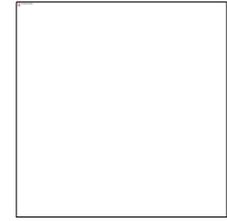


药包材微生物检测技术的探讨

2019年11月18日

国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心
广东省医疗器械质量监督检验所

主要内容



- ▶ 微生物学检验相关信息
- ▶ 菌种保藏技术及培养基
- ▶ 2015版药典无菌检测
- ▶ 2015版药典微限检测

基本概念

1. 微生物

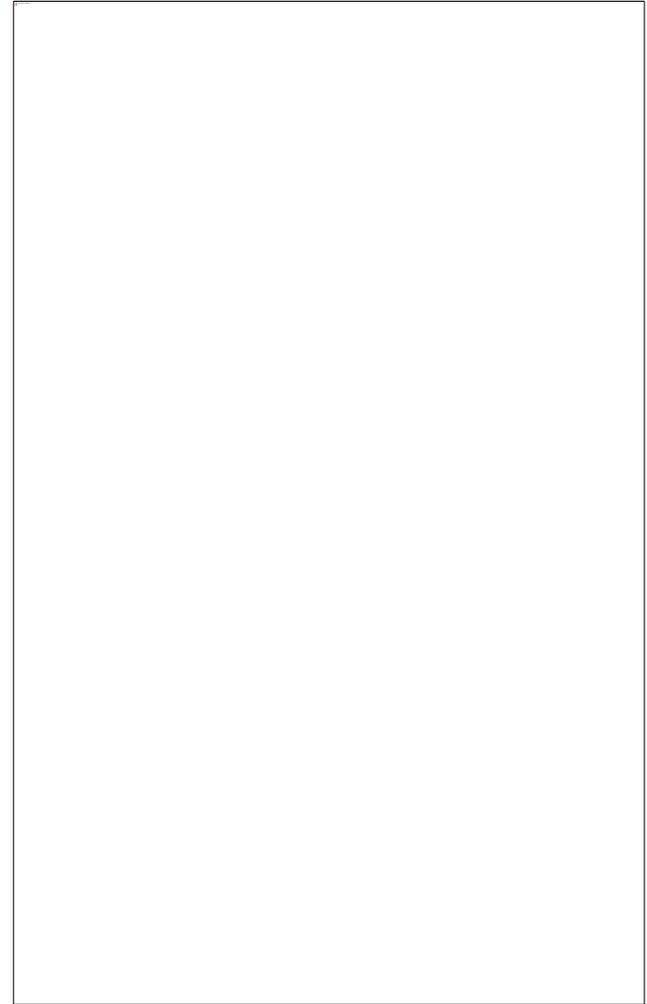
所谓微生物是指个体微小，必须借助于显微镜才能看清它们外形的一群低等的、原始的微小生物。

原核：细菌、放线菌、蓝细菌、支原体、立克次氏体、衣原体

真核：真菌、原生动物、显微藻类

非细胞：病毒

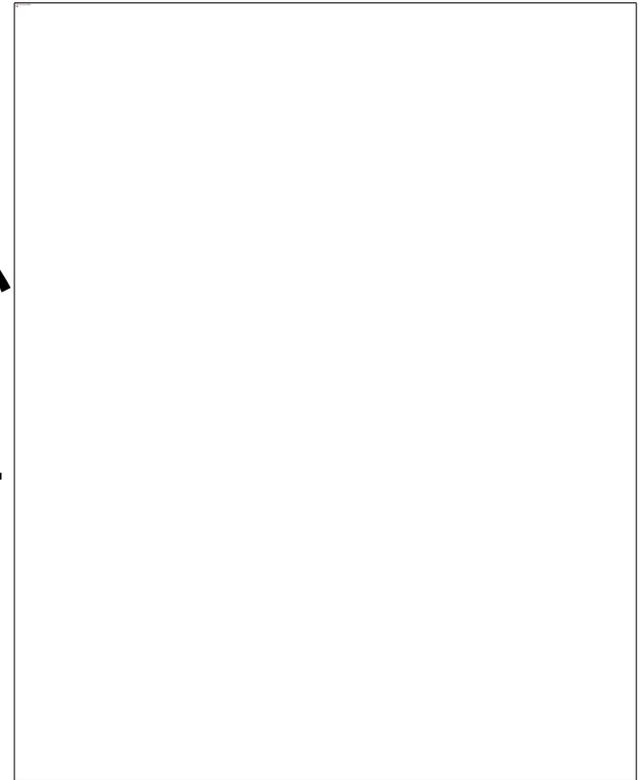
微生物形态学检查-细菌



请在此处显示该图片

微生物形态学检查-真菌

- ▶ 酵母菌和霉菌。有细胞壁和典型细胞核。
- ▶ 霉菌 丝状真菌，绒毛状、棉絮状或蜘蛛网状。
- ▶ 酵母菌 单细胞通常出芽繁殖，少数分裂繁殖。

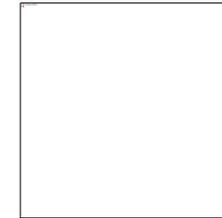


病毒

- ▶ 一类由核酸和蛋白质等少数几种成分组成的超显微“非细胞生物”，其本质是核酸分子。



各类常见微生物的菌落特征



微生物类别 菌落特征		单细胞微生物		菌丝状微生物		
		细菌	酵母菌	放线菌	霉菌	
主要特征	细胞	形态特征	小而均匀、个别有芽孢	大而分化	细而均匀	粗而分化
		相互关系	单个分散或按一定方式排列	单个分散或假丝状	丝状交织	丝状交织
	菌落	含水情况	很湿或较湿	较湿	干燥或较干燥	干燥
		外观特征	小而突起或大而平坦	大而突起	小而紧密	大而疏松或大而致密
其他特征	菌落透明度		透明或稍透明	稍透明	不透明	不透明
	菌落与培养基结合度		不结合	不结合	牢固结合	较牢固结合
	菌落颜色		多样	单调	十分多样	十分多样
	菌落正反面颜色差别		相同	相同	一般不同	一般不同
	细胞生长速度		一般很快	较快	慢	一般较快
	气味		一般由臭味	多带酒香	带有泥腥味	霉味

微生物的特点：

体型微小，必须借助于光学显微镜或电子显微镜才能看到它们的结构

结构简单，有的具有细胞构造，有的没有细胞构造

生长繁殖快，对物质具有非常强烈的转化作用

容易引起变异，种类繁多

数量多，**分布广**，对自然环境的适应性强

微生物的分布

▶ 土壤

土壤是微生物的天然培养基，它具备微生物正常发育所必须的一切条件：无机物和有机物；适当的水分；中性偏碱；含有气体（ CO_2 、 O_2 和 N_2 ）；温度变化不大（ $10-25^\circ\text{C}$ ）。

来自天然生活在土壤中的自养菌和腐物寄生菌以及随动物排泄物及其尸体进入土壤的细菌。

离地面10-20厘米土层微生物最多。

水

水中的细菌来自土壤、尘埃、污水、人畜排泄物及垃圾等。水中微生物种类及数量因水源不同而异。

受到污染的水中含有大量的有机物，适合微生物的生存。静水中的微生物多，流水中的少；离岸近处微生物多，离岸远处少；经过大城市的河流，水受到污染，含有大量的粪便，并含有大量的致病菌。

国家标准规定，纯化水需氧菌总数每毫升不得超过100CFU。

空气

接近地面的空气层，就含有一定的微生物。

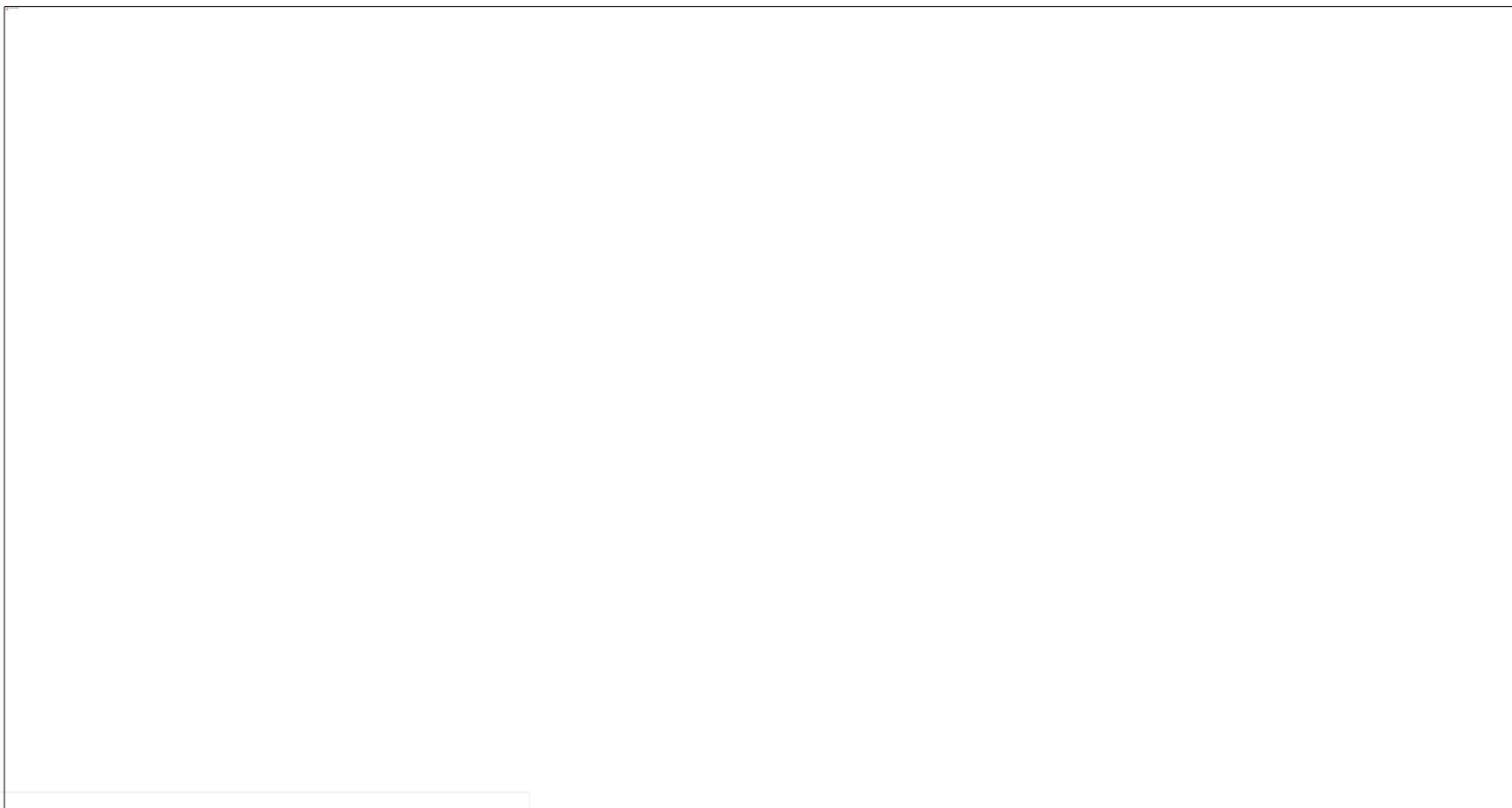
公共场所，人多，空气流通差，细菌多；

大城市上空微生物数量多。

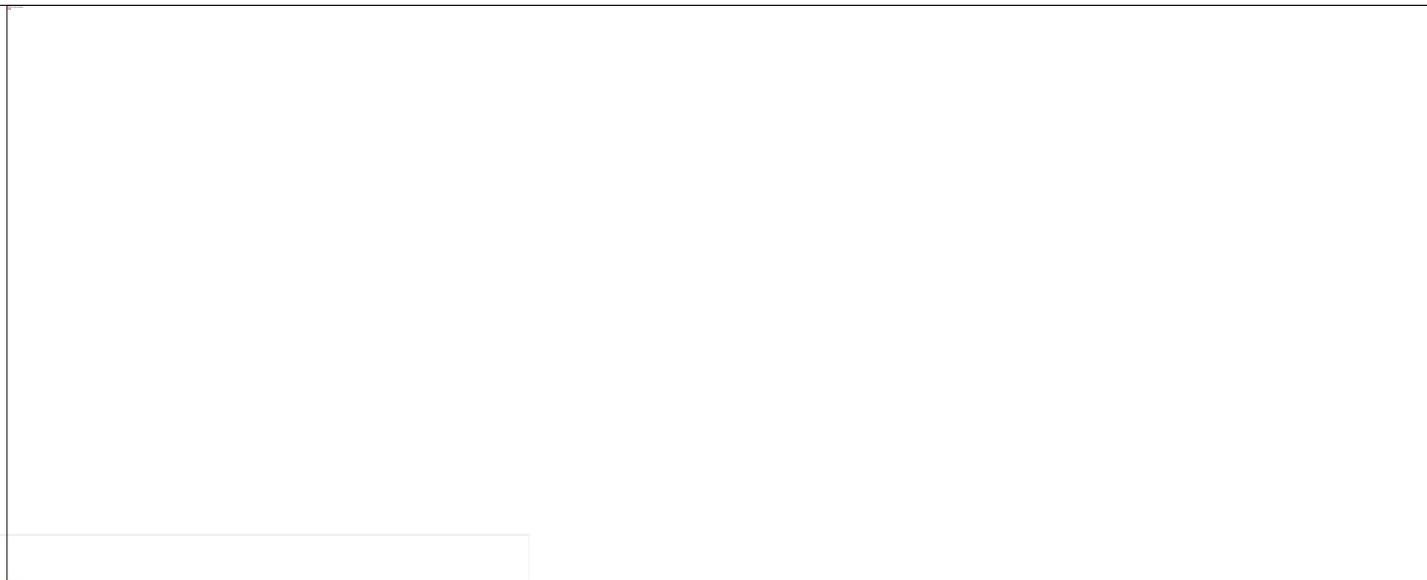
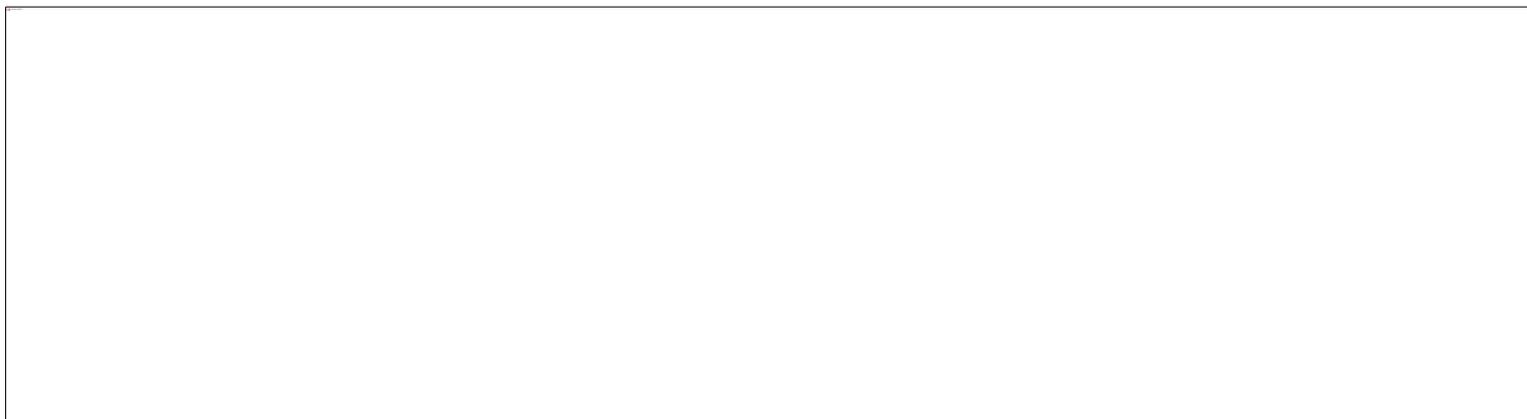
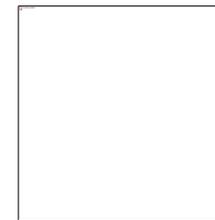
人体

