

微生物检测 验证技术

主编 汪穗福

Weishengwu
Jiance Yanzheng
Jishu

中国医药科技出版社

微生物检测验证技术

主 编 汪穗福

副主编 张新妹

参编人员 蔡芷荷 邓金花 刘国斌
何慧贞 赵 军 洪其明

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书紧密结合《中国药典》(2005年版)的最新要求;重点阐述了微生物检测在医药、食品、化妆品等行业上应用所涉及到的仪器与设备,消毒剂与培养基,无菌、微生物数量、抗生素效价、细菌内毒素、控制菌等检查所要求进行的验证项目和内容(含方法、方案和具体的实操)及验证实验实例,提供了作者根据实际工作经验编写的微生物实验数量统计分析软件程序。

本书内容新颖、丰富,具有较强的实用性、指导性和可操作性,既能供各高等、中等职业技术学院选修课使用,又可作为培训教材,更可作为微生物检验者的指导书。

图书在版编目(CIP)数据

微生物检测验证技术/汪穗福主编. —北京:中国医药科技出版社, 2005.5

ISBN 7-5067-3192-4

I. 微... II. 汪... III. 微生物-检测
IV. Q93-332

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2005)第 028261 号

美术编辑 陈君杞

责任校对 张学军

版式设计 程 明

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲 22 号

邮编 100088

电话 010-62244206

网址 www.mpsky.com.cn

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 13 $\frac{1}{2}$

字数 269 千字

印数 1—3000

版次 2005 年 5 月第 1 版

印次 2005 年 5 月第 1 次印刷

印刷 廊坊市海翔印刷有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 7-5067-3192-4/R·2655

定价 22.00 元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

编写说明

近年来,随着医药食品科技业的进步和发展,我国医药业借鉴国外药品生产质量管理规范(简称GMP)的成功经验,开展了GMP认证工作,取得了很大的成果。到2004年7月1日止,共有近7成的医药企业取得了GMP认证,从而使我国的药品生产走上了规范化管理。GMP认证工作的开展,推动了验证技术的发展。众所周知,GMP的管理使人们从传统的成品检验把关,上升到验证及对生产全过程进行有效监控的现代质量管理,它是管理加验证。因此验证技术,构成现代质量控制与管理的中心。而微生物检测作为一种有别于数理检验的特殊检测技术与方法,涉及面广,影响因素多,更需要有验证技术与方法作依据来证明(或说明)其所进行的微生物检测或检验的可靠性、准确性与可行性。鉴于目前国内此项验证技术的工具书和参考书缺乏,尤其是能指导生产一线上操作者使用的指导书、实用书更少,我们参照《现代医药工业微生物实验室质量管理与验证技术》与《药品生物检定技术》等书的有关内容,重点围绕实验室微生物检测内容,突出配合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(2005年版)所要求开展的药品无菌检查、微生物限度检查验证工作,并配合各高等和中等职业技术学院开设的选修课组织有关专家编写了该书。希望本书的出版发行,能对微生物检测工作者起到一定帮助作用,并为推动医药、食品、化妆品等行业开展验证技术工作发挥积极应有的作用。

本书突出了微生物检测在医药、食品、化妆品等行业上所涉及有关内容验证的项目与内容,如微生物检测用仪器、设备、消毒剂、培养基、灭菌法、无菌检查、微生物(细菌、霉菌及酵母菌)计数检查、抗生素效价的微生物检定、细菌内毒素检查、控制(致病)菌的检查等所要求进行的验证(包括方法、方案和具体的实操方法)。作者本着注重实用性与可操作性的原则进行编写,并紧密结合了最新《中国药典》(2005年版)的要求,融合了编者多年的实操经验与做法。特别是为配合实验室开展微生物检测实验数理的统计工作,作者结合多年利用Office办公软件Excel电子表格的经验,编写了紧密结合微生物检测的有关统计软件程序,为读者自行建立统计模式提供参考,因而具有较强的实用性、可操作性和指导性。

全书由汪穗福(广州市医药中专学校高级讲师)和张新妹(中国药品生物检定所副研究员)担任主编和副主编,蔡芷荷(广东省环凯微生物科技有限公司副研究员)、邓金花(广东省微生物研究所工程师)、刘国斌与何慧贞(广州市医药中专学校讲师)、赵军和洪其明(上海市医药学校高级讲师、讲师)参编。具体的编写分工是:汪穗福第一章、第二章和第三章;邓金花第四章;蔡芷荷第五章;何慧贞第六章;张新妹第七章;刘国斌第八章;赵军和洪其明第九章;最后由汪穗福、张新妹统稿。由于编者水平有限,可能有不足之处,敬请读者指出。在此也对编写时参考使用到的有关参考书籍和文献的著(作)者表示致谢。

