

药品微生物限度检查误差的影响因素及控制方法

张小莉

(陕西省咸阳市食品药品检验检测中心, 陕西 咸阳 712000)

摘要:目的 分析药品微生物限度检查误差的影响因素及控制方法。方法 从人、机、料、法、环5个途径着手分析,通过解读2015年版《中国药典(四部)》通则9203和通则9205,并结合微生物实验室工作经验,提出简单可行及保障结果准确的措施。结果与结论 为避免实验误差,上述5条途径均需加以注意。人,微生物实验员应具备极强的责任心和专业理论水平;机,应使用合格设备;料,注意抽样代表性和抽样环境,保证培养基质量并定期更换消毒液;法,选用合适、准确的方法标准、判断标准和人员操作标准及规范;环,按照《中国药典》要求控制环境。

关键词:药品;微生物限度检查;误差;影响因素;控制方法

中图分类号:R927.12

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)06-0090-03

Influence Factors and Control Approach of Error in Microbial Limit Test of Drug

Zhang Xiaoli

(Xianyang Food and Drug Inspection Center, Xianyang, Shaanxi, China 712000)

Abstract: Objective To analyze the influence factors and control approach of error in microbial limit test of drug. **Methods** The analysis was carried out from 5 aspects of human, equipment, material, method and environment. By explicating the general rule 9203 and general rule 9205 of *Chinese Pharmacopoeia* (2015 Edition, Volume IV), and combining with the work experience in the microbiology laboratory, we put forward some simple and feasible measures to ensure the accuracy of the results. **Results and Conclusion** In order to avoid the error of test, the above 5 aspects needed to be paid attention to. Human: microbiological experimenter must have strong sense of responsibility and professional theory level. Equipment: the instrument and equipment should be qualified. Material: the representativeness of sampling and the environment of sampling should be pay attention to, in order to ensure the quality of the medium and replace the disinfectant regularly. Method: the appropriate and accurate method standards, criterions for judgments and standards and specifications for personnel operation were selected. Environment: the environment was controlled according to the *Chinese Pharmacopoeia*.

Key words: drug; microbial limit test; error; influence factors; control approach

药品质量评价标准除理化指标外,还有生物学指标。生物学检验包括少数制剂(如注射剂、植入剂及部分眼

第一作者:张小莉(1973-),大学本科,主管药师,主要从事药物分析与检验工作,(电子信箱)zx138122885@163.com。

- 2013;282-287.
- [5] 周仲璞. 中医内科学[M]. 第7版. 北京:中国中医药出版社, 2003:408.
- [6] 胡金飞,何靖康. 奈达铂加替吉奥联合三维适形放疗治疗晚期非小细胞肺癌的临床疗效和安全性[J]. 中国现代医生, 2013,51(17):69-70.
- [7] 彭爱华,施幼雄,冯国生. 吉非替尼联合放疗治疗晚期非小细胞肺癌的研究进展[J]. 国际肿瘤学杂志, 2015,42(7): 539-541.
- [8] 鲁广,夏冰,柴枫,等. 尼妥珠单抗联合三维适形放射治疗晚期非小细胞肺癌的临床效果观察[J]. 中国生化药物杂志, 2016,36(2):154-156.
- [9] Palma D, Lagerwaard F, Rodrigues G, et al. Curative treatment of Stage I non-small-cell lung cancer in patients with severe COPD: stereotactic radiotherapy outcomes and systematic review[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012,82(3):1149-1156.
- [10] 陈黎,李红,邱婷,等. 益气养阴法联合吉西他滨对老年晚期非小细胞肺癌生活质量的影响[J]. 南京中医药大学学报, 2016,32(4):330-333.
- [11] 陈孟峰,段小华,蒋合蓓. 中药益气养阴汤联合TKI方案对晚期非小细胞肺癌患者PFS及OS的影响[J]. 中国中医药科技, 2017,24(1):74-75.
- [12] 曾瑞,钟红卫. 益气养阴法治疗中晚期非小细胞肺癌的临床疗效观察[J]. 陕西中医, 2016,37(2):164-165.
- [13] 李天传,何冰晶,余静平. 益气养阴法配合TP化疗方案治疗晚期非小细胞肺癌临床研究[J]. 光明中医, 2013,28(7): 1418-1420.
- [14] 梁平,辛海. 益气养阴方配合化疗治疗老年晚期非小细胞肺癌40例临床观察[J]. 中医药导报, 2016,22(1): 30-32.
- [15] 陈曦,彭纲,胡文兵. 益气养阴方联合TP方案治疗晚期气阴两虚型非小细胞肺癌临床疗效观察[J]. 时珍国医国药, 2014,25(5):1174-1175.