- ▶ 正常人体皮肤、粘膜及外界相通的各种腔道（如口腔、鼻咽腔、肠道和泌尿道）等部位，存在着对人体无害的微生物群。

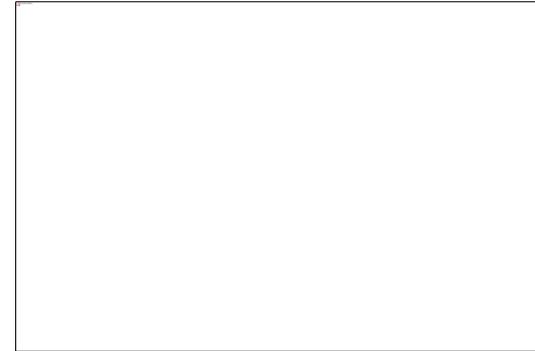
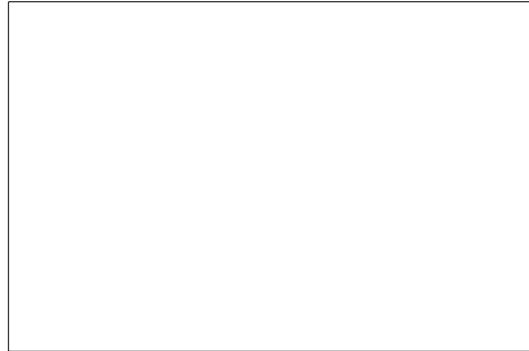
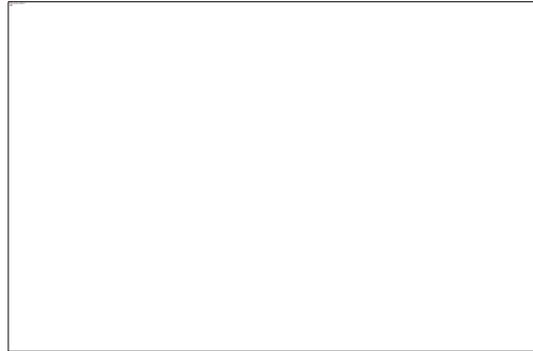
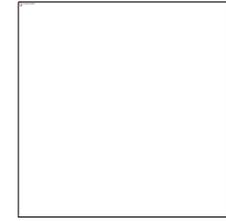
人体常见微生物



革兰氏染色



实验室常用细菌革兰氏染色结果

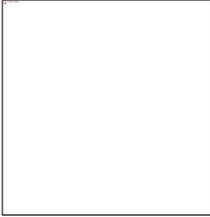


G⁻杆菌代表菌种：
铜绿假单胞菌
(*Pseudomonas aeruginosa*)
大肠埃希菌
(*Escherichia coli*)

G⁺芽孢杆菌代表菌种：
枯草杆菌
(*Bacillus subtilis*)

G⁺球菌代表菌种：
金黄色葡萄球菌
(*Staphylococcus aureus*)

革兰氏染色原理



第一步：结晶紫使菌体着上紫色

第二步：碘和结晶紫形成脂溶性大分子复合物，分子大，能被细胞壁阻留在细胞内

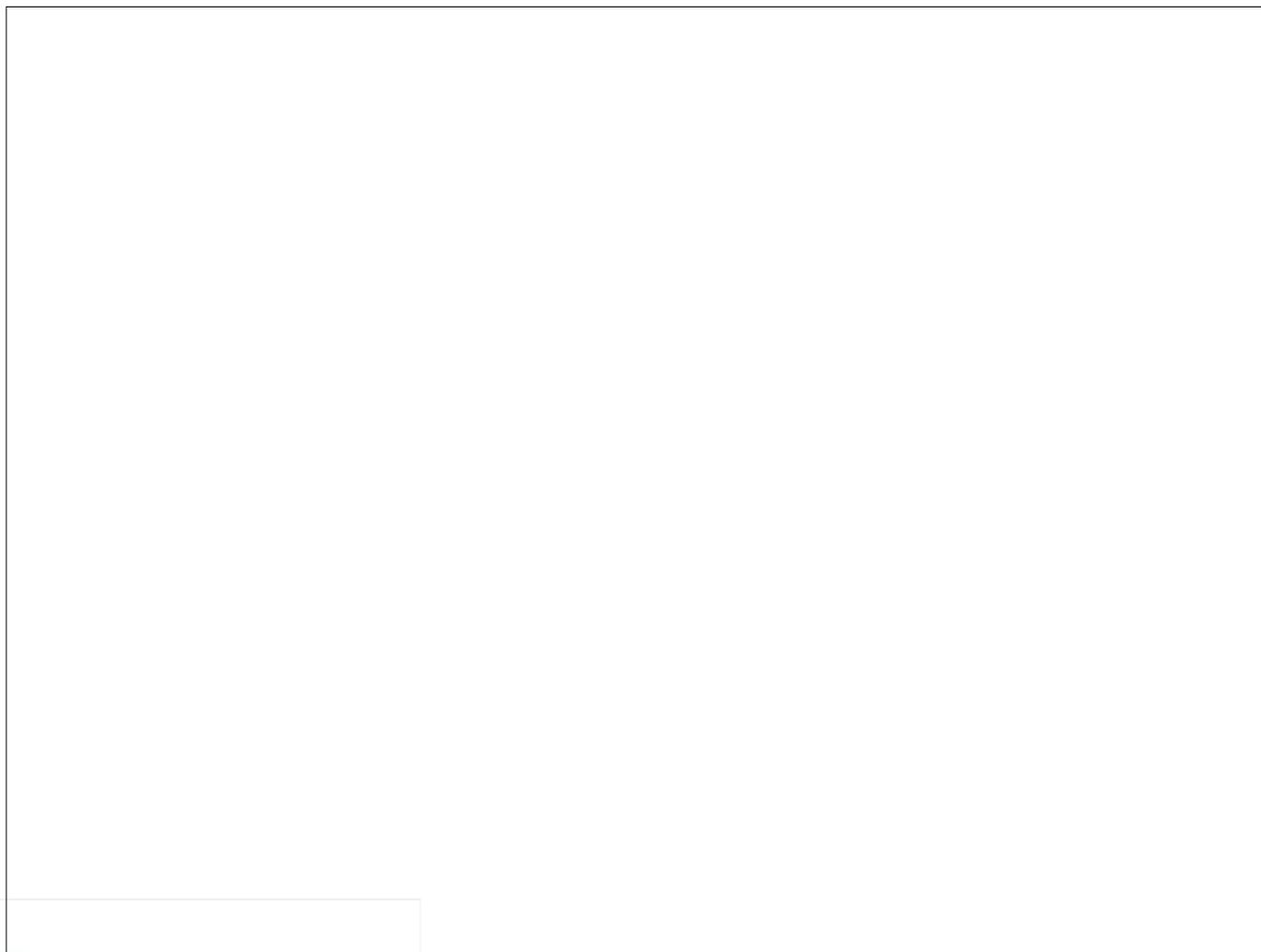
第三步：酒精脱色，细胞壁成分和构造不同，出现不同反应

第四步：番红复染，增加脱色菌与背景的反差并区别于未脱色菌。

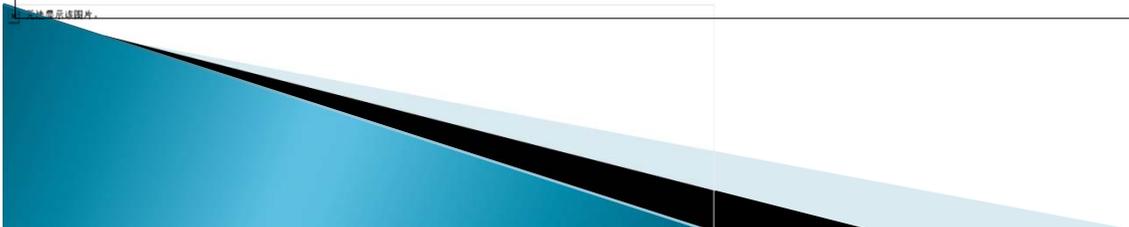
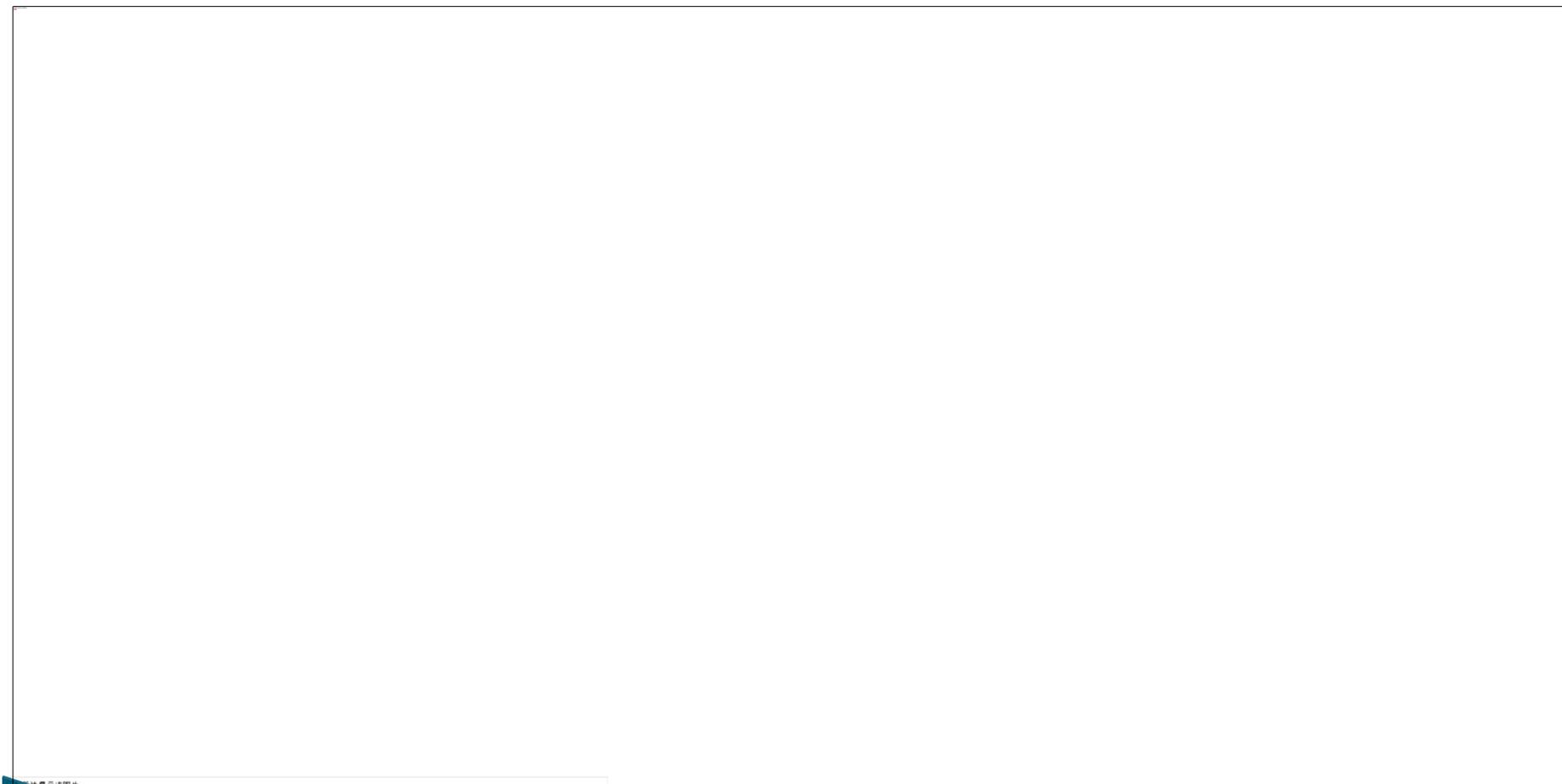
G⁺菌：细胞壁厚，肽聚糖网状分子形成一透性屏障，当乙醇脱色时，肽聚糖脱水而孔隙缩小，故保留结晶紫-碘复合物在细胞膜上，呈紫色

