试验平皿数对药品低水平微生物计数结果准确性的影响

王杠杠，王似锦，马仕洪 *
（中国食品药品检定研究院，北京 100050）

摘要：分别以浓度为 0.85、1.15、3.08 cfu/mL 的 3 组大肠埃希菌菌悬液为研究对象，每组各 100 个平皿进行菌落计数，作为数据基础模拟不同个数平皿合并计数后的计数结果，并分析不同情况下报告结果与真值之间的偏离程度。结果显示，3 组数据均服从泊松分布；试验平皿数相同时，随着菌悬液浓度增加，平皿计数结果的 RSD 减小；同一份菌悬液，随试验平皿数增多，平皿计数结果的 RSD 减小，报告的结果范围缩窄。菌浓度越低，其 RSD 越大，误判的风险越高，增加试验平皿数有利于提高低生物负载水平供试液微生物计数结果的准确性。合并计数后菌落数不小于 4 cfu、RSD ≤ 50%时，菌落计数结果可对供试液的生物负载水平进行较为准确的估计。

关键词：平皿计数；泊松分布；微生物计数；微生物污染控制
中图分类号：TQ460.7　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)01-0096-05
引用：王杠杠 , 王似锦 , 马仕洪．试验平皿数对药品低水平微生物计数结果准确性的影响 [J]．中国医药工业杂志 , 2025, 56(1)：96-100．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.01.011

Effect of the Number of Test Plates on the Accuracy of Low Microbial Counting Results of Pharmaceutical Products

WANG Ganggang, WANG Sijin, MA Shihong*
(*National Institutes for Food and Drug Control*, *Beijing 100050*)

ABSTRACT: Three levels of concentration (0.85, 1.15, 3.08 cfu/mL) of *Escherichia coli* suspensions were used as objects, with 100 plates in each group for colony counting, which served as the data basis for simulating the data for different numbers of test plate combined with counting. The deviations between the reported results and the true values were analyzed under different conditions. Data of 3 groups followed Poisson distribution. For the same number of test plates, the RSD of plate counts decreased with the increasing of the concentration of bacterial suspension. For the same bacterial suspension, the RSD of plate counts and the range of reported results decreased with the increasing of the number of test plates. The lower concentration of bacterial suspension, the greater coefficient of dispersion, and the higher the risk of misjudgment. Increasing the number of test plates was beneficial to improve the accuracy of microbial count resulted in low bioburden test dilution. When the combined count of colonies was no less than 4 cfu and the RSD was no more than 50%, the colony count results could provide an accurate estimate of the bioburden of the sample solution.

Key Words: plate count; Poisson distribution; microbial enumeration; microbial contaminant control

非无菌药品、原辅料及中间产品通常需要进行微生物计数以考察微生物污染程度。一般情况下，需将供试品制备成均匀的供试液，经适当稀释后，取其中一部分进行菌落计数。国内外对于微生物平皿计数误差已有一定的研究积累。平皿计数误差主要来源于 2 个方面：一是由于微生物聚集及计数结

收稿日期：2024-05-04
基金项目：中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金项目（2022A7）
作者简介：王杠杠（1993—），女，硕士，从事药品微生物检验与控制研究。
通信作者：马仕洪（1972—），男，主任药师，硕士生导师，从事药品微生物检验与控制研究。
E-mail：mash@nifdc.org.cn

果不连续导致的分布误差或取样误差；二是由于稀释级增多产生的误差，即稀释误差[1]。在实际的药品检验中，只针对规定检验量的供试品进行检验（一般为 10 g 或 10 mL），且需制成均匀的供试液，因此可认为是小样本且不存在微生物聚集的理想情况，该情况下平皿计数的结果服从泊松分布[2—3]。基于泊松分布的微生物计数研究多集中在食品领域，药品领域应用较少[3—5]。泊松分布为小概率的离散型分布，特点是均值等于方差。服从泊松分布的菌落计数 RSD（标准差 / 均值）可依据式①计算。

$$RSD=\pm\frac{100}{\sqrt{T}}\% \qquad ①$$

式中：T 为多份平皿计数的平均值，当计数均值为 1 cfu 时，RSD 为 100 %，计数均值为 25 cfu 时，RSD 为 20%。计数均值越低，随机误差越大，样本的 RSD 也越大，对菌悬液浓度估计的准确性越差。

