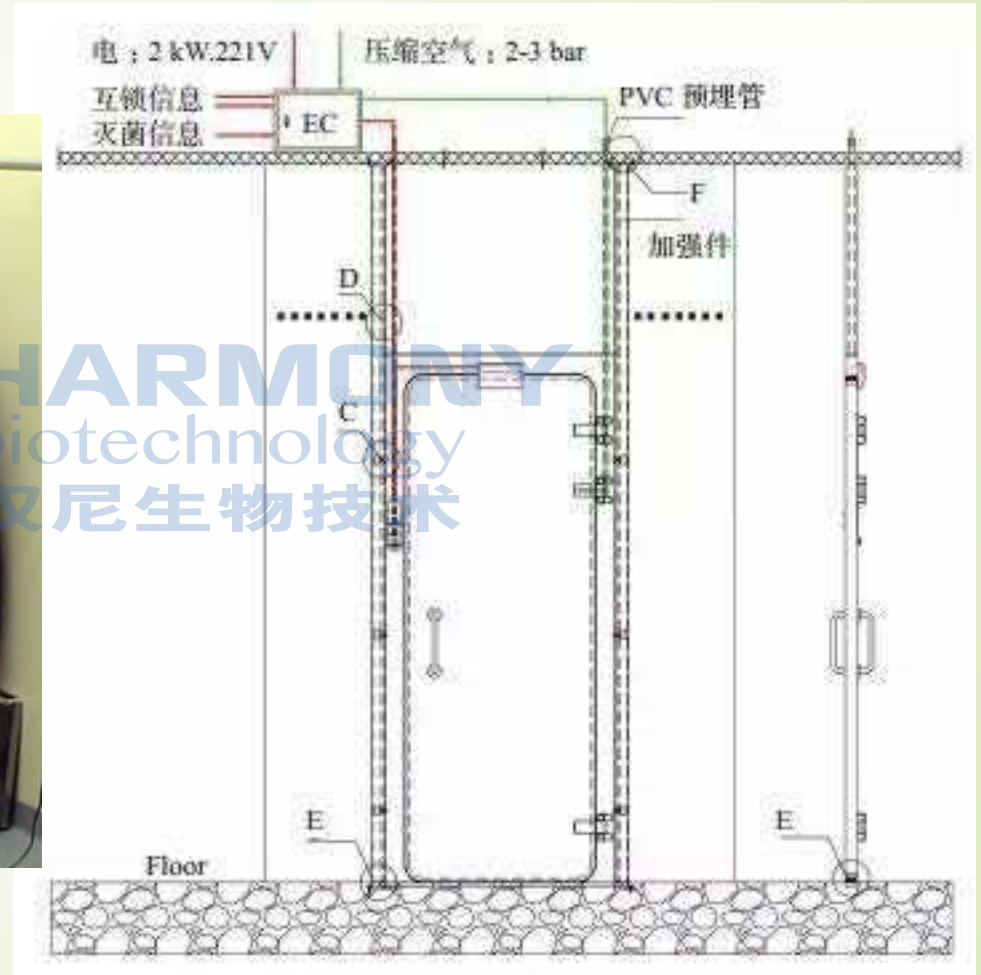


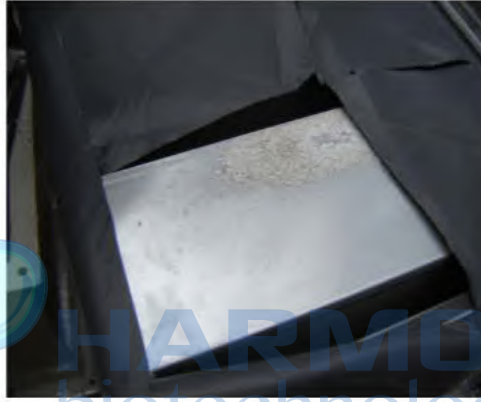
1. CI变色程度和完成变色时间都是考察内容
2. CI布点考虑易观测
3. 也可以先期用水试运行, 用湿度计记录腔室内湿度变化情况, 可以布置在一些不宜观察但是结构复杂的点
4. 利用EI定量分析杀灭能力