G⁻菌：肽聚糖层薄，交联松散，乙醇脱色不能使其结构收缩，其脂含量高，乙醇将脂溶解，结晶紫-碘复合物溶出细胞壁，番红复染后呈红色。

革兰氏染色液



培养基-培养基的种类



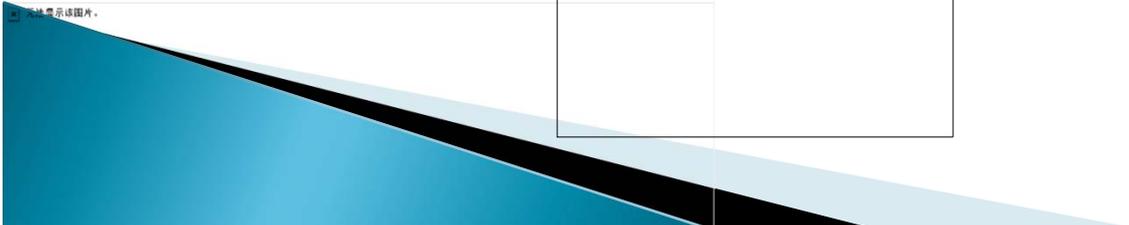
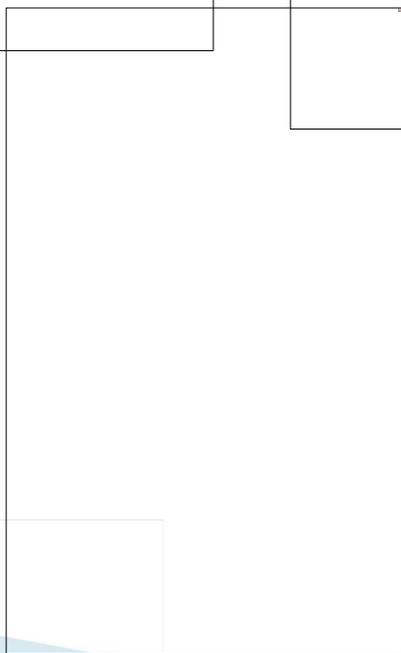
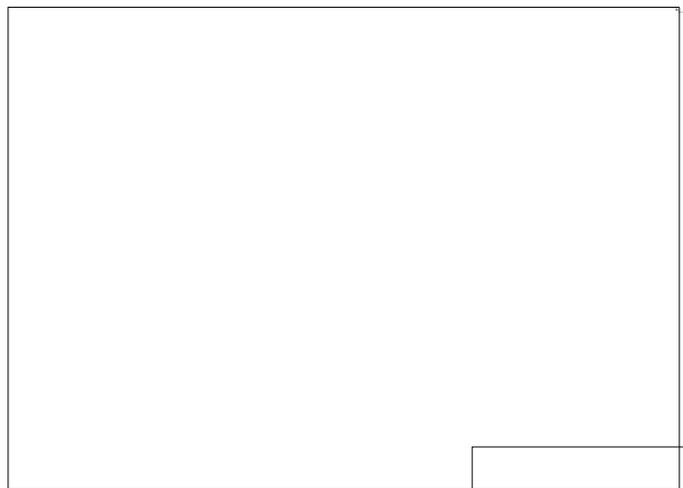
培养基的种类

- ▶ **基础培养基** 常用的是肉浸液加蛋白胨和氯化钠，除对营养要求苛刻的菌外，大多数细菌都能再此类培养基中生长。多用于细菌计数和纯培养。
- ▶ **增菌培养基** 根据待检菌的特征与营养要求配制培养基，专一性较强，有时为防止其他菌生长，加入选择性抑菌剂，使目的菌优势生长。
- ▶ **选择培养基和鉴别培养基** 根据各种细菌的生化特征鉴别属种的培养基。如分离用培养基、生化培养基。可根据细菌在培养基上的生长情况、菌落特征、动力、产硫化氢、产酸、产气及生化反应等，进行细菌分类及鉴别属种。

培养基的储存

- ▶ 制备好的培养基应保存在2~25 °C、避光的环境，若保存于非密闭容器中，一般在3周内使用，若保存于密闭容器中，一般可在一年内使用。
- ▶ 配制培养基应有配制记录

培养基



▶ 第二部分 菌种保藏原理及方法

国内菌种保藏机构

- ▶ • 农业微生物菌种保藏中心（ACCC）：农科院
土肥所
- ▶ • 普通微生物菌种保藏中心（CCGMC）：中科院
微生物所，真菌、细菌。
- ▶ • 工业微生物菌种保藏中心（CICC）
- ▶ • 中国食品药品检定研究院（CMCC）
- ▶ • 中国预防医学科学院病毒研究所
- ▶ • 林业微生物菌种保藏中心（CFCC）
- ▶ • 兽医微生物菌种保藏中心（CVCC）

国外菌种保藏机构

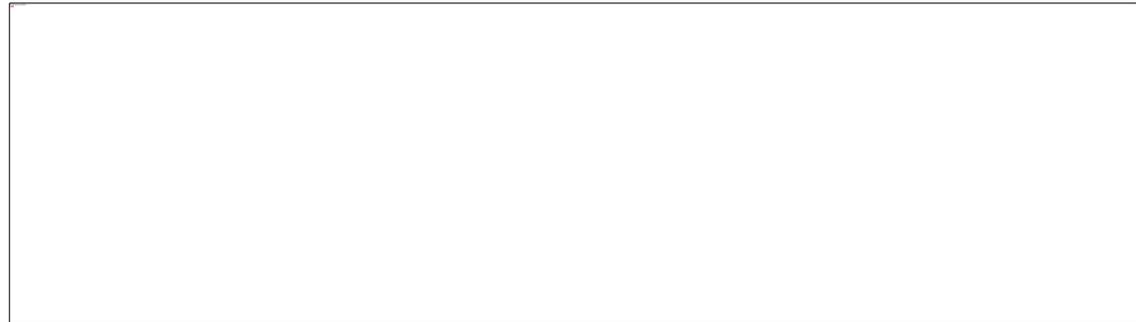
- ▶ 世界菌种保藏联合会 (WFCC)
- ▶ 美国标准菌种收藏所 (ATCC)
- ▶ 美国农业部 “北部研究实验室” (NRRL)
- ▶ 英国 “国立标准菌株收藏所” (NCTC)
- ▶ 日本微生物菌种保藏联合会 (JFCC)

菌种保藏的目的及原理

- ▶ 目的：是使菌种长期保存之后，仍然保持着原来的生命力、优良的生产性能、形态特征以及不污染杂菌。
- ▶ 原理：通过低温、干燥、隔绝空气（真空）和断绝营养等手段，以达到最大限度地降低菌种的代谢强度，抑制菌丝的生长繁殖。保藏过程中，菌种的代谢相对静止，生活活动将处休眠状态，所以能够保藏较长时间。

菌种传代与保藏

- ▶ 0代菌种开启（4℃冰箱保存）

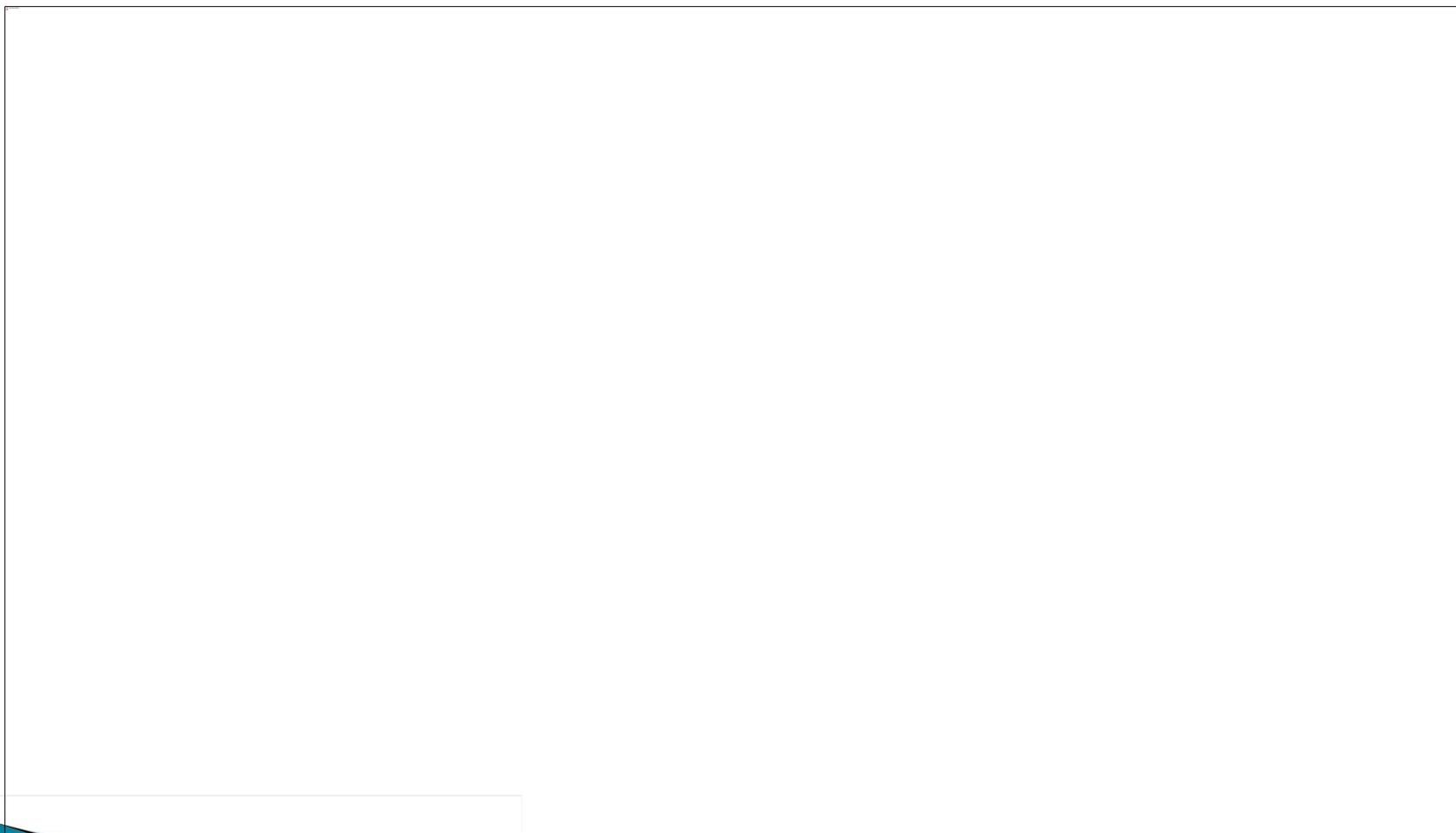


菌种传代

- ▶ 接种方法：常用的有斜面试种法、平板接种法、液体接种法、试管深层固体培养基的穿刺接种法。
- ▶ 接种工具：常用的有接种针、接种环、接种钩、接种圈、接种铲或接种锄、玻璃涂棒等（见下图）。

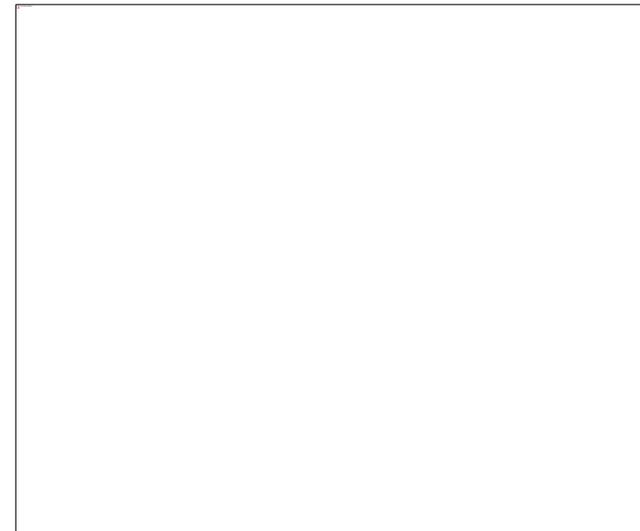
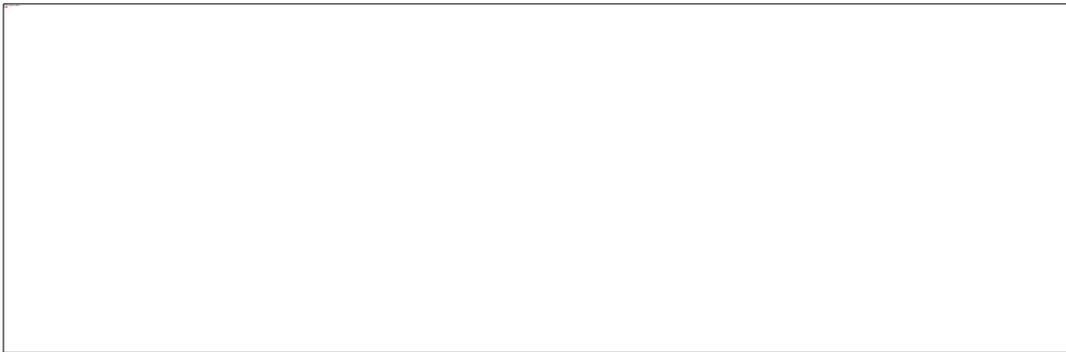


菌种传代

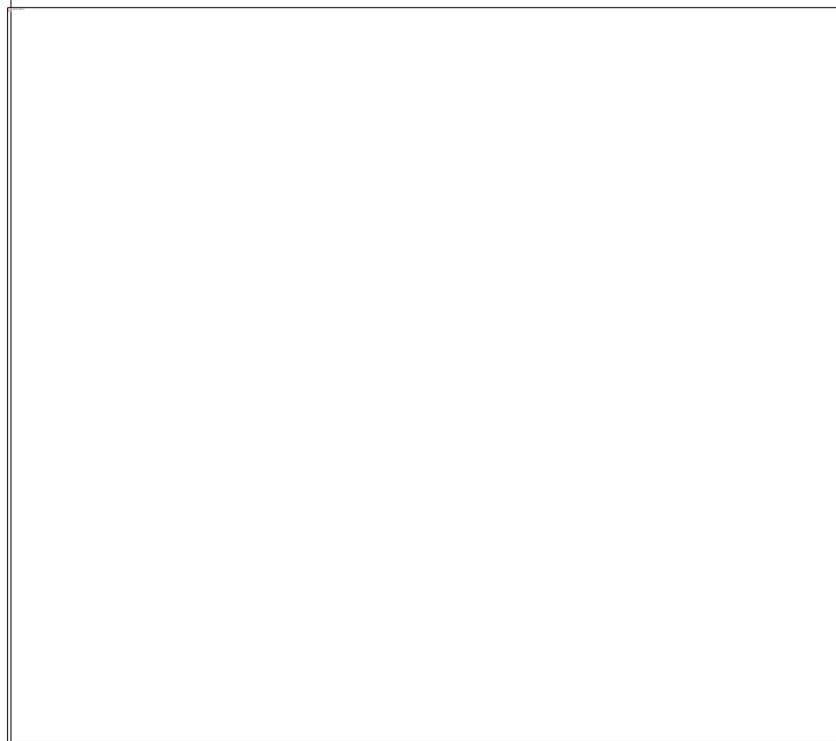
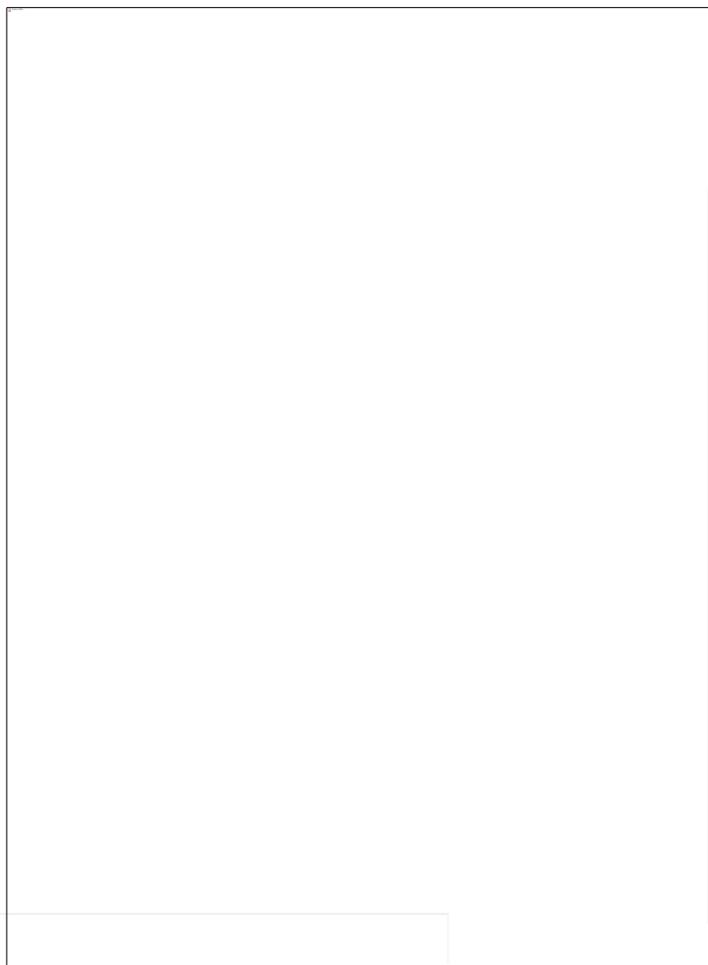


