

## 附件：9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则公示稿（第二次）

## 1 9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则

2 本指导原则是为所采用的试验方法能否替代药典规定的方法以培养为基  
3 础的经典微生物检验方法（简称经典方法）用于药品微生物检验提供指导。

4 随着微生物学分析技术的迅速发展，为满足制药生产过程控制等的需  
5 要，制药领域不断引入了一些新的微生物检验技术。相较于传统的微生物  
6 检验方法，新技术通常具有快速、可实现实时或近实时监控等优势。这些新  
7 技术大体可分为三类：①基于检测微生物生长信息的检验技术，如生物发光  
8 技术、电化学技术、比浊法等；②直接测定被测介质中活微生物的检验技  
9 术，如固相细胞计数法、流式细胞计数法等；③基于分析微生物细胞所含有  
10 中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  
11 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  
12 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  
13 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。

14 在控制药品微生物质量中，微生物实验室出于各种原因，如成本、生产  
15 量、快速简便及提高药品质量等需要而采用非药典规定的检验方法（即替代  
16 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  
17 法。

18 药品微生物检验替代方法（简称替代方法）可用于药品生产过程的质量  
19 控制和终产品放行的微生物检验。当替代方法应用于药品生产过程的质量控  
20 制时，其结果与经典方法相比某些参数如准确度等可能存在差异，但二者应  
21 具有明确的相关性。在终产品放行过程中，当经典方法难以满足质量控制要  
22 求时，可结合风险评估结果，依据本指导原则建立替代方法，并经批准后方  
23 可使用。当替代方法用于代替药典方法进行终产品放行时，替代方法应不劣  
24 于药典方法，使用者可在一定时间内对一定数量的产品采用药典方法和替代  
25 方法进行平行试验，同时进行充分的风险评估，并对已放行的产品质量负  
26 责，必要时经批准后方可使用；对上市产品的评价需采用经注册或备案批准

27 的质量标准中方法进行检验，若标准中未明确方法，则应按药典方法进行检  
28 验。

### 29 微生物检验方法的类型及验证参数

30 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  
31 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  
32 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  
33 试验；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，  
34 对其进行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分，或属、种及菌株水平确认。鉴定  
35 试验的验证参见微生物鉴定指导原则（通则指导原则 9204）。

36 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、  
37 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  
38 标准分析方法验证指导原则（通则指导原则 9101）不完全适用于微生物替  
39 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。在进行替代方  
40 法验证时，需根据实际应用目的、场景及具体方法，结合风险评估选择合  
41 宜的参数进行验证。不同微生物检验类型替代方法的验证参数见表1。

42 表1 不同微生物检验类型替代方法的验证参数

参数	定性试验		定量试验	
	过程控制	终产品放行	过程控制	终产品放行
准确度	-	-	+	+
精密度				
重复性	-	-	+	+
中间精密度	-	-	+	-
重现性	-	+	-	+
专属性	+	+	+	+
检测限	+	+	-	-
定量限	-	-	+	+
线性	-	-	+	+
范围	-	-	+	+

耐用性

-

+

-

+

43

44 进行药品生产过程中微生物检验定性检验（简称定性试验）替代方法  
45 验证时，验证参数至少需验证方法的包括专属性及检测限；进行微生物检验  
46 定量检验（简称定量试验）替代方法验证时应结合微生物污染的警戒限  
47 度、纠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  
48 度、专属性、定量限、线性和范围。

49 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  
50 1 要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试验替  
51 代方法验证时，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  
52 评估，至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  
53 性。

54

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 a	-	+
精密度 a	-	+
专属性 a,b	+	+
检测限 b	+	-
定量限 a	-	+
线性 a	-	+
范围 a	-	+
耐用性	+	+
重现性	+	+

55

56 注：① +表示需要验证的参数；-表示不需要验证的参数；

57 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  
58 的参数；b 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  
59 证时至少需验证的参数。

60 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  
61 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  
62 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  
63 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。

64 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宜的统  
65 计学方法进行分析。当替代方法产生的结果不以菌落形成单位（cfu）表示  
66 时，应对结果进行评估和趋势分析，并采用合适宜的统计学方法进行处理。  
67 进行方法验证时，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  
68 改，只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  
69 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  
70 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  
71 用的微生物回收系统而不是整个无菌试验方法。

## 72 替代方法验证的一般要求

73 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  
74 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  
75 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  
76 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  
77 法使用者完成。需全面了解替代方法的检测原理、应用条件、仪器设备以及  
78 预期信号等信息，并结合应用目的、应用场景等，对替代方法研发者提供的  
79 预处理方法、响应类型、准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、范  
80 围、线性和耐用性等内容进行审查。

81 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  
82 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  
83 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  
84 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  
85 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  
86 号的样品，每批样品应平行进行至少 3 次独立实验。并按要求与经典方法进  
87 行比较。

