

附件：药品微生物分析方法验证、确认及转移指导原则草案公示稿（第一次）

药品微生物分析方法验证、确认及转移指导原则

本指导原则用于指导研究、生产及检测等机构在药品微生物分析方法全生命周期中的验证、确认及转移，涵盖分析方法的开发、验证及变更等过程。本指导原则针对药品微生物的特点，明确了方法学考察的参数及其可接受限度要求，主要分为药品微生物分析方法验证、药品微生物分析方法确认和药品微生物分析方法转移三个部分。

一、药品微生物分析方法验证（validation）

（一）总则

药品微生物分析方法验证的目的是证明建立的方法适合于相应检测要求。验证应尽可能全面，以满足预期用途或应用领域的需要。适用药品微生物分析方法验证的情境包括但不限于：

- （1）新方法的开发；
- （2）已有分析方法的修订（修订内容对方法的性能参数、测定结果等可能产生影响）；
- （3）超范围使用法定方法。

对无参考方法的验证可采用自然污染或人工污染等方式，对预先设定的指标进行验证；对有参考方法（通常将法定方法或原方法作为参考方法）的验证可采用待验证方法与参考方法比较的方式进行。

（二）验证的一般要求

方法开发实验室选择适宜的性能参数开展验证。对可能在多个实验室中使用的方法，特别是制定法定方法时，应开展实验室间验证。

1. 验证参数的选择

药品微生物分析方法主要分三种类型：定性方法、定量方法和鉴定方法。定性方法是指测定样品中是否存在目标微生物的方法；定量方法是指测定样品中目标微生物数量或浓度的方法；鉴定方法是借助现有的分类系统，通过对微生物的特征测定，对其进行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分，或属、种及菌株水平确认的方法。

一般情况下，应验证新方法的全部性能参数，如开发基于培养原理的新的

29 不可接受微生物检查法等。对于替代以培养为基础的经典微生物检验方法的验证，
30 可参照药品微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）实施。微生物
31 鉴定方法的验证按微生物鉴定指导原则（指导原则 9204）实施。

32 如对已有分析方法的修订涉及样品前处理、改变培养条件等，或超出预定
33 范围使用法定方法，方法开发或使用者应综合考虑风险，评估技术可行性，根
34 据预期用途选择适宜的性能参数进行验证。微生物分析方法验证参数的选择可
35 参考表 1。一般定性方法至少选择检测限、定量方法至少选择准确度进行实验室
36 间验证。

37

38

表 1. 微生物分析方法验证参数

参数	定性方法	定量方法
专属性	+	+*
准确度	-	+
精密度		
重复性	-	+
中间精密度	-	+*
重现性	+	+*
检测限	+	-
定量限*	-	+
线性	-	+
范围	-	+
耐用性	+	+

39 注 1: +表示需要验证的参数; -表示不需要验证的参数。

40 注 2: *可根据用途和需要选做。

41 2. 样品

42 方法开发实验室应根据方法规定的预期用途，兼顾药品的剂型和给药途径
43 选择适宜的样品。验证时优先选择自然污染的样品，如果无法获得足够数量的
44 自然污染样品，可使用人工污染的样品。制样时宜包含不同浓度的背景微生物。
45 实验室间验证时应确保所用样品的一致性。

46 3. 数据处理

47 一般由方法开发实验室负责实验室内及实验室间数据的统计和分析。可采用
48 用格拉布斯（grubbs）检验等统计学方法或经确认适宜的分析方法。定量数据
49 可进行适当转换（如转换为常用对数值）后进行统计分析。

50 (三) 验证内容

51 1. 专属性（specificity）

52 微生物定性分析方法的专属性指检测样品中可能存在的特定微生物种类的
53 能力。微生物定量分析方法的专属性是指在非目标微生物和（或）其他成分可
54 能存在的情况下，采用的分析方法能正确测定目标微生物的能力。当微生物分
55 析方法以微生物生长信号作为判断微生物是否存在时，其专属性验证应确认所
56 用培养体系的促生长能力，还应考虑检测系统中外来物质的存在对生长信号或
57 微生物生长的影响。当微生物分析方法不以微生物生长信号作为判断指标时，
58 其专属性验证应确认检测系统中外来物质不会对结果产生干扰。验证时，选择
59 的菌株应能反映目标微生物和非目标微生物的多样性，如不同表型、基因型和
60 （或）血清型。

