

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.13.017

基于板蓝根颗粒需氧菌总数计数的药品微生物检测能力验证研究

肖 璜,戴 翠,周发友,马仕洪[△]

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

摘要:目的 提高国内药品微生物检验实验室微生物限度的检测能力。方法 将板蓝根颗粒样品随机编号,经冷链运输发放至各参与实验室,采用单因素方差分析法和 *t* 检验分析样品的均匀性和稳定性。对能力验证结果进行统计与分析,评价实验室的检测能力。结果 全国共 152 个实验室报名参加,涉及 31 个省(市)、自治区;共回收 148 个检测结果,整体满意率为 93.38% (141/151),其中,食药监系统满意率为 96.81% (91/94),企业满意率为 87.04% (47/54),科研院所满意率为 100.00% (1/1),检验检测机构满意率为 100.00% (2/2);造成不满意的主要原因为平台上报检测结果产生错误,实验人员培训不足致试验中断,检测结果溢出。结论 国内药品微生物检验实验室微生物限度检测能力较高,但检验检测标准在不断提升,需持续关注能力建设,加强相关培训。

关键词:能力验证;均匀性;稳定性;微生物限度检查;板蓝根颗粒;需氧菌总数;计数

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)13-0060-04

Proficiency Testing of Drug Microbiological Testing Laboratories Based on the Total Aerobic Microbial Count of Banlangen Granules

XIAO Huang, DAI Hui, ZHOU Fayou, MA Shihong

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 100050)

Abstract: **Objective** To improve the microbial limit testing capabilities of domestic drug microbiological testing laboratories. **Methods** The samples of Banlangen Granules were randomly numbered and distributed to participating laboratories by cold chain transportation. One-way analysis of variance (ANOVA) and *t*-test were used to analyze the uniformity and stability of the samples. Statistical analysis on proficiency testing results was performed to evaluate the laboratory testing capabilities. **Results** Totally 152 laboratories from 31 provinces, municipalities or autonomous regions were enrolled and 148 results were received. The overall satisfaction rate was 93.38% (141/151). Among them, the satisfaction rate of food and drug supervision system was 96.81% (91/94), the satisfaction rate of the enterprise was 87.04% (47/54), the satisfaction rate of scientific research institutes was 100.00% (1/1), the satisfaction rate of inspection and testing institutions was 100.00% (2/2). The main reasons for dissatisfaction were as follows: the platform reported the error of test results, the experiment was interrupted due to insufficient training of test personnel, and the test results overflowed. **Conclusion** Domestic drug microbiological testing laboratories have relatively high microbial limit detection capabilities. Due to the continuous improvement of inspection and testing standards, it is necessary to continue focusing on capacity building and strengthen relevant training.

Key words: proficiency testing; uniformity; stability; microbial limit test; Banlangen Granules; total aerobic microbial; count

药品微生物限度检查于 1972 年在国内起步,卫生部 1978 年颁布了首个药品微生物限度标准,1995 年版《中国药典》首次收录了微生物限度检查法,2000 年版《中国药典》首次收录了微生物限度标准,2005 年版《中国药典》强调了药品微生物检验中的“方法验证”,以避免因方法不合理而造成漏判、误判。2015 年版《中国药典》解决了与人用药品注册技术要求国际协调会议 (ICH) 协调案的协调问题,实现了与国际标准的全面接轨,强化了操作关键点的控制^[1]。我国药品微生物限度检查起步较早,标准已对标国际,但因实验室条件、人员技术水平、对标准和方法的理解存在差异,故各实验室微生物限度检测能力不同^[2-5]。文献[6]报道,地方药品检验系统食品菌落总数计数能力验证能力需加强。需氧菌总数是指胰酪大豆胨琼脂培养基 (TSA) 上生长的总

菌落数(包括真菌菌落数)^[7],是药品微生物限度检查的重要项目,用以判断样品被微生物污染的程度,反映药品生产、运输、储存等环节质量的优劣。能力验证是利用实验室间的比对,按预先制订的准则评价参与者的能力^[8-9]。实验室比对是指按预先规定的条件,由 2 个或多个实验室对相同或类似的测试样品进行检测的组织、实施和评价^[8],是国际通行的实验室质量控制和认可机构确认实验室能力的有效技术手段。2015 年版《中国药典》^[7]也明确,在外部质量控制评估中,实验室应参与能力验证来评估检测能力的水平,通过参加外部质量评估来评定检测结果的偏差。实验室对评估结果进行分析后可适时改进。质控样品的均匀性和稳定性是能力验证项目实施的关键^[6,10-14]。本研究中通过考察板蓝根颗粒菌落总数样品(小样和正式样品)的均匀性,以及储藏、运