由 NMPA 药品审评中心发布的《非无菌化学药品及原辅料微生物限度研究技术指导原则（试行）》[6]中提到，对于非无菌药品的微生物计数，当存在标准限值较低或选择较高稀释级的情况时，必要时可以通过增加接种量（试验平皿数等）来降低检验误差。本研究以不同浓度的大肠埃希菌菌悬液为研究对象，通过模拟不同试验平皿数菌落计算结果与实际菌悬液浓度的偏离程度，探讨试验平皿数对低微生物负荷水平药品计数结果准确性的影响，以期为实际检验工作中选择合适的试验平皿数提供参考。

1 仪器与试药

生物安全柜（美国 Nuaire 公司）；复合型低温恒温培养箱（日本 Yamato 公司）。

胰酪大豆胨液体培养基、胰酪大豆胨琼脂培养基（上海诺狄生物科技有限公司）；0.9%无菌氯化钠溶液［华夏生生药业（北京）有限公司］。

大肠埃希菌［*Escherichia coli* CMCC(B)44102，中国医学细菌保藏管理中心］。

2 方法与结果

2.1 菌悬液的制备

将冻干菌种接种至胰酪大豆胨液体培养基 10 mL 中，于 32.5 ℃培养 24 h，以 0.9%无菌氯化钠溶液 10 倍稀释至 1×10^2 cfu/mL，从中取 1、2、4 mL，分别稀释至 100 mL，作为计数用菌悬液①、②、③。

2.2 菌落计数

将制备好的菌悬液充分涡旋混匀，取菌悬液 1 mL 置 90 mm 一次性无菌平皿中，倾注胰酪大豆胨琼脂培养基，每份菌悬液共 100 个试验平皿。待培养基凝固后，在 32.5 ℃条件下倒置培养，24 h 后点计菌落并记录。

2.3 数据检验与模拟运算

每份菌悬液的浓度（真值）以 100 个试验平皿的菌落数均值计算（单位：cfu/mL）。使用 SPSS 20 软件对每份菌悬液获得的计数结果及模拟计数结果以单样本 Kolmogorov-Smirnov 法进行非参数检验，若 $P\leqslant0.05$ 则认为差异有统计学意义[7]，判断结果是否服从泊松分布。

将每份菌悬液获得的 100 个菌落计数数据，随机编码为 1 ～ 100。模拟计算不同数量试验平皿结果合并计数后的计算结果。当以 2 个平皿合并报告结果时，将编码为“n”“n+50”（$n\leqslant50$）的数据相加生成新的一组数据，共 50 个数据。当以 5 个平皿合并报告结果时，将编码为“n”“n+20”“n+40”“n+60”“n+80”（$n\leqslant20$）的数据相加生成新的一组数据，共 20 个数据。当以 10 个平皿合并报告结果时，将编码为“n”“n+10”“n+20”……“n+90”（$n\leqslant10$）的数据相加生成新的一组数据，共 10 个数据。

2.4 不同浓度大肠埃希菌菌悬液的菌落计数结果

3 组不同浓度大肠埃希菌菌悬液的计数结果如表 1 所示。菌悬液①浓度为 0.85 cfu/mL，菌悬液②浓度为 1.15 cfu/mL，菌悬液③浓度为 3.08 cfu/mL。对 3 组计数结果进行单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验，结果显示 3 组数据均服从泊松分布。