密封相关注意事项



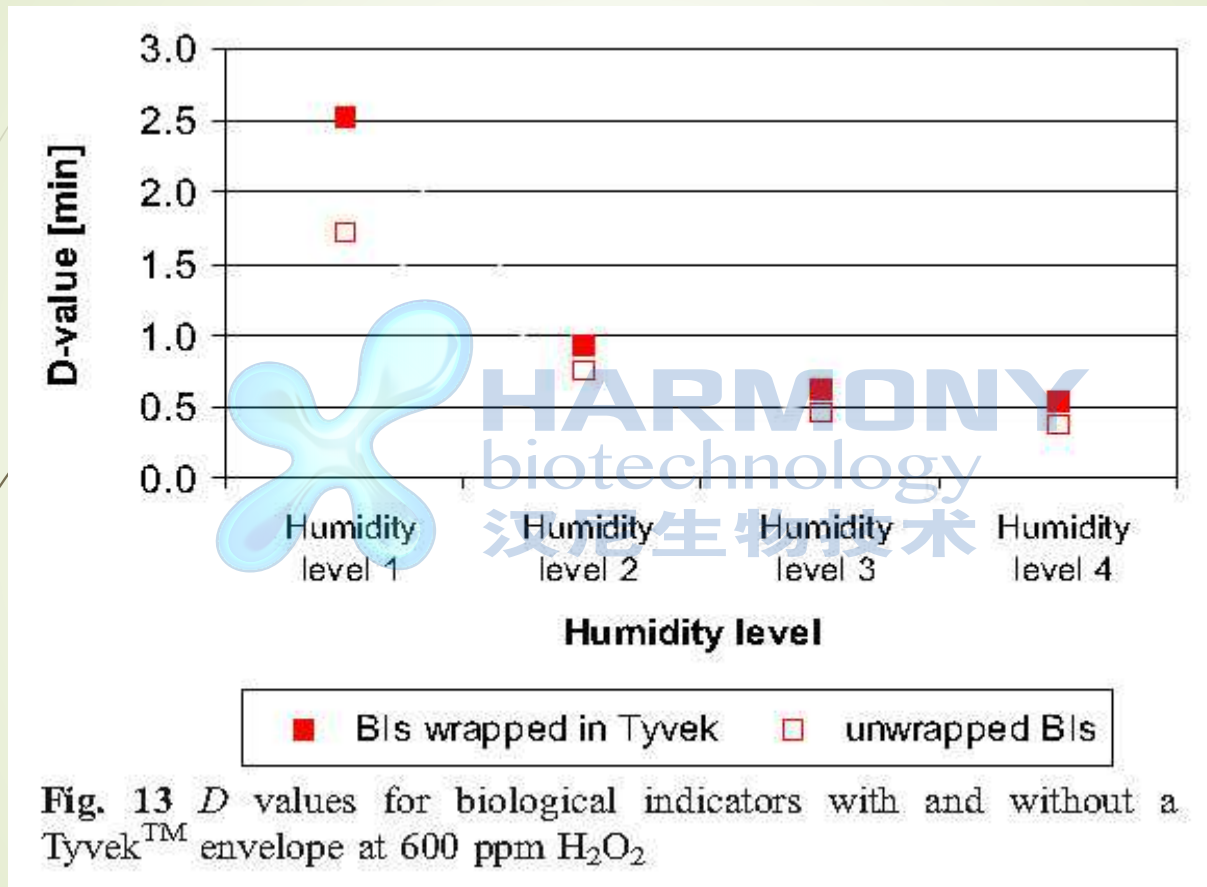
在进行洁净室空间消毒时，由于系统是在微正压情况运行，必须关掉相邻的空调系统，避免交界面的房间被倒灌污染，同时为了防止泄露，需要进行密封。如果消毒过程要求所有内部房间门打开怎么办？



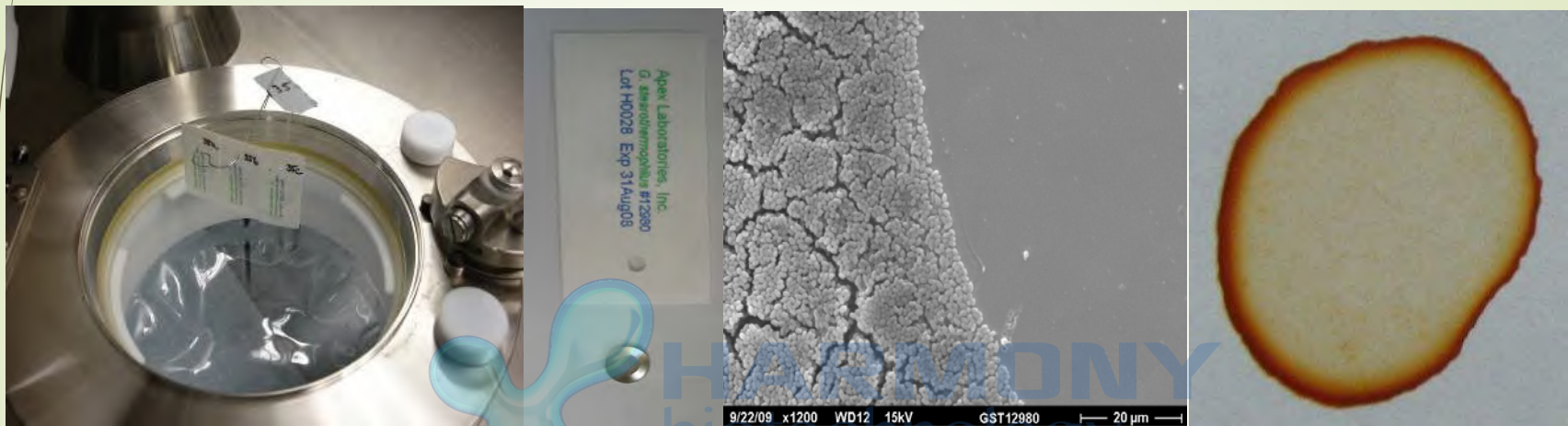


Paint blistering of surfaces and floors





关于BI除了载片和涂布的问题外，包装的Tyvek 材质对VHP有一定的阻隔作用。



生物指示剂布置几点注意事项及建议:

