

药品微生物检验替代方法验证指导原则

本指导原则的目的是为所采用的试验方法能否替代药典规定的方法用于药品微生物的检验提供指导。

随着微生物学的迅速发展，制药领域不断引入了一些新的微生物检验技术，大体可分为三类：(1)基于微生物生长信息的检验技术，如生物发光技术、电化学技术、比浊法等；(2)直接测定被测介质中的活微生物的检验技术，如固相细胞技术法、流式细胞计数法等；(3)基于微生物细胞所含有的特定组成成分的分析技术，如脂肪酸测定技术、核酸扩增技术、基因指纹分析技术等。这些方法与传统检查方法比较，或简便快速，或具有实时或近实时监控的潜力，使生产早期采取纠正措施及监控和指导优良生产成为可能，同时新技术的使用也促进了生产成本降低及检验水平的提高。

在控制药品微生物质量中，微生物试验室出于各种原因如成本、生产量、快速简便及提高药品质量等需要采用非药典规定的检验方法（即替代方法）时，应进行替代方法的验证，确认其应用效果优于或等同于药典的方法。

微生物检验的类型及验证参数

药品微生物检验方法主要分两种类型：定性试验和定量试验。定性试验就是测定样品中是否存在活的微生物，如无菌检查及控制菌检查。定量试验就是测定样品中存在的微生物数量，如菌落计数试验。

由于生物试验的特殊性，如微生物检验方法中的抽样误差、稀释误差、操作误差、培养误差和计数误差都会对检验结果造成影响，因此，药品质量标准分析方法验证指导原则（附录XIX）不完全适宜于微生物替代方法的验证。药品微生物检验替代方法的验证参数见表1。

表 1、 不同微生物检验类型验证参数表

参数	定性检验	定量检验
准确度	—	+
精密度	—	+

专属性	+	+
检测限	+	—
定量限	—	+
线性	—	+
范围	—	+
耐用性	+	+
重现性	+	+

注：+ 表示需要验证的参数

— 表示不需要验证的参数

尽管替代方法的验证参数与药品质量标准分析方法验证参数有相似之处，但是其具体的内容是依据微生物检验特点而设立的。替代方法验证的实验结果需进行统计分析，当替代方法属于定性检验时，一般采用非参数的统计技术；当替代方法属于定量检验时，需要采用参数统计技术。

进行微生物替代方法的验证时，若替代方法只是针对药典方法中的某一环节进行技术修改，此时，需要验证的对象仅是该项替代技术而不是整个检验方法。如无菌试验若改为使用含培养基的过滤器，然后通过适宜的技术确认活的微生物存在，那么，验证时仅需验证所用的微生物回收系统而不是整个无菌试验方法。

替代方法验证的一般要求

在开展替代方法对样品检验的适用性验证前，有必要对替代方法有一个全面的了解。首先，所选用的替代方法应具备必要的方法适用性证据，表明在不含样品的情况下，替代方法在不同类型的微生物检验中所具有的专属性、精密度和检测限等参数。这些证据或由替代方法的研发者提供，或由方法使用者完成。

使用者在基本确认替代方法的适用性后，应采用样品按表 1 规定的参数逐一进行验证，以确认替代方法可否用于该样品的检验。验证应至少使用 2 个批号的样品，每批样品应平行进行至少 3 次独立实验。

在开展各参数验证时，涉及的菌种除应包括微生物限度检查法（附录 XI J）和无菌检查法（附录 XI H）中培养基适用性检查规定的菌株外，还应根据替代方法及样品的特点增加相应的菌株。各菌种应分别进行验证。

样品中微生物定性检验方法的验证

1、专属性

微生物定性检验的专属性是指检测样品中可能存在的特定微生物种类的能力。当替代方法以微生物生长作为判断微生物是否存在时，其专属性验证时应确认所用培养基的促生长试验，还应考虑样品的存在对检验结果的影响。当替代方法不是以微生物生长作为判断指标时，其专属性验证应确认检测系统中的外来成分不得干扰试验而影响结果，如确认样品的存在不会对检验结果造成影响。采用替代方法进行控制菌的检验，还应选择与控制菌具有类似特性的菌株作为验证对象。

