



28 药品微生物检验方法主要分两三种类型：定性试验和、定量试验和鉴定  
 29 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  
 30 检查；定量试验就是测定样品中存在的微生物数量，如微生物计数试验；  
 31 鉴定试验就是借助现有的分类系统，通过对未知微生物的特征测定，对其进  
 32 行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分，或属、种及菌株水平确认。鉴定试验的  
 33 验证参见微生物鉴定指导原则（通则 9204）。

34 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、  
 35 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  
 36 标准分析方法验证指导原则（通则 9101）不完全适宜于微生物替代方法的验  
 37 证。药品微生物检验替代方法的验证参数见表 1。

38 在进行替代方法验证时，需根据实际应用目的、场景及具体方法，结合  
 39 风险评估选择合适的参数进行验证。

40 进行药品生产过程中定性检验替代方法验证时至少需验证方法的专属性  
 41 及检测限；进行定量检验替代方法验证时应结合微生物污染的警戒限度、纠  
 42 偏限度或其他限度要求开展验证，验证参数至少需包括准确度、精密度、专  
 43 属性、定量限、线性和范围。

44 进行终产品放行时的定性检验和定量检验替代方法验证时需根据表 1 要  
 45 求对各参数进行逐一验证。某些特殊产品如短效期产品进行定性替代方法验  
 46 证时，应结合产品的特性、生产工艺和无菌保障条件等方面的风险评估，至  
 47 少对替代方法的专属性及检测限进行验证，并评估其耐用性和重现性。

48 表 1 不同微生物检验类型验证参数

参数	定性检验	定量检验
准确度 <sup>a</sup>	-	+
精密度 <sup>a</sup>	-	+
专属性 <sup>a,b</sup>	+	+
检测限 <sup>b</sup>	+	-
定量限 <sup>a</sup>	-	+
线性 <sup>a</sup>	-	+

范围 <sup>a</sup>	-	+
耐用性	+	+
重现性	+	+

49

50 注：① +表示需要验证的参数；-表示不需要验证的参数；

51 ② a 为药品生产过程中进行定量检验替代方法验证时至少需验证的参数；b  
52 为药品生产过程中或某些特殊产品放行进行定性检验替代方法验证时至少需验证的参  
53 数。

54 ~~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  
55 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  
56 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  
57 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。~~

58 ~~进行微生物替代方法的验证时，替代方法验证的结果需采用合适的统计  
59 学方法进行分析。当替代方法产生的结果不以菌落形成单位（cfu）表示时，  
60 应对结果进行评估和趋势分析，并采用合适的统计学方法进行处理。进行方  
61 法验证时，若替代方法只是针对药典经典方法中某一环节进行技术修改，只  
62 需验证该项替代环节而不是整个检验方法。此时，需要验证的对象仅是该项  
63 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，  
64 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  
65 生物回收系统而不是整个无菌试验方法。~~

### 66 替代方法验证的一般要求

67 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~~  
68 ~~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~~  
69 ~~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、~~  
70 ~~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~~  
71 ~~用者完成。需全面了解替代方法的检测原理、应用条件、仪器设备以及预期~~  
72 ~~信号等信息，并结合应用目的、应用场景等，对替代方法研发者提供的预处~~  
73 ~~理方法、响应类型、准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、范围、线~~  
74 ~~性和耐用性等内容进行审查。~~

75 以仪器设备为主体的微生物检验替代方法应对所使用的设备建立用户需  
76 求说明，并进行设计确认、安装确认、运行确认和性能确认等。使用者在基  
77 ~~本确认替代方法的适用性后，性能确认时需进行参数验证，参数验证应根据~~  
78 ~~方法的预期用途选择适宜的微生物，应采用样品按表 1 规定的参数逐一带样~~  
79 ~~品进行验证，以确认替代方法可否用于该样品的检验。验证至少使用 2 个批~~  
80 ~~号的样品，每批样品应平行进行至少 3 次独立实验。并要求与经典方法进~~  
81 ~~行比较。~~

82 ~~在开展各参数验证时，涉及的菌种除应包括非无菌产品微生物限度检查、~~  
83 ~~微生物计数法（通则 1105）、非无菌产品微生物限度检查、控制菌检查法（通~~  
84 ~~则 1106）和无菌检查法（通则 1101）中培养基适用性检查规定的菌株外，还~~  
85 ~~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。~~

