

# 微生物学检查方法验证与评价要求

宁黎丽, 成海平, 魏农农

国家食品药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100038

**摘 要** 本文系统阐述了微生物限度和无菌检查法验证的内容和技术评价要求, 目的是规范微生物限度和无菌检查方法验证工作, 供注册申请人在进行微生物限度和无菌检查研究时参考。微生物限度和无菌检查的评价要求, 可用于具体的审评工作。

**关键词** 微生物学检查; 方法验证; 评价要求

**中图分类号:** R927.33      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674-6376 (2009) 01-0006-04

## 1 概述

本文中的微生物学检查方法包括微生物限度检查法和无菌检查法。微生物限度检查法系检查非规定灭菌制剂及其原料药、辅料受微生物污染程度的方法, 包括细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查。无菌检查法系用于检查药典要求的无菌药品、原料药、辅料等是否无菌的方法; 若检查结果符合规定, 表明在该检验条件下未发现微生物污染。

《中国药典》2000年版及以前的版本虽然收录了微生物限度检查法和无菌检查法, 但在如何保证检验方法的科学性及检验结果的准确性方面存在一些问题, 与国外药典的相关要求比较有一定差距, 关键是未明确对检验方法进行必要的方法学验证。以前品种的申报资料中一般仅提供微生物限度检查或无菌检查的检查结果, 无方法学验证内容。但从保证药品安全性的实际出发, 不同品种需要选择建立各自适当的检查方法, 即使是仿制药。由于不同生产企业采用的工艺、辅料等的不同, 其产品可能表现出不同的抑菌特性, 进行微生物限度检查或无菌检查时, 具体的检查方法也不能简单地照搬, 需要通过试验验证核实已有的试验方法和检测系统是否适用, 因此, 也需要进行必要的方法验证。

《中国药典》2005年版对微生物限度检查法

和无菌检查法进行了修订完善, 明确规定进行药品微生物限度检查或无菌检查时应进行方法验证, 目的是确认试验中应选择药典收载的何种供试液制备方法、何种测定方法, 以及验证确定的检测系统是否适用于该药品的检验。如果供试品有抑菌性, 影响测定结果, 则应采用适当的方法消除供试液的抑菌活性后再进行检查。也就是说, 只有通过方法验证, 才能确定针对具体品种的具体的检验方法, 保证采用的方法的科学性和检验结果的准确性。

## 2 方法验证的思路

首先了解供试品是否有抑菌性、抑何种菌, 再考虑选择适当的方法消除或降低供试品的抑菌性, 然后用试验验证所采用的方法已经消除了其抑菌性(能使人工加入的各种试验菌生长良好), 特别是能满足对产品最敏感菌的生长; 最后将所作的试验记录在案, 形成确认该供试品在该检验量及该检验条件下, 已充分消除抑菌性, 能确保试验结果准确可靠的验证报告。

微生物限度和无菌检查方法验证试验可概括描述为在采用的检验方法和过程中, 通过分别加入规定量的代表性微生物, 以验证供试品是否在规定的检验量、在所采用的检验条件下无抑菌性, 或已充分消除了抑菌性(供试品本身的以及操作系统中

收稿日期: 2009-04-21

作者简介: 宁黎丽(1972-), 女, 理学博士, 副主任药师。主要从事药品审评工作。E-mail: ningli@cde.org.cn

可能对微生物生长有影响的各种因素), 并且所用方法对微生物生长无不良影响, 从而确认检验方法的有效性, 保证检验结果的准确可靠。整个试验过程中的每一个环节均应有合理的证明, 保证其对结果的判断没有影响。

### 3 方法验证的重点

3.1 验证制成适宜供试液的前处理方法, 证明方法对微生物生长、检出无影响。

3.2 验证样品有无抑菌性、抑什么菌、最敏感的菌是那一个, 其结果将直接影响后续检验方法的选择和操作步骤的进行, 同时是最终所选检验方法和操作步骤合理性的证明。

3.3 验证消除样品抑菌性的方法, 证明方法的有效性 & 方法对污染菌生长无影响; 如何选择合理、适宜、简单有效的消除抑菌性的方法是当前验证工作的关键。

## 4 方法验证的步骤与内容

### 4.1 制备验证试验用菌液

按《中国药典》2005 年版无菌检查法中培养基灵敏度检查项中试验用菌液的制备方法将规定需用的试验菌分别制成含菌 10 ~ 100 个/mL (CFU) 的供试菌液。