2、检测限

微生物定性检验的检测限是指在替代方法设定的检验条件下，样品中能被检出的微生物的最低数量。由于微生物所具有的特殊性质，检测限是指在稀释或培养之前初始样品所含有的微生物数量，而不是指检验过程中某一环节的供试液中所含有的微生物数量。例如，微生物限度检查中规定不得检出沙门菌，对检测限而言，是指每 10g 样品中能被检出的沙门菌的最低数量。

检测限确定的方法是在样品中接种较低浓度的试验菌(每单位不超过 5cfu)，然后分别采用药典方法和替代方法对该试验菌进行检验，以检出与否来比较两种方法的差异。试验菌的接种量须根据试验而定，以接种后采用药典方法 50% 的样品可检出该试验菌为宜。检测限验证至少应重复进行 5 次。对于同一种试验菌可采用卡方检验 (χ^2) 来评价两种方法的检测限是否存在差异。

3、重现性

微生物定性检验的重现性是指相同的样品在正常的实验条件（如实验地点、实验人员、仪器、试剂的批次等）发生变化时，所得检验结果的精密度。重现性可视为微生物检验方法在检验结果上抵抗操作和环境变化的能力。方法使用者应优先测定该验证参数。在样品中接种一定数量的试验菌（接种量应在检测限以上），采用药典方法和替代方法，分别由不同人员，在不同时间，使用不同的试剂（或仪器）进行检验，采用卡方检验 (χ^2) 来评价两种方法的重现性是否存在差异。验证过程中，应关注样品的一致性。

4、耐用性

微生物定性检验的耐用性是指当方法参数有小的刻意变化时，检验结果不受影响的能力，为方法正常使用时的可靠性提供依据。方法使用者应优先测定该验证参数。与药典方法比较，若替代方法检验条件较为苛刻，则应在方法中加以说明。替代方法与药典方法的耐用性比较不是必须的，但应单独对替代方法的耐用性进行评价，以便使用者了解方法的关键操作点。

样品中微生物定量检验方法的验证

微生物定量检验一般都涉及菌落计数。对计数结果进行数据处理时通常需要使用统计的方法。由于菌落计数服从泊松分布，因此采用泊松分布的统计方法对计数结果进行数据处理优于采用正态分布的统计方法。检验者往往习惯采用正态分布的统计方法，因此也可以通过对数转换或平方根加 1 的方法将原始数据转换为正态分布数据后再进行统计分析。两种统计方法都适用于微生物数据的统计分析。

1、准确度

微生物定量检验的准确度是指替代方法的检验结果与药典方法检验结果一致的程度。准确度的确认应在检测的范围内，通常用微生物的回收率（%）来表示。

检测范围内的准确度都应符合要求，准确度验证的方法是：制备试验菌的菌悬液，菌悬液的浓度应选择为能够准确计数的最高浓度，然后系列稀释至较低浓度（如小于 10cfu/ml）。例如，菌落计数平皿法的替代方法，在制备高浓度菌悬液时，其浓度可以是 10^3 cfu/ml，并系列稀释至 10^0 cfu/ml。每个试验菌应至少选择 5 个菌浓度进行准确度确认，替代方法的检验结果不得少于药典方法检验结果的 70%，也可以采用合适的统计学方法表明替代方法的回收率至少与药典方法一致。当替代方法的回收率高于药典方法时，有必要结合专属性项下的有关内容对准确度进行评价。