菌种保藏

- ▶ **传代培养保藏法**：斜面、穿刺培养后4 °C ~6 °C保藏1个月。使用范围：一般经常使用的细菌及霉菌酵母菌保藏，缺点：传代多，易变异和污染。



菌种保藏



菌种保藏

液体石蜡保藏法：

斜面培养物或穿刺培养物表面覆盖无菌液体石蜡后4℃ ~6℃保藏3 ~6个月。

载体保藏法：

将微生物吸附在适当的载体上，如砂土、硅胶、滤纸上，而后进行干燥保藏的方法。如：砂土保藏法、滤纸保藏法。

菌种保藏

寄主保藏法：

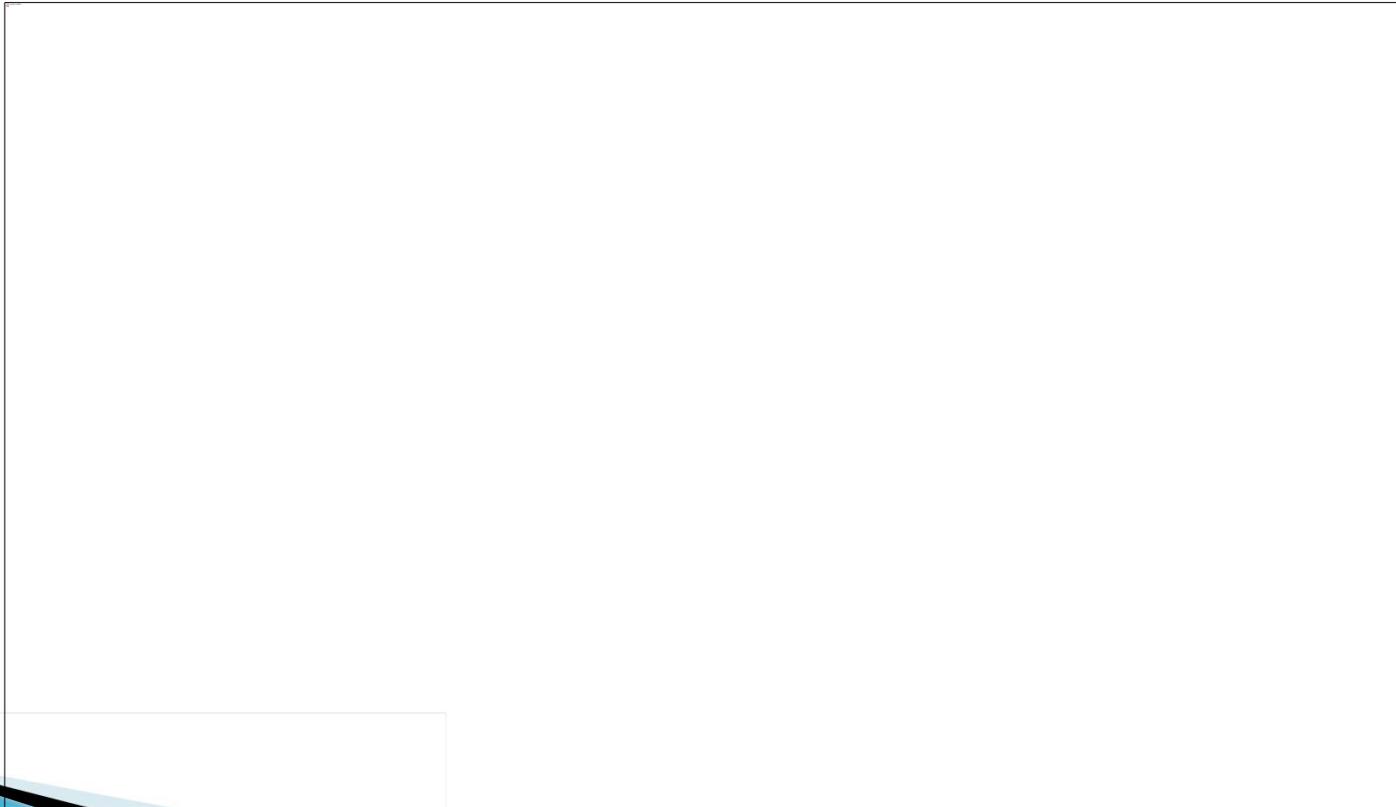
目前尚不能在人工培养物上生长的微生物，如病毒、立克次体、螺旋体等，必须在活的动物、昆虫、鸡胚内感染并传代。

冷冻保藏法：

液体培养物加入适当比例甘油，低温冰箱保藏（ $-20^{\circ}\text{C} \sim -30^{\circ}\text{C}$ 或 $-60^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ ）、液氮保藏法（ -196°C ）等。

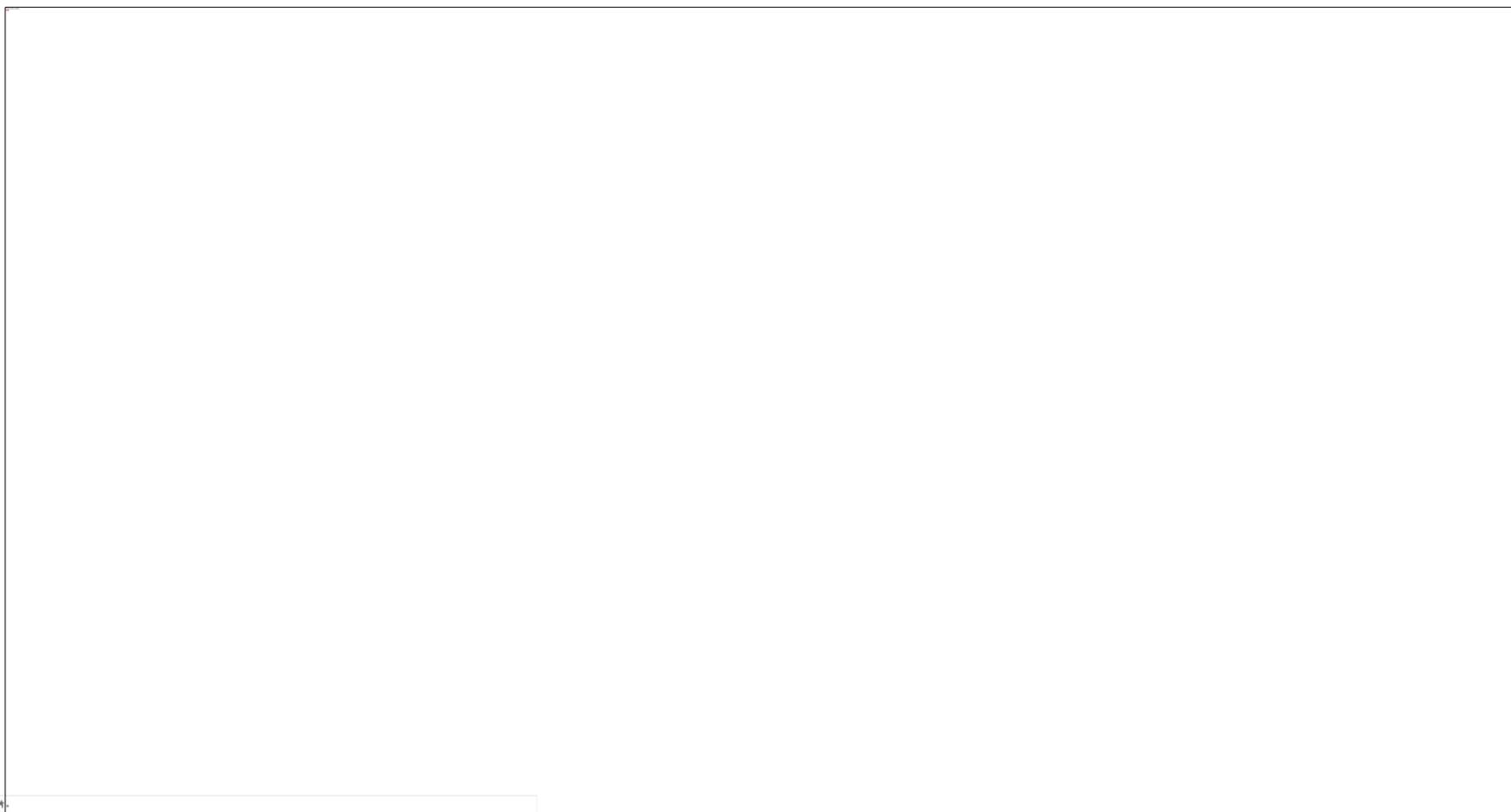
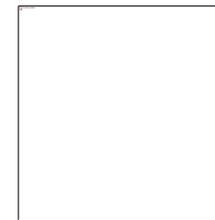
菌种传代