### 4.2 样品的前处理方法

样品的前处理方法是验证试验的一部分, 需证明所用的处理方法对各试验菌的生长无影响。根据供试品的性状, 选用以下适宜的方法, 或几种方法联合使用。

溶解: 验证所用溶液、助溶剂和水浴助溶温度对微生物的生长无影响。

乳化: 验证所用乳化剂和水浴助溶温度的有效性、使用量及对微生物的生长无影响。

破乳: 验证所用破乳剂的有效性、使用量及对微生物的生长无影响。

萃取: 验证有机相选择的合理性、有效性及对微生物的生长无影响。

稀释: 验证降低供试品相对抑菌浓度的有效稀

释倍数。

离心: 验证所用转速、时间和微生物的分布情况。

应说明采取某种前处理方法的原因, 如样品不需要特别的前处理就能制成均匀的供试液, 这一步可以省掉, 直接进入确定样品有无抑菌性的步骤。

### 4.3 确定供试品是否有抑菌性、抑什么菌

通过文献资料或申报资料中的药效学资料, 了解其对不同细菌的 MIC, 参考已经验证过的品种, 抗菌药物可根据抗菌谱确定敏感菌, 中成药抗菌谱不清楚, 至少需选择一株细菌和一株真菌来试验, 也可以直接通过验证试验确定抑菌性。

试验确定抑菌性的方法: 在规定的供试液中加入试验用微生物 10 ~ 100 个, 如微生物生长良好, 说明供试品对该种微生物无抑菌活性。如已用药典规定的各试验菌进行了试验, 结果均能生长良好, 说明供试品无抑菌性, 可用常规方法检验。如加入的微生物不生长或生长缓慢, 说明供试品有抑菌性; 如加入的微生物中有某一种菌最不能生长或生长最缓慢, 这一种菌就是该样品的敏感菌。

### 4.4 选择适当的方法消除或有效降低供试品的抑菌性

根据供试品的特性选择药典规定的消除其抑菌性的方法 (一种或几种方法联合), 或根据药物的化学特性, 寻找出其他合理、有效的方法, 特别是有效的中和剂; 并通过模拟试验 (验证试验) 对消除或降低抑菌性的效果进行检验。

无菌检查可采用: ①薄膜过滤法; ②中和法 (《中国药典》2005 年版仅收载  $\beta$ -内酰胺酶处理法)。薄膜过滤法适用于液体供试品和可溶于水的固体供试品 (只要许可, 应首先采用)。验证的重点是确定滤膜的适用性、确定冲洗的方法和冲洗液的用量。中和法适用于能充分被其灭活抑菌活性的样品 (如  $\beta$ -内酰胺酶灭活  $\beta$ -内酰胺类、对氨基苯甲酸灭活磺胺类)。验证的重点是确定中和剂有效、证明对污染微生物的生长无毒性, 以及加入的方法和加入量。

检验供试品是否已消除或降低抑菌性的验证

试验：每种试验菌为一组，每组两管，其中一管为供试品加试验菌管，另一管为试验菌对照管。结果判断：如平行 3 次独立试验，各管微生物均生长良好，说明供试品已消除了抑菌活性；可以进行该品的无菌检查。如有供试品管的微生物生长微弱、缓慢或不生长，说明供试品仍有抑菌性；应考虑进一步增加冲洗量或中和剂的用量，以消除抑菌性，并重新进行验证，直至验证证明已充分消除或有效降低供试品的抑菌性为止。

微生物限度检查可采用：①培养基稀释法；②离心沉淀法；③薄膜过滤法；④中和法。①培养基稀释法：取规定量的供试品/供试液加至较大的培养基中，使单位体积内的供试品浓度降低至不显抑菌作用。该方法适用于不能采用薄膜过滤法且抑菌活性较弱的样品。验证的重点是确定培养基量增加至多少才能使供试品/供试液不显抑菌活性。②离心沉淀法：利用沉降系数差异分离去掉药渣、含抑菌活性的部分，留下含微生物的部分。该方法适用于不能采用薄膜过滤等方法的样品。验证的重点是确定能将药渣、抑菌部分分离掉而留下微生物的有效的离心率。③薄膜过滤法：同无菌检查法，常可与离心沉淀法联合使用。④中和法：同无菌检查法。

实践证明几种方法联合使用效果更好。薄膜过滤法和中和法是最有效的消除抑菌性的方法。但是应对样品采取某种消除抑菌性的方法的原因进行说明。

由于微生物限度检查由菌数计数和控制菌检查两部分组成，所以，在检验是否已消除或有效降低抑菌性的试验中也应分别进行验证。

微生物限度检查中的菌数计数属定量试验。验证试验是通过对加入的各种规定微生物的回收率试验进行。验证中可以仅选用已确定的敏感菌，这样可减少工作量，因为能满足敏感菌生长的条件必然能满足其他菌的生长。也可以完全按照《中国药典》2005 年版规定，逐一进行每种试验菌的验证：对每种试验菌均建立（1）试验组（供试液加菌液组），菌数计数测得 CFU1；（2）菌液组，菌数计数测得 CFU2；（3）供试液本身对照组，菌数计数测