61 专属性验证包括包容性试验（inclusivity）和排他性试验（exclusivity）。包
62 容性是指方法检出目标微生物的能力，排他性是指方法不受非目标微生物干扰
63 的能力。包容性试验一般选择不少于 20 株目标微生物，排他性试验一般选择
64 不少于 20 株非目标微生物。应选取代表性微生物，特别是样品中常见的微生物种
65 群，并尽可能将其鉴定到种。试验时，每个测试中微生物的接种量宜控制在 10^2
66 -10^3 cfu。

67 包容性试验结果应能检出全部目标微生物，排他性试验结果不应检出非目
68 标微生物。

69 2. 准确度（accuracy）

70 微生物定量分析方法的准确度是所建立方法的测定结果与样品接受参考值
71 （无参考方法）或参考方法测定结果的一致程度。准确度通常用回收率（%）
72 表示，计算方法可参考药品微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）
73 中定量方法的回收率。也可计算待验证方法的 β -期望容忍区间（ β -ETI）的上下
74 限，评价待验证方法是否符合要求。该统计方式计算的准确度是精密度、重复
75 性等参数的集中体现。方法开发实验室亦可选择其他适宜的统计方式。

76 如采用 β -ETI 的统计方式，可选择低、中、高 3 个浓度水平，同时设置 1 个

77 空白对照。实验室内验证时，每个浓度各取 2 个样品，每个样品一般重复测试
78 不少于 5 次；实验室间验证时，每个浓度各取 1 个样品，每个样品一般重复测
79 试不少于 2 次。准确度验证的接受限通常设定为 ± 0.5 个对数值，必要时可根据
80 需要重新计算和设定新的接受限。如所有样品计算的 β -ETI 上限都不高于 0.5 个
81 对数值，且下限都不低于 -0.5 个对数值，则待验证方法的准确度符合要求；如
82 部分样品计算的 β -ETI 上限高于 0.5 个对数值或下限低于 -0.5 个对数值，但均不
83 超出接受限，则待验证方法准确度符合要求；除上述情况外，待验证方法准确
84 度不符合要求。

85 3. 精密度 (precision)

86 精密度是指在规定条件下，对同一份均匀样品多次取样测定，其检验结果
87 的接近程度。通常用偏差、标准偏差、相对标准偏差或置信区间等方式表示。
88 在相同条件下，由同一个分析人员测定结果的精密度称为重复性；在同一个实
89 验室内的条件改变，如不同时间、不同分析人员、不同设备等测定结果之间的
90 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，称为重现性。
91 已有重现性验证结果，则无需验证中间精密度。相关统计可参考药品微生物检
92 验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）中定量方法的精密度。

93 如平板计数方法测定的菌落数服从泊松分布，随着菌落数的降低，计数误
94 差显著增加，验证时可根据需要设定接受限度。

95 4. 检测限 (limit of detection, LOD_x)

96 微生物定性分析方法的检测限是指在设定检验条件和特定检出概率 (x) 下，
97 能检出样品中微生物的浓度。通常以 LOD_{50} 或相对检出限 (RLOD) 表示。
98 RLOD 是待验证方法与参考方法 LOD_{50} 之间的比值。也可采用药品微生物检验
99 替代方法验证指导原则（指导原则 9201）中的检测限、置信区间、POD 模型等
100 适宜的统计方式进行分析。

101 实验室内验证时，一般测试 20 个平行样品。实验室间验证时，每个验证实
102 验室一般测试 8 个平行样品。试验菌的接种量以出现部分阳性结果为宜，阳性
103 结果数占测试总数的比例一般为 25%~75%。同时分别设置空白对照和阳性对
104 照（污染水平是检测限的 10 倍以上）各 1 个。