1. BI使用前一定要提前约2小时取出, 便于平衡温度和菌复苏
2. BI布置必须注意载菌的方向, 一定要朝向VHP气体, 特别是布置在短径管路内
3. BI布置一定要保证自由悬挂, 没有物体阻碍, 不会紧贴物体表面; 布置与运动物体表面的保证足够支撑强度, 避免BI倒伏
4. 如可能同一点可以布置3个BI或更多BI, 可利用MPN计算SLR, 有阳性也可接受
5. 如果可能采用LHSPK法进行背景D值研究, 可提前更换高D值BI, 也可为可能失败提供相关数据。但是对程序本身没有太多意义, 更多的是项目时间/成本的权衡。但对于积累了大量历史数据的供应商来说, 实际意义更多。
6. **千万不要裸手操作**

HVAC及HEPA相关注意事宜

- HVAC的空调机组的表冷选型必须要确保能够排空，否则导致VHP的冷凝
- 空调管道以及VHP管道的保温一定要到位，否则冬季低温时会导致VHP的冷凝，同时要有足够的密封性。
- HVAC的机组需要定期清洁，管道里的灰尘会吸附分解VHP
- 普通的镀锌板不耐受VHP，会降解VHP，降低VHP浓度
- 不同类型的HEPA表面对过氧化氢有不同程度的吸附和截留。由于过滤介质的巨大表面积，在系统中存在HEPA过滤器，可能会延迟达到HEPA过滤器下游的峰值浓度水平。HEPA还将捕捉空气中存在的气溶胶液滴。VHP会通过HEPA过滤器，下游的浓度水平也会相应上升，一旦吸附发生，浓度水平就会低于上游浓度水平。过高的浓度和吸附发生时，可能会导致VHP在HEPA表面冷凝。在通风阶段，观察到相反的效果。由于HEPA玻纤的快速解吸，下游的过氧化氢水平在曝气开始时将暂时达到峰值。应采用硅脂密封胶。
- 低风速循环对管道消毒效果更好。

关于残留相关注意事项

VHP可以渗透高分子塑料材质，渗透分为两步：第一步是气体在薄的表面层中溶解，第二步是扩散到材料内部。

VHP在PE、PP中渗透能力较弱，可以很快通过通风去除。

VHP很容易穿透聚烯烃POF，聚氯乙烯PVC，Tyvek这一类包装；硅胶可以吸附大量VHP。在隔离器中如直接接触产品的部件使用tyvek或呼吸袋包装，一定要考虑正常通风是无法去除包装内的残留，必须制定合适的使用策略或包装策略。

VHP性质更偏向于有机物，会与脂肪族叔氮反应，存在脂肪酸等油脂会降低杀灭能力，所以VHP过程中，禁止裸手操作。

VHP的渗透性还会破坏物体结构强度。

VHP可能会和有机物的某些基团或键的有机物反应，导致变色，氧化，老化等损伤。



腐蚀问题

对于洁净室而言，如果彩钢板采用了PE涂层，涂层较薄，不够致密，则VHP很可能渗透进入彩钢板，可能降解产生气泡，引发鼓泡现象。同样如果VHP前未很好干燥彩钢板，VHP过量冷凝也可渗透进入引发鼓泡现象。高频次的VHP应尽量避免。