目 录

第一章 绪论	(1)
一、验证的概念与内涵	(2)
二、验证的类型	(2)
三、药品微生物检测验证的特点与影响因素	(3)
(一) 微生物学检测对象的特点	(4)
(二) 微生物学检测的特点	(4)
(三) 微生物学检测的影响因素	(5)
四、药品微生物检测验证技术的内容	(5)
第二章 微生物检测实验室的设施与设备验证	(7)
一、实验室设施与验证	(7)
(一) 洁净室(无菌室)	(8)
(二) 毒菌种处理和微生物鉴别局部 100 级控制室	(11)
(三) 抗生素微生物检定、细菌内毒素检查、抑菌实验的半无菌室	(12)
(四) 其他室(培养室, 试液及培养基的配制室或灭菌室, 器皿洗涤、烘干室, 实验室, 办公休息室)	(12)
二、实验室设备与验证	(12)
(一) 仪器设备的管理原则	(13)
(二) 实验室设备的质量保证和管理要求	(14)
(三) 超净工作台的监控规程与使用指南	(22)
三、实验室操作所用玻璃器具(容器)的校正(验证)	(23)
(一) 容量瓶容积的校正	(23)
(二) 移液管(刻度管)容积的校正	(24)
(三) 滴定管容积的校正	(24)
(四) 校正容量仪器时的注意事项	(25)
(五) 常见容量仪器的容量允差	(26)
(六) 微量加样器的校验	(26)
第三章 微生物检测用标准物质的使用及管理	(28)
一、概述	(28)
(一) 标准品或对照品的来源	(28)
(二) 标准品或对照品的保管	(29)
(三) 标准品或对照品的存储和领用	(29)

(四) 标准品或对照品的销毁及使用记录·····	(29)
(五) 定期对标准品或对照品进行抽样检查·····	(29)
(六) 特殊的标准品——菌种·····	(29)
二、抗生素标准品·····	(29)
(一) 使用与保存·····	(29)
(二) 效价复核·····	(30)
(三) 效价复核数据的统计学分析实例·····	(32)
(四) 效价复核数据的计算机统计处理·····	(35)
三、微生物菌种的使用、保存与管理、验证·····	(36)
(一) 制定菌种使用、保藏管理程序·····	(36)
(二) 严格控制菌种的传代、做好保藏工作·····	(37)
(三) 常用菌种保藏方法·····	(38)
(四) 菌种保藏标签的规范与要求·····	(40)
(五) 严格菌种的质量控制, 确保菌种的质量·····	(40)
(六) 菌种处理的注意事项与有关记录·····	(41)
四、细菌内毒素标准品与鲎试剂·····	(43)
(一) 细菌内毒素国家标准品和工作标准品·····	(43)
(二) 细菌内毒素验证品·····	(44)
(三) 凝胶鲎试剂灵敏度复核·····	(46)
(四) 光度法标准曲线的可靠性试验·····	(49)
第四章 消毒剂的使用及效力验证·····	(51)
一、消毒剂与灭菌剂的划分·····	(51)
(一) 卫生处理与卫生洗涤剂·····	(51)
(二) 消毒与消毒剂·····	(51)
(三) 灭菌与灭菌剂·····	(52)
二、微生物对消毒因子的敏感性·····	(52)
三、消毒剂的效力等级与消毒效力评价·····	(52)
四、影响消毒剂效力的主要因素·····	(53)
(一) pH·····	(53)
(二) 温度·····	(53)
(三) 有机物·····	(53)
(四) 表面活性剂和金属离子·····	(53)
(五) 水·····	(53)
五、消毒剂的作用方式·····	(54)
(一) 使蛋白质变性、凝固·····	(54)
(二) 破坏或损伤细胞膜·····	(54)
(三) 阻断食物摄取和废物排泄·····	(54)