(收稿日期:2017-10-12;修回日期:2017-11-21)

用制剂)的无菌检查和绝大部分非无菌药品的微生物限度检查。药品微生物限度检查法是指非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的检查方法,包括染菌量及控制菌的检查。1972年版《中国药典》开展了药品微生物限度检查^[1],但直到1995年版才正式收载此方法。药品微生物限度是对生产单位所用的药品原料、器具设备、工艺流程、生产环境和操作者的卫生状况进行卫生评价的综合依据^[2]。药品一旦受到微生物污染,将造成药品变质,主成分分解而失效,也可能分解产生毒素,造成机体反应,引起疾病甚至威胁生命。本研究中从人、机、料、法、环5个途径查找药品受到微生物污染的可能途径,以寻找控制污染之法。

1 污染途径分析与控制

1.1 人员

供试液制备过程为主要影响因素,由于供试液制备由实验人员完成,因此,微生物实验的操作人员是主要影响因素^[3-4]。实验者因实践经验、理论专业和文化水平的差异而对同一标准理解不同,操作和检验方法选择不同,可能因操作产生差异而造成最终结果错误。

人员素质:操作人员应有极高的职业素质,要有责任心,才能按要求^[5]严格控制实验环境;还要有专业素质,即操作规范、熟练。人员操作过程保证真实的药品污染状态^[6],不杀死微生物,也不污染样品,避免因操作不当样品污染实验环境,且严格控制检验时间(不超过1h)。

无菌观念:微生物实验室不同于一般理化实验室,对环境控制很严格,工作人员必须有无菌观念。首先,进入实验室的器具应采用适当方法灭菌;其次,工作人员须身体健康,不能带某些传染病(如感冒)进入实验室,保证实验室不被污染;再次,人员装束符合微生物实验室要求(如不能佩戴饰物,要求穿洁净服)^[7];最后,完成实验及时清理实验垃圾,以免滋生微生物而污染环境。

相关规定:按2015年版《中国药典(四部)》通则9203《药品微生物实验室质量管理指导原则》(以下简称通则9203)和通则9205《药品洁净室微生物监测和控制指导原则》(以下简称通则9205)中要求执行,其中,通则9203规定了操作环境的标准,通则9205规定了控制环境频次的最低要求。

1.2 设备

仪器核检:包括所用设备检定[压力容器、天平、冰箱和培养箱用的温度监测仪、空气检测设备(如测定浮游菌、悬浮粒子)]或校准(烤箱、培养箱、加液枪、分液器或刻度吸管)。超净台或生物安全柜也要按规程检定。环境处理过程所用的高效过滤器、超净台或生物安全柜,

检验过程的天平,培养过程的培养箱,一方面定期核查,保证运行正常,另一方面定期处理,保证不污染样品。

设备和耗材优化:选用适于本实验室且易于操作的设备,过去用刻度吸管采样,现在可用加液枪(加液枪换枪头比换刻度吸管方便);配备匀浆仪和水域震荡仪加速样品的释放;涡旋震荡仪混匀样品。也可使用一次性耗材,提高工作效率,缩短实验时间,减少污染。