参考

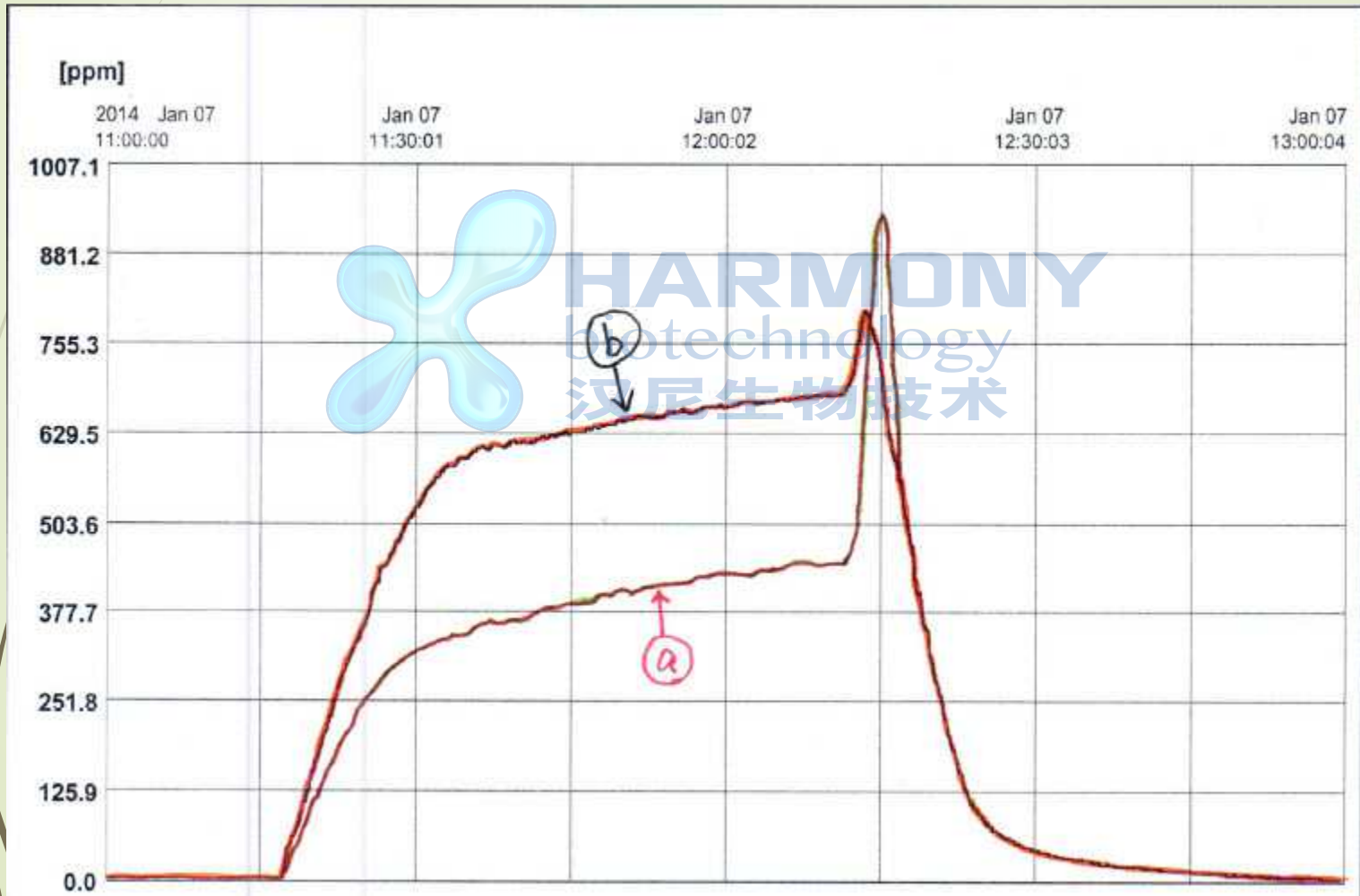
Vapor Phase Hydrogen Peroxide – Method for Decontamination of Surfaces and Working Areas from Organic Pollutants
Real-World Vapor Phase Hydrogen Peroxide Decontamination, Jan 2020, Pharmaceutical Technology, Volume 44, Issue 1

VHP程序验证失败的常见原因

1. 温湿度控制：空调机组的冷凝，机组蒸汽加热除湿，管路冷凝，内部温度低，运动物体表面高温，闪蒸器温度，动力压缩空气温度湿度，外界低温高湿
2. 浓度控制：闪蒸效率，泄露，冷凝结露，高温，分布，HEPA影响，其他循环风系统的影响
3. BI布置：方向，孔隙
4. BI问题：coffee ring (edge effect)，载片，包装，平衡。
5. 长时间使用后物体表面的磨损
6. 清洁干燥未到位