105 如验证时无参考方法，采用待验证方法进行测试，可根据式 (1) 计算
106 LOD_{50} ，单位为 cfu/g (ml)。

$$LOD_{50} = \frac{0.7 \times d}{\ln(n/(n-y))} \dots \dots \dots (1)$$

108 式中：

109 d ——样品接受参考值，单位为 cfu/g (ml)；

110 y ——经确证的阳性结果数；

111 n ——重复测试数。

112 如验证时有参考方法，分别采用参考方法和待验证方法进行测试，根据式

113 (2) 计算 RLOD。

$$RLOD = \frac{\ln(n_{ref}/(n_{ref}-y_{ref}))}{\ln(n_{val}/(n_{val}-y_{val}))} \dots \dots \dots (2)$$

115 式中：

116 y_{ref} ——参考方法检测的阳性结果数；

117 n_{ref} ——参考方法检测的重复测试数；

118 y_{val} ——待验证方法检测的经确证的阳性结果数；

119 n_{val} ——待验证方法检测的重复测试数。

120 配对分析的接受限一般设定为 1.5，非配对分析的接受限一般设定为 2.5。

121 5. 定量限 (limit of quantification, LOQ)

122 微生物定量分析方法的定量限是指样品中能被准确定量测定的微生物的最
123 低数量。一般当待验证方法的检测原理不是基于对目标微生物的菌落进行计数
124 时，才需验证定量限。例如仪器测定微生物生长相关的荧光值等。验证时若无
125 参考方法，可采用待验证方法测试空白样品，至少测试 10 份，结果用于估计基
126 线或值的标准偏差。通常建议将仪器测试空白值加上 10 倍的重复性标准偏差作
127 为分析方法的 LOQ。如果验证时有参考方法，可参考药品微生物检验替代方法
128 验证指导原则（指导原则 9201）中定量方法的定量限。

129 6. 线性 (linearity) 和范围 (range)

130 微生物定量分析方法的线性是指在一定范围内，测定结果与样品中微生物
131 数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。
132 微生物定量分析方法的范围是指适用检验方法且准确度、精密度和线性符合一
133 定要求的微生物高低限浓度或量的区间。可参考药品微生物检验替代方法验证
134 指导原则（指导原则 9201）中定量方法的线性和范围。

135 7. 耐用性 (robustness)

136 耐用性是指在测定条件有小的刻意变化时，测定结果不受影响的承受程度，
137 为所建立的方法用于常规检验提供依据。开始研究分析方法时，就应考虑其耐
138 用性。如果测试条件要求苛刻，则应在方法中注明可接受变动的范围。典型的
139 影响因素有样品制备方法、培养温度、培养时间等。

140 8. 相对正确度 (relative trueness)

141 必要时可验证微生物定量分析方法的相对正确度。通常使用自然和（或）
142 人工污染样品。可使用 Bland-Altman 方法分析，计算待验证方法和样品接受参
143 考值（无参考方法）或参考方法的平均值和差值，偏倚可用这两种方法测定结
144 果的差值的平均值进行估计，平均值的变异情况用差值的标准差描述。95%的
145 差值都应位于偏倚的 95%置信区间内。

146 9. 不确定度 (uncertainty)

147 一般情况下，实验室无需对微生物定性分析方法开展不确定度评定，但应
148 尽可能了解试验结果的可变性。必要时，实验室应对微生物定量分析方法开展
149 不确定度评定。微生物定量分析方法的不确定评定主要来源包括样品因素（质
150 量和体积等）和非样品因素（操作者、时间、设备、培养基和试剂等）。

151 二、药品微生物分析方法确认 (verification)

152 (一) 总则

153 药品微生物分析方法确认的目的是证实实验室具有使用法定方法的能力，
154 同时证实该法定方法适用于被分析的样品。当实验室首次使用法定方法（含修
155 订后的法定方法）时，应进行方法确认。