-70 °C，菌体的原生质形成稳定“玻璃态”，能长时间保存菌种。代谢活动停止，但不死亡。

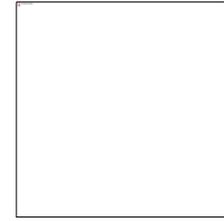


第三部分 2015版药典无菌检测

无菌检查法发展历史



无菌检查的相关概念



定义

- 用于药典要求无菌的药品、生物制品、医疗器具、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法

性质

- 是有关药品安全的一种定性试验
- 根据培养基中是否有微生物生长判断结果

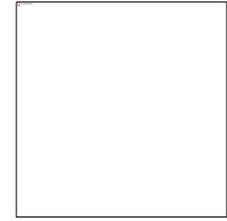
影响因素

- 环境、人员、用品无菌性、检验数量、检验量、培养基适用性、方法适用性、培养条件等

局限性

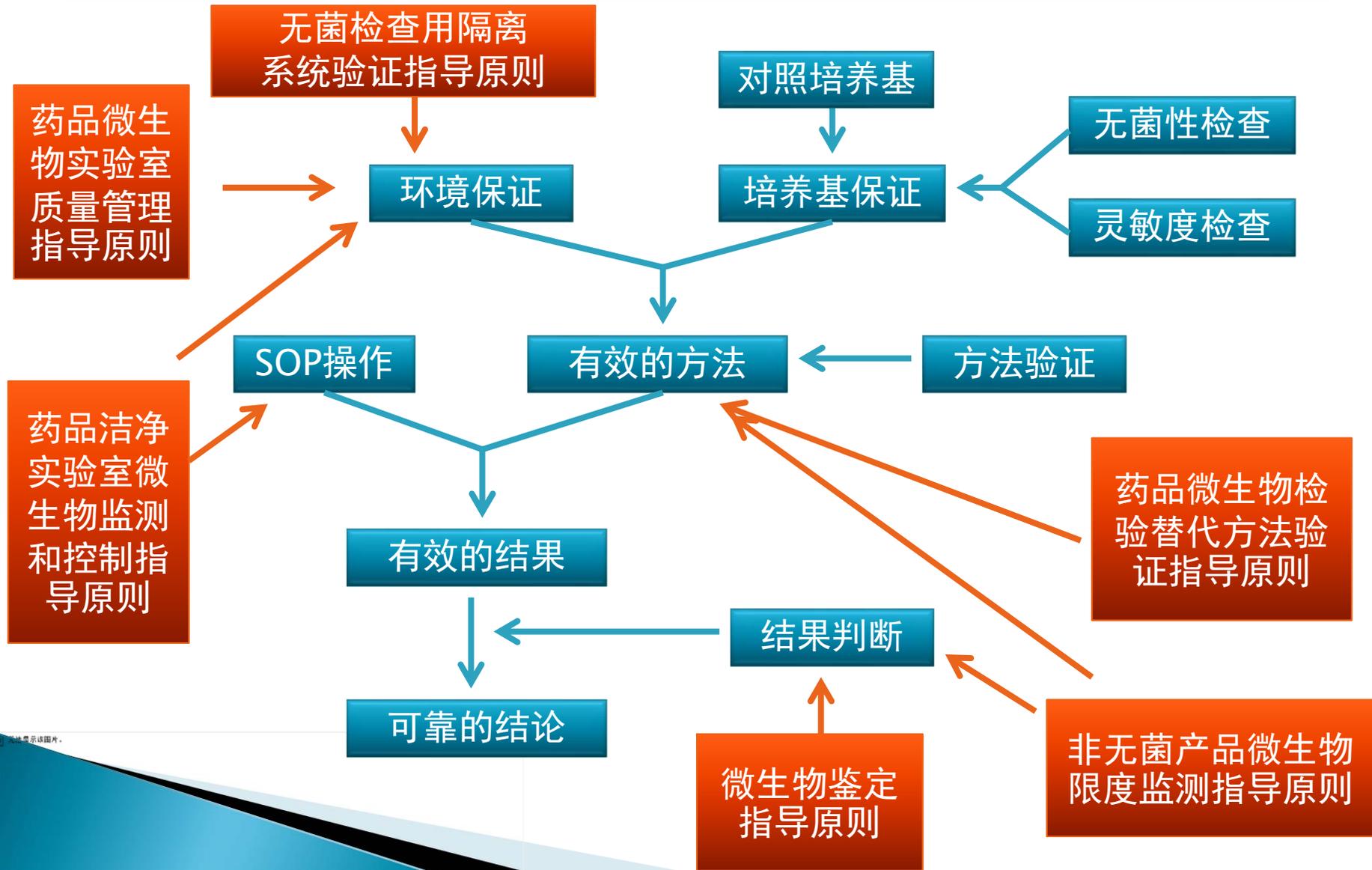
- 微生物污染不均匀
- 检验方法局限

无菌检查的局限性

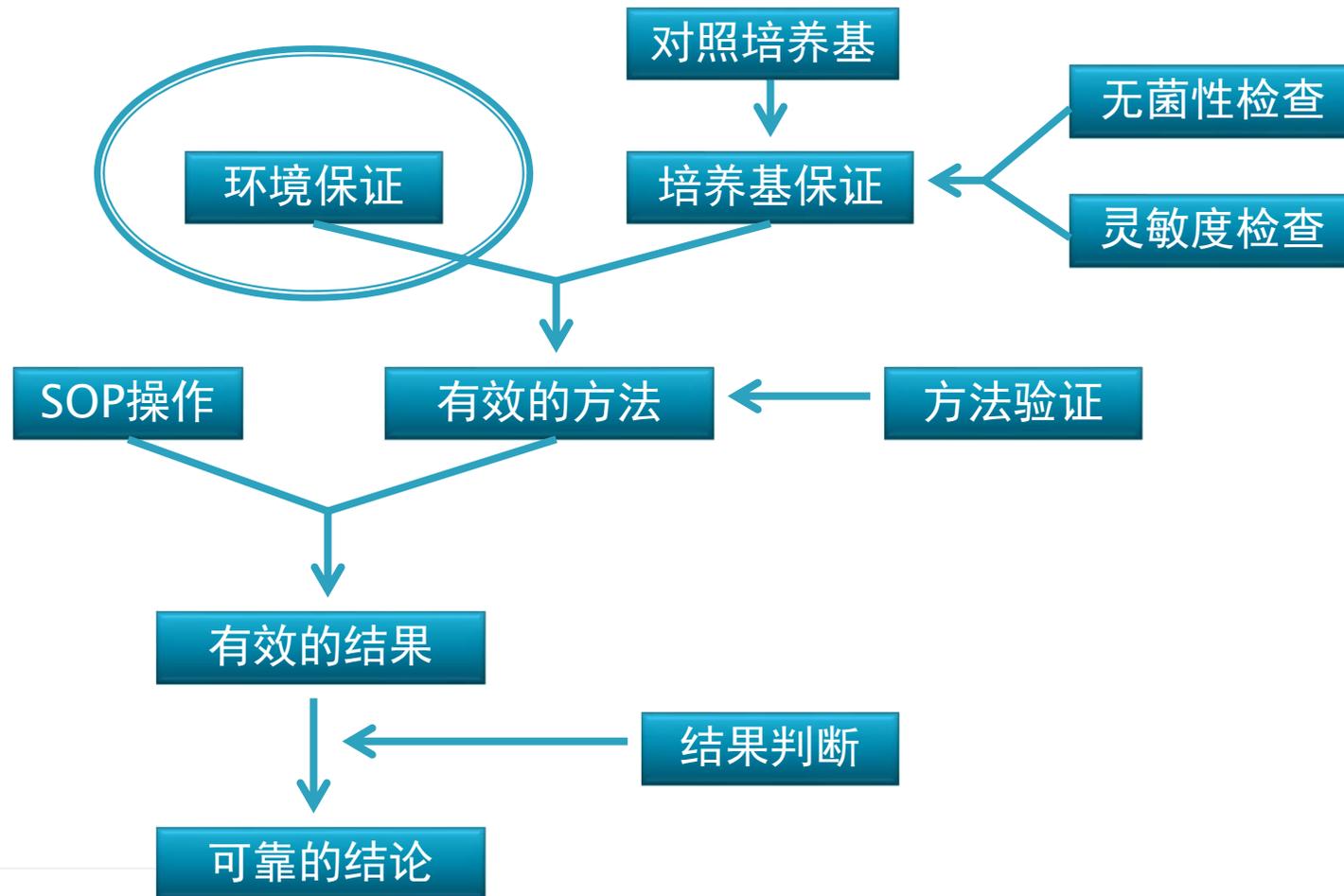
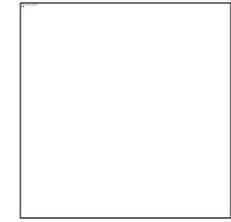


- ▶ 无菌是根据概率的原则判断的。从给定批号的所有产品中存在被污染产品的概率得出判断
- ▶ 无菌测试本身并不是设计用于保证产品无菌或产品已灭菌。产品的无菌保证是通过灭菌工艺或灭菌工艺的验证来得到的
- ▶ 无菌测试适用于药典要求无菌的药物成分，配制剂或制剂。然而，合格结果仅说明在测试条件下受检的样品中未发现微生物污染

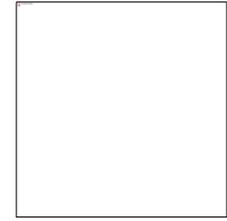
无菌检查的过程控制



无菌检查的过程控制



无菌检查的环境要求

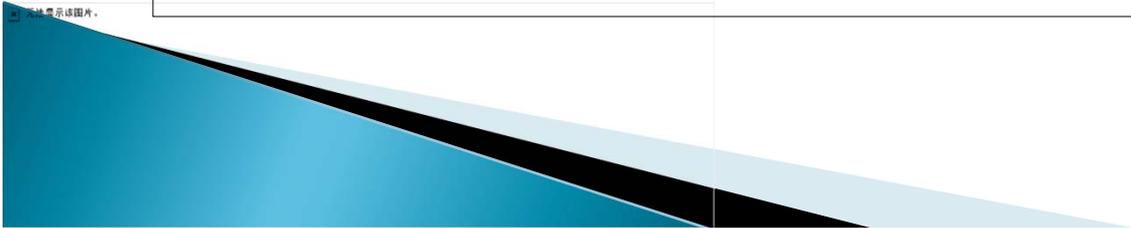
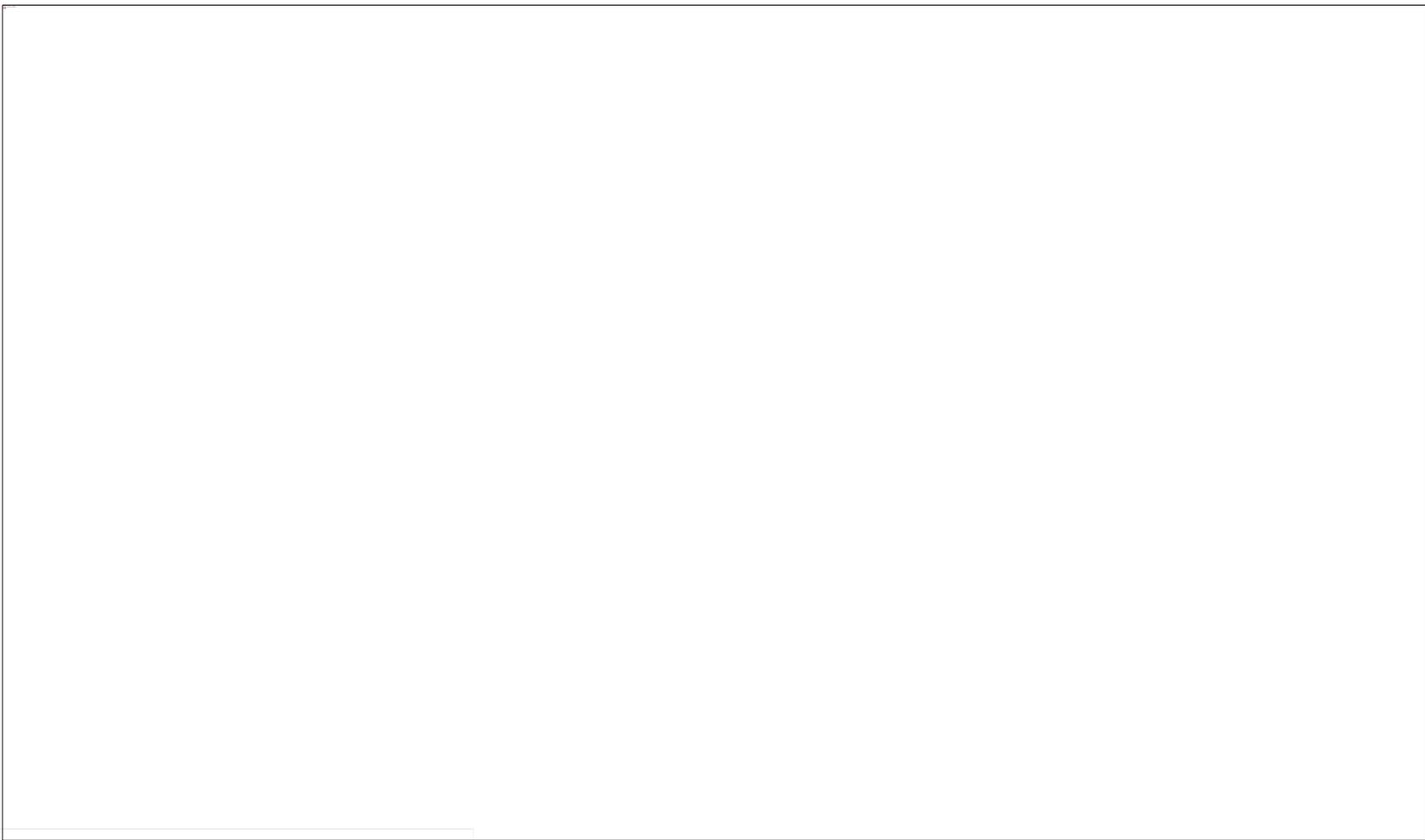


《中国药典》（2010年版）
万级下的百级

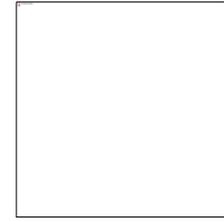
《中国药典》（2015年版）
9205 药品洁净实验室微生物监测和控制
指导原则
9206 无菌检查用隔离系统验证指导原则

B+A 或隔离系统

无菌环境要求



清洁、消毒和卫生



· 理想的消毒剂

可杀死广泛的微生物；对人类无毒害；不会腐蚀或沾污设备；

具有清洁剂作用；稳定；起效快；不会被有机物灭活；

极小的残留；价格合理

· 主要的消毒剂类型

酚类；季铵盐类；次氯酸钠；二氧化氯；过氧化氢；过乙酸；

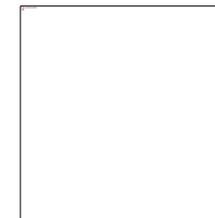
过乙酸/过氧化氢混合物；戊二醛/甲醛；醇类

	喷雾70%酒精	抹擦70%异丙醇	喷雾间抹擦
金黄色葡萄球菌	99.8	99.6	100.0
枯草芽孢杆菌	27.6	80.6	93.9

无菌隔离系统与传统洁净技术的对比

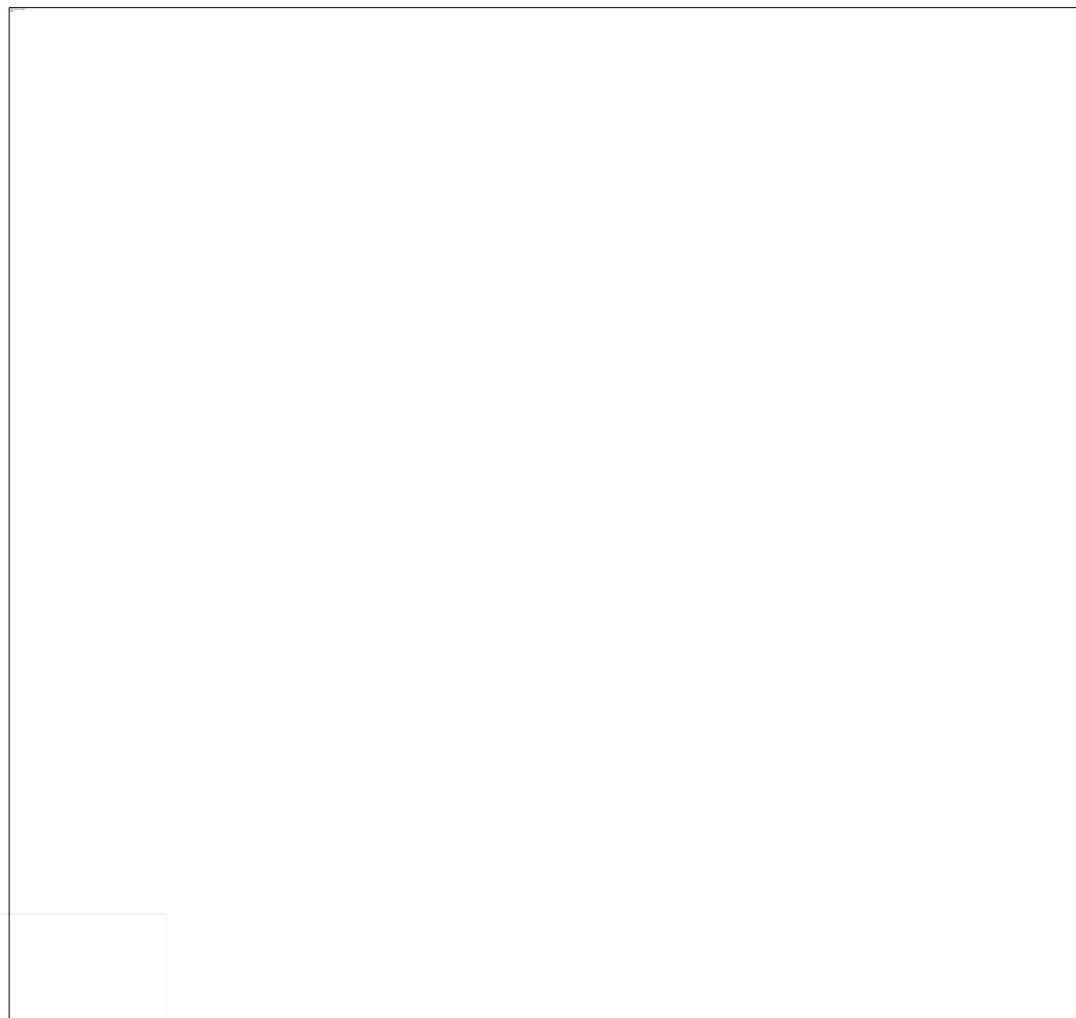
项目	消毒/灭菌方法	洁净环境的控制	对操作人员的防护	物料传送方式	人员进出	运行所需能耗	误操作导致的无菌环境污染的风险
传统洁净技术	消毒剂擦拭/熏蒸/紫外线照射等方法受空间等诸多因素影响效果难以验证	易受人员、物料等诸多因素影响，易受污染，难以控制	取决于操作人员自身技术和熟练程度	传统的传递窗，易导致无菌室环境破坏和物料的污染	需复杂的换鞋/工作服更换等步骤，带来额外工作量	高	误操作可能性大，与操作人员有较大相关性
无菌隔离器技术	自动气体灭菌，省时省力，气体分布均匀，效果较好，容易验证	与外界完全隔离，仅通过HEPA进行空气交换并可恒定舱内压力以阻绝外界污染	安全系数高	双门快速传递系统保证在无菌环境中传递，无菌保证程度高	仅通过穿戴手套/半身工作服即可	低	可能性极小