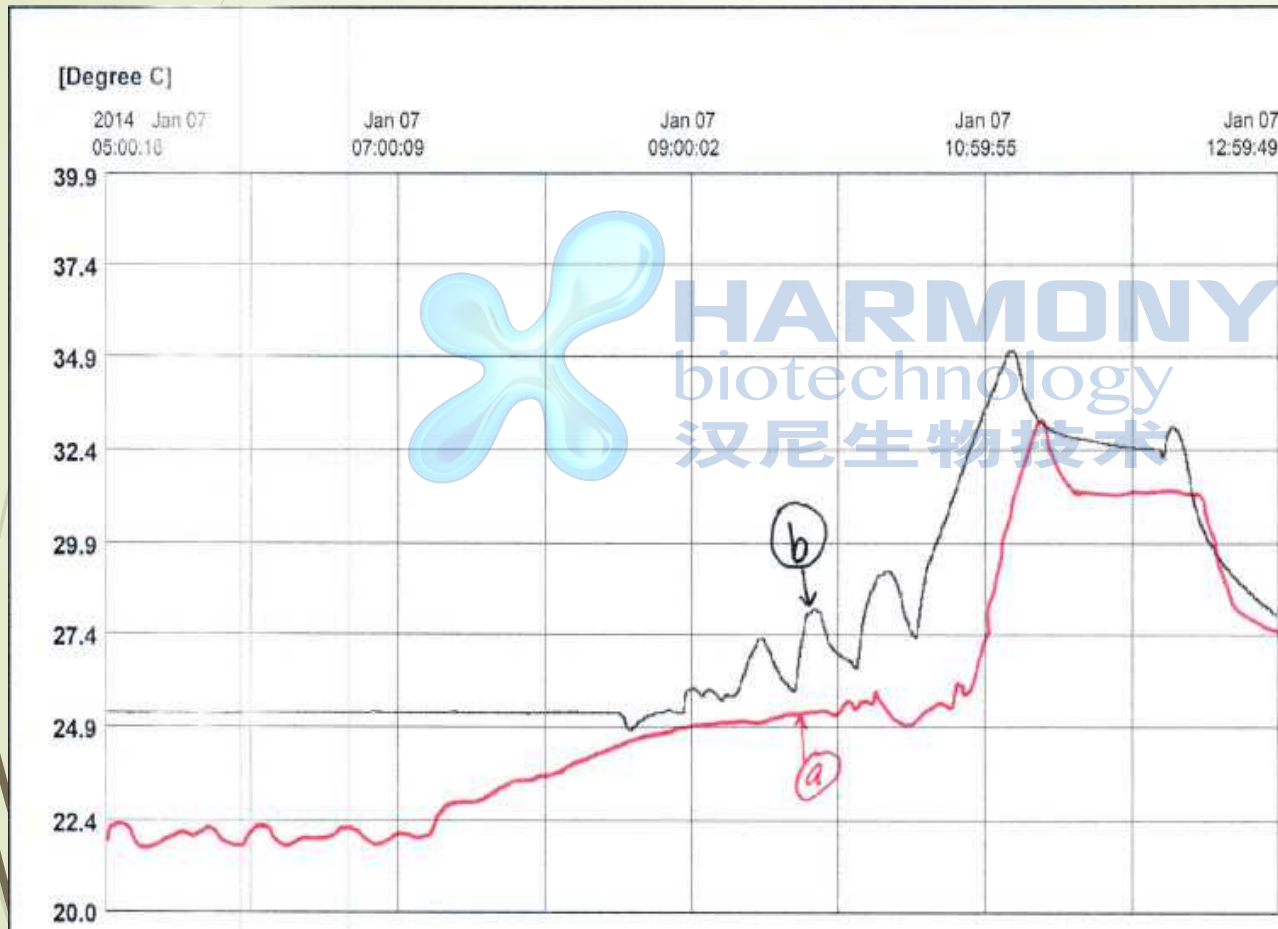
VHP灭菌程序验证失败的常见原因

控温



VHP灭菌程序验证失败的常见原因

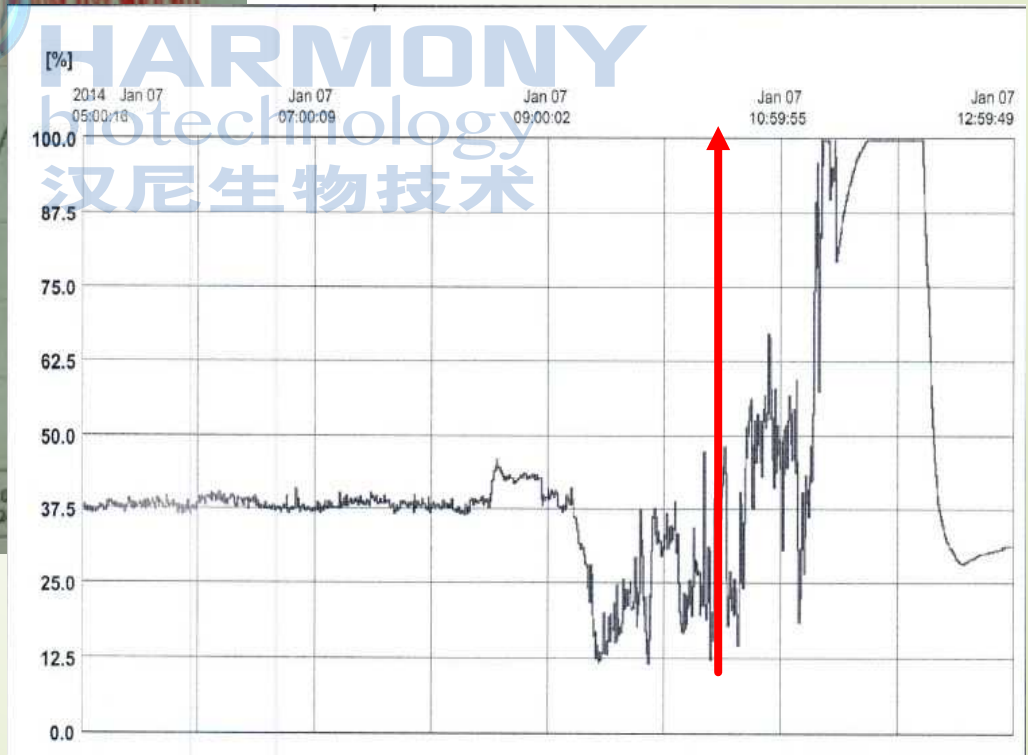
