

9213 兽药微生物分析方法验证、确认及转移指导原则（新增）

本指导原则用于指导研究、生产及检测等机构在兽药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。本指导原则针对兽药微生物的特点，明确了方法学考察的参数及其可接受限度要求，主要分为兽药微生物分析方法验证、兽药微生物分析方法确认和兽药微生物分析方法转移三个部分。

一、兽药微生物分析方法验证（validation）

（一）总则

兽药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。适用兽药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（如开发基于培养原理的新的不可接受微生物检查法等）
- （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）超出预定范围使用的法定方法。

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

兽药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。对于替代以培养为基础的经典微生物检验方法的验证，可参照兽药微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）实施。微生物鉴定方法的验证按微生物鉴定指导原则（指导原则9204）实施。

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，或超出预定范围使用法定方法，方法开发或使用应综合考虑风险，评估技术可行性，根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间验证。

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	+	+

注 1：+表示需要验证的参数；-表示不需要验证的参数。

注 2：*可根据用途和需要选做。

2. 样品

方法开发实验室应根据方法规定的预期用途，兼顾兽药的剂型和给药途径选择适宜的样品。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。实验室间验证时应确保所用样品的一致性。

3. 数据处理

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。定量数据可进行适当转换（如转换为常用对数值）后进行统计分析。

（三）验证内容

1. 专属性（specificity）

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，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（或）血清型。

专属性验证包括包容性试验（inclusivity）和排他性试验（exclusivity）。包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 $10^2 \sim 10^3$ cfu。

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标微生物。

2. 准确度（accuracy）

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（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（%）表示，计算方法可参考兽药微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）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。

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，待验证方法准确度不符合要求。

3. 精密度 (precision)

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。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。已有重现性验证结果，则无需验证中间精密度。相关统计可参考兽药微生物检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。

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，计数误差显著增加，验证时可根据需要设定接受限度。

4. 检测限 (limit of detection, LOD_x)

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，能检出样品中微生物的浓度。通常以 LOD₅₀ 或相对检出限（RLOD）表示。RLOD 是待验证方法与参考方法 LOD₅₀ 之间的比值。也可采用兽药微生物检验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（probability of detection）模型等适宜的统计方式进行分析。

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照（污染水平是检测限的 10 倍以上）各 1 个。

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 LOD₅₀，单位为 cfu/g（ml）。

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

式中 d —— 样品接受参考值，单位为 cfu/g（ml）；

y —— 经确证的阳性结果数；

n —— 重复测试数。

如验证时有参考方法，同时采用参考方法和待验证方法进行测试，根据式（2）计算 RLOD。

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

式中 y_{ref} —— 参考方法检测的阳性结果数；

n_{ref} —— 参考方法检测的重复测试数；

y_{val} —— 待验证方法检测的经确证的阳性结果数；

n_{val} —— 待验证方法检测的重复测试数。

两种定性方法同时检验某一样品时，若第一步增菌方法相同，可使用该样品的同一试样进行分析，该分析称为“配对分析”，接受限一般设定为 ≤1.5；若第一步增菌方法不同，则使用该样品的不同试样分别进行分析，该分析称为“非配对分析”，接受限一般设定为 ≤2.5。

4. 定量限（limit of quantification，LOQ）

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为分析方法的 LOQ。如果验证时有参考方法，可参考兽药微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则 9201）中定量方法的定量限。

6. 线性（linearity）和范围（range）

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。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

定要求的微生物高低限浓度或量的区间。可参考兽药微生物检验替代方法验证指导原则（指导原则9201）中定量方法的线性和范围。

7. 耐用性（robustness）

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，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。典型的影响因素有样品制备方法、培养温度、培养时间等。

8. 相对正确度（relative trueness）

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）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%的差值都应位于偏倚的95%置信区间内。

9. 不确定度（uncertainty）

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）。

二、兽药微生物分析方法确认（verification）

（一）总则

兽药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，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（含修订后的法定方法）时，应进行方法确认。

首次使用法定方法时，应首先确保实验室的人员、仪器设备等满足兽药微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、操作步骤和分析对象等。

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。

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1106）等。

（三）确认要求

1. 确认参数

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）执行。

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	+	-

注：*可根据用途和需要选做。

2. 样品

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，可综合考虑目标微生物种类、给药途径、产品剂型，样品性状、供试液制备方法、抑菌活性等选择合适的样品。

3. 确认内容

（1）专属性

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。

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生长能力符合规定。

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标微生物。

(2) 准确度

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。

(3) 精密度

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测定。每次测定可选择低、中、高 3 个浓度水平的样品，每个浓度一般测试不少于 10 次重复。

估计偏差：两次测定结果之间的差值在 0.5 个对数值以内。

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 ）。

按照公式（3）计算，接受限不大于 $2S_R$ 。

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

式中 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 B 人员，或 A 日期和 B 日期等）测试数据的常用对数值。

(4) 检测限

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 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，检测限测试组阳性检出比例一般为 50% 左右。

4. 确认豁免

除另有规定外，经评估下列情况可确认豁免：

- (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。
- (2) 对含有相同成分且浓度相同，仅规格不同的制剂，可豁免部分产品的确认。
- (3) 参与法定方法验证的实验室。

三、兽药微生物分析方法转移（transfer）

（一）总则

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

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）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、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、公司内部的其他部门、或其他公司等。

微生物分析方法的转移可通过多种途径实现。

（1）比对试验

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。

（2）两个或多个实验室间共同验证

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。共同验证应满足实验室间验证的要求。

（3）再验证

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。再验证时应对照兽药微生物分析方法验证中收载的可能在转移过程中受影响的验证指标进行说明。

（二）转移步骤

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、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。

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

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，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，对于中国药典无明确要求的，双方应约定可接受标准。

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，接收实验室需及时通知转移实验室，必要时共同分析原因。

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，采取有效的纠正措施，整改完成后再次测试，以达到可接受标准的要求。

（三）转移豁免

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。如果符合转移豁免条件，接收方应根据豁免理由形成文件。

除另有规定外，经评估下列情况可转移豁免：

- （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。
- （2）被转移的分析方法与接收方已使用方法相同或相似；
- （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。
- （4）参与共同验证的实验室。