2、精密度

微生物定量检验的精密度是指在检验范围内，对同一个均匀样品多次重复取样测定，其检验结果的一致程度，通常采用标准偏差或相对标准偏差来表示，

也可以采用其他适宜的方式。

精密度验证的方法是：制备试验菌的菌悬液，菌悬液的浓度应选择为能够准确读数的最高浓度，然后系列稀释至较低浓度（如小于 10cfu/ml）。每个试验菌选择其中至少 5 个浓度的菌悬液进行检验。每一个浓度至少应进行 10 次重复检验，以便能够采用统计分析方法得到标准偏差或相对标准偏差。一般情况下，可以接受的相对标准偏差（RSD）应不大于 35%。不考虑特殊的检验结果，替代方法的相对标准偏差（RSD）应不大于药典方法。例如，药典菌落计数平皿法其可接受的相对标准偏差（RSD）与含菌浓度的关系见表 2。

表 2、 不同含菌浓度下预期的相对标准偏差

cfu/皿	预期 RSD
<10	<35%
10~30	<25%
30~300	<15%

3、专属性

微生物定量检验的专属性是指通过检测适宜的试验菌，以证明检验方法与其设定目的相适应的能力。例如，菌落计数平皿法其设定目的在于检出一定数量的微生物，则其专属性验证应证明当样品中存在一定数量的试验菌时，通过平皿法检验，能够检出试验菌，而样品的存在不会对结果造成影响。专属性验证时，应能够设计出可能使替代方法出现假阳性的实验模型来挑战替代方法，从而确认替代方法的适用性。当替代方法不依赖微生物生长出菌落或出现混浊就可以定量时（如不需要增菌或在 1~50cfu 范围内就可直接测定菌数的定量方法），以上验证方式就显得更为重要。

4、定量限

微生物定量检验的定量限是指样品中能被准确定量测定的微生物最低数量。由于无法得到含有已知微生物数量的实验样品，因此，在定量限验证时，应选择在检验范围内至少 5 个菌浓度，每个浓度重复取样测定不少于 5 次，替代方法的定量限不得大于药典方法。需要注意的是，由于细菌计数和菌落数服从泊松分布，可能存在计数结果的误差，因此替代方法的定量限仅需证实在相近的低限度下其灵敏度至少相当于药典方法。

定量限验证的方法是：在检验范围的低限制备 5 份不同含菌浓度的菌悬液，每份菌悬液分别用药典方法和替代方法进行不少于 5 次检验，采用统计方法比较替代方法的检验结果与药典方法结果的差异，从而评价替代方法的定量限。

5、线性

微生物定量检验的线性是指在一定范围内，检验结果与样品中微生物数量成比例关系的程度。线性验证时必须覆盖能够准确测定的所有浓度范围。每株试验菌应选择至少 5 个浓度，每个浓度至少测定 5 次。根据以上实验数据，以检验结果为因变量，以样品中微生物的预期数量为自变量进行线性回归分析，计算相关系数 r^2 。当相关系数不能准确评估线性时，只能确定简单大约的关系值。替代方法的相关系数不得低于 0.95。

6、范围

微生物定量检验的范围是指能够达到一定的准确度、精密度和线性，检验方法适用的高低限浓度或数量的区间。

7、重现性

微生物定量检验的重现性是指相同的样品在正常的实验条件（如实验地点、实验人员、仪器、试剂的批次等）发生变化时，所得检验结果的精密度。重现性可视为微生物检验方法在检验结果上抵抗操作和环境变化的能力。方法使用者应优先测定该验证参数。在样品中接种一定数量的试验菌（接种量应在定量限以上），采用药典方法和替代方法，分别由不同人员，在不同时间，使用不同的试剂（或仪器）进行检验，对检验结果进行统计分析，以相对标准偏差（RSD）来评价两种方法的重现性差异。验证过程中，应关注样品的一致性。

8、耐用性

微生物定量检验的耐用性是指当方法参数有小的刻意变化时，检验结果不受影响的能力，为方法正常使用时的可靠性提供依据。方法使用者应优先测定该验证参数。与药典方法比较，若替代方法检验条件较为苛刻，则应在方法中加以说明。替代方法与药典方法的耐用性比较不是必须的，但应单独对替代方法的耐用性进行评价，以便使用者了解方法的关键操作点。