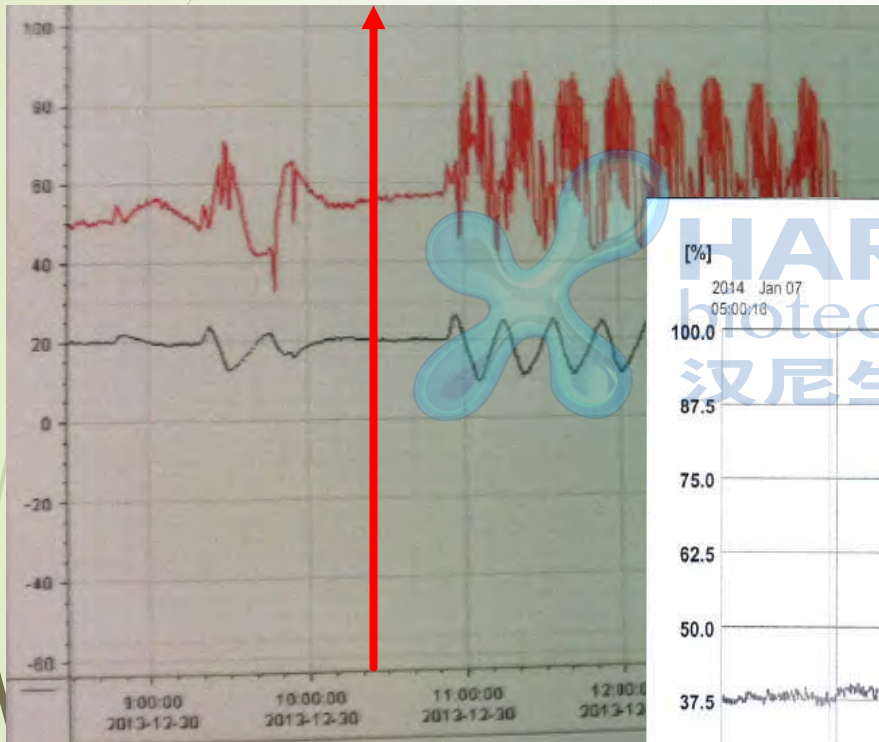
控温



可以看到：
相对应的a曲线，
初始阶段隔离器
内部温度较低，
长时间低温可能
会导致金属表面
温度过低，在双
氧水注入的时候，
空气中的VHP比
较容易凝结在金
属表面，导致空
气中的VHP浓度
偏低。