156 首次使用法定方法时，应首先确保实验室的人员、仪器设备等满足药品微
157 生物实验室质量管理指导原则（指导原则 9203）的相关要求。实验室一般无需
158 对法定方法进行完整的再验证，可根据评估结果参考表 2 进行确认。方法确认
159 的范围和参数取决于实验人员的经验水平、分析方法种类、相关仪器设备、操
160 作步骤和分析对象等。

161 对于修订后的法定方法，实验室应评估修订内容，除文字修订外，涉及培
162 养基、培养温度、检测设备等对结果有影响的关键步骤的修改，应进行确认。

163 经评估实验室及分析人员有能力使用微生物法定分析方法后，采用该法定
164 方法，如无菌或微生物限度检查法用于具体品种检验时，可按方法适用性试验
165 进行确认，具体参考无菌检查法（通则 1101）、非无菌产品微生物限度检查：微

166 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（通则
167 1106）及中药饮片微生物限度检查法（通则 1108）等。

168 (二) 确认要求

169 1. 确认参数

170 实验室内方法确认应根据使用情境和适用范围不同，选择适宜参数。推荐
171 的确认参数见表 2。鉴定方法的确认按微生物鉴定指导原则（指导原则 9204）
172 执行。

173 表 2. 微生物分析方法确认推荐参数

参数	定性方法	定量方法
专属性	+	+*
准确度	-	+
精密度	-	+
检测限	+	-

174 注：*可根据用途和需要选做。

175 2. 样品

176 实验室应选择与实验目的相匹配的适宜样品。一般选择 1-3 批代表性样品开
177 展试验。如对无菌检查法的确认应选择无菌制剂；非无菌制剂微生物限度检查，
178 可综合考虑目标微生物种类、给药途径、产品剂型，样品性状、供试液制备方
179 法、抑菌活性等选择合适的样品。
180

181 3. 确认内容

182 (1) 专属性

183 确认法定方法时，通常在供试品中添加检测限 10 倍的目标微生物进行包容
184 性测试，并至少选择 1 种与特定微生物具有类似特性的菌株进行排他性测试。
185 应根据分析方法检测目标确定排他性测试菌种。如方法检测到属，宜选择相同
186 科内的不同属；如方法检测到种，宜选择相同属内的不同种。此外，如待确认
187 方法以微生物生长信号作为判断微生物是否存在时，应确认所用培养体系的促
188 生长能力符合规定。

189 包容性试验结果应能检出全部目标微生物；排他性试验结果不应检出非目
190 标微生物。

191 (2) 准确度

192 定量试验的准确度可采用回收率评估，回收率应在 0.5-2.0 之间。也可采用
193 其他适宜的统计方法，待确认方法的准确度应满足相应要求。

194 (3) 精密度

195 定量试验的精密度可通过考察中间精密度，用估计偏差或重复性标准偏差
196 的方法确认。采用待确认方法，可由不同分析人员或不同试验日期等进行两次
197 测定。每次测定可选择适宜的三个连续污染浓度的样品，每个浓度一般测试不
198 少于 10 次重复。

199 估计偏差：两次测定结果之间的差值在 0.5 个对数值以内。

200 重复性标准偏差 (S_r)：该评估方法需已知方法的重复性标准偏差 (S_R)。
201 按照公式 (3) 计算，接受限不大于 $2S_R$ 。

$$202 S_r = \sqrt{\frac{1}{2n} \sum_{i=1}^n (y_{iA} - y_{iB})^2} \dots\dots\dots (3)$$

203 i 是测试样品序号， $1 \leq i \leq n$ (n 为重复次数， y_{iA} 和 y_{iB} 是两次试验 (A 人员和
204 B 人员，或 A 日期和 B 日期等) 测试数据的常用对数值。

205 (4) 检测限

206 在供试品中添加与待确认定性方法的检测限浓度相当的目标微生物进行 20
207 次重复测试，同时分别设置空白对照和阳性对照各 1 组。其中阳性对照污染水
208 平一般大于检测限的 10 倍。空白对照结果应为未检出，阳性对照结果应为检出，
209 检测限测试组阳性检出比例一般为 50%左右。