88 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  
89 查：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  
90 法（通则 1106）和无菌检查法（通则 1101）中培养基适用性检查规定的菌  
91 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  
92 验证。

93 替代方法验证时应充分考虑样品对方法的影响，并选择合适宜的微生物  
94 进行验证。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  
95 证，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  
96 物、受损或生长缓慢微生物和临床分离微生物等）进行验证。

### 97 样品中微生物检验定性检验方法的验证

#### 98 1. 专属性

99 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  
100 的能力。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  
101 性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  
102 统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  
103 法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  
104 的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  
105 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  
106 选择与控制菌具有类似特性的菌株作为验证对象。

107 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  
108 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。

#### 109 2. 检测限

110 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  
111 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  
112 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  
113 环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  
114 菌，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。

115 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  
116 同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

117 别采用~~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~~  
118 ~~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~~  
119 ~~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~~  
120 ~~同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~~  
121 ~~异。根据同时出现的阴性和阳性结果，采用合适宜的统计学方法评估两种方~~  
122 ~~法的检测限是否存在差异。例如，当采用单个较低浓度的微生物悬液进行试~~  
123 ~~验时，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~~  
124 ~~用一系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~~  
125 ~~法），评估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~~  
126 ~~用低浓度的微生物，因此与其它验证参数相比，需要更多的重复次数以满足~~  
127 ~~统计学要求。~~

### 3. 重现性

128 ~~微生物~~定性~~检~~试验的重现性是指相同的样品在正常的实验条件（如实验  
129 ~~地点、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~~  
130 ~~结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~~  
131 ~~操作和环境变化的抵抗能力。~~

132 ~~方法使用者应优先测定该验证参数。重现性验证方法时：~~在样品中接种  
133 ~~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，~~  
134 ~~分别由不同人员，在不同时间在不同实验室，使用不同的试剂（或仪器）进~~  
135 ~~行检验，采用并选择合适宜的统计学方法如卡方检验（ $\chi^2$ ）来评价两种方法~~  
136 ~~的重现性是否存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~~  
137 ~~与经典方法进行比较。验证过程中，应关注样品的一致性。~~

### 4. 耐用性

138 ~~微生物~~定性~~检~~试验的耐用性是指当方法参数存在测定条件有小的刻意变  
139 ~~化变动时，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~~  
140 ~~靠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~~  
141 ~~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有特殊条件~~  
142 ~~要求，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~~  
143 ~~的。~~

145 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  
146 作点。

### 147 样品中微生物~~检验~~定量~~检验~~试验方法的验证

148 ~~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~~  
149 ~~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~~  
150 ~~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~~  
151 ~~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~~  
152 ~~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~~  
153 ~~于微生物数据的统计分析。~~

#### 154 1.准确度

155 ~~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  
156 验结果~~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  
157 行验证，通常用微生物的回收率（%）来表示。

158 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  
159 的菌悬液，菌悬液的浓度应选择为能够准确计数的~~最高适宜~~浓度，然后系列  
160 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，  
161 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  $10^0$   
162 cfu/ml。每个试验菌~~通常应选择不少于至少选择~~5 个菌浓度进行准确度确  
163 认，~~替代方法的检验结果不得少于药典方法检验结果的 70%，也可以应~~采用  
164 ~~合适~~的统计学方法~~表明证明~~替代方法的回收率~~至少与药典经典方法一致无~~  
165 显著性差异，例如采用方差分析并结合  $t$  检验评价方法回收率之间的差异。  
166 当两种测定方法原理不同，无法用回收率进行准确度评价时，应证明两种方  
167 法具有明确的相关性。当替代方法的回收率高于~~药典经典~~方法时，有必要结  
168 合专属性项下的有关内容对准确度进行评价。

#### 169 2.精密度

170 ~~微生物~~定量~~检验~~的精密度是指在检验范围内，对同一~~个份~~均匀~~的~~样品  
171 多次~~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  
172 对标准偏差~~或其他适宜的方式~~来表示，~~也可以采用其他适宜的方式~~。

173 在相同条件下，由同一个实验人员测定所得结果的精密度称为重复性；  
 174 在同一实验室内的条件改变，如不同时间、不同实验人员、不同仪器等测定  
 175 结果之间的精密度，称为中间精密度；不同实验室测定结果之间的精密度，  
 176 称为重现性，重现性可视为微生物检验方法在检验结果上对操作和环境变化  
 177 的抵抗能力。

178 ~~精密度重复性验证的方法是~~：制备试验菌的菌悬液，菌悬液的浓度应选  
 179 择为能够准确读数计数的最高适宜浓度，然后系列稀释至较低浓度（如小于  
 180 10cfu/ml）。每个试验菌通常应选择不少于至少选择其中至少5个浓度的菌悬  
 181 液进行检验。每一个浓度通常应至少应进行不少于10次重复检验，以便能够  
 182 采用统计分析方法得到标准偏差或相对标准偏差（RSD）。~~一般情况下，可以~~  
 183 ~~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~~  
 184 ~~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~~  
 185 ~~可接受的相对标准偏差（RSD）与含菌浓度的关系见表2。~~