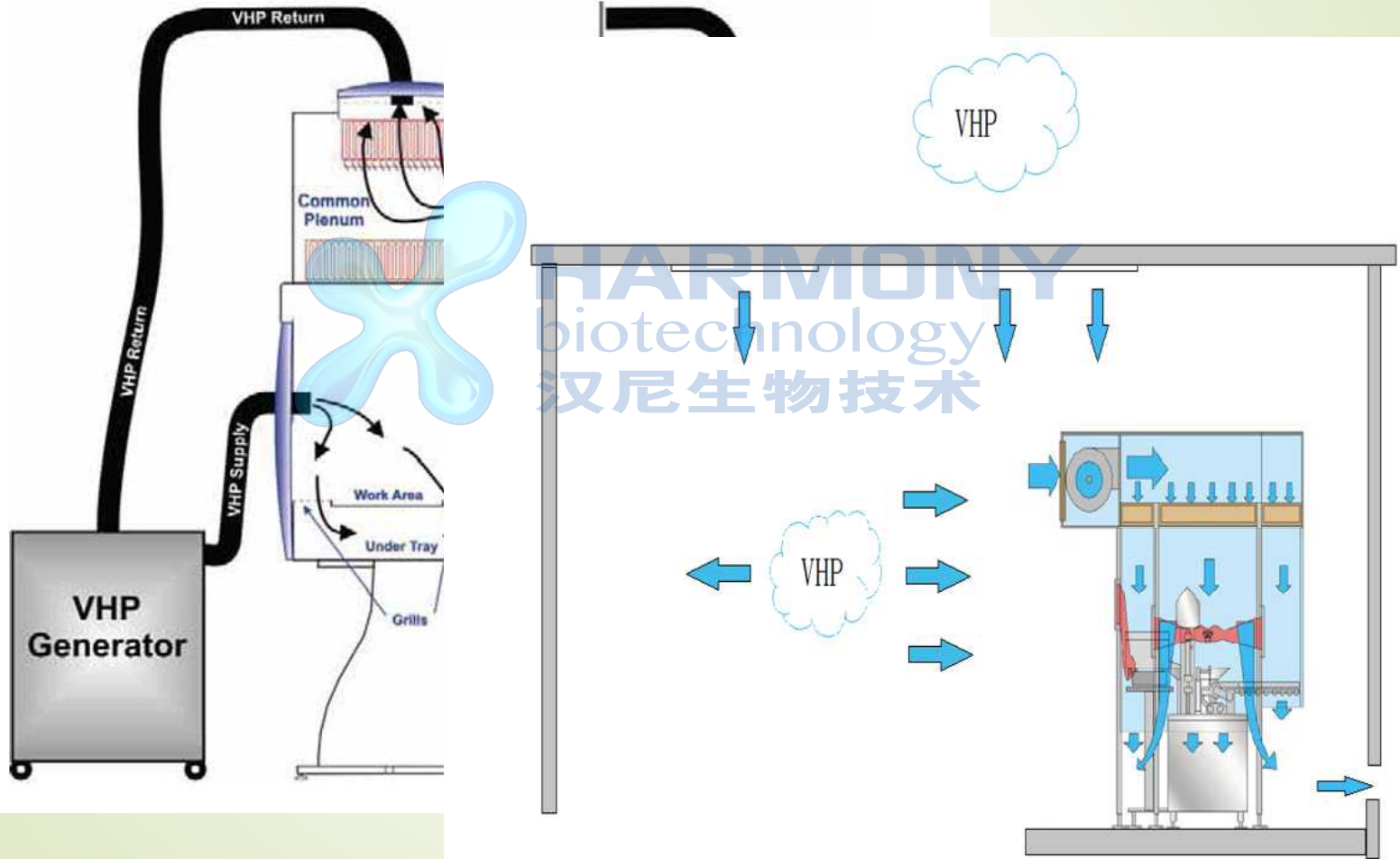
VHP灭菌程序验证失败的常见原因

控湿



VHP灭菌程序验证失败的常见原因

空间VHP的分布



VHP灭菌程序验证失败的常见原因



装载摆放的合理性和规范性
装载包装形式和规格

Halvorson–Ziegler 公式

$$\text{MPN} = \ln \left(\frac{n}{r} \right)$$

n:布置BI数;r:合格BI数

如:

(+ - -) n=3 r=2; $\text{MPN} = \ln(3/2) = 0.405$

(+ + -) then n=3 and r=1; $\text{MPN} = \ln(3/1) = 1.099$

$$\text{SLR} = \text{Log}_{10} \text{ BI Population} - \text{Log}_{10} \text{ MPN}$$