三种主要设备比较

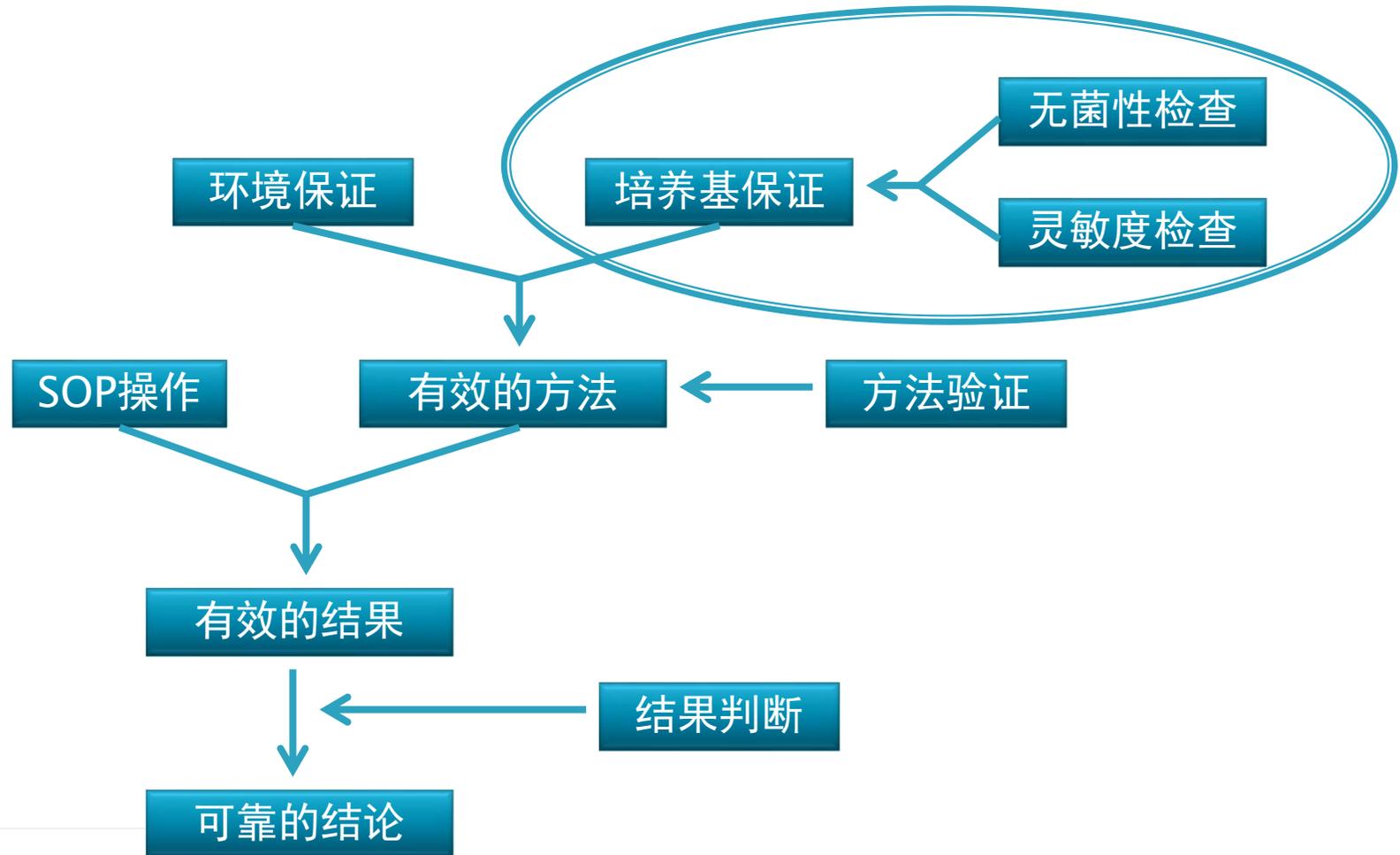
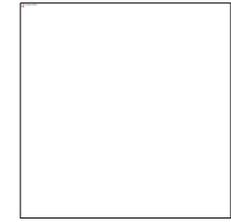


	生物安全柜	层流柜	无菌隔离器
人员保护	☆☆	☆	☆☆☆
环境要求	☆☆	☆☆☆	☆
样品保护	☆☆	☆☆	☆☆☆
处理样品灵活性	☆☆☆	☆☆	☆
操作难度	☆☆	☆☆☆	☆
运行维护难度	☆☆	☆☆☆	☆

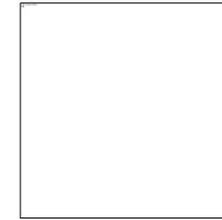
无菌隔离系统



无菌检查的过程控制

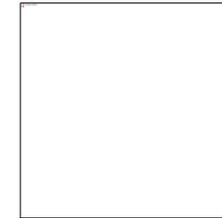


2015版无菌检查培养基与USP、BP的比较



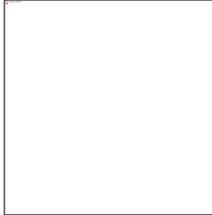
药典	USP	BP	中国药典2015
名称	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基
目的	培养需氧、厌氧和微需氧微生物（主要是厌氧菌）	培养需氧、厌氧和微需氧微生物（主要是厌氧菌）	培养需氧、厌氧微生物
培养条件	14天于30~35℃及20~25℃		
配方	Pancreatic Digest of Cassein（胰酪蛋白胨） Yesat Extract（酵母浸出粉） Dextrose（葡萄糖） Sodium Chloride（氯化钠） L-Cystine（L-胱氨酸） Sodium Thioglycollate（硫乙醇酸钠） Agar（琼脂） Resazurin（刃天青）		15.0g 5.0g 5.5g 2.5g 0.5g 0.5g 0.75g 1.0mg

大豆胰酪胨培养基（TSB） & 改良马丁培养基



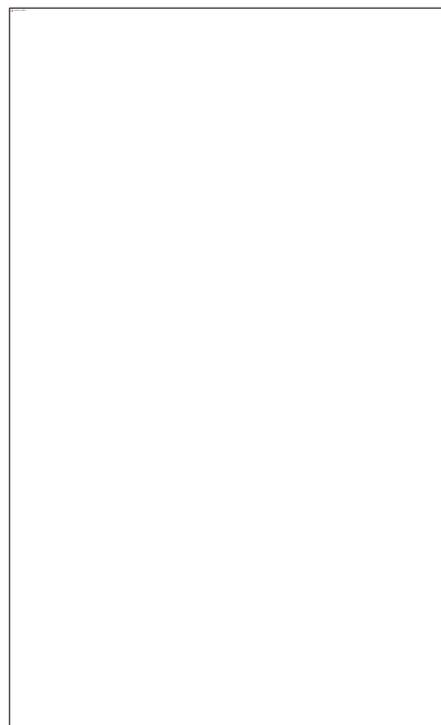
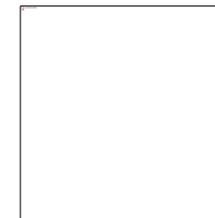
药典	USP36	BP-2013	中国药典2010版	中国药典2015版
名称	Tryptic Soy Broth (Soybean Casein Digest Medium) 大豆-胰酪胨培养基		改良马丁培养基	胰酪大豆胨液体培养基
配方	胰酪蛋白胨 7.0g 大豆木瓜蛋白酶消化物 3.0g 氯化钠 5.0g 磷酸氢二钾 2.5g 一水葡萄糖 2.5g		蛋白胨 5.0g 酵母浸出粉 2.0g 葡萄糖 20.0g 磷酸氢二钾 1.0g 硫酸镁 0.5g	胰酪胨 17.0g 大豆木瓜蛋白酶水解物 3.0g 氯化钠 5.0g 磷酸氢二钾 2.5g 葡萄糖 2.5g
目的	支持广泛微生物的生长，包括需氧菌、专性和兼性厌氧菌、真菌（主要是需氧菌）		用于培养真菌	支持广泛微生物的生长，包括需氧菌、专性和兼性厌氧菌、真菌（主要是需氧菌）
培养条件	14天于30~35℃及20~25℃		14天于20~25℃	14天于30~35℃及20~25℃

微生物实验室常用菌株

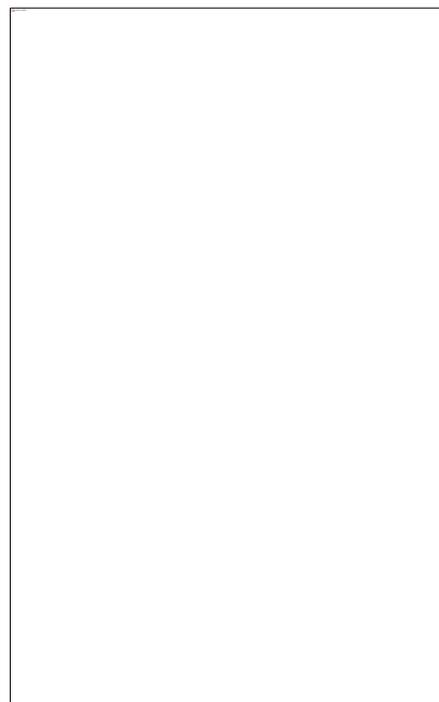


- 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)
[CMCC (B) 10104]
 - 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)
[CMCC (B) 44102]
 - 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)
[CMCC (B) 26003]
 - 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)
[CMCC (64941)]
 - 枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*)
[CMCC (B) 63501]
 - 白色念珠菌 (*Candida albicans*)
[CMCC (F) 98001]
 - 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)
[CMCC (F) 98003]
- G-杆菌
- G+球菌
- 兼性需氧菌
- 专性厌氧菌
- G+芽孢杆菌
- 酵母菌
- 霉菌
- 专性需氧菌

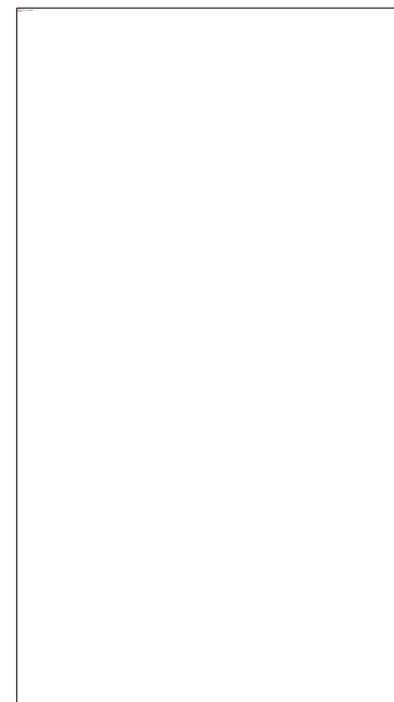
在硫乙醇酸盐流体培养基中生长差异



需氧层厌氧层均生长



仅在厌氧层生长



仅在需氧层生长

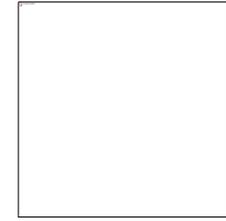
- 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)
CMCC (B) 10104
- 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*)
CMCC (B) 44102
- 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)
CMCC (B) 26003

- 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)
CMCC (B) 64941

- 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
CMCC (B) 63501



培养基的适用性检查



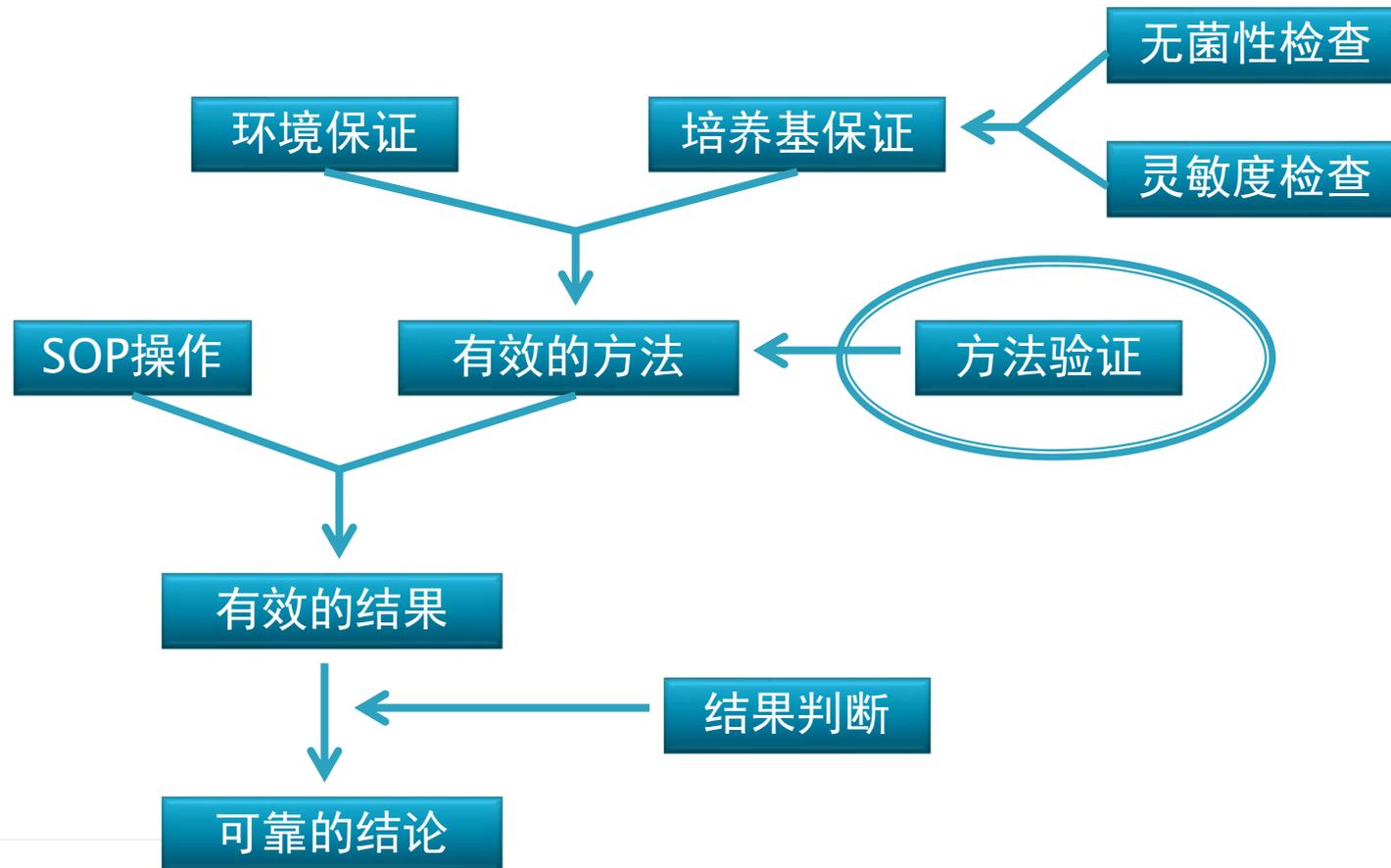
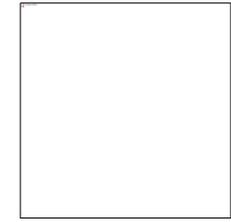
▶ 无菌性检查

