

药品无菌检查 OOS 结果的调查与分析

朱晓燕, 陈伟盛, 关倩明* (广州市药品检验所, 广州 510160)

摘要 **目的:** 对药品无菌检查实验进行回顾性调查分析, 探索药品无菌检查阳性结果调查的规范操作规程。**方法:** 参照新版 GMP 中的超限度 (OOS) 调查章节, 逐条分析可能引入微生物污染的相关因素, 并针对性地分析现场环境引入污染的可能性。**结果:** 初步建立了药品无菌检查阳性结果调查的分析方案。调查结果表明, 检出菌并非实验室检验过程带来的污染, 而是来自样品本身。**结论:** 微生物实验室建立完善的 OOS 调查方案用于规范调查操作过程, 对微生物实验室的质量管理具有重要的指导意义。

关键词: 药品检验; 无菌检查; 微生物污染; 超限度 (OOS); 实验室污染排除; 实验室质量管理

中图分类号: R927.1; R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2017)07-0750-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2017.07.007

On the OOS Results of Drug Sterile Examination

Zhu Xiaoyan, Chen Weisheng, Guan Qianming* (Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

Abstract **Objective:** To explore the standard operating procedure for the survey of the positive results of drug sterile examination using retrospective investigation and analysis of the sterile examination test. **Methods:** The factors related to microbial contamination were analyzed one by one; the possibility of the contamination introduced by the field ambient was also analyzed on purpose according to out of specification (OOS) survey chapter in the new version of GMP. **Results:** A preliminary program for analysis of positive results of drug sterile examination was established and the fact that the detected bacteria was not due to the contamination of the examination test, but the sample itself was found out. **Conclusion:** The establishment of a perfect OOS survey program to standardize the survey process has a great guiding significance to the management of microbiology laboratory.

Keywords: drug inspection; sterile examination; microbial contamination; out of specification (OOS); laboratory pollution elimination; laboratory quality control

OOS (out of specification, 超限度、超规格) 结果, 是指产品质量指标测试中超出已经建立的可接受标准的单个或一系列结果。无菌产品的阳性结果、微生物限度试验超出行动值或超过规格、内毒素试验结果超标准等均为 OOS 结果^[1]。《中国药典》2015 年版^[2]和新版《药品生产质量管理规范》(GMP)^[1]增加了 OOS 调查章节, 对微生物实

验室 OOS 结果的调查做出了较为详细的阐述和实例分析, 要求任何 OOS 结果必须按照书面规程进行完整的调查。因为只有确定了 OOS 结果产生的原因并判定其是否有效, 进而才能制订完善的预防和整改措施, 以保证检验结果的准确性。因此, 实验室建立 OOS 调查处理程序, 对 OOS 结果进行科学、及时、有效的调查分析处理是十分必要的^[3-5]。

微生物在自然环境中无处不在,并可能会随检验人员、检验用器材以及检品的包装容器进入检验环境^[6]。因此,关于微生物检验中药品的无菌检查项目,新版药典对其操作环境提出了更高要求,新版GMP也加强了对无菌操作环境空气微生物、表面微生物以及人员手套和操作服表面微生物的监测频率,并做出了明确规定。而对于无菌检查OOS结果的调查,需核实的相关记录和影响因素更为繁杂^[7]。基于它的复杂性,OOS结果的调查须追溯到实验过程的每一个环节,而对于它的变异性,调查过程又需针对不同的OOS结果着重分析调查相应的不同环节。

对于微生物实验室OOS的调查,局限于每个检验单位的技术水平和资源,同样限于人类对微生物掌握的局限,不是每次的OOS调查都可以发现其根本原因,但通过此调查过程仍能够帮助调查者找出超标结果发生的可能原因并进而采取纠正预防措施,基于风险分析,对相关批次产品做出最后处理决定^[8],从而降低药品质量风险,既是保证药品质量的重要工作,又是质量体系持续改进的原动力^[9]。本文通过对4批无菌产品的无菌检查实验全过程的回顾性分析和调查,探索导致无菌实验OOS结果的明确原因,以期建立微生物实验室完善的OOS调查方案。

1 材料、仪器与试剂

全自动智能无菌集菌仪(默克MILLIPORE);

一次性使用全封闭集菌培养器(杭州高得医疗器械有限公司);显微镜Axio Scope A1(德国ZEISS蔡司公司);全自动微生物鉴定仪Vitek2 Compact(法国生物梅里埃公司);酵母菌鉴定卡(YST,法国生物梅里埃公司)。