(四) 钝化关键酶的活性·····	(54)
六、细菌对消毒剂的耐受性·····	(55)
(一) 具耐受性的细菌和不能完全致死的消毒剂剂量·····	(55)
(二) 分泌多聚糖样物质黏附细菌, 共同形成生物膜·····	(55)
(三) 清洁剂之间的交互作用钝化消毒剂效力·····	(55)
七、消毒剂的选择和交替使用·····	(56)
八、制药工业常用的消毒剂·····	(56)
(一) 醇类·····	(56)
(二) 酚类化合物·····	(57)
(三) 季铵盐类化合物·····	(57)
(四) 液体灭菌剂和杀芽孢剂·····	(57)
九、消毒剂的效力确认·····	(59)
(一) 确认时需要考虑的因素·····	(60)
(二) 现场考察·····	(60)
(三) 实验室考察·····	(60)
(四) 定量悬浮试验·····	(61)
(五) 载体浸泡定量试验·····	(63)
十、消毒剂稀释液的效期确认·····	(63)
十一、培训 and 安全教育·····	(64)
十二、消毒剂消毒效果验证实验 (定量悬浮试验) 实例·····	(64)
(一) 验证原理·····	(64)
(二) 验证材料·····	(64)
(三) 验证方法 (定量悬浮试验)·····	(65)

第五章 培养基、缓冲液、稀释剂、淋洗液和试剂的验证 ···· (67)

一、培养基的概念与分类·····	(67)
二、培养基的制备、融化程序的确认及注意事项·····	(67)
(一) 培养基的制备·····	(67)
(二) 培养基融化程序的确认·····	(68)
(三) 培养基制备应注意事项·····	(69)
三、培养基的储存·····	(70)
四、培养基的质量控制·····	(71)
(一) 外观检查·····	(71)
(二) pH 检查·····	(72)
(三) 培养基的无菌性检查·····	(72)
(四) 培养基的灵敏度检查 (促菌生长性)·····	(72)
五、染色液与各种生化反应试液的验证·····	(79)
六、缓冲液、稀释液与淋洗液·····	(81)

(一) 无菌检查用稀释液、淋洗液及其制备方法·····	(81)
(二) 微生物限度检查用稀释剂及其制备方法·····	(82)
七、文件管理与标签·····	(82)
八、有效期的确认·····	(83)
九、培养基灵敏度的验证试验实例·····	(84)
(一) 无菌检查培养基灵敏度的验证试验实例·····	(84)
(二) 微生物限度检查培养基灵敏度的验证试验实例·····	(85)
附一 无菌检查用培养基及其制备方法·····	(88)
附二 微生物限度检测用培养基及其制备方法·····	(89)
附三 微生物限度检测用试药、试液与指示液·····	(92)
附四 抗生素效价测定用培养基及灭菌缓冲液的制备方法·····	(94)
附五 微生物检测用生化试验培养基及试剂的制备方法·····	(96)
附六 微生物检测用试液、指示液、染色液的配制及染色法·····	(99)
第六章 灭菌法 ·····	(101)
一、灭菌方法·····	(101)
(一) 湿热灭菌法·····	(102)
(二) 干热灭菌法·····	(103)
(三) 辐射灭菌法·····	(103)
(四) 气体灭菌法·····	(104)
(五) 过滤除菌法·····	(104)
(六) 无菌生产工艺·····	(105)
二、生物指示剂·····	(105)
(一) 制备生物指示剂用微生物的基本要求·····	(106)
(二) 生物指示剂的制备·····	(106)
(三) 生物指示剂的应用·····	(106)
(四) 常用生物指示剂·····	(106)
三、湿热灭菌法验证试验实例·····	(107)
(一) 产芽孢梭菌芽孢 - 生物指示剂验证乳剂类产品的灭菌工艺实例·····	(107)
(二) 生物指示剂验证实例·····	(109)
(三) 常用消毒灭菌效果评价实验操作实例·····	(109)
第七章 药品微生物检验方法的验证 ·····	(111)
一、确保药品微生物检测方法验证准确性的关键因素·····	(112)
(一) 验证实验用微生物的种类及其生理特性·····	(112)
(二) 验证用微生物接种液的制备·····	(112)
(三) 验证试验条件·····	(113)