每批培养基随机取不少于5支（瓶），置各培养基规定的温度培养14天，应无菌生长。

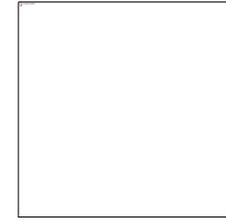
▶ 灵敏度检查

- 菌液制备
- 培养基接种

无菌检查的过程控制



方法适用性内容修订



2010版（方法验证）

硫乙醇酸盐流体培养基接入小于100cfu的

- ①金黄色葡萄球菌
- ②大肠埃希菌
- ③枯草芽孢杆菌
- ④生孢梭菌

改良马丁培养基接入小于100cfu的

- ①白色念珠菌
- ②黑曲霉

2015版（方法适用性试验）

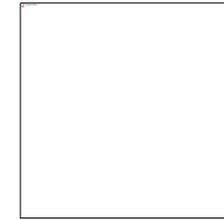
硫乙醇酸盐流体培养基接入小于100cfu的

- ①金黄色葡萄球菌
- ②大肠埃希菌
- ③生孢梭菌

胰酪大豆胨液体培养基接入小于100cfu的

- ①枯草芽孢杆菌
- ②白色念珠菌
- ③黑曲霉

方法适用性检查---直接接种法 (FT)



培养3~5d, 观察生长情况

金葡、大肠和生孢
各两支 (分别接入小于100cfu)。



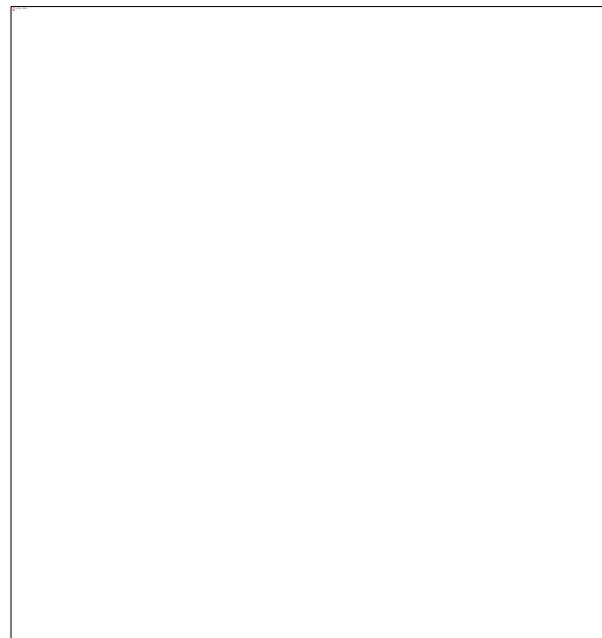
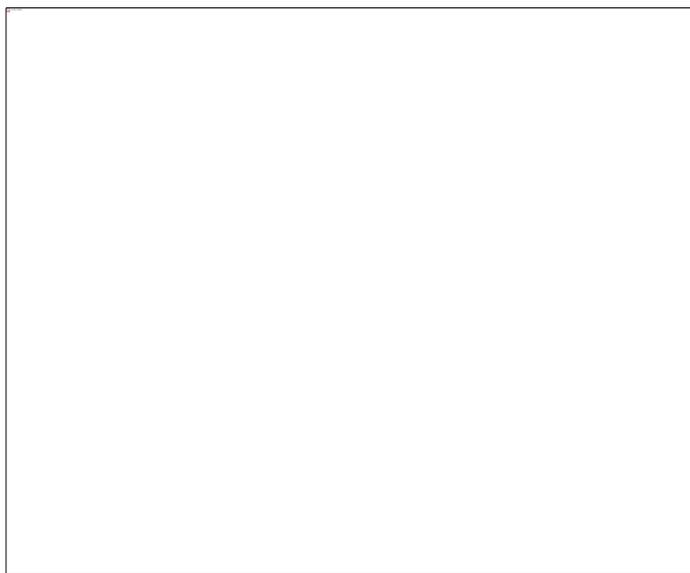
方法适用性检查---直接接种法（TSB）



枯草、白念和黑曲霉
各两支（100cfu）。
TSB

培养3~5d,
观察生长
情况

无菌检查方法适用性-薄膜过滤法



最后一次冲洗后加入阳性菌。



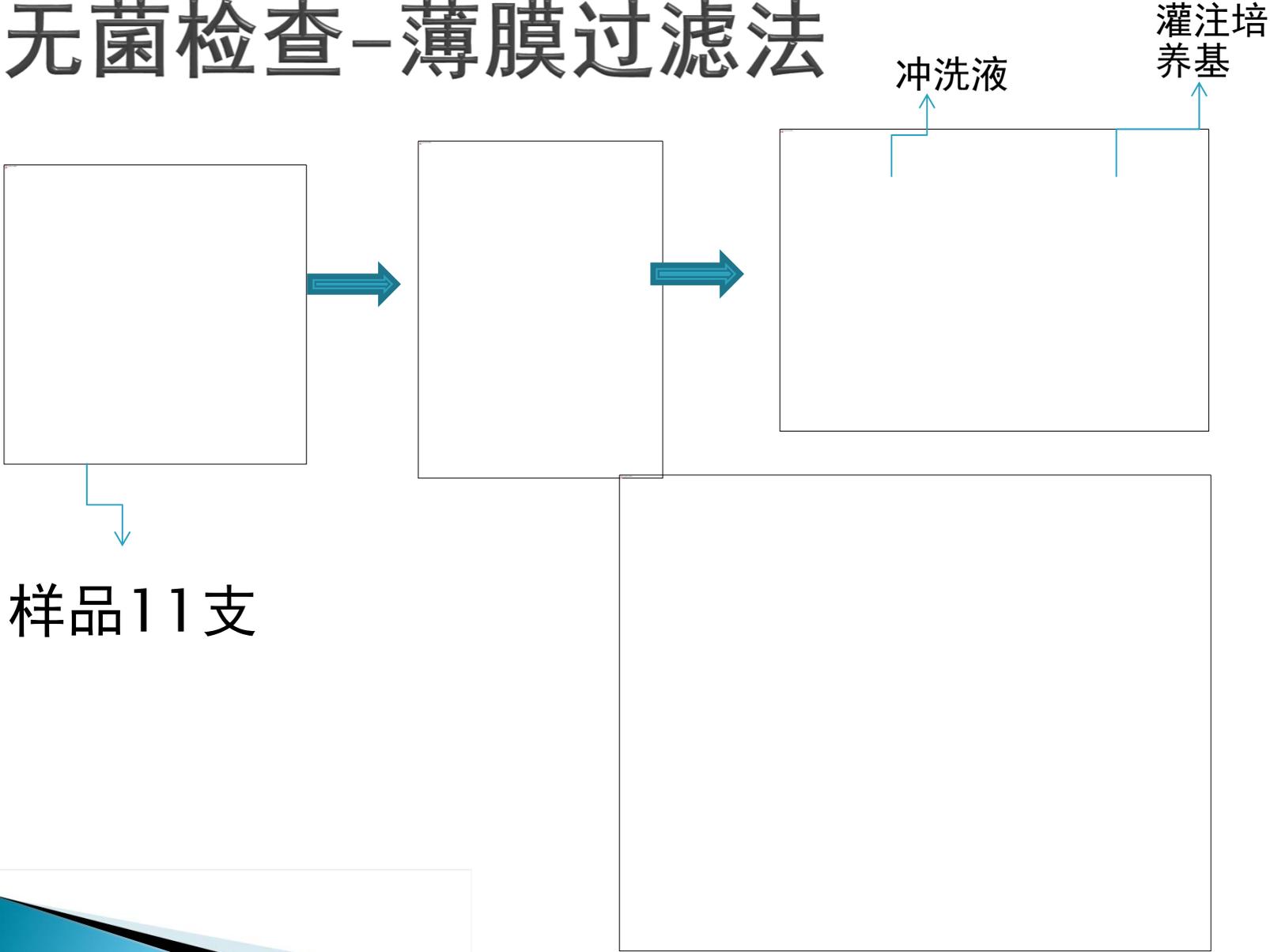
直接接种法----实例

FT培
养基
30-
35 °C

TSB培养
基20-
25 °C

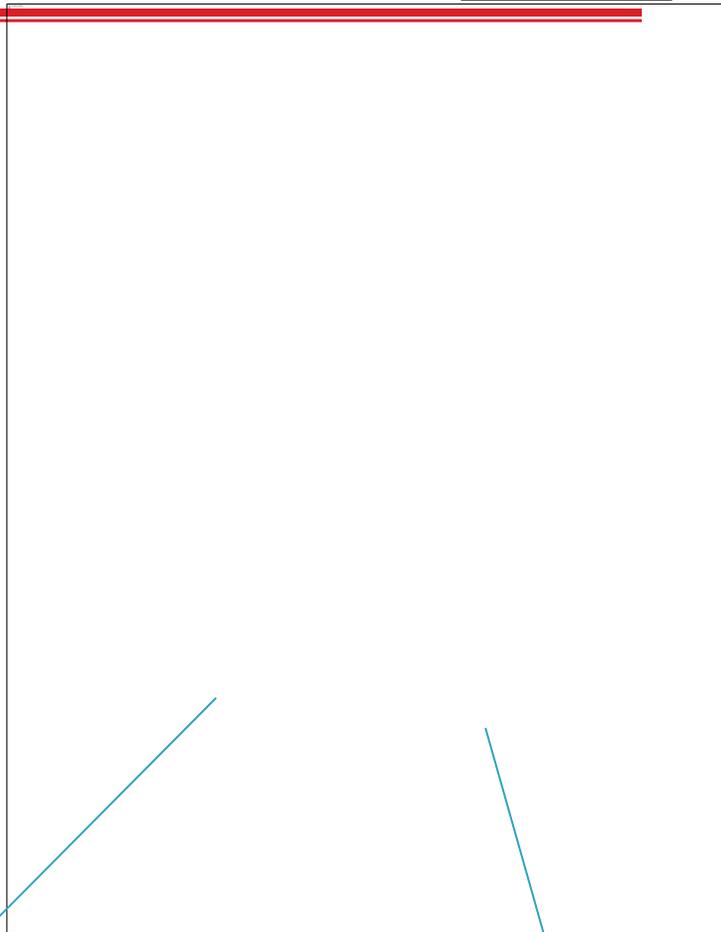
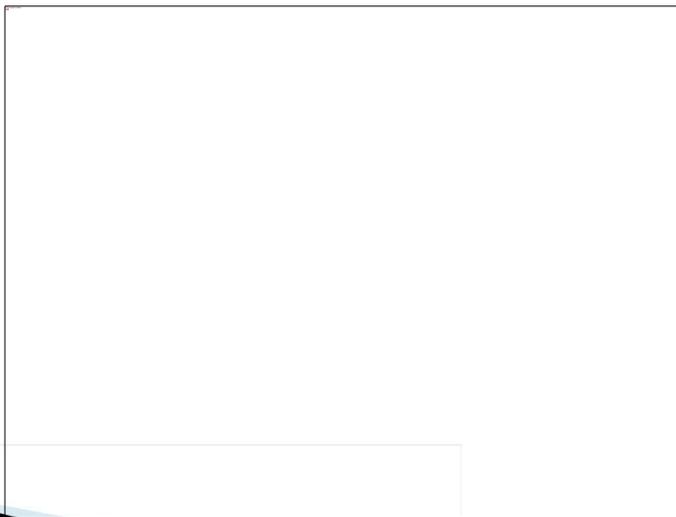
培养14d，每天观察生长情况。

无菌检查-薄膜过滤法



供试品的无菌检查（培养及观察）

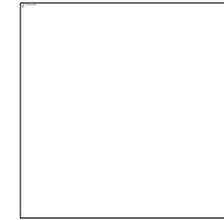
- ▶ 硫乙醇酸盐流体培养基 30°C ~35 °C
- ▶ 胰酪大豆胨液体培养基 20°C ~25 °C
- ▶ 培养时间：14天
- ▶ 逐日观察并记录
- ▶ 培养液涂片、染色、镜检