第一作者:肖璜,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品微生物检验及相关质量标准,(电子信箱)xiaohuang@nifdc.org.cn。

[△]通信作者:马仕洪,男,硕士研究生,主任药师,研究方向为药品质量分析与质量评价,(电话)010-67095990。

输的稳定性来确保其满足能力验证要求。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌株

仪器: SJ-CJ-2FD 型超净工作台, BHC1300 II A2 型生物安全柜, 均购于阿尔泰实验室设备 <北京> 有限公司; BCD-118TMPA 型海尔电冰箱(海尔智家股份有限公司); LT-CPS80C 型立式压力蒸汽灭菌锅(立德泰勃 <上海> 科学仪器有限公司); DZX-50KB 型立式压力蒸汽灭菌锅(上海申安医疗器械厂); ZXDP-A2270 型恒温培养箱(上海智城分析仪器制造有限公司); DN-300M 型生物显微镜(宁波永新光学股份有限公司); ZYO-0.5 型药用真空冷冻干燥机(上海东富龙科技股份有限公司)。

试剂: 冷冻保护液(温州微穹微生物技术有限公司); TSA 培养基(赛默飞世尔科技公司)。

菌株: 萎缩芽孢杆菌(*Bacillus atrophaeus*, ATCC 9372, 美国医学菌株保藏管理中心); 短小芽孢杆菌 [*Bacillus pumilus*, CMCC(B) 63202, 中国医学细菌保藏管理中心]。

1.2 样品制备及考察

1.2.1 方案设计

样品为铝塑袋包装的板蓝根颗粒, 设置阳性和阴性两组样品。阴性样品用于方法验证, 计数结果无需上报; 阳性样品用于开展试验, 计数结果上报。试验参照《NIFDC-PT-196 板蓝根颗粒需氧菌总数能力验证作业指导书》(以下简称《作业指导书》) 进行。

1.2.2 样品制备

阴性样品: 板蓝根颗粒在装袋前灭菌, 直接用铝箔袋包装, 每袋 10 g。

阳性样品: 将菌株培养成孢子并收集, 制成孢子悬液, 通过纯化使其最终的孢子形成率大于 95%; 孢子悬液再通过 80~85℃ 高温处理 15 min, 得到稳定可靠的孢子, 计数制得的孢子悬液; 混悬均匀的孢子悬液, 按目标菌数加入板蓝根颗粒样品中; 板蓝根颗粒在混入冻干菌株前应灭菌, 确保板蓝根初始污染水平一致。

1.2.3 样品考察

因为定量样品的均匀性和稳定性对于后期试验结果回收影响大, 故制备了 2 批样品。小样制备量为 100 个, 正式样品制备量为 600 个。按照《能力验证样品均匀性和稳定性评价指南》(CNAS-GL03)^[10], 采用单因素分析法检验样品的均匀性, 当 F 值 < F 临界值 ($F_{0.05}$) 时, 认为样品制备充分均匀。采用 t 检验法进行稳定性考察, 当 $|t_{\text{stat}}|$ 值 < t 单尾临界值 ($t_{0.05}$) 时, 表明考察期内样品稳定。

均匀性: 1) 小样, 在制作过程的前、中、后取 10 个样

品检查制作的均匀性。2) 正式样品, 在制作过程的前、中、后取 40 个样品检测制作的均匀性。

稳定性: 1) 小样。取 24 个样品监控 37℃ 高温模拟运输 72 h 的稳定性, 检查其中 6 个样品; 取 18 个样品监控室温 90 d 保存的稳定性, 检查其中 6 个样品; 取 18 个样品监控 4℃、90 d 保存的稳定性, 检查其中 6 个样品。2) 正式样品。结合小样的稳定性监控结果、发样时间(2019 年 9 月 24 日至 9 月 26 日)和据报名预测运输时间(偏远地区 6 d), 增加 37℃ 高温模拟运输 144 h 和 45℃ 高温模拟运输 97 h 的稳定性监控, 各检查 6 个样品。

