药品微生物检测实验室质量管理的要点分析

叶笑, 颜若曦*

国家药品监督管理局 食品药品审核查验中心, 北京 100076

摘要: 药品微生物检测实验室是药品生产企业质量控制的核心内容之一, 其质量管理存在较大特殊性, 因此从人员、设备、检测相关物料、检测方法、设施环境、检测数据方面对药品微生物检测实验室质量管理的要点、典型性缺陷举例分析, 为药品生产企业、药品检测机构提供参考借鉴。

关键词: 药品微生物检测实验室; 质量管理; 人员; 设备; 检测相关物料; 检测方法; 设施环境; 检测数据

中图分类号: R951 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2024)06-1620-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2024.06.041

Analysis of key points of quality management in drug microbiological testing laboratory

YE Xiao, YAN Ruoxi

Center for Food and Drug Inspection of NMPA, Beijing 100076, China

Abstract: Drug microbiological testing laboratory is one of the core contents of quality control in drug manufacturing enterprises, and its quality management has significant specificity. This article analyzes the key points and typical deficiencies cases of quality management in drug microbiological testing laboratories from the aspects of personnel, equipment, testing related materials, testing methods, facility and environment, and testing data, providing reference for pharmaceutical production enterprises and testing institutions.

Key words: drug microbiological testing laboratory; quality management; personnel; equipment; testing related material; testing method; facility and environment; testing data

药品生产质量管理规范(GMP)旨在最大限度地降低药品生产过程中污染、交叉污染和混淆、差错等风险, 其中污染是药品质量的最大威胁, 污染控制是药品生产质量管理的重要内容^[1], 特别是微生物污染更是无菌药品污染控制的核心。在药品微生物污染控制策略中, 药品微生物检测是确保药品质量和安全的关键环节之一, 通过对物料、中间产品和成品微生物(包括细菌、酵母菌和霉菌等)的检测能够及早发现并排除潜在的质量问题, 进一步降低药品质量风险。药品微生物实验室检测的项目除无菌和微生物限度(包括微生物计数、控制菌检查)外, 一些实验室同时还承担生产车间微生物环

境监测的培养和计数, 以及细菌内毒素检测等相关项目。良好的微生物检测实验室质量管理对及时发现并报告送检样品的微生物污染情况、保证检测结果的准确性有重要的作用。

与常规的质量控制实验室相比, 药品微生物检测实验室的质量管理存在较大特殊性, 国内外多个药品监管相关机构、相关组织都制定了针对性的指南或指导原则, 如《中国药典》2020年版四部9203药品微生物室质量管理指导原则、世界卫生组织药品行业微生物实验室良好管理规范^[2]、美国食品药品监督管理局药品质量控制微生物实验室检查指南^[3]、PIC/S 无菌检测建议^[4]等。按照质量管理基本理念,

收稿日期: 2024-02-27

作者简介: 叶笑(1986—), 女, 主管药师, 硕士, 从事药品注册监管与检查研究。E-mail: yex@cfdi.org.cn

*通信作者: 颜若曦(1983—), 男, 主任药师, 硕士, 从事药品质量管理、药品检查研究。E-mail: sssyrx@163.com

结合 GMP 基本原则, 上述药品微生物检测实验室的指南或指导原则实质上也是从微生物检测的特点出发, 围绕人员、设备、检测物料、检测方法、设施环境、数据记录、生物安全等方面进行了进一步的规定。通过对近年来国内外药品监管或检查机构(包括国家药品监督管理局、世界卫生组织、美国食品药品监督管理局、欧洲药品管理局等)检查发现缺陷的分析和收集, 从上述几方面对其中涉及药品微生物检测实验室的近 100 条缺陷进行分类统计发现: 在药品微生物检测实验室的各类缺陷中, 最突出的问题集中在设施环境方面(占比 27%), 其次是检测相关物料(包括检测样品、培养基、缓冲液、菌种等, 占比 24%), 再次是检测方法(占比 15%), 排第 4 位的是数据和记录方面的问题(占比 9%), 排第 5 位是检测设备方面的问题(占比 8%), 人员方面的问题占比为 4%。因此本文从人员、设备、检测相关物料、检测方法、设施环境、检测数据等方面对药品微生物检测实验室质量管理的要点、典型性缺陷举例分析, 为药品生产企业、药品检测机构提供参考借鉴。