以单个平皿菌落数报告结果时，3 组的计数结果分别为每平皿 0 ～ 3 cfu、0 ～ 4 cfu、0 ～ 8 cfu。随菌悬液浓度的增加，平皿计数结果的 RSD 减小。

2.5 不同试验平皿数计算结果的模拟情况

3 组菌悬液以 2 个、5 个、10 个试验平皿合并计数的结果（共 9 组数据）如表 2 ～ 4 所示。对 9

表 1　3 组大肠埃希菌菌悬液的计数结果

Tab.1　Enumeration Results of Three Groups of *Escherichia coli* Suspension

每皿菌落数 /cfu	出现频次		
	菌悬液①	菌悬液②	菌悬液③
0	41	35	3
1	39	30	13
2	14	24	25
3	6	7	22
4	0	4	17
5	0	0	13
6	0	0	4
7	0	0	2
8	0	0	1
均值 /(cfu·mL^{-1})	0.85	1.15	3.08
标准差 /(cfu·mL^{-1})	0.88	1.10	1.64
RSD/%	103	96	53
泊松分布检验 *P* 值	1.00	1.00	1.00

组计数结果进行单样本 Kolmogorov-Smirnov 检验，结果显示 9 组数据均服从泊松分布。

以 2 个平皿菌落数报告结果时，3 组菌悬液的菌落计数范围分别为每 2 平皿 0 ～ 3 cfu、0 ～ 6 cfu、1 ～ 11 cfu；以 5 个平皿菌落数报告结果时，3 组菌悬液的菌落计数范围分别为每 5 平皿 1 ～ 8 cfu、1 ～ 11 cfu、7 ～ 23 cfu；以 10 个平皿菌落数报告结果时，3 组菌悬液的菌落计数范围分别为每 10 平皿 4 ～ 14 cfu、7 ～ 17 cfu、19 ～ 42 cfu。

试验平皿数相同时，随菌悬液浓度增加，平皿计数结果的 RSD 减小。同一份菌悬液，随试验平皿数增多，平皿计数结果的 RSD 减小。

2.6　增加试验平皿数对报告结果的影响

在不同试验平皿数的情况下，计算报告的结果范围，结果如表 5 所示。随试验平皿数的增加，报告的结果范围逐渐缩窄；当增加至 5 个平皿合并计数时，结果范围较单个平皿缩窄约 1/2；增加至 10 个平皿合并计数时，结果范围较单个平皿缩窄约 2/3。试验平皿数越多，报告的结果越接近真值，更有利于确定菌悬液的真实浓度。

3　讨论

USP 42 通则 <1227> 药品微生物回收的验证中给出的标准为：平皿上的细菌和念珠菌、巴西曲霉的推荐计数下限分别为 25 cfu 和 8 cfu，RSD 分别为 20％和 35.4％。药品在严格的 GMP 条件下生产，

表 2　3 组大肠埃希菌菌悬液以 2 个平皿合并计数结果

Tab.2　Enumeration Results with Two Test Plates of Three Groups of *Escherichia coli* Suspension

每 2 皿菌落数 /cfu	出现频次		
	菌悬液①	菌悬液②	菌悬液③
0	8	4	0
1	17	11	1
2	11	15	1
3	11	12	3
4	2	3	7
5	1	4	9
6	0	1	9
7	0	0	7
8	0	0	3
9	0	0	5
10	0	0	4
11	0	0	1
均值 /(cfu·mL^{-1})	1.70	2.30	6.16
标准差 /(cfu·mL^{-1})	1.22	1.42	2.29
RSD/%	72	62	37
泊松分布检验 *P* 值	1.00	1.00	1.00

表 3　3 组大肠埃希菌菌悬液以 5 个平皿合并计数结果

Tab.3　Enumeration Results with Five Test Plates of Three Groups of *Escherichia coli* Suspension