86 替代方法验证时应充分考虑样品对方法的影响，并选择合适的微生物进  
87 行验证。进行方法验证时应根据预期用途采用药典规定的标准菌株进行验证，  
88 此外还应选择对方法和样品具有挑战的微生物（如样品及环境分离微生物、  
89 受损或生长缓慢微生物和临床分离微生物等）进行验证。

## 90 样品中微生物定性检验方法的验证

### 91 1. 专属性

92 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  
93 能力。当替代方法以微生物生长信号作为判断微生物是否存在时，其专属性  
94 验证时应确认所用培养基体系的促生长试验能力，还应考虑样品的检测系统  
95 中的外来物质的存在对检验结果生长信号或微生物生长的影响。当替代方法  
96 不是以微生物生长信号作为判断指标时，其专属性验证应确认检测系统中的  
97 外来成分物质不得干扰试验而影响结果，不会对结果产生干扰。如确认样品  
98 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  
99 择与控制菌具有类似特性的菌株作为验证对象。

100 当采用替代方法进行控制菌检查或特定目标微生物检验时，应证明方法  
101 可检出目标微生物，且不会受到特性类似的非目标微生物干扰。

### 102 2. 检测限

103 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  
104 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  
105 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  
106 节的供试液中所含有的微生物数量。例如控制菌检查中规定不得检出沙门菌，  
107 对检测限而言，是指每 10 g 样品中能被检出的沙门菌的最低数量。

108 检测限~~确定验证~~的方法是在样品中接种较低浓度（使同一平行试验中同  
109 时出现阴性和阳性结果的浓度）的试验菌~~（每单位不超过 5cfu）~~，然后分别  
110 采用~~药典方法经典方法~~和替代方法对该试验菌进行检验~~，以检出与否来比较~~  
111 ~~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~~  
112 ~~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~~  
113 ~~一种试验菌可采用卡方检验（ $\chi^2$ ）来评价两种方法的检测限是否存在差异。~~  
114 根据同时出现的阴性和阳性结果，采用合适的统计学方法评估两种方法的检  
115 测限是否存在差异。例如，当采用单个较低浓度的微生物悬液进行试验时，  
116 可以采用卡方检验（ $\chi^2$ ）评估两种方法的检测限是否存在差异；当使用一系  
117 列稀释浓度梯度的试验菌进行验证时，可采用最可能数法（MPN 法），评估  
118 两种方法的最可能数置信区间是否重叠。由于检测限验证通常采用低浓度的  
119 微生物，因此与其它验证参数相比，需要更多的重复次数以满足统计学要求。

### 120 3.重现性

121 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~~  
122 ~~点、实验人员、仪器、试剂的批次）发生变化时，在不同实验室所得检验结~~  
123 果的~~精密度接近程度~~。重现性可视为微生物检验方法在检验结果上~~抵抗对操~~  
124 作和环境变化的~~抵抗能力~~。

125 ~~方法使用者应优先测定该验证参数。验证时~~在样品中接种一定数量的试  
126 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~~  
127 ~~员，在不同时间在不同实验室，使用不同的试剂（或仪器）~~进行检验，采用  
128 并选择合适的统计学方法如卡方检验（ $\chi^2$ ）~~来评价两种方法的重现性是否存~~  
129 ~~在差异对结果进行评估。替代方法的重现性评价不需要将其与经典方法进行~~  
130 比较。验证过程中，应关注样品的一致性。

### 131 4.耐用性

132 微生物定性检验的耐用性是指当方法参数存在测定条件有小的刻意变化  
133 变动时，检验测定结果不受影响的能力承受程度，为方法正常使用时的可靠  
134 性提供依据为所建立的方法用于常规检验提供依据。方法使用者应优先测定  
135 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有特殊条件要  
136 求，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，  
137 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。

### 138 样品中微生物定量检验方法的验证

139 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  
140 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  
141 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  
142 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加 1 后开方的方  
143 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  
144 于微生物数据的统计分析。

#### 145 1. 准确度

146 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经典方法检验  
147 结果一致的接近程度。准确度的确认应在检测的范围内应在检测范围内进行  
148 验证，通常用微生物的回收率（%）来表示。

149 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  
150 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  
151 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  
152 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  
153 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  
154 于药典方法检验结果的 70%，也可以应采用合适的统计学方法表明证明替代  
155 方法的回收率至少与药典经典方法一致无显著性差异，例如采用方差分析并  
156 结合  $t$  检验评价方法回收率之间的差异。当两种测定方法原理不同，无法用回  
157 收率进行准确度评价时，应证明两种方法具有明确的相关性。当替代方法的  
158 回收率高于药典经典方法时，有必要结合专属性项下的有关内容对准确度进  
159 行评价。