1 微生物检测实验室人员

检测人员是保证微生物检测结果准确可靠的核心要素, 必须具有与检测相适宜的资质和经验。从事微生物检测的人员需要经过适当的培训并经考核合格后才允许上岗, 培训内容通常包括 GMP 和微生物基础知识、无菌和微生物限度检查法(包括方法适用性试验)、微生物鉴定方法、培养基制备和质量控制、菌种复苏传代和保藏、菌落计数、环境监测、无菌更衣和无菌操作、设施设备的清洁和消毒、异常情况处理、微生物安全等方面的内容。

检查参考缺陷: 微生物实验室检测人员按实验室主管要求篡改车间洁净区环境监测不合格数据^[5]; 检验员不熟悉微生物检测洁净室的更衣流程; 微生物检测实验室清洁程序描述不详细, 导致人员未能受到很好的培训; 现场检查期间发现检测人员躺在实验室洁净区地面上进行培养皿贴标签操作; 无菌检测人员不清楚培养结束后硫乙醇酸盐流体培养基氧化层不得超过 1/2 的要求。

2 微生物检测实验室设备

药品微生物检测实验室的设备应同检验操作的性质和规模相适应, 具有适当量程和精度, 定期进行清洁、消毒和维护。常见药品微生物检测设备主要包括: 洁净环境控制设备(如超净工作台、生

物安全柜、无菌隔离系统)、环境温度湿度条件控制设备(如培养箱、冰箱、恒温水浴锅、恒温金属浴)、检测操作型设备(如微生物计数仪、生物显微镜、天平、微生物鉴定设备)、辅助功能设备(如湿热灭菌器、干热灭菌柜、酸度计、旋涡混合器、离心机)和容积计量器具(包括一次性容积计量器具、移液枪)等。通常可以按照《美国药典》(USP43) 1058 章分析仪器的确认分为 3 类开展对应的确认(即准备型、测量型和分析型), 核心是根据设备预期用途基于风险进行分类管理, 保证对应检测设备能满足其预期功能。对于洁净环境控制设备, 重点是设备能保证适宜的洁净级别, 避免对检测结果造成影响, 特别是设备确认、环境监测、使用前后的清洁和消毒。其中对无菌检测隔离系统的特殊性要求可参照《美国药典》(USP43) 1208 章、《中国药典》2020 年版四部 9206 章的有关规定, 如一般无风速和换气次数的要求、气流流行可以是湍流、舱体完整性测试与操作时的正压监测、灭菌剂浓度与分布确认、灭菌验证(空载、适宜装载方式下 3 个循环保证 6 个对数单位的灭菌效力)、包装完整性确认(包括样品、培养基)、手套完整性监测等。对于环境温度湿度等条件控制设备, 重点是设备温度湿度分布的确认、持续监测和异常情况处理、清洁和消毒。对于检测操作型设备, 重点是确认其与实际操作的适宜性, 如天平的校准(包括砝码)、生物显微镜的拍照功能和数据储存等。对于微生物检测实验室常见的 5 种辅助功能设备, 湿热灭菌器、干热灭菌柜的关注重点与生产车间基本一致, 主要包括设备确认的充分性和有效性、与实际灭菌操作的一致性, 使用和维护中对灭菌物品装载方式、灭菌关键参数监测、灭菌效果监测项目和频次等^[6], 同时注意关注针对带菌物品灭菌用设备避免污染和交叉污染措施的充分性; 酸度计主要用于缓冲液、培养基 pH 值的测定, 重点关注校验情况和针对琼脂培养基的适用性; 旋涡混合器主要用于洁净环境下的菌悬液、样品溶液的制备, 注意是否存在潜在的污染和交叉污染风险; 离心机常用于样品溶液的制备, 注意离心转速的校准、是否存在潜在的污染、交叉污染风险。对于容积计量器具重点是校准, 其中对于一次性容量器具应基于供应商管理进行适宜的抽样确认。