1.3 计划实施

1.3.1 参加机构

全国共 152 个实验室, 涉及 31 个省(市)、自治区, 地域和单位属性分布见表 1。本次能力验证主要以食药监系统实验室为主。

表 1 参加机构地域和单位属性分布(个)

Tab. 1 Geographical and unit attribute distribution of participating institutions (unit)

省(市)、食药监 自治区	系统	企业	科研 院所	检验检 测机构	合计	省(市)、食药监 自治区	系统	企业	科研 院所	检验检 测机构	合计
安徽	3	0	0	0	3	辽宁	4	1	0	1	6
北京	3	6	0	0	9	内蒙古	2	1	0	0	3
福建	2	1	0	0	3	宁夏	1	0	0	0	1
甘肃	1	0	0	0	1	青海	1	0	0	0	1
广东	11	10	1	1	23	山东	6	1	0	0	7
广西	3	1	0	0	4	山西	2	0	0	0	2
贵州	3	1	0	0	4	陕西	3	0	0	0	3
海南	1	1	0	0	2	上海	1	3	0	0	4
河北	2	0	0	0	2	四川	2	2	0	0	4
河南	2	0	0	0	2	天津	3	2	0	0	5
黑龙江	1	1	0	0	2	西藏	1	0	0	0	1
湖北	3	1	0	0	4	新疆	2	0	0	0	2
湖南	0	2	0	0	2	云南	10	1	0	0	11
吉林	5	2	0	0	7	浙江	6	5	0	0	11
江苏	9	8	0	0	17	重庆	1	2	0	0	3
江西	1	2	0	0	3	合计	95	54	1	2	152

1.3.2 随机编号

由中国药检能力验证服务平台(以下简称平台)对参与实验室样品进行随机编号。

1.3.3 运输包装

选择聚乙烯自封袋包装产品, 双人双核, 再用防撞袋包装, 放入隔热聚乙烯泡沫箱, 每个箱内放置 4 个冰袋, 打包后当天运输。

1.3.4 检测方法

《作业指导书》中明确规定样品保存于 2~8℃, 供试品制备需将铝塑袋打开, 整体转移至 90 mL 灭菌氯化

钠蛋白胨溶液,作为 1:10 供试品溶液,保证样品分散均匀。规定按照 2015 年版《中国药典(四部)》通则中“1105 非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法”项下平皿法(倾注法),平行测定两皿。结果须通过平台上报,报告测定平行计数结果和样品中需氧菌总数(cfu/g)。

1.3.5 结果评价原则

根据回收的实验室结果,将报告值显著低于预期的判定为离群值,予以剔除。以其他数据的对数中位值作为指定值,以对数中位值 ± 0.5 作为能力评定标准^[15]。

本次样品考核的结论设为满意、不满意。满意:在规定截止日期上报结果,对数中位数 $-0.5 \leq$ 报告值的对数值 $\leq$ 对数中位数 $+0.5$ 。不满意:1)在规定截止日期未上报结果,且未主动与实施方进行沟通;2)因样品损毁,上报结果为未开展实验;3)在规定截止日期上报结果,报告值为异常值(为零,或数量级存在差异);4)在规定截止日期内上报结果,报告值的对数值 $>$ 对数中位数 $+0.5$ 或报告值的对数值 $<$ 对数中位数 -0.5 。符合上述 4 项中其中 1 项即可判定为不满意。

2 结果与分析

2.1 均匀性结果

结果见表 2 和表 3。小样 $F_{0.05} = 3.02$, 计算 $F = 0.64 < F_{0.05}$, 表明差异无统计学意义,小样的菌落数组间均匀;正式样品 $F_{0.05} = 1.70$, 计算的 $F = 1.06 < F_{0.05}$, 表明差异无统计学意义,正式样品的菌落数组间均匀。由两轮次样品的均匀性试验结果可见,制备工艺可靠,样品均匀性符合要求。