二、验证试验的原理与方法	(116)
(一) 验证的原理	(116)
(二) 验证的合格标准	(116)
(三) 药品无菌检查方法的验证	(117)
(四) 药品细菌、霉菌及酵母菌计数检查方法的验证	(118)
(五) 药检控制菌检查法的验证	(119)
(六) 药检中各控制菌检测的注意事项	(120)
三、验证实验结果的评价与报告	(122)
四、验证实验实例	(123)
实例(一) 氟喹诺酮类药物的无菌检查方法验证	(123)
实例(二) $\times \times$ 注射液的无菌检查(薄膜过滤法)方法的验证方案示例	(126)
实例(三) 微生物限度检查方法(平皿菌落计数法)的验证方案示例	(129)
实例(四) 大肠埃希菌检查方法的验证方案示例	(132)
第八章 微生物检测数据的趋势分析和统计处理	(134)
一、检测数据的趋势分析	(134)
(一) 检测数据趋势分析的目的	(134)
(二) 微生物检测进行趋势分析的常规项目	(134)
(三) 趋势分析的意义	(134)
二、微生物检测数据的统计处理	(135)
(一) 统计学常用的变异指标数值	(136)
(二) 正态(常态)分布(曲线)	(137)
(三) t 检验与 t 分布	(139)
(四) F 检验(方差分析)	(141)
(五) χ^2 (读作卡方) 分析	(142)
三、制备趋势分析图进行分析	(144)
四、微生物检测数据的统计处理	(146)
(一) 特异反应检测值的剔除	(146)
(二) t 检验实例	(148)
(三) F 检验实例	(149)
(四) χ^2 检验实例	(152)
(五) 试验结果的合并计算	(153)
五、统计例题的微机运算	(157)
(一) 配对试验 t 检验微机运算	(158)
(二) 多因素 F 检验微机运算	(159)
(三) 配对试验 χ^2 (卡方) 检验	(162)
(四) 量反应平行线测定随机区组设计(3.3)法的微机运算	(163)
(五) 常规检定中的合并计算微机运算	(168)

六、微生物检测数据分析应注意的问题·····	(172)
第九章 有关微生物检测 (查) 的操作方法	(173)
一、抗生素微生物检定·····	(173)
(一) 管碟法·····	(173)
(二) 浊度法·····	(176)
二、细菌内毒素检查·····	(179)
(一) 凝胶法操作·····	(180)
(二) 凝胶半定量试验·····	(183)
(三) 光度测定法操作·····	(183)
三、无菌检查·····	(186)
(一) 薄膜过滤法·····	(188)
(二) 直接接种法·····	(189)
(三) 无菌检查结果判断·····	(190)
四、微生物限度检查·····	(191)
(一) 供试液的制备·····	(191)
(二) 细菌、霉菌及酵母菌计数·····	(192)
(三) 控制菌检查·····	(193)
(四) 微生物限度检查结果判断·····	(199)
附(一) 《中国药典》(2005 年版)(一部)微生物限度标准	(200)
附(二) 《中国药典》(2005 年版)(二部)微生物限度标准	(201)
五、鲜乳中抗生素残留量检验·····	(202)
参考文献	(203)

第一章 绪 论

微生物检测（如药品的无菌检查，药品、食品、化妆品的微生物限度检查以及其他有关卫生学的检查等）是保证生产厂家产品质量安全的一项重要检查项目。由于微生物自身具有的特性，使得它的检查与常规理化检查有着与众不同的特点，为了保证产品检查的真实性与重现性，近年来，随着药厂 GMP 认证的开展，药品的生产管理，由传统的产品质量控制从出厂前检验，发展到“通过验证确立控制生产过程的运行标准，通过对已验证状态的监控，控制整个工艺过程，确保质量”的验证质量体系。众所周知，一个实验室在建立一个新方法或第一次使用一个新方法时，都要对该方法的适用性和可靠性进行测定，这就是验证。大量的实践证明，验证技术使药厂 GMP 的实施水平跃上一个新的台阶。同时验证技术（方法）也逐步深入到药典的各种检测方法中，虽然现在 GMP 认证在药厂以外行业尚没有全面推行实施，但验证技术（方法）的思想与体系同样适用于其他行业，它对保证质量起着重要作用。本书就验证技术在微生物检测中的原理、方法、应用所涉及的知识与技术等将做进一步的叙述。

我国的《药品生产质量管理规范》（1998 年修订）在第七章验证中规定：“第五十七条：药品生产验证应包括厂房、设施及设备安装确认、运行确认、性能确认和产品验证。第五十八条：产品的生产工艺及关键设施、设备应按验证方案进行验证。当影响产品质量的主要因素，如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等发生改变时，以及生产一定周期后，应进行再验证。第五十九条：应根据验证对象提出验证项目、制定验证方案，并组织实施。验证工作完成后应写出验证报告，由验证工作负责人审核、批准。第六十条：验证过程中的数据和分析内容应以文件形式归档保存。验证文件应包括验证方案、验证报告、评价和建议、批准人等”。