得 CFU3；（4）稀释剂对照组，菌数计数测得 CFU4。验证试验和对验证结果的判断：应符合  $CFU4/CFU2 \geq 70\%$ 、 $(CFU1 - CFU3)/CFU2 \geq 70\%$ 。如两个回收率均  $\geq 70\%$ ，则说明所用方法已消除了供试品的抑菌性；可以按该方法进行该品种的菌数计数检查。如回收率小于 70%，则说明供试品仍有抑菌性，应进一步考虑采取适宜的措施以消除其抑菌性，并重新进行验证，直至验证的回收率均  $\geq 70\%$ ，证明已充分消除或有效降低供试品的抑菌性为止。

微生物限度检查中的控制菌检查属定性试验。验证试验应同时设置：（1）目标菌阳性对照管；（2）供试品加目标菌管；（3）阴性对照管；（4）非目标菌对照管。验证试验和对验证结果的判断：（1）目标菌阳性对照管菌必须生长良好；（2）供试品加目标菌管生长良好；（3）阴性对照管必须无菌生长；（4）阴性菌对照必须无菌生长。上述试验成立，则说明所用方法已消除或充分减低了供试品的抑菌性，可以按该方法进行该品种的控制菌检查。如出现（2）供试品加目标菌管生长缓慢、或不生长，则说明供试品仍有抑菌性，应进一步考虑采取适宜的措施以消除其抑菌性，并进行重新验证，直至验证结果中（2）供试品加目标菌管与（1）目标菌阳性对照管相同，证明已充分消除或有效降低供试品的抑菌性为止。如出现（3）阴性对照管有菌生长；（4）阴性菌对照管有菌生长；则说明试验不成立，所用方法不专属，应寻找原因并重新进行验证试验。

## 5 方法验证中应注意的问题与评价要求

### 5.1 验证试验的完整性

验证试验的完整性与方法的科学性密切相关，验证工作不完整，就不能全面体现供试品和试验过程对微生物的影响情况，则很可能影响或干扰对最终试验结果的判断。故应按照《中国药典》2005 年版的要求进行方法验证。特别是对某些具有抑菌性的供试品，需采取适当的方法消除或有效降低供试品的抑菌性。在对供试品进行特殊处理时，既要考察供试品的抑菌性，还要考察在供试液制备过程中微生物受影响的程度（稀释剂对照组）。

所致的 $t_k$ 基因突变。也有些证据表明小鼠淋巴瘤试验也可检测染色体丢失。

其他一些体内试验可用于标准组合,或作为追加试验以提高评价体外或体内试验结果的证据的份量(见下)。在合适的体内试验(通常是两个)的阴性结果,其检测终点被认为是足够合理和证实有暴露(见指导原则4.8节),足以证明缺乏遗传毒性作用。

## 2 标准试验组合的两种选择

以下标准试验组合的两种选择被认为是同等适合的:

### 选择一

(1) 一项细菌基因突变试验;

(2) 一项染色体损伤的细胞遗传学试验(体外中期相染色体畸变试验或体外微核试验),或一项体外小鼠淋巴瘤 $t_k$ 基因突变试验;

(3) 一项体内遗传毒性试验,通常为采用啮齿类造血细胞进行的染色体损伤试验,无论对于微核还是中期相的染色体异常。

### 选择二

(1) 一项体外细菌基因突变试验;

(2) 用两种组织进行的遗传毒性体内评估试验,通常是一项啮齿类造血细胞的微核试验及第二项体内试验。

在两种标准试验组合选择中,当剂量足够时,体内遗传毒性试验常结合在重复给药毒性试验中(见指导原则4.7节)。在选择2中,如果剂量/暴露不合适,应进行一项急性的体内研究(当可能时将两个遗传毒性试验合并在一个研究中)以优化基于暴露/毒性的剂量选择(见指导原则4.7.2和4.7.3节),或者选择1中应接着进行一项体外哺乳动物细胞试验。

对于试验结果为阴性的化合物,根据当前建议实施和评价,完成了任一试验组合通常可提供缺乏遗传毒性作用的充足证明,不再需要进行其他的试验。标准试验组合结果为阳性的化合物,根据他们的治疗用途,可能需进行更多的试验(见指导原则第5节)。