1.3 物料

检验对象:因样品污染的不均匀性,正确的抽样方法(抽样代表性、抽样环境)很重要^[8]。

培养基:所用培养基须经过适用性检查。现在,一般实验室使用商品培养基,且按照药典或培养基使用说明要求进行配制和严格灭菌,既不破坏成分,又可保证灭菌彻底。培养基要求参见通则9203中对培养基的要求。注意高压后培养基的营养成分和pH^[9],以保证培养基的灵敏度。保存依赖于其质量、贮存条件和培养基种类。制备好的培养基一般可于2~8℃冰箱保存30~60d^[10-11]。

其他:检验用水的水质须符合实验要求;实验室所用消毒液定期更换,以免产生耐受菌株;实验所用器具及物品应清洗干净,不残留抑菌物质^[12];注意所用菌种生物特征是否典型。

1.4 方法

合理选择检验方法:《中国药典》从2005年版开始进行微生物方法学验证,以保证选用方法准确、可靠。一般参照企业提供有可靠、准确方法和明确结论的资料,但也有部分例外,如某企业产品菌落计数中产品资料需氧菌总数仅 10^{-1} 用薄膜过滤法, 10^{-2} , 10^{-3} 未说明,如直接选用平皿法,可能出现假阴性,造成漏检。此时应先与企业沟通,无果时再选薄膜过滤法。又如食品标准中根据水源不同分为生活饮用水、包装饮用水和饮用天然矿泉水,3种水微生物指标均不同,如果用错标准导致误判,将造成浪费或不合格产品流入市场,甚至造成严重后果。

菌落计数误差控制^[13]及控制菌的培养时间:2015年版《中国药典》选用的培养基应用范围比以前更适合微生物生长,需氧菌总数选用胰酪大豆琼脂培养基,比以前的营养琼脂更适于微生物生长。统计霉菌和酵母菌总数时选择的沙氏葡萄糖琼脂培养基比玫瑰红钠琼脂培养基(选择性培养基)计数范围更广,而且规定生长细菌也计数。笔者做某一外用药物制剂方法适用性试验时发现,外用药金黄色葡萄球菌(30~35℃)预培养时间为18~24h,按照规定培养24h接种至琼脂平板,阳性对照生长18h生长良好,但供试品阳性对照培养72h未生长。预培养时间延长至36h,供试品阳性对照在琼

脂平板在 72 h 内生长良好。其原因是金黄色葡萄球菌敏感,容易被抑制,由于受到供试液的干扰,微生物受损,修复较慢,延长预培养时间很有必要。

灭菌方法:压力容器定期用生物指示剂进行灭菌验证;每次用化学指示卡进行灭菌验证,保证灭菌彻底。

判定标准掌控:2015 年版《中国药典》通则 1107《非无菌药品微生物限度标准》中有可接受范围^[14],但如不严控生产质量,就会造成微生物限度标准要求降低的错觉。作为生产企业的标准,有内控指标以保证贮存期药品合格,不能考虑可接受范围,否则进行检验结果偏差(OOS)调查^[15]。

实验细节:一是注意对照试验,开展阴性对照试验,以便确定样品本身实际情况,避免环境或操作人员带入,阳性对照(控制菌)实验则可确认该方法是否适用于本实验室;二是实验前正确保存样品,以避免开检前污染,同时做好标记,以免混淆样品。

1.5 环境控制

样品检验环境:微生物实验室药品严于食品^[16],应符合实验室设计要求,即通则 9203 对环境的总要求,实验室参数[空气悬浮粒子、浮游菌、沉降菌、无菌手套和无菌服的表面微生物和物理参数(温度、相对湿度、换气次数、气流速度、压差)]均须满足实验要求。且应依据通则 9205 定期监测实验室的空气质量(悬浮粒子、浮游菌、沉降菌)^[17]。