此外，《中国药典》从 2000 年版和 2005 年版就开始收载《药品质量标准分析方法验证指导原则》。在《药品质量标准分析方法验证指导原则》中明确指出：“药品质量标准分析方法验证的目的是证明采用的方法适合于相应检测要求，在建立药品质量标准时，分析方法需经验证；在药品生产工艺变更、制剂的组分变更、原分析方法进行修订时，则质量标准分析方法也需进行验证。方法验证理由、过程和结果均应记载在药品标准起草说明或修订说明中。

需验证的药品质量标准分析项目有：鉴别试验，杂质定量检查或限度检查，原料药或制剂中有限成分含量测定，以及制剂中的其他成分（如防腐剂等）的测定。药品溶出度、释放度等功能检查中，其溶出量等的测试方法也需做必要验证。

验证内容有：准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。”

以上这些法规从不同方面对检验方法做了规定，它们是我们实施检验方法验证的重要依据，也是实施办法的准则，因此必须坚决执行。

一、验证的概念与内涵

WHO 的 GMP 中,对验证的定义为:“能证明任何程序、工艺、设备、物料、活动、或系统确实能导致预期结果的文件证明的行为”。而验证一词在美国 FDA 官员编写的《药品生产验证》中,他们认为验证与确认这两个词是同义词。“确认”这个词往往用于有技术规格及运行参数的设备或系统。当设备或系统获得产品或接近最终结果降级时,才使用“验证”这个词。我国的《药品生产质量管理规范》(1998 年修订)在第十四章第八十五条中将它界定为:“证明任何程序、生产过程、设备、物料、活动或系统确实能导致预期结果的有文件证明的一系列活动”。可见,验证是药品生产及质量管理中的一个全方位的质量活动,它是实施 GMP 的基础,可用图 1-1 来简述各项验证及其相关性。

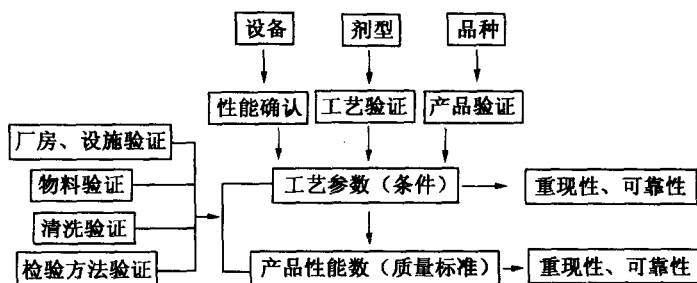


图 1-1 各项验证的相关性

二、验证的类型

一般根据产品和工艺、方法的要求以及设备变更、工艺修订等特点可以把验证分为 4 种类型。

(1) 前瞻性验证 就是在方法正式投入使用前按照预定的方案进行研究,并收集实验数据,以证实检定方法是否达到预期要求的行为。该验证方法是一种常用的最好验证方法,一般用于产品要求高,没(或缺)历史资料,靠生产控制及成品检查不足以确保重现性及产品质量的生产工艺或过程,如无菌产品生产中所采用的灭菌工艺(蒸汽灭菌、干热灭菌、无菌过滤)等都必须通过验证——以物理试验及生物指示剂试验来验证。

(2) 同步验证 就是已经在生产中实施的某项工艺运行中同时进行的验证。这种情况下验证数据的收集来源于工艺的实际运行过程中,一般要通过几次运转才能获得足够的数据来证明工艺的可靠性。采用这种验证方式的先决条件是:①有完善取样计划,即生产及工艺条件的监控比较充分;②有经过验证的检定方法,方法的灵敏性、特异性及选择性比较好;③对所验证的产品或工艺已经有相当的经验及把握。

(3) 回顾性验证 如果某一产品已经生产了很长一段时间,但没有按照前瞻性验证的要求进行过验证,而又不能进行同步验证(如储备的原液可以使用几年或设备正用于其他的用途),此时可以采用回顾性验证。通过对产品、生产步骤和检验步骤进行检测和分析,以证明生产步骤和生产工艺的一致性和完整性。对于检定方法,如果有足够的数据或有充