210 4. 确认豁免

211 除另有规定外，经评估下列情况可确认豁免：

212 (1) 法定方法的修订仅为文字修订等，对实验结果无实质性影响。

213 (2) 对含有相同成分且浓度相同，仅规格不同的制剂，可豁免部分产品的
214 确认。

215 (3) 参与法定方法验证的实验室。

216 三、药品微生物分析方法转移 (transfer)

217 (一) 总则

218 微生物分析方法转移是保证不同实验室之间获得一致、可靠和准确检测结
219 果的重要环节，同时也是对实验室检测能力的重要评估。

220 当一个实验室（方法接收实验室）需采用另一实验室（方法转移实验室）
221 建立并经过验证的非法定方法检测样品时，需进行方法转移。转移方通常是方
222 法开发方，负责提供分析方法过程、试验菌株信息、验证报告和必需文件，并
223 在方法转移过程中根据接收方需要提供必要的培训和帮助，如企业研发实验室、
224 研发外包实验室或集团实验室等。接收方可以是企业质控实验室、公司内部
225 的其他部门、或其他公司等。

226 微生物分析方法的转移可通过多种途径实现。

227 (1) 比对试验

228 比对试验是分析方法转移最常用的方法。由于微生物活体的性质，存在的
229 影响因素较多，为确保样品的一致性和稳定性，通常采用人工污染等方式制备
230 样品进行比对试验。分析时要依据已被批准的转移方案，方案包括明确操作步
231 骤、使用的样品信息、预先制定验收标准和可允许偏差等。检查结果符合预先
232 制定的可接受标准是确保接收方有资格运行该方法的必要条件。

233 (2) 两个或多个实验室间共同验证

234 执行分析方法验证的实验室要具备运行该分析方法的资格。转移方可与接
235 收方共同开展实验室间验证，获得重现性评估数据。共同验证应按预先批准的
236 转移或验证方案进行。方案中应明确具体方法、所用样品和可接受标准等。共
237 同验证应满足实验室间验证的要求。

238 (3) 再验证

239 方法接收实验室可对该方法进行再验证或部分验证，实现方法转移。再验
240 证时应对应药品微生物分析方法验证中收录的可能在转移过程中受影响的验证指
241 标进行说明。

242 (二) 转移步骤

243 分析方法转移前，转移方应提供完整的验证报告及技术细节，对接收方进
244 行培训。接收方应安排有资质的技术人员参加培训，充分了解方法的基本原理、
245 检测参数、数据分析方法等内容，提供满足要求的设施和设备。

246 转移的双方应对通过讨论达成共识并制定文件形成转移方案。建议方案可
247 以包含以下内容：转移的目的、范围、双方责任、使用的微生物菌株及制备方
248 法、样品处理方法、试剂和培养基、仪器设备、分析方法、试验设计、最差测
249 试条件的考量和方法转移中使用的可接受标准。根据验证数据和验证过程知识，

250 转移方案应明确需要评价的指标（可参考微生物分析方法验证部分表1）和用于
251 评价可接受结果的分析。可接受标准不应低于中国药典要求，对于中国药典无
252 明确要求的，双方应约定可接受标准。

253 完成分析方法转移后，接收方应起草方法转移报告，报告应提供与可接受
254 标准相关的实验结果，确认接收方已具备使用该方法的能力。报告中应完整记
255 录实施过程中的所有偏差并说明理由。如实验中发现重大偏差，接收实验室需
256 及时通知转移实验室，必要时共同分析原因。

257 若实验结果符合指定的可接受标准，则分析方法转移成功。若结果不符合
258 可接收标准，接收实验室应在转移方的协助下调查根本原因，采取有效的纠正
259 措施，整改完成后再次测试，以达到可接受标准的要求。

260 (三) 转移豁免

261 不同实验室很难制备完全相同的微生物样本，并完全重现微生物分析方法的
262 结果。因此，应慎重评估微生物分析方法转移豁免的风险。如果符合转移豁
263 免条件，接收方应根据豁免理由形成文件。