186 表2 ~~不同含菌浓度下预期的相对标准偏差~~

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

187  
 188 中间精密度或重现性验证方法：在样品中接种一定数量的试验菌（接种  
 189 量应在定量限以上），采用替代方法，在同一实验室内的条件改变（如不同  
 190 时间、不同实验人员、不同仪器等）情况下或在不同实验室间进行检验，并  
 191 选择适宜的统计学方法对结果进行评估，如采用t检验评价实验结果的差异  
 192 性。替代方法的中间精密度及重现性评价不需要将其与经典方法进行比较。  
 193 验证过程中，应关注样品的一致性。

### 194 3. 专属性

195 ~~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  
 196 法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  
 197 分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  
 198 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

199 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  
200 造成影响。

201 专属性验证 **方法：时**，应设计能够设计出可能使替代方法出现假阳性的  
202 实验模型来进行挑战 **替代方法**，必要时可使用混合微生物，从而确认替代方  
203 法的 **适用性专属性**。当替代方法不 **依赖** 以微生物生长 **出菌落或出现混浊就可**  
204 **以信号进行** 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  
205 定量方法），以上验证方式 **就显得更为** 尤为重要。

#### 206 4. 定量限

207 **微生物** 定量 **检** 试验的定量限是指样品中能被准确定量测定的微生物最低  
208 数量。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，  
209 ~~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~~  
210 ~~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~~  
211 ~~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~~  
212 ~~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~~  
213 在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**  
214 **足检测要求**。

215 定量限验证 **的方法** 是：**通常** 在检验范围的 **低限最低浓度** 附近制备 **至少 5**  
216 份不同 **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  
217 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 **药典经典** 方法结  
218 果在 **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~~  
219 **时的最低浓度即为方法的定量限**。

#### 220 5. 线性

221 **微生物** 定量 **检** 试验的线性是指在一定范围内，检验结果与样品中微生物  
222 数量成比例关系的程度。线性验证 **方法：时** 必须覆盖能够准确测定的所有浓  
223 度范围。每株试验菌应选择至少 5 个浓度，每个浓度 **通常** 至少测定 5 次。~~根~~  
224 ~~据以上实验数据，选取准确度及精密度符合要求的所有浓度梯度数据，以检~~  
225 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，  
226 计算 **相关系数 r** 决定系数  **$R^2$** 。~~当相关系数不能准确评估线性时，只能确定~~  
227 ~~简单大约的关系值。替代方法的相关系数决定系数不得低于 0.950.9。~~

## 228 6.范围

229 ~~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，  
230 ~~检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  
231 和线性符合一定要求的微生物高低限浓度或量的区间。

## 232 7.重现性

233 ~~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~~  
234 ~~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~~  
235 ~~果的精密度的接近程度。重现性可视为微生物检验方法在检验结果上抵抗对操~~  
236 ~~作和环境变化的抵抗能力。~~

237 ~~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~~  
238 ~~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~~  
239 ~~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~~  
240 ~~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~~  
241 ~~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~~  
242 ~~结果的差异性。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~~  
243 ~~证过程中，应关注样品的一致性。~~

## 244 8.耐用性

245 ~~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  
246 ~~化变动时，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~~  
247 ~~靠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~~  
248 ~~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有特殊条件~~  
249 ~~要求，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~~  
250 ~~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~~  
251 ~~作点。~~

---

起草单位：浙江省食品药品检验研究院 联系电话：0571-85191528

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

## 9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则

### 第二次公示稿修改说明

根据 2022 年 11 月 9201 药品微生物检验替代方法验证指导原则首次公示稿的反馈意见和建议，国家药典委员会微生物专业委员会进行了研讨，在第一次公示稿的基础上修订了部分内容，主要为：

1. 明确对于已上市产品的评价需按照经注册或备案批准的质量标准中方法进行检验，若标准中没有明确微生物检验方法，则应按照药典方法进行检验。
2. 为更好阐述验证过程的基本要求，将表 1 相关内容提前同时进行全面修订，明确不同检验类型在不同场景下需至少验证的参数；对于精密度参数，与通则 9101 保持一致，新增重复性和中间精密度相关内容，并将重现性归入精密度范畴。
3. 验证过程的菌浓度选择、平行试验次数等需根据所采用的统计学方法确定，文中删除“应”、“至少”等强制性要求，修订为参考性建议。
4. 参考指导原则 9101 相关内容，新增重复性、中间精密度和重现性的相关定义，并将下文中原重现性相关内容合并至精密度。
5. 根据重复性的验证方法，新增中间精密度及重现性的验证方法。
6. 决定系数根据统计学相关书籍和国外的相关指导原则修订为  $R^2$ 。
7. 将文本中微生物检验方法统一修订表达为定性试验和定量试验。