表 2 小样单因子方差分析结果

Tab. 2 Results of one-way ANOVA of small sample

差异源	df 值	F 值	P 值	$F_{0.05}$ 值
组间	9	0.638	0.744	3.020
组内	10			
合计	19			

表 3 正式样品单因子方差分析结果

Tab. 3 Results of one-way ANOVA of formal samples

差异源	df 值	F 值	P 值	$F_{0.05}$ 值
组间	39	1.056	0.432	1.697
组内	40			
合计	79			

2.2 稳定性结果

结果见表 4 和表 5。小样 $t_{0.05} = 2.02$, 计算 $t_{4^{\circ}\text{C}, 90\text{d}} = 1.99$, $t_{\text{室温}, 90\text{d}} = 0.75$, $t_{37^{\circ}\text{C}, 72\text{h}} = 1.16$, 均小于 $t_{0.05}$, 和第 0 天相比,3 个平均值间的差异均无统计学意义。小样的稳定性试验结果显示,在 4℃ 和室温条件保存 90 d,样品稳定性符合要求,运输稳定性通过 37℃、72 h 的极端挑战,符合要求。正式样品 $t_{0.05} = 2.02$, 计算 $t_{37^{\circ}\text{C}, 144\text{h}} = 0.47$,

$t_{45^{\circ}\text{C}, 97\text{h}} = 0.42$, 均小于 $t_{0.05}$, 和第 0 天相比,2 个平均值间的差异均无统计学意义。正式样品的稳定性试验结果显示,运输稳定性通过 37℃、144 h 和 45℃、97 h 的极端模拟挑战,也符合要求,可保证偏远地区样品运输的稳定性。

表 4 小样 t 检验结果

Tab. 4 t-test results of small samples

项目	4℃, 90 d		室温, 90 d		37℃, 72 h	
	第 0 天	第 90 天	第 0 天	第 90 天	第 0 天	72 h
平均	2.441	2.524	2.441	2.475	2.440	2.379
方差	0.011	0.001	0.011	0.002	0.011	0.009
观测值	6	6	6	6	6	6
泊松相关系数	0.450		0.082		0.182	
假设平均差	0		0		0	
df 值	5		5		5	
t_{Stat} 值	-1.986		-0.753		1.164	

表 5 正式样品 t 检验结果

Tab. 5 t-test results of formal samples

项目	37℃, 144 h		45℃, 97 h	
	第 0 天	144 h	第 0 天	97 h
平均	2.799	2.794	2.799	2.808
方差	0.001	0.001	0.001	0.001
观测值	6	6	6	6
泊松相关系数	0.636		-0.192	
假设平均差	0		0	
df 值	5		5	
t_{Stat} 值	0.468		-0.425	

2.3 能力验证统计结果

本次能力验证共 152 个实验室报名参加,食药监系统有 1 个实验室中途退出,3 个实验室在规定时限内未提交检测结果,最终 148 个实验室在规定时限内提交了检测结果。计算剔除离群值的数据对数中位值为 2.79,按照结果评价的原则,结果对数值满意范围为 2.29~3.29;报告值满意范围为 195~1950 cfu/g。按结果评价的原则,未提交检测结果的 3 家机构的实验室直接判定为不满意。上报的 148 个实验室检测结果中,141 个为满意,7 个为不满意,整体满意率为 93.38% (141/151)。结果按单位属性统计,食药监系统满意率为 96.88% (91/94),企业满意率为 87.04% (47/54),科研院所满意率为 100.00% (1/1),检验检测机构满意率为 100.00% (2/2)。

2.4 不满意结果原因分析

本次能力验证共 152 个实验室报名参加,1 个实验室中途退出,3 个实验室在规定时限内未提交检测结果,原因为:实验室检验检测能力正在建设调整;收样后

未开展工作;自身原因。

上报的148个实验室检测结果中,7个结果不满意,结合平台提交结果和原始记录分析,原因:操作人员原始记录正确,平台上报结果产生错误(5个);实验人员培训不足致试验中断(1个);检测结果溢出(1个)。

3 讨论

通过考察样品的均匀性和稳定性可见,本次能力验证的样品均匀、稳定;通过回收数据可见,未发现质量问题 and 破损问题,表明样品稳定性好。本次能力验证中,样品均匀性和稳定性考察、统计设计、数据分析、结果评价等环节均符合《能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明》(CNAS-CL03-A001,以下简称《说明》)^[15]。该《说明》中,微生物水平较高的定量计划,可将参加者结果转换为以10为底的对数值,通过计算统计量[Z值、临界值(CD值)、中位值 ± 0.5]来评定参加者的能力。本次能力验证活动中选择了以对数中位值 ± 0.5 进行评定。同时,此评价标准也符合2015年版《中国药典》要求,即微生物计数同一供试品重复性允许误差为2次测定结果对数值之差不超过0.3,重复性允许误差为2次测定结果对数值之差不超过0.5^[16]。