检查参考缺陷: 用于保存微生物检测样品和检测菌种的冰箱均未安装温度报警系统, 仅每月进行

1 次人工记录；培养基灭菌用湿热灭菌柜验证的装载模式描述不清晰，无法保证与设备确认的一致性，设备确认中未描述生物指示剂放置的具体位置；现场在确认有效期内的生物安全柜工作异常，不能显示准确压差；滴定管缺少每年或周期的委托外部校准，仅每 3 个月进行 1 个内部校准。

3 药品微生物检测相关物料

检测相关物料是指包括检测样品、培养基、菌种（菌悬液）、缓冲液、试剂在内的物料，其管理要点集中于质量、数量，同时注意做好标识管理。质量主要指检测相关物料符合其预期用途，如检测样品的包装完整，且其储存条件、储存时间对微生物无显著影响；培养基的配制规范、灭菌、贮藏符合规定要求，且进行了必要的验证、质量控制项目（如 pH 值、适用性试验或灵敏度检查试验、无菌等）符合要求；检测菌种（菌悬液）来源可靠、贮藏条件和贮藏时间对菌种、活菌数均无不良影响、复苏和培养符合要求、代次不超过 5 代、无污染、活菌数满足使用要求；缓冲液的配制、灭菌、贮藏符合要求，且进行了必要的验证、质量控制项目（如 pH 值、无菌等）均符合要求；试剂应建立接收、检查、贮藏程序，并进行必要的验证（如必要的鉴别）确保符合检测要求。数量主要指检测相关物料的接收入库量、使用量、剩余量、销毁量可追溯，且与实际一致。

检查参考缺陷：纯化水微生物检测程序没有规定在收到样品后到检测的时间限制，未规定如果不立即进行测试时纯化水样品的储存条件；微生物检验用的培养基未做促生长实验或仅对每批培养基干粉进行试验，难以保证检测的可靠性；环境监测培养皿培养后发现干裂；检测用金黄色葡萄球菌与无菌检测用培养基贮藏于同一冷藏柜中；0.1%蛋白胨溶液与 pH 7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲溶液采用相同的批号。

4 微生物检测方法

药品微生物检测方法需要基于药品的特性选择适宜的检查方法，对于药典规定的方法需要进行适用性确认，如无菌检测、控制菌检测中的薄膜过滤法、直接接种法，微生物计数检测中的平皿法、薄膜过滤法、最可能数（MPN）法等，对于其他非法定收载的方法应进行替代方法验证（包括过程控制中的快速微生物检测方法）。需要注意关注不同微生物检测项目的一些特殊性规定和要求，如无菌

检测中，当产品产生悬浮、絮凝或沉积在培养基中时，应在 14 d 后将容器内的适当份量（如 2%~5%，不少于 1 mL）转移至新鲜培养基中，并在无菌室条件下再培养 7 d^[4]；无菌试验检测不合格只有在符合特定条件下（如阴性对照中有菌生长等）才能认可试验无效，且重新检测的样品应能反映出原始样品一致的取样位置或无菌生产时间；无菌检测中薄膜过滤法需要确保提前进行润湿，且在冲洗期间避免出现干燥；在供试品接种前，硫乙醇酸盐流体培养基氧化层的高度不得超过培养基深度的 1/3，培养结束后不超过 1/2；阳性对照微生物的选择与合理加入时间；微生物计数中，同一个稀释级两个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上（当平均值 ≥ 15 CFU 时），薄膜过滤法每张滤膜上的菌落数应不超过 100 CFU 等。对于部分还负责进行细菌内毒素检测等项目的药品微生物检测实验室质量管理的基本要点与原则是一致的，需要关注的是与检测相关的特殊性规定，如细菌内毒素凝胶法中的鲎试剂灵敏度复核试验与干扰试验、光浊度法中标准曲线的可靠性试验与干扰试验等。