检验前药品储存环境:保持样品原有状态,做好标记,并保证药品不受污染和不过度灭菌。

供试品培养环境:保持培养箱和培养室洁净。

2 值得探讨的问题

除上面提到的问题及相应的控制方法外,在实践中还遇到以下问题值得探讨。

样品稀释液选择:为了让微生物尽快修复但不是繁殖,一般制样选择 pH = 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液,但有耐胆盐革兰阴性菌检查项目选择稀释剂胰酪大豆胨液体培养基(TSB),应观察菌落计数是否增加。

制剂与稀释剂产生反应:如某口服液 10 mL 加至 pH = 7.0 无菌氯化钠蛋白胨 100 mL 或胰酪大豆胨液体培养基 100 mL 时有沉淀产生,静置析出固体颗粒物。是否反应产生新物质影响原液,有待考证。

培养基与样品发生反应:某些成分复杂的中药制剂如沙门菌的预培养物 0.1 mL 加至 10 mL RV 培养基后发生反应,颜色变成白色,类似于阳性对照培养后的颜色,干扰初步判断。主要的分离增菌的培养基与样品发生反应,造成培养基有效成分损失,可能降低沙门菌的生长能力,以至于影响检出率。

菌落污染问题:药品中污染的微生物菌落致病性强于药典中规定的控制菌,这种情况下,即使发现菌落总数超标或控制菌检查药典以外的菌落,也要进行鉴定,确定药品污染可能的途径,以采取预防措施。

实验中阳性对照菌株使用:某些情况下,企业选用菌种虽然一样,但亚型不一样,在第三方实验室阳性对照不明显(如沙门菌),不一定是方法问题。这值得注意。

其他:可开发控制菌鉴定培养基,以减少实验步骤及微生物分离或鉴定仪器在实验室的使用,进一步减少人为误差。

参考文献:

- [1] 严佳,钟桂香,贺全山,等.我国药品微生物限度检查的发展历程[J].药学实践杂志,2010,289(3):211-212.
- [2] 李佩蓉,范秋汝.药品微生物限度检验的误差影响因素[J].北方药学,2011,8(3):81.
- [3] 刘金凤.分析药品微生物限度检验误差影响因素[J].中国当代医药,2011,18(4):121.
- [4] 达朝荣,陈建强.药品微生物限度检验误差影响因素分析[J].北方药学,2016,13(1):177-178.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:389-393.
- [6] 文玉辉.药品微生物限度检查的探讨[J].山西医药杂志,2003,32(5):499.
- [7] 马绪荣,苏德模.药品微生物学检验手册[M].北京:科学出版社,2000:307.
- [8] 杨立,陈历刚.影响微生物限度检查及方法验证的影响因素[J].医药卫生,2016,2(9):125.
- [9] 黄英.药品微生物限度检验误差分析[J].中国药师,2005,8(2):172-174.
- [10] 陈晓燕.药品微生物限度检查用培养基储存期限的探讨[J].中国医药指南,2014,12(19):111-112.
- [11] 陈新颜.药品微生物限度检查用培养基质量控制试验和贮存条件及效期的探讨[J].海峡药学,2015,27(6):77-80.
- [12] 玛尔江·木饮,萨丽塔娜提·居努司.影响药品微生物限度检查及方法验证的影响因素[J].新疆畜牧业,2016,6(12):36-37.
- [13] 杨立,张催.药品在微生物限度检验中的误差影响因素[J].养生保健指南,2016(33):207.
- [14] 国家药典委员会.中国药典分析检测技术指南[M].北京:中国医药科技出版社,2017:594.
- [15] 杨燕,孙梦佳,蒋波,等.药品无菌检查中微生物的鉴定与 OOS 调查[J].中国医药工业杂志,2016,47(12):1559-1563.
- [16] 曹克任.药品微生物限度检查和食品微生物限度检验的异同[J].中国食品工业,2012,2(1):37-39.
- [17] 单兰天,伏琳,封公喜.药品微生物限度检验误差分析[J].科技创新与应用,2017(17):79.

(收稿日期:2017-11-12;修回日期:2017-12-25)