每 5 皿菌落数 /cfu	出现频次		
	菌悬液①	菌悬液②	菌悬液③
1	2	1	0
2	3	1	0
3	3	2	0
4	3	3	0
5	2	4	0
6	4	0	0
7	2	3	1
8	1	3	0
9	0	2	2
11	0	1	0
12	0	0	3
13	0	0	2
15	0	0	2
16	0	0	1
18	0	0	3
19	0	0	3
20	0	0	1
21	0	0	1
23	0	0	1
均值 /(cfu·mL^{-1})	4.25	5.75	15.40
标准差 /(cfu·mL^{-1})	2.10	2.63	4.41
RSD/%	49	46	29
泊松分布检验 *P* 值	0.99	0.99	0.65

微生物负载水平通常较低，无法达到推荐的菌落计数范围。FDA 发布的《细菌学分析手册》[8] 中同样

表 4 3 组大肠埃希菌菌悬液以 10 个平皿合并计数结果

Tab.4 Enumeration Results with Ten Test Plates of Three Groups of *Escherichia coli* Suspension

每 10 皿菌落数 /cfu	出现频次		
	菌悬液①	菌悬液②	菌悬液③
4	1	0	0
6	1	0	0
7	0	1	0
8	5	1	0
9	0	2	0
10	1	0	0
11	1	1	0
12	0	2	0
14	1	1	0
16	0	1	0
17	0	1	0
19	0	0	1
24	0	0	1
25	0	0	1
28	0	0	2
34	0	0	1
35	0	0	1
36	0	0	1
37	0	0	1
42	0	0	1
均值 /(cfu·mL^{-1})	8.50	11.50	30.80
标准差 /(cfu·mL^{-1})	2.72	3.37	7.10
RSD/%	32	29	23
泊松分布检验 *P* 值	0.88	1.00	0.84

表 5 不同试验平皿数时报告的结果范围

Tab.5 Enumeration Result Ranges with Different Numbers of Test Plate

试验平皿数	报告结果范围 /(cfu·mL^{-1})		
	菌悬液①	菌悬液②	菌悬液③
1	0 ～ 3.00	0 ～ 4.00	0 ～ 8.00
2	0 ～ 2.50	0 ～ 3.00	0.50 ～ 5.50[1)]
5	0.20 ～ 1.60[1)]	0.20 ～ 2.20[1)]	1.40 ～ 4.60[1)]
10	0.40 ～ 1.40[1)]	0.70 ～ 1.70[1)]	1.90 ～ 4.20[1)]
真值（菌液浓度）	0.85	1.15	3.08

注：[1)] 报告的结果范围上限≤ 2 倍真值（菌液浓度）。

推荐 25 cfu 作为平皿可计数范围的下限，并将每皿 25 cfu 作为计数方法的定量限，在平均菌落数小于 25 cfu 时，报告结果记作“<25 cfu× 稀释倍数”。但药品由于本身的抑菌性等特点，可能出现供试液稀释级较高等问题，对应严格的标准限值，无法参考《细菌学分析手册》中的菌落数报告标准来进行结果判断，结果判断时可能出现“每皿不大于 2 cfu”甚至“每皿不大于 1 cfu”的判断标准，导致误判的风险很高[6,9]。本研究中 3 组大肠埃希菌菌悬液实测数据的 RSD 测算值与 USP 42 通则 <1227> 中 RSD 公式所得的计算值接近（表 6）。因此，以 RSD 公式估计实测计数结果的 RSD 是可行的。

在实际的药品检验中，过多增加试验平皿数可能会增加由于人员操作、检验环境等因素导致的误差[10]，并且增加检验的工作量和成本，因此应综合考虑误判风险，选择合适的试验平皿数量。在药品微生物检验中，考虑到计数结果的可变性，计数结果判断中标准的执行遵循 2 倍因子（饮片除外），即标准限值为 10 cfu 时，可接受的最大菌数为 20 cfu，以此类推。参考该判断原则，在计数水平较低的情况下，当报告的结果范围上限≤ 2 倍真值时，认为菌落计数结果可对供试液的生物负载水平进行较为准确的估计。本研究中的 3 组大肠埃希菌菌悬液，浓度分别为 0.85、1.15、3.08 cfu/mL。前 2 组在 5 个平皿合并计数时满足上述要求，第 3 组则在 2 个平皿合并计数时可满足上述要求。因此，试验平皿数的选择应考虑供试液的生物负载水平。菌浓度越低，其 RSD 越大，导致结果误判的风险越高，此时应考虑增加试验平皿合并计数，以降低误判风险，满足判断标准。