*

示例：

BI 含菌量 = 2.8×10^6 /条，每点布置3条BI

$\text{Log}_{10} 2.8 \times 10^6 = 6.447$

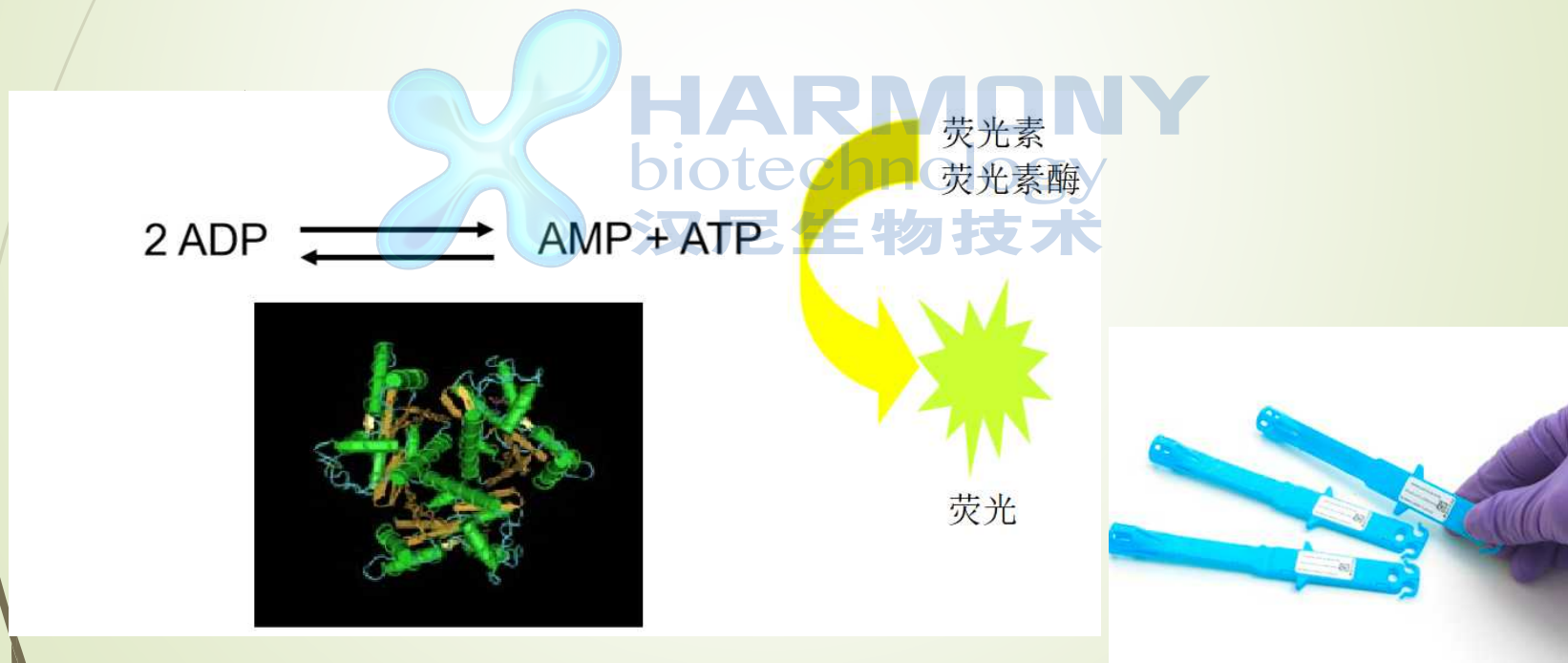
该点BI灭菌情况：(+ + -), MPN = 1.099

$\text{Log}_{10} 1.099 = 0.041$

则： $\text{SLR} = 6.447 - 0.041 = 6.406$

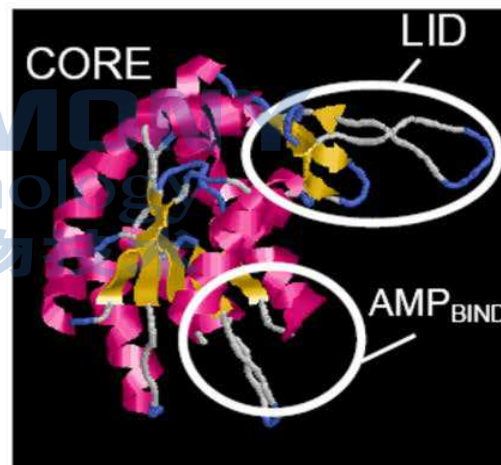
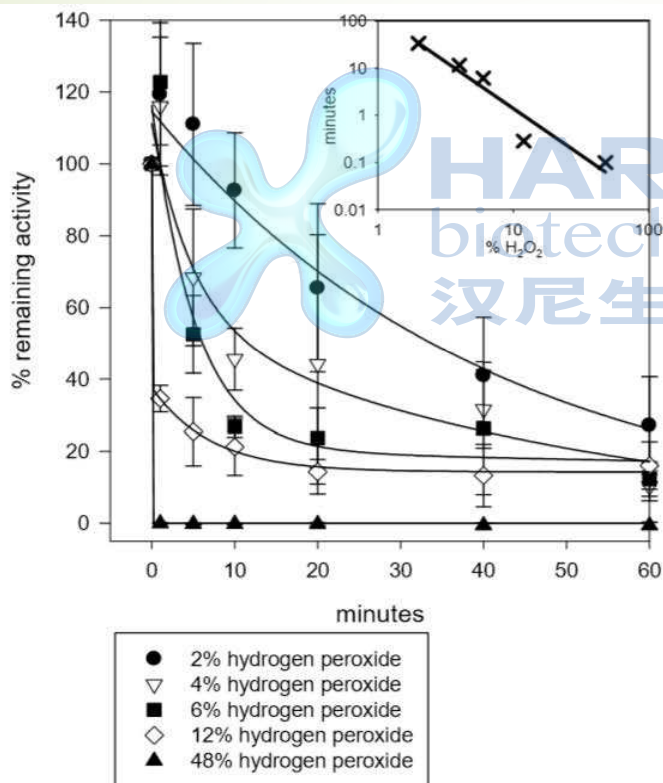
酶指示剂EI

酶指示剂EI (Enzyme Indicator)：使用耐热性的腺苷酸激酶tAK的指示剂。tAK酶指示剂使用荧光素/荧光素酶反应提供即时量化的结果。该酶催化产生光的反应,所产生的光的量直接与指示剂上剩余的tAK活性的量相比较,通过发光测定法进行快速定量测定。



酶指示剂

过氧化氢对tAK的杀灭与浓度和时间相关。当tAK作为BI的模拟替代使用时，可在2min内提供精确的杀灭能力定量数据（ $\log 2.5$ - $\log 9$ ），同时阴性对照和阳性对照均可提供，消除BI诡异的高D现象。



脆弱的VHP



HARMONY
biotechnology
汉尼生物技术

MHRA blog, PHSS的GMP澄清均不建议
将VHP用于直接和产品接触的部件灭菌上。