分的历史数据可以利用时,也可以采用这种回顾性验证的方式进行验证。同前瞻性验证的几批或一个短时间运行获得的数据相比,回顾性验证所依托的积累的资料比较丰富,从对大量历史数据的回顾分析中可以看出工艺控制状况的全貌,因而其可靠性也更好。它通常必须具备有 20 个连续批次的数据;检验方法经过研制,并且检验的结果可以用数值表示,可用于统计分析;批记录符合 GMP 的要求,有明确的工艺条件;有关的工艺变量必须是标准化的,并一直处于控制状态,如原料标准、生产工艺的洁净级别、分析方法、微生物控制等。

同步验证、回顾性验证通常用于非无菌工艺的验证,一定条件下二者可以结合使用。

(4) 再验证 系指一项生产工艺、一个系统或设备或者一种原材料经过验证并在使用一个阶段以后,旨在证实其“验证状态”没有发生漂移而进行的验证。

当影响产品质量的主要因素,如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等发生改变时,以及生产一定周期后,应进行再验证。它是旨在证实已验证状态没有发生漂移,表明该工艺仍能达到预定的要求。

一旦一个系统或一个工艺得到了验证,在操作过程未发生改变时,则认为达到了原定的要求。当发生改变、或出现错误、或更换设备或设备位置发生改变时,则需要再进行验证。

根据再验证的原因,可分为 3 种类型:①药监部门或法规要求的强制性再验证;②发生变更时的“改变”性再验证;③每隔一段时间进行的“定期”再验证。

三、药品微生物检测验证的特点与影响因素

在化学测试中,药品含量测定方法需要验证,与此相应,微生物检测方法也需要验证,尽管药品的微生物学检测方法在各国药典中均有规定。但是,不同的检品、不同的仪器或材料及实验环境条件均可能对检验结果产生影响。例如,当检测药品具有抑菌性时,它们会掩盖无菌药品已受污染的事实或造成低于实际污染水平的菌检结果;选用不适当的培养基,其促菌生长能力不符合要求,也会造成类似的后果。另外,为了保证药品使用的安全性,有些药品加了一定的防腐剂,当对防腐剂的防腐性能进行验证试验时,微生物的种类、生长的状态、介质的 pH 等因素又对验证的结果产生影响,此外微生物学检测除具有一般的理化检查的特点与要求外,还有自身特点与要求,为了使微生物学检验方法的结果准确可靠,需要对每个品种的具体检验方法进行验证,本书重点讨论的微生物检验方法验证的内容包括:微生物检测实验室的设施与设备验证,菌种的使用保存与管理验证,消毒剂的使用及效力验证,培养基、缓冲液和试剂验证及有效期的确认与验证,灭菌方法的验证,药品微生物学检验方法学验证,微生物检测数据的趋势分析和统计处理等知识。同化学检验方法验证的原理相似,将药品的微生物学检验方法具体应用于某一品种时,需进行方法验证,摸清微生物学检验方法适用的条件,即通过试验,寻找并确定合适的稀释材料、条件和方法。在这一工作的基础上,通过验证试验,最终确认检验方法,批准成为正式检验方法。

（一）微生物学检测对象的特点

微生物学检验除具有一般的理化检查的特点与要求外，如准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。还有自身特点与要求，造成药品微生物限度检验中的困难。除微生物制剂外，药品微生物限度检查与药品中有效成分的含量测定显著不同，其检查对象具有以下特点：

（1）活体易变性 菌体细胞在药品中处于不稳定状态，随存放时间延长死亡，也可在适宜条件下增殖。一批液体制剂若不含防腐剂，它可能是出厂时合格，保存时不合格，最终又可能“合格”。当保存条件稳定时，其污染量在一定时间内处于动态平衡，总体污染状况可以标准化的条件予以正确评估。

（2）分布不均匀性 除产品在生产前期污染外，通常是局部的。一批产品中不同瓶（盒）中污染状态会出现差异，其污染特别是致病菌通常是少量的。正确的检验有赖于合理的抽样方法。

（3）多数处于受损坏状态 药品中微生物，受到原料处理、加工等过程的影响，或者药品本身对微生物的抑杀作用，使其受到一定程度的损坏，这些受到损坏的微生物用一般的方法检查，往往会出现假阴性或计数偏低的结果。

（4）生态环境多样复杂 污染菌的来源多样，种类多样，加之药品种类繁多、剂型成分复杂，同一种菌在不同的药剂中所测定的结果各不相同。

（二）微生物学检测的特点

以上检查对象的这些特点就造成药品微生物学检验具有以下特点：检查对象的未知性、不确定性、不均匀性、特殊性、影响因素的多样性。

（1）检验对象的未知性 药品的无菌检查与微生物限度检查（控制菌检测）因和大多数理化检测不同，它们往往都是未知的，不知是否有菌或含有检测菌，全凭检测结果判断，难度大。