#### 160 2. 精密度



161 微生物定量检验的精密度是指在检验范围内，对同一个均匀的样品多次  
162 重复取样测定，其检验结果的~~一致接近~~程度，通常采用标准偏差~~或~~、相对标  
163 准偏差~~或其他适宜的方式~~来表示，~~也可以采用其他适宜的方式~~。

164 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~~  
165 够准确~~读数计数~~的最高浓度，然后系列稀释至较低浓度（如小于 10cfu/ml）。  
166 每个试验菌~~至少~~选择其中~~至少~~5 个浓度的菌悬液进行检验。每~~一个~~浓度~~应~~至  
167 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  
168 准偏差（RSD）。~~一般情况下，可以接受的相对标准偏差（RSD）应不大于手~~  
169 ~~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~~  
170 ~~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~~  
171 ~~菌浓度的关系见表 2。~~

172 ~~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%

173

### 174 3. 专属性

175 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~~  
176 ~~与其设定相适应~~在非目标微生物和/或其他成分可能存在的情况下，采用的分  
177 析方法能正确测定目标微生物的能力。例如，菌落计数平皿法其设定目的在  
178 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  
179 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  
180 成影响。

181 专属性验证时，应~~设计能够设计出~~可能使替代方法出现假阳性的实验模  
182 型~~来进行挑战替代方法，必要时可使用混合微生物~~，从而确认替代方法的~~适~~  
183 ~~用性专属性~~。当替代方法不~~依赖~~以微生物生长~~出菌落或出现混浊就可以信号~~  
184 ~~进行定量时~~（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  
185 法），以上验证方式~~就显得更为~~尤为重要。

186

### 4. 定量限

187 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  
188 量。由于定量限验证时，菌悬液浓度较低会导致计数结果存在较大误差，由  
189 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  
190 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  
191 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  
192 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  
193 相近的低限度下其灵敏度至少相当于药典经典方法，特殊情况时应至少满足  
194 检测要求。

195 定量限验证的方法是：在检验范围的低限最低浓度附近制备至少 5 份不  
196 同含菌浓度的菌悬液，每份菌悬液分别用药典经典方法和替代方法进行不少  
197 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经典方法结果在  
198 准确度和精密度上的差异，从而评价替代方法的定量限。无显著性差异时的  
199 最低浓度即为方法的定量限。

## 200 5.线性

201 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  
202 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。  
203 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  
204 据，选取准确度及精密度符合要求的所有浓度梯度数据，以检验结果为因变  
205 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  $r$   
206 决定系数  $R$ 。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。  
207 替代方法的相关系数决定系数不得低于 0.950.9。

## 208 6.范围

209 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  
210 验方法适用的高低限浓度或数量的区间。适用检验方法且准确度、精密度和  
211 线性符合一定要求的微生物高低限浓度或量的区间。

## 212 7.重现性

213 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  
214 点、实验人员、仪器、试剂的批次）发生变化时，在不同实验室所得检验结



215 果的**精密度接近程度**。重现性可视为微生物检验方法在检验结果上**抵抗对操**  
216 作和环境变化的**抵抗能力**。

217 ~~方法使用者应优先测定该验证参数。验证时~~在样品中接种一定数量的试  
218 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**  
219 ~~员，在不同时间在不同实验室，使用不同的试剂（或仪器）~~进行检验，~~对检~~  
220 ~~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~~  
221 ~~异。采用并选择合适的统计学方法对结果进行评估，如采用  $t$  检验评价实验结~~  
222 果的差异性。替代方法的重现性评价不需要将其与经典方法进行比较。验证  
223 过程中，应关注样品的一致性。

#### 224 8.耐用性

225 微生物定量检验的耐用性是指**当方法参数存在测定条件有小的刻意变化**  
226 **变动时，检验测定结果不受影响的**能力承受程度**，为方法正常使用时的可靠**  
227 **性提供依据为所建立的方法用于常规检验提供依据。方法使用者应优先测定**  
228 ~~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有特殊条件要~~  
229 ~~求，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，~~  
230 ~~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。

---

231 起草单位：浙江省食品药品检验研究院 联系电话：0571-86459427

232 参与单位：上海市食品药品检验所、天津市药品检验研究院、杭州市食品药  
233 品检验研究院