无菌检查样品为4个批号的注射用头孢噻肟钠。

2 方法与结果

2.1 实验方法

2.1.1 药品的无菌检查

依照《中国药典》2010年版^[10]检验注射用头孢噻肟钠的无菌检查项目。

2.1.2 镜检及鉴定

取阳性样本,划线TSA平板培养24~48 h,按照仪器及试剂的使用说明,对经过纯化的微生物进行革兰氏染色,确定微生物形态,然后根据形态选择鉴定卡,使用全自动微生物鉴定仪Vitek2 Compact进行鉴定。

2.2 结果

4个批号的注射用头孢噻肟钠的无菌检查检验结果如表1所示:2号和4号样品改良马丁培养基均在第3天变浑浊。取改良马丁培养液划线TSA平板,30~35℃培养48 h,平板上呈现白色、光滑、边缘整齐、形态单一的菌落。

革兰氏染色镜检结果为酵母菌。经全自动微生物鉴定仪Vitek2 Compact鉴定,均为季也蒙假丝酵母。

表1 4个批号的注射用头孢噻肟钠的无菌检查结果

样品编号	1	2	3	4
样品批号	141117	141118	141119	150309
实验地点	无菌三室		无菌二室	
实验者	甲		乙	
无菌检查结果	符合规定	不符合规定	符合规定	不符合规定
菌株鉴定结果	/	季也蒙假丝酵母	/	季也蒙假丝酵母
现场环境监控	现场环境监测沉降皿菌落数: 0, 0, 0		现场环境监测沉降皿菌落数: 0, 0, 0	

3 OOS结果的调查和分析

依据新版GMP对OOS调查的要求,回顾性分析调查注射用头孢噻肟钠无菌检查OOS结果产生的原因。

①日常监控和验收记录:

培养基的验收记录、培养基的制备和灭菌记录、检验器具准备和灭菌记录、消毒液配置和无菌过滤记录、洁净室清洁消毒记录、检验员使用洁净服的灭菌记录和使用记录、无菌检验操作记录以及环境监控记录等均未发现异常。

②人员:

甲和乙实验人员均能熟练掌握无菌检验的流程、监控要点和无菌操作规范。

③样品:

确认样品的编号和批号无误,无菌检查取样前,样品西林瓶外观正常,西林瓶盖并未发现松动的迹象。

④实验器具:

实验中使用的KSF330集菌器、一次性使用无菌注射器以及一次性使用无菌手套的无菌验收均符合规定,且用于当天其他检品的检验,并未发现污染情况。

⑤培养基及冲洗液和稀释液:

无菌检查用培养基的阴性对照均符合规定,且同批制备和灭菌的培养基用于同日检查的其他检品,并未发现污染情况。

⑥检验环境:

现场环境监控的3皿沉降菌监测的TSA平皿均未有菌落生长,并未出现污染情况。定期环境检测表面菌符合规定,样品无菌检查当日洁净空调系统均运行正常。

⑦不同检验体系对结果判定造成的影响:

由于现行《中国药典》无菌检查使用的改良马丁培养基不同于国际标准使用的TSB,将改良马丁培养物划线TSA平板上长出的菌落接种至TSB培养液中^[11],24 h后培养液即出现混浊现象。因此可以排除因检验体系不同造成的实验结果偏差。

⑧菌株:

样品检出菌经鉴定为季也蒙假丝酵母菌,比对日常洁净室监控收集的菌株建立的菌库,洁净室中从未监测到此种菌株。

⑨附加实验的结果与分析:

通过以上分析,初步认定无菌不合格为实验有效结果。但鉴于此次无菌检验过程并未严格按照新版GMP和《中国药典》2015年版规定的对检验环境和人员的全面监控,环境和人员带来的污染仍有造成OOS结果的可能性,附加实验就是对检验环境进行全面监测。

现场环境监控按照新版GMP的要求实施,并增加对洁净室回风口浮游菌的监测,监测结果均符合规定。微生物监测方面,除实验人员无菌服胸口处采集到一个菌落,其他均未有菌落生长。实验人员无菌服采集到的菌落为革兰氏阳性球菌,经鉴定为Kocuria kristinae(克氏库克菌),此菌种曾在日常洁净室监控中不止一次检出过,并未对样品产生过污染。

4 结论与讨论

OOS调查结果表明,并未在实验室发现导致OOS结果的明确原因,检出菌也并非由于实验室检验过程带来的污染,怀疑样品本身被季也蒙假丝酵母菌所污染,从而导致无菌检查的阳性结果。

通过对上述OOS的调查和分析,初步建立了微生物实验室OOS结果调查的分析方案,分别从人、机、料、法、环5个方面进行阐述^[4, 12]:

人一实验人员。考察人员是否经过相关检验的培训和考核,是否了解该项检验的流程和监控要点。无菌区全体人员每年应进行一次再培训和资格的再确认,对无菌区人员操作服和手套表面的微生物监测严格按新版GMP执行;