（2）检查对象的不确定性 药品受外来微生物的污染，这种污染是可无可有；在有中又可多可少；其种类可以多样。污染的情况依生产、设备、原材料、管理、剂型等条件而定，非药品本身所固有，所以微生物限度检验的对象是不确定的。药品所规定的项目，除了无菌检查和热原检查具有上述性质外，其他检查项目均无此特征。这一点往往被忽视。污染对药品而言是一个意外事件。污染批号中的不合格品是一个随机变量。

（3）检查分布的不均匀性 不均匀性是不确定性的另一种表现形式，在一个批号内产品有的被污染，有的不被污染，分布不匀；在被污染的部分中有的数量极多，有的较少，种类上可以复杂或较单一。这种不均匀性源于污染源的复杂性，原辅料污染、工艺污染、空间污染和操作人员污染等，构成污染量的多少差异，形成不均匀性。再者微生物具簇团性，簇团大小、紧密程度是可遗传的，簇团的分散性差异极大，该特点无疑强化了不均匀性。

（4）特殊性 由于以上的特点造成了它与一般的理化检查不同的特殊性，如出分析结果慢、检查操作步骤繁杂等。

(5) 影响因素的多样性 见后(二)微生物学检测的影响因素所述。

因此,微生物限度检查必须遵循以下原则:①样品正式检验前必须保持原污染状态。防止第二次污染和防止污染微生物的繁殖或死亡;②应有适当的供试液制备方法。供试液的正确制备是保证检验结果准确可靠的前提;③检验方法准确可靠;④检验结果判断无误。

做好微生物限度检验,检验人员的职业道德和业务素质至关重要。建立科学的质量保证体系,是获取检验结果正确可靠的基本保证。

(三) 微生物学检测的影响因素

在药品微生物学检验中,不管是微生物限度检查、无菌检查还是药品防腐剂的抑菌效力测定、灭菌法、消毒剂的使用及效力验证、检测结果受多种因素影响,其中菌种制备、培养基、灭菌方法、抑菌的因素等备受关注。在药检实践中,以下几种因素均可对微生物学检测产生影响:①药品本身的抑菌性或药品中防腐剂的抑菌性;②标准菌种制备与传代、种类及生长状态是否符合规范;③培养基的促菌生长能力;④培养条件(温度、湿度及需氧或厌氧);⑤消毒或灭菌方法;⑥过滤系统(滤器、滤膜性质、材质)性能;⑦检验方法的正确与否。以上种种因素等都会影响微生物的检测结果。

众所周知,培养基成分的不同来源,如不同品种的蛋白胨、牛肉膏、牛肉浸液对细菌的生长影响是有差异的;又如细菌总数测定,其中抽样及误差分析均缺少科学数据要求,增加了测定结果的不稳定因素。在空气洁净度的菌落计数测定中,不同的测定方法其结果差异是很大的。由于微生物检验方法,不少项目是执行国家标准的法定检验,同一个品种同一批号检测的不同结果,可能引起争议,其后果可想而知,同时也会造成与国际接轨的困难。因此微生物培养条件是影响供试品菌检计数准确与否的重要因素。同时应注意影响结果的两个方面:一是培养基本身的性质;二是培养条件。通俗来说,培养基应具备广谱性,即有助于检品中所存活微生物的生长,因此要通过培养基灵敏度验证试验。另外,应注意采用最佳培养条件,以确保微生物充分生长并使计数结果呈良好的重现性。建立合适检验方法的标准化与验证问题,成为一项迫切的任务。

一些无菌药品中,如注射剂或滴眼剂,往往添加抑菌剂,以保证它们在一段时间可安全使用。而抑菌剂的有效性要用微生物验证试验来证实。验证试验用微生物菌种的制备方法,又影响抑菌性产品的检验。因为试验用微生物的生长和制备方式决定着细胞的生理状态,这种状态又直接影响抑菌效力测定的结果。此外,检验方法的正确与否也影响微生物的检测结果。

综上所述,这些因素的存在,大大增加了微生物检测的难度,对此微生物检测工作者要有充分的认识。

四、药品微生物检测验证技术的内容

验证技术是一门涉及方方面面的应用与实用技术,单就微生物检测应用领域而言,其验证主要包括:微生物检测实验室的有关设施与设备验证,检验中的菌种使用、保存与管理的验证,消毒剂的使用及效力的验证,培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液和试剂的