本研究以 3 组低浓度大肠埃希菌菌悬液模拟低

表 6 依据计数结果得到的 RSD 测算值与依据公式得到的 RSD 计算值

Tab.6 RSD Values Calculated by Enumeration Results vs. by the Formula

检查项目	菌悬液①				菌悬液②				菌悬液③			
	单个平皿计	2 皿合并计	5 皿合并计	10 皿合并计	单个平皿计	2 皿合并计	5 皿合并计	10 皿合并计	单个平皿计	2 皿合并计	5 皿合并计	10 皿合并计
均值 /(cfu·mL^{-1})	0.85	1.70	4.25	8.50	1.15	2.30	5.75	11.50	3.09	6.18	15.45	30.90
RSD 测算值 /%	103	72	49	32	96	62	46	29	53	37	29	23
RSD 计算值 /%	108	77	49	34	93	67	42	29	57	40	25	18

生物负载水平的供试液，讨论了多个平皿合并计数方法的可行性。结果表明，随试验平皿数的增加，报告的结果范围逐渐缩窄，报告的结果更接近真值，即增加试验平皿数有利于对供试液生物负载水平进行准确估计。本研究结果显示，合并计数后的菌落数≥ 4 cfu 且 RSD ≤ 50%时，可采用该菌落计数结果对供试液的生物负载水平进行较为准确的估计。

参考文献：

[1] JENNISON M W, WADSWORTH G P. Evaluation of the errors involved in estimating bacterial numbers by the plating method [J]. *J Bacteriol*, 1940, **39**(4): 389-397.

[2] SUTTON S. Accuracy of plate counts [J]. *J Valid Tech*, 2011, **17**(3): 42-46.

[3] 钟雨婷, 张立实, 王　君. 食品中微生物的分布 [J]. 卫生研究, 2016, **45**(2): 310-314.

[4] 邓通洋, 程　琮, 冯维良, 等. 泊松分布在消毒与灭菌效果监测法检出限中的应用 [J]. 中华医院感染学杂志, 2013, **23**(4): 867-869.

[5] 邓通洋, 程　琮, 冯维良, 等. 稀菌液细菌数服从泊松分布及其在菌落计数方面的应用 [J]. 中国卫生检验杂志, 2014, **24**(9): 1255-1256.

[6] 国家药品监督管理局药品审评中心. 非无菌化学药品及原辅料微生物限度研究技术指导原则（试行）[EB/OL]. (2023-02-17) [2024-02-12]. https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/b522b0ea49412b5edc52f002a1d1036a.

[7] 刘爱玉. SPSS 基础分析教程 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2014: 304-307.

[8] Food and Drug Administration. Bacteriological analytical manual, chapter 3: aerobic plate count [EB/OL]. (2021-06-16) [2023-08-16]. https://www.fda.gov/food/laboratory-methods-food/bam-chapter-3-aerobic-plate-count.

[9] 国家药典委员会. 9202 非无菌产品微生物限度检查指导原则公示稿（第一次）[EB/OL]. (2024-06-11) [2024-06-12]. https://www.chp.org.cn/#/business/standardDetail?id=6656defdbd8c1197f9682fc1.

[10] 刘婷婷, 张　捷, 王尊文. 整体法评估药品中需氧菌计数检验结果的不确定度 [J]. 中国药事, 2021, **31**(1): 74-78.