机一实验中使用的仪器设备。检查仪器近期使用记录是否发现异常,参数设置是否正确。仪器的计量和校准均需有效,无菌区内使用的仪器需定期消毒并定期进行微生物的表面监测,使用的器具需经灭菌消毒,一次性使用器具需经质量验收;

料一样品、培养基、稀释液和冲洗液。检查剩余样品的编号和批号是否准确,样品的外观是否异常,瓶盖是否有松脱现象以及样品的前期存放条件和取样方式是否合理。必要时,对样品的瓶盖和瓶口等关键部位擦抹取样,培养观察;

检查培养基质量验收记录和配制记录,确认配制和灭菌是否合理有效,是否用于其他样品的检验,培养基、稀释液和冲洗液的阴性对照应符合规定;

法—检验方法和依据。实验所用标准应符合设定实验和检验依据的要求；

环—实验环境。检查洁净空调系统是否运行正常，监测记录包括定期监控记录和实验现场环境监控记录，是否符合洁净度要求，清洁记录显示是否按时清洁，消毒液是否使用合理。另外，未确定OOS结果产生的明确原因时，不能急于对环境进行消毒处理，以免忽略了可能的环境污染因素。

微生物负荷和实验检出菌的比对分析。实验室的微生物负荷，包括洁净室的空气微生物、表面微生物和人员操作服及手套的表面微生物。对日常环境监控收集的菌株进行有效鉴别和分析，建立洁净室生物负载数据库，可为微生物OOS调查提供数据基础^[13]。对检出菌进行鉴定，分析监控收集的微生物分布和鉴定与阳性结果的相关性，当发现与阳性菌株相近的菌株时，可利用分子生物学方法比对阳性菌株与微生物负荷的同源性，为阳性菌的污染溯源^[14-15]提供依据。

此外，对不同实验会产生不同的OOS结果，可针对某些相关环节灵活考察。例如，针对不同的微生物，采用不同的监测手段，阳性检出菌为酵母菌时，增加沙氏葡萄糖琼脂用于环境监控的附加实验，则能够更好地确认环境中的该类微生物。

需要着重强调的是，检出菌的鉴别对于OOS结果的调查非常关键，决定最后是否可以发现根本原因，应该给予足够重视^[9]。

综上所述，微生物相关检验项目OOS结果的调查工作量很大，且专业性强，实验室不仅需要具备受过良好培训和具有丰富检验经验的工作人员，还需建立完善的OOS调查方案来规范调查操作。

参考文献：

- [1] 药品GMP指南：质量控制实验室与物料系统[S]. 2011：259-263.
[2] 中国药典：四部-9023药品微生物实验室质量管理指

导原则[S]. 2015：388-393.

- [3] 石秀兰. 美国FDA关于实验室检验超标结果调查程序简介[J]. 中国药事, 2010, 24(3): 314-315.
[4] 贾欣秒, 于密荣. 药品质量风险管理中超趋势数据的处理[J]. 中国药物警戒, 2009, 6(11): 658-660.
[5] 胡谦谦, 梁毅. 药品生产OOS调查[J]. 食品与药品, 2008, 10(7): 70-73.
[6] 范文平, 赵宏大, 谢文, 等. 药品检验中微生物数据偏差的实验室调查[J]. 中国药师, 2015, 18(11): 1974-1977.
[7] 常鸿彦, 米永峰. CGMP关于药品检验结果(OOS)的调查与处理[J]. 齐鲁药事, 2007, 26(10): 630-631.
[8] 高海燕, 丁恩峰, 陈军丽, 等. 国际注册中微生物相关MDD调查探讨[J]. 医药工程设计, 2011, 32(1): 29-31.
[9] 游赣花, 谭德讲. 探讨药品质量控制过程中OOS分析存在的问题[J]. 中国药事, 2015, 29(10): 1041-1046.
[10] 中国药典：二部附录无菌检查法[S]. 2010.
[11] 范文平, 赵宏大, 谢文. 无菌检查试验的先天缺陷及应对策略的思考[J]. 中国药事, 2014, 28(6): 591-594.
[12] 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 2015年版《中国药典》无菌检查法解读[J]. 中国药业, 2015, 24(24): 7-10.
[13] 陈伟盛, 朱荣峰, 关倩明. 药品洁净室生物负载信息的分析与采集[J]. 中国药师, 2015, 18(6): 1046-1048.
[14] 中国药典：四部 9025药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则[S]. 2015：396-398.
[15] 陈伟盛, 关倩明, 朱荣峰. 药品微生物限度检查中微生物污染的鉴定和溯源分析[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(1): 58-63.

(收稿日期 2016年12月19日 编辑 郑丽娥)