264 转移豁免的一般条件如下：

265 (1) 新的待测定样品的组成与已有样品的组成类似和（或）活性组分的浓
266 度与已有样品的浓度类似，并且接收方有使用该分析方法的经验。

267 (2) 被转移的分析方法与接收方已使用方法相同或相似；

268 (3) 转移方负责方法开发、验证或日常分析的人员调转至接收方。

起草单位：上海市食品药品检验研究院牵头，辽宁省药品检验检测院、天津市药品检
验研究院主要参与。

联系电话：18001677230

复核单位：浙江省食品药品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、北京市药品检
验研究院

药品微生物分析方法验证、确认及转移指导原则起草说明

一、目的意义

准确的分析结果依赖于可靠的分析方法，而科学地建立与使用分析方法需要
要进行适宜的方法学考察和评价。目前，《中国药典》和国外主流药典中与方法

学有关的指导原则和技术文件都是针对化学分析方法或者是生物分析方法中的理化分析部分制订的，缺失了微生物分析方法的验证、确认和转移指导原则。由于微生物活体的性质，存在的影响因素较多、微生物试验变异性大，比理化、生物分析方法更复杂。2020 年版《中国药典》四部通则收载 9099 分析方法确认指导原则、9100 分析方法转移指导原则及 9101 分析方法验证指导原则等 3 个关于分析方法的指导原则均明确指出不包括微生物分析方法。国外药典和相关法规也为类似规定。同时，各国药典中与微生物验证相关的指导原则仅针对快速检测方法，均不包括新建药品微生物分析方法的验证，未涵盖药品微生物分析方法确认，无药品微生物分析方法转移的要求。

本指导原则旨在明确《中国药典》微生物分析方法中关于验证、确认及转移的术语和定义，规范其使用场景，指导药品微生物分析方法建立、使用的全过程，保证微生物分析方法在药品领域的科学应用。

二、起草过程

本项目由国家药典委员会委托上海市食品药品检验研究院牵头，辽宁省药品检验检测院、浙江省食品药品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、天津市药品检验研究院、北京市药品检验研究院等单位共同参与起草。课题组通过广泛的文献标准规范调研、行业应用分析，邀请行业知名专家学者、方法开发机构等方式开展多次研讨交流，拟订《药品微生物分析方法验证、确认及转移标准草案》。为保证药品微生物分析方法结果的准确性和相关参数设置的科学性，课题组分别进行了药品微生物定性和定量分析方法的实例研究，组织实施了实验内和实验室间复核，探讨了技术指标设置及拟订指导原则的实际应用场景，为药典标准制订提供实践指导和数据支撑。

三、总体思路

随着微生物检验理念和技术的进步，制药领域不断引入新的微生物分析方法，本指导原则定位于通用性技术要求，旨在规范、指导和推动新标准方法及非标方法在实验室的应用。

标准草案中样品选择、参数设置和数据统计要求等参考国内外分析方法验证、确认及转移相关的法规、文献和技术指南，主要包括：《中国药典》2020 年版通则 9099、9100、9101 和 9201；《美国药典》通则<1223>、<1224>、<1225>、<1226>、<1227>、<1032>、<1033>、<1034>；《欧洲药典》通则<5.25>；《日本

药典》；ICH Q2 (R1) 指导原则；ISO 系列标准 (ISO 16140 part 1-6、ISO 17468、ISO 1384843)；AOAC 国际方法委员会食品及环境表面微生物方法的验证指南 (2012)；PDA (TR 33 和 TR 65)；GB 4789.45-2023、RB/T 033-2020、SN/T3266-2012 等。

四、关于主要内容的说明

参照《中国药典》2020 年版四部通则 9099、9100、9101 及 9201 的体例，本草案分为三个板块，分别为药品微生物分析方法验证、药品微生物分析方法确认和药品微生物分析方法转移。其中，验证部分的主要内容包括总则、验证的一般要求和验证内容；确认部分的主要内容包括总则、确认要求、确认内容和确认豁免；转移部分包括总则、转移步骤和转移豁免。