实验室质量管理工作分为人员、培养基、试剂、菌种、环境、设备、样品、检测方法、污染废弃物处理、检测结果质量保证和检测过程质量控制、实验记录、结果判断和检测报告、文件共13个要素,2015年版《中国药典(四部)》9203章节《药品微生物实验室质量管理指导原则》中有详细描述^[2]。通过本次能力验证,全面考察了其中11个要素(除菌种和污染废弃物处理)。回收的148个实验室检测结果中,实际仅有1个数据溢出,说明参与单位药品需氧菌总数测试能力整体达到优秀水平。可见,人员是影响微生物检验检测结果的重要因素,回收的148个实验室的检测中,6个不满意结果均为人员操作失误导致,且上述提到的1个数据溢出可能也与操作人员能力和经验不足有关。说明需要不断提高人员的操作能力,加强相关培训,不断提高检验检测标准和能力建设要求。

需要指出的是,以上结果均在以对数中位值 ± 0.5 的统计值评定下得到。本次能力验证为药品微生物检验检测领域内首次开展全国范围内的定量能力验证,在组织和统计上存在缺乏经验指引的不足,统计指标选择较初级。如果选用微生物国际能力验证中最常采用的Z值,以对数中位值为指定值(x),以标准化四分位距为能力评定标准差(σ)作为统计值。即 $|Z| \leq 2.0$ 为满意, $2.0 < |Z| < 3.0$ 为有问题, $|Z| \geq 3.0$ 为不满意,以此评定准

则来进行评定。整体满意率为93.38%(141/151),如按上述标准,142个实验结果(148个返回结果,去除人员操作失误的6个结果)中,有7家机构的试验结果不满意,有6家机构的试验结果可疑。最终结果满意率下降为85.43%(129/151),从侧面反映本次能力验证方案中统计设计相对简单。

本次能力验证方案设计中还存在其他不足和需要提高的地方,如数据防窜通不够、尚未体现药品计数方法验证的特点。今后的工作中将不断完善和改进药品微生物检验检测能力验证计划,进一步提升药品微生物检验检测工作的水平和能力。

参考文献

- [1] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015,50(20):1747-1751.
- [2] 杨敏,李远波. 探析微生物检验室内PDCA循环管理改进措施对检验质量的影响[J]. 临床医学研究与实践,2017(26):197-198.
- [3] 何宏周,王伟. 微生物检验结果的影响因素与质量控制[J]. 临床医学研究与实践,2017,2(31):141-142.
- [4] 张国林. 药品微生物检验实验室质量控制影响因素分析[J]. 中国卫生产业,2017,14(19):26-29.
- [5] 张玲玲. 药品微生物检测实验室质量控制措施[J]. 生物化工, 2017,3(6):69-71.
- [6] 陈怡文,张晓东,宋佳兴,等. 菌落总数质控样的制备及其在能力验证中的应用[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(12):3772-3776.
- [7] 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,2015:140.
- [8] CNAS-RL02,能力验证规则[S].
- [9] 张辉. 浅谈能力验证工作经验体会[J]. 化工管理,2018(11):3-4.
- [10] CNAS-GL003,能力验证样品均匀性和稳定性评价指南[S].
- [11] 骆海朋,唐颂,陈怡文,等. 沙门氏菌能力验证样品的研制及其应用[J]. 食品安全质量检测学报,2016,7(4):1473-1478.
- [12] 姚佳人,苟斌,朱文中,等. 能力验证物品均匀性检验所用统计方法探讨[J]. 理化检验:物理分册,2019,55(10):715-717.
- [13] 顾文佳,张懿翔,许超,等. 运用统计学方法对能力验证定性样品的均匀性和稳定性进行评价[J]. 食品安全质量检测学报,2019,10(21):7138-7141.
- [14] 李宗亮. 实验室能力验证中的测试样品均匀性和稳定性检验方法探讨[J]. 电子质量,2018(7):87-89.
- [15] CNAS-CL03-A001,能力验证提供者认可准则在微生物领域的应用说明[S].
- [16] 杨晓莉,李辉,马英英,等. 中国药典2015年版非无菌产品微生物限度检查:微生物计数法解读[J]. 药物分析杂志, 2016,36(6):1101-1107.

(收稿日期:2021-02-01)