标准试验组合不包括为检测非整倍体而设计

的特定试验。但是,从体外哺乳动物细胞试验和微核试验中可得到数目方面改变的信息,标准方案中能提供这些信息的因素是有丝分裂指数升高、多倍体产生和微核增加。也有实验证据表明小鼠淋巴瘤 $t_k$ 试验中可检测到纺锤体损害。在选择2中体内遗传毒性试验首选微核试验,而不是染色体畸变试验,因其具有更强的检测染色体丢失(可能导致非整倍体)的能力。

一些体内试验可用于在选择2中体内试验评价的第二部分(见指导原则4.3节)。由于有暴露和代谢能力,肝脏是首选的组织,但是体内组织的选择和试验应基于多因素,诸如潜在代谢、体内代谢、被认为是相关组织的暴露等信息。当剂量被认为是合理时(见指导原则4.7节)和方案可一致时,体内遗传毒性试验可以结合在已有的(重复给药)毒性试验中。

建议采用标准试验组合并不意味着其他遗传毒性试验不合适。其他试验可用作进一步研究标准试验组合得到的遗传毒性试验结果(见指导原则4.3节和指导原则5节)。若需要或被充分验证有效时,替代的种属(包括非啮齿类)也可应用。

在极端的情况下,标准组合中的一个或更多试验可能由于技术原因而无法实施,在给出的标准组合试合不适合时,替代的确证试验可用作代替,为支持论点提供充分的科学的证明。

## 3 标准组合的调整

### 3.1 预期有遗传毒性的经典类型的化合物

对预期有遗传毒性的经典类型的化合物,如一些对苯二酚类抗生素、一些核苷类似物,标准组合可调整,以在已知对这些有反应的试验/方案中进行适当的证明。

### 3.2 对细菌有毒性的受试物

当化合物(如某些抗生素)对细胞有高毒性时,细菌回复突变(Ames)试验仍应进行,因在致突变性可发生于更低的、较小毒性的浓度。在这种情况下,应进行任何一个体外哺乳动物细胞试验,即应采用选择1。

### 3.3 具有遗传毒性可疑结构的化合物

标准试验组合通常可检出有可疑结构的化合

物, 因为大部分“可疑结构”被定义与细菌诱变性有关。已知少数化学类别在哺乳动物细胞染色体损伤试验中比在细菌突变试验中更易检测到。因此, 具有可疑结构的化合物在任一种试验组合结果为阴性时, 通常已足以证明缺乏遗传毒性。但是, 对于具有某些特定可疑结构的化合物, 调整标准组合方案是合适的。附加试验的选择或方案的调整取决于这些结构可疑化合物的化学性质、已知反应性和任何代谢资料。

### 3.4 使用体内试验的局限性

对有些化合物, 众多体内试验(尤其是骨髓、血、肝脏)不能提供足够有用的信息。这些化合物包括毒代或药代动力学研究表明其不被全身吸收、

因此无法在靶组织获得者, 如放射影像剂、抗酸铝合剂、一些吸入用药和一些皮肤或其他局部用药。在改变给药途径也不能提供足够的靶组织暴露, 以及对大部分暴露组织无法获得合适的遗传毒性试验的情况下, 仅根据体外试验进行评价可能是合适的。在某些情况下, 在接触部位评价遗传毒性作用可能也是合理的, 虽然这些试验还未被广泛应用。

### 4 生殖细胞诱变剂的检测

比较研究结果表明, 从质的意义上说, 大多数生殖细胞诱变剂同样能在体细胞试验中检出, 因此体内体细胞遗传毒性试验的阴性结果通常提示对生殖细胞也无影响。

---

(上接第 5 页)

influenza virus real-time RT-PCR detection panel [EB/OL].  
(2009-04-27)[2009-04-27].

[9] FDA, Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act) [EB/OL]. (2004-12-31) [2009-04-27]. <http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/FederalFoodDrugandCosmeticActFDCA/default.htm>

[10] FDA, Tamiflu® Fact sheet for health care providers, (09-04-27) [09-04-27]. [www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/UCM143874.pdf](http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DrugSafety/InformationbyDrugClass/UCM143874.pdf)

[11] FDA, Relenza® Fact sheet for health care providers

[EB/OL].(09-04-27)[09-04-27]. <http://www.fda.gov/cder/drug/antivirals/influenza/default.htm>

[12] FDA, Tamiflu® Fact sheet for patients and parents [EB/OL].(09-04-27)[09-04-27].<http://www.fda.gov/downloads/drugs/drugsafety/informationbydrugclass/ucm143876.pdf>

[13] FDA, Zanamivir summary fact sheet for patients and parents[EB/OL].(09-04-27)[09-04-27].<http://www.fda.gov/DrugSafety/InformationbyDrugClass/UCM143860.pdf>