检查参考缺陷：不当的检测操作，如现场检查发现部分正在培养中的硫乙醇酸盐流体培养基氧化层已超过 1/2；纯化水检测结果基于 5 mL 样品量无法保证微生物含量较高时的准确计数。不适宜的培养条件，如环境监测平皿仅在 30~35 °C 培养缺少更适用于真菌生长的条件。不合适的培养基，如纯化水微生物检测的培养基未使用 R2A 琼脂培养基或仅使用 R2A 琼脂培养基、现场发现多个平皿中 R2A 琼脂培养基加入量大约只有 5 mL，且与企业程序规定的 15~25 mL 不一致。

5 微生物检测实验室设施环境

设施环境需要适合相应检测项目的开展，并能有效避免各项活动中的混淆、污染和交叉污染，设计并建立适宜的分区和洁净环境，并开展相应监测，确保有效的清洁消毒和维护。无菌检测需要在无菌隔离系统或 B 级背景下的 A 级环境下操作，微生物限度检测通常建议在 D 级背景下的层流工作台或生物安全柜（A 级）内操作。对于微生物检测实验室洁净环境的要求基本与生产车间一致，主要包括合理的设计和维护、充分的洁净环境确认、适宜的环境监测（涉及程序规定、监测计划和监测实施）和有效的清洁、消毒等方面^[5]，对于带菌操作同时需要关注对人员、环境的防护。

微生物检测实验室设施环境检查发现的问题主要集中在设施设计、设施维护和环境监测 3 个方面, 检查参考缺陷: 设施设计方面, 实验室当前设施的设计不适合进行有效的清洁消毒以将污染风险降至最低、洁净区无 D 级区域导致非洁净区直接与 C 级区相邻、在同一个房间内放置两个超净工作台进行微生物限度检测, 但未考虑如果不同人员在同一时间处理不同样品存在污染和交叉污染的风险、实验室布局允许人员穿过清洗区域(非洁净区) 拿取已制备的培养基、阳性对照操作区域退出通道没有洗手或消毒装置、脱水培养基、配制培养基和商业培养基与活菌储存在同一区域、冷藏室不能从内部打开且缺少内部通报报警装置; 设施维护方面, 如实验室墙壁等位置存在裂缝或灰尘等、洁净区更衣室标签脱落、现场洁净区两个门在互锁系统的控制下仍可以同时打开、生物安全柜上有霉菌或真菌的黑色污渍; 环境监测方面, 存在未监测实验室洁净区内温度、A 级与 B 级的地面的表面微生物限度标准与 GMP 规定不一致、浮游菌和沉降菌监控取样点数量和位置没有基于房间大小功能和关键活动位置评估确定、环境监测计划中没有包含接触皿监测、对于实验室 B 级区监测发现的芽孢杆菌未按洁净区环境监测程序规定启动偏差调查。

6 药品微生物检测数据

微生物检测的许多操作均为人工操作, 记录的同步性问题较突出^[7], 系统的数据可靠性管理在药品微生物实验室的管理中尤为重要, 实验室检测人员需掌握数据管理的基本原则和要求, 严格杜绝数据操纵行为, 需要建立一套完善、清晰、完整、可追溯的结果记录体系^[8], 以确保所有重要环节都可追踪溯源, 符合数据“ALCOA+”原则(可塑、清晰、同步、原始、准确、完整、一致、持久、可获得^[9]), 并持续强化数据的规范性管理。