验证,所使用的灭菌方法验证,药品无菌检查和微生物限度检验的方法学验证,以及微生物检测数据的趋势分析和统计处理和有关微生物检测的标准操作规范等内容。本书就以上内容做了进一步的论述与阐明,供读者在生产过程中参考使用。

验证技术虽然不是一门新知识、新技术,仅是近年来在医药工业上强调的一门涉及多门学科的综合知识技术,其起步在医药行业的 GMP 认证中得到全面的应用和使用推广,已被医药界肯定。但验证是能证明任何程序、工艺、设备、物料、活动或系统确实能导致预期结果的文件证明行为。因而其管理与质量监控的精髓无不可同样地适用到其他诸如食品、卫生、化妆品等行业,虽然现在这些行业有些尚没有强制实行或还没有试行 GMP 认证,但实践证明,验证是保证检测方法学准确的重要措施与有效质控手段;而作为各行业的微生物检测,具有更多的相同性与共通性,因此微生物检测工作者要充分认识到它的重要性与相通性。同时我们相信验证技术今后在药厂以外的行业也会被借鉴执行,因为在微生物检测中进行验证技术的贯彻执行,对提高检测质量会起到重要保障作用。

第二章 微生物检测实验室的设施与设备验证

毫无疑问,微生物检测实验室的设施与设备是开展微生物检测的物质基础和保证。因此开展微生物检测实验,离不开实验室设施与设备。但光有实验室设施与设备,而没有对实验室设施与设备的性能进行检测的验证,同样起不到保证作用。微生物检测实验室的设施与设备主要包括有:①保证检测的无菌环境设施与器械——如洁净室(无菌室)、无菌隔离系统、净化工作台等;②保证检测用实验用品与用具的无菌(灭菌)设施或设备——如高压蒸汽灭菌器(或手提高压蒸汽灭菌锅)、电热恒温干燥箱等;③保证检测细菌内毒素反应的器械用具——如各种细菌内毒素反应测定仪;④保证检测中微生物能恒温生长与菌种保存的恒温设备——如恒温培养箱、冰箱;⑤各种实验操作所用仪器——全封闭薄膜过滤装置、电动匀浆仪、电热恒温水浴箱、离心机、天平、显微镜等;⑥实验操作所用的玻璃器具——各种刻度吸管、移液管、容量瓶、试管、三角烧瓶、双碟培养皿等常用玻璃器具;⑦保证测量各类样品中微生物菌落数或抑菌直径的有关测量仪——如空气浮游菌采样器、空气悬浮粒子计数器、zY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪等。

以上微生物检测实验室的设施与设备如何做好管理与验证,确保质量标准,在总体管理上,要建立实验室的设施与设备明细目录,包括名称、型号、厂商(家)、购置时间、验收、调试或校验、仪器保管负责人、使用操作规范、使用或维修记录、最后到报废等一系列的仪器设备质量保证档案。

一、实验室设施与验证

由中国实验室认可委员会(简称 CNACL)1999 年制定实验室认可准则(CNACL201-09)中的设施与环境中规定:“设施和环境实验室的设施、工作区域、能源、照明、采暖、通风等应便于校准或检测工作的正常运行。校准或检测所处的环境不应影响校准或检测结果的有效性或对其所要求的测量准确性产生不利的影响,在非固定场所进行校准和检测时尤应注意。适当时,实验室应配备对环境条件进行有效监测、控制和记录的设施。实验室应注意周围因素(例如微生物菌种、灰尘、电磁干扰、湿度、电网电压、湿度、噪声、振动级……),以免影响检测或校准工作质量。相邻区域的活动相互之间有不影响时,应采取有效的隔离措施。进入和使用有影响工作质量的区域应有明确的限制和控制。应有充分的措施保证做好实验室的内务管理。实验室应有符合有关健康和安全的要求”。

国家药品监督管理局 2000 年 9 月颁发的《药品检验所实验室质量管理规范(试行)》中第十八条规定:“无菌检查、微生物限度检查与抗生素微生物检定的实验室,应严格分开。无菌检查、微生物限度检查实验室分无菌操作间和缓冲间。无菌操作间应具备相应的空调净化设备和环境,采用局部百级措施时,其环境应符合万级洁净度要