检查参考缺陷: 微生物实验室的原始数据在未保证可追溯的情况下被销毁, 菌落计数值直接写在平皿上, 之后使用电子表格进行对数计算; 在环境监测计数时仅对记录进行复核, 缺少实际有效的双人复核; 记录信息不完整, 如缺少检测的开始时间和结束时间、检测记录缺少菌株批号、缺少培养期间观察记录、缺少培养基储存间温度监测记录(要求 25℃ 以下储存) 等。

7 其他

药品微生物检测实验室检查中的常见问题还

涉及微生物鉴定、超标结果调查处理、消毒剂管理、实验室生产安全等。检查参考缺陷: 实验室使用的消毒剂效力确认未包括环境中分离的典型菌株; 实验室缺少带菌溅洒物的消毒处理物品; 微生物实验室不合逻辑的无任何超标或超常结果报告; 没有程序规定何时需要进行微生物鉴别以及鉴别需执行到种还是属。

8 结语

药品微生物检测实验室是药品生产企业质量控制的核心内容之一, 属于药品质量控制实验室的一部分, 是在同一个药品生产质量管理体系下开展的活动, 做好药品微生物检测实验室的质量管理需要在充分考虑其特殊性的基础上确保系统性, 包括偏差处理、变更控制、文件和记录管理、纠正和预防措施、超标和超常结果处理^[10]、设备管理、确认和验证、委托管理、供应商管理、质量风险管理等, 需要从质量管理体系角度分析药品微生物检测实验室的相关工作。

药品微生物检测的重要性导致其是全球各类药品检查中均需要覆盖的内容之一, 药品生产企业必须高度重视药品微生物检测工作。本文对药品微生物检测实验室质量管理的要点进行了探讨, 并对近年来国内外检查中相关方面的问题进行了分析和典型问题举例, 可为药品生产企业、药品检测机构提供参考借鉴, 进一步提升微生物检测质量管理体系。在具体执行时, 可结合 WHO 对药品质量控制实验室检查的 21 个方面进行总结和对比分析^[11]。在各类药品检查和内外部审计中, 当涉及微生物检测相关内容时, 可参考本文列举的要点和典型问题, 提高检查工作实效。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献:

- [1] 颜若曦. 无菌药品污染控制策略要点探析 [J]. 医药导报, 2023, 42(9): 1424-1429.
- [2] World Health Organization. WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories [EB/OL]. (2011) [2024-02-11]. https://www.who.int/docs/default-source/medicines/norms-and-standards/guidelines/quality-control/trs961-annex2-goodpractices-pharmaceutical-microbiology-laboratories.pdf?sfvrsn=ebd1845e_0.
- [3] FDA. Guide to Inspections of Microbiological Pharmaceutical Quality Control Labs [EB/OL]. (1993) [2024-02-11]. <https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-guides/microbiological>

- pharmaceutical-quality-control-labs-793.
- [4] PIC/S. Recommendation on Sterility Testing [EB/OL]. (2007)[2024-02-11]. <https://picscheme.org/docview/3442>.
- [5] 颜若曦. 药品生产洁净环境监测要点的研究与分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(10): 29-35.
- [6] 颜若曦. 生物制品生产设备检查要点探析 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(2):497-502.
- [7] 颜若曦, 曹轶, 翟铁伟. 药品生产企业质量控制实验室要点与缺陷分析 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(9): 1253-1258.
- [8] 范一灵, 秦峰, 刘浩, 等. WHO 药品预认证微生物实验室质量管理的要求与思考 [J]. 中国药事, 2020, 34(4): 417-422.
- [9] 颜若曦, 曹轶. 药品生产企业数据可靠性缺陷分析 [J]. 中国药物警戒, 2018, 15(1): 20-23.
- [10] 颜若曦, 曹轶, 翟铁伟, 等. 药品超标与超常结果调查处理 [J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(9): 1208-1212.
- [11] 叶笑, 颜若曦. 世界卫生组织对药品质量控制实验室资格预审检查分析 [J]. 中国药物评价, 2023, 40(4): 353-356.

[责任编辑 解学星]