澄清

浑浊

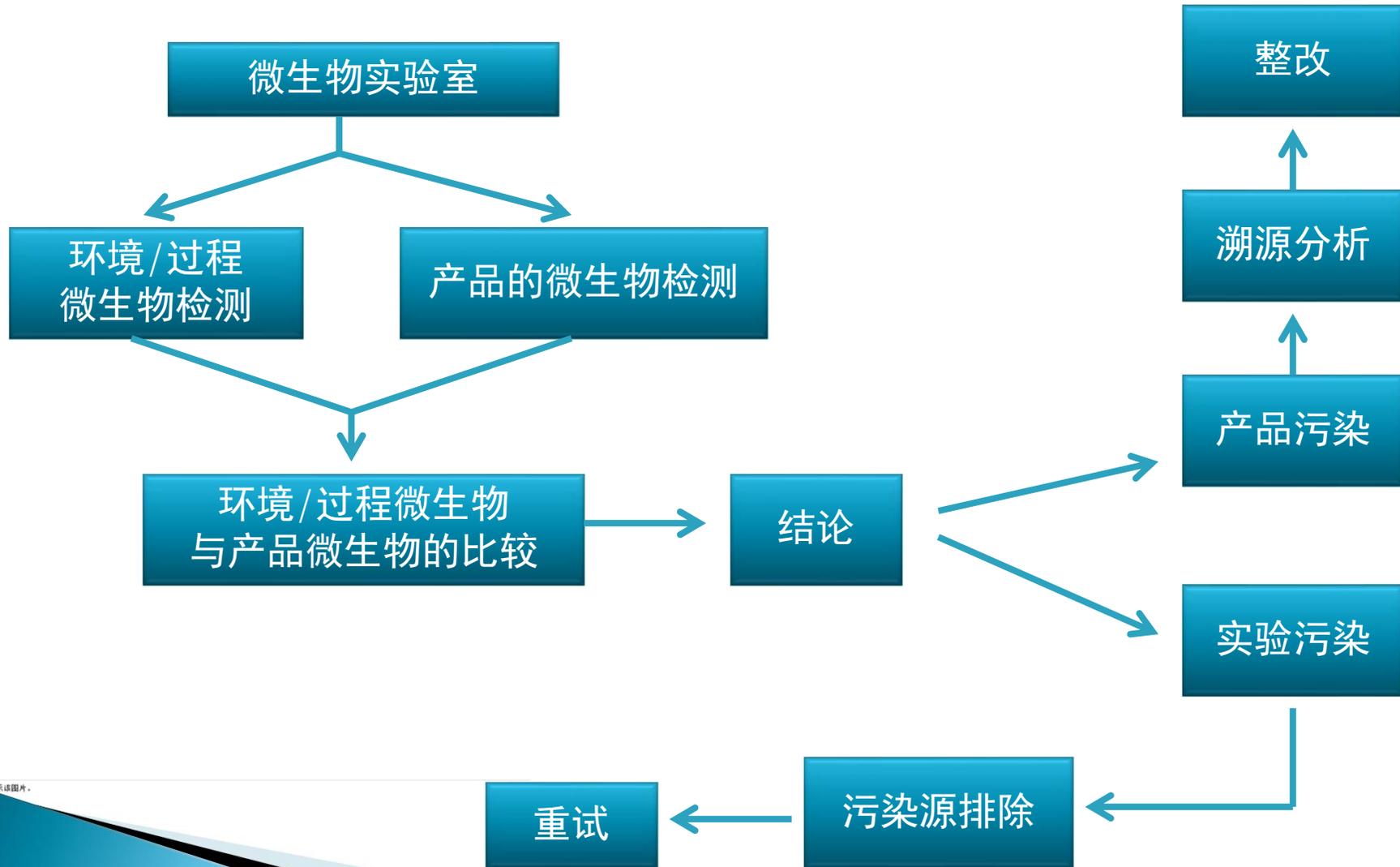
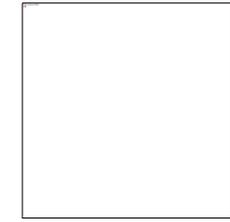
供试品的无菌检查（结果判断）



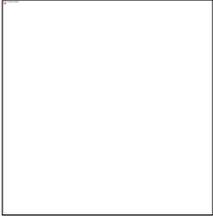
- ▶ 阳性对照管（+），阴性对照管（-）
- ▶ 若供试品管均澄清，或虽显浑浊但经确证无菌生长，即判合格。
- ▶ 若供试品管中任何一管显浑浊并确证有菌生长，即判不合格。
- ▶ 当符合下列至少一个条件时可判试验结果无效
 - 设备、环境的微生物监控结果超标
 - 回顾试验过程，发现污染因素
 - 鉴定微生物，确认是操作引入的试验若经确认无效，应重试。

无菌试验经确认无效，可重试。

无菌检验的溯源分析



总结



- ▶ 无菌检查的基本概念

 - 定性、局限性、影响因素

- ▶ 无菌检查的过程控制

 - 环境保障、培养基保障、操作保障

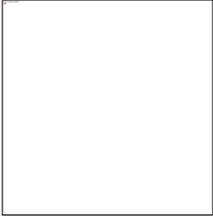
- ▶ 无菌检查的溯源性调查

 - 过程微生物信息的全面性、微生物鉴定结果的准确性

2015版微生物限度检测

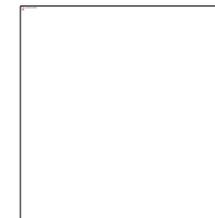
- ▶ 非无菌产品微生物
- ▶ 限度检查法

主要内容



- ▶ 微生物限度检查法概述
- ▶ 非无菌产品微生物限度检查（微生物计数法）
- ▶ 非无菌产品微生物限度检查（控制菌检查法）

微生物限度检查法概述



▶ 适用范围

- 非规定灭菌制剂及其原料、辅料受微生物污染程度的方法
- 用于能在有氧条件下生长的嗜温细菌和真菌的计数
- 不适用于活菌制剂的检查

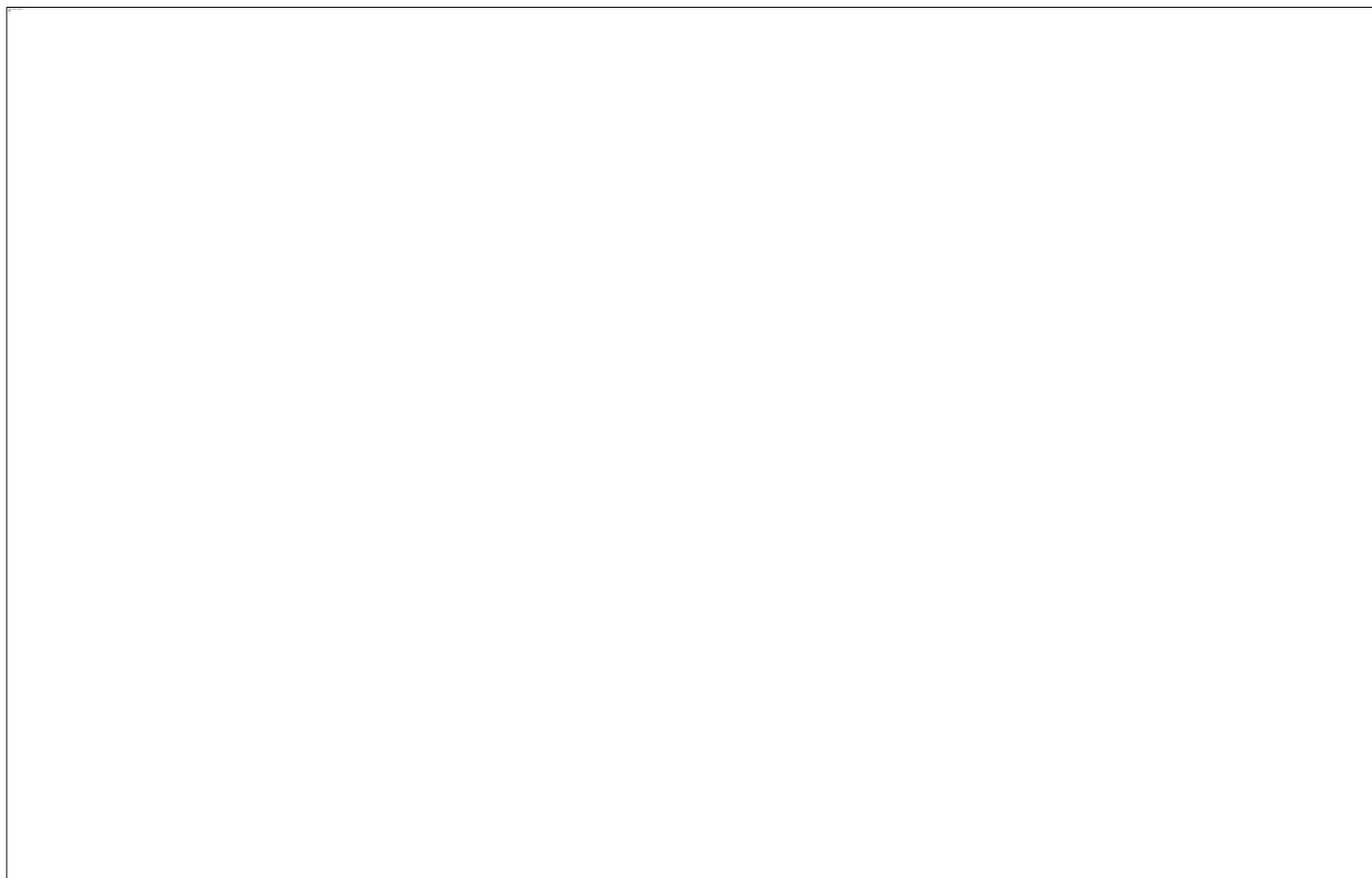
▶ 环境要求

- 不低于D级背景下的B级单向空气流

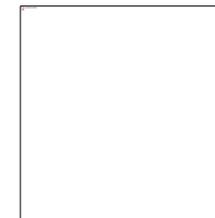
▶ 培养条件

- 需氧菌：30 °C ~35 °C
- 霉菌和酵母菌；20 °C ~25 °C

微生物限度2015版

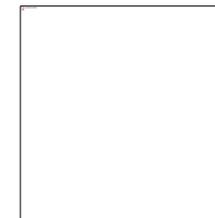


微生物限度检查法概述（计数法）



	15版药典	10版药典
分类依据	营养条件	微生物类别
检验项目1	需氧菌总数，3d~5d 胰酪大豆胨琼脂/肉汤（TSA/B）	细菌数，3d 营养琼脂（NA）
检验项目2	霉菌及酵母菌总数，5d~7d 沙氏葡萄糖琼脂（SDA）	霉菌及酵母菌总数，5d 玫瑰红钠琼脂（RA）
特点	客观严谨	检验条件不满足控制要求

微生物限度检查法概述



10版药典

15版药典

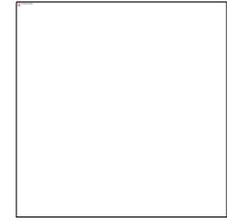
细菌数—营养琼脂

需氧菌总数（TAMC）—胰酪大豆胨琼脂（TSA）
生长在TSA上的所有菌落（包括霉菌和酵母菌）

霉菌及酵母菌—玫瑰红钠琼脂培养基

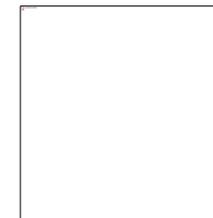
霉菌及酵母菌总数（TYMC）——沙氏葡萄糖琼脂（SDA）
生长在SDA上的所有菌落（包括细菌）
如果由于细菌的生长而使TYMC结果不符合微生物限度要求，可使用含抗生素（氯霉素、庆大霉素）的沙氏葡萄糖琼脂或其他选择性培养基（如玫瑰红钠琼脂培养基）重新进行计数

微生物限度检查：微生物计数法



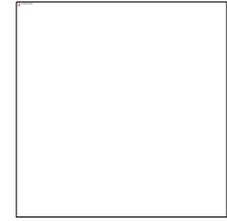
- ▶ 培养基适用性检查
- ▶ 方法适用性检查
- ▶ 常用计数方法（平皿法/薄膜过滤法/MPN法）

微生物限度检查：培养基适用性检查



试验菌株	试验菌液的制备	培养基适用性检查	
		需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌计数
金黄色葡萄球菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB, 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	/
铜绿假单胞菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB, 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	/
枯草芽孢杆菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB, 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	/
白色念珠菌	SDA或PDA, 20~25℃培养2~3d	TSA, 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	SDA, 20~25℃培养不超过5天, 接种量不大于100cfu
黑曲霉	SDA或PDA, 20~25℃培养5~7d	TSA, 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	SDA, 20~25℃培养不超过5天, 接种量不大于100cfu

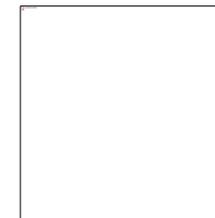
微生物限度检查：培养基适用性检查



- ▶ 培养基适用性检查评判标准：
 - 被检固体培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值在0.5 ~ 2范围内
 - 与对照培养基上的菌落形态大小一致

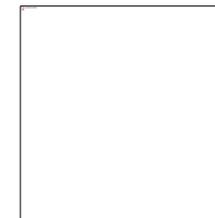


微生物限度检查：方法适用性检查



试验菌株	试验菌液的制备	培养基适用性检查	
		需氧菌总数计数	霉菌和酵母菌计数
金黄色葡萄球菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB (MPN法), 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	/
铜绿假单胞菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB (MPN法), 30~35℃培养不超过3d, 接种量不大于100cfu	/
枯草芽孢杆菌	TSA或TSB, 30~35℃培养18~24h	TSA或TSB (MPN法), 30~35℃培养不超过5d, 接种量不大于100cfu	/
白色念珠菌	SDA或PDA, 20~25℃培养2~3d	TSA (MPN法不适用), 30~35℃培养不超过5d, 接种量不大于100cfu	SDA, 20~25℃培养不超过5天, 接种量不大于100cfu
黑曲霉	SDA或PDA, 20~25℃培养5~7d	TSA (MPN法不适用), 30~35℃培养不超过5d, 接种量不大于100cfu	SDA, 20~25℃培养不超过5天, 接种量不大于100cfu

微生物限度检查：方法适用性检查



▶ 培养基适用性检查评判标准：

- 平皿法&膜法：回收率在50% ~200%

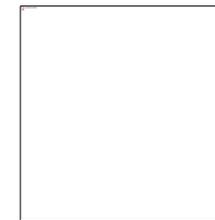
试验组的加菌回收率=



- MPN法：试验组的菌数应在稀释剂对照组菌数的95%置信限内



微生物限度检查：方法适用性检查变化



▶ 试验菌株的加入方式：

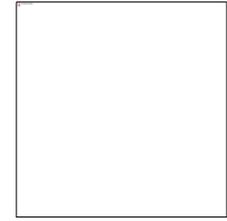
- 10版药典：1mL供试液和100cfu试验菌分别注入平皿
- 15版药典：**菌液加入供试液**，所加菌液体积不超过供试液体积的1%，使每mL供试液或每张滤膜所滤过的供试液中含菌量不大于100cfu

▶ **不规定**试验重复次数（10版：3次）

▶ 方法适当调整

- 若因供试品抗菌活性或溶解性较差的原因导致无法选择最低稀释级的供试液进行方法适用性试验时，应采用适宜的方法对供试液进行进一步处理
- 如果供试品对微生物生长的抑制作用无法以其他方法消除，供试液可经过中和、稀释或薄膜过滤处理后再加入试验菌悬液进行方法适应性试验

非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法

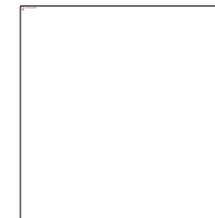


▶ 常用的计数方法：

- 平皿法：倾注法和涂布法
- 薄膜过滤法
- **最可能数法**（Most-Probable-Number Method，简称MPN）

注：为15版药典新增内容，仅在供试品需氧菌总数没有适宜计数方法时使用不适用霉菌计数。用于微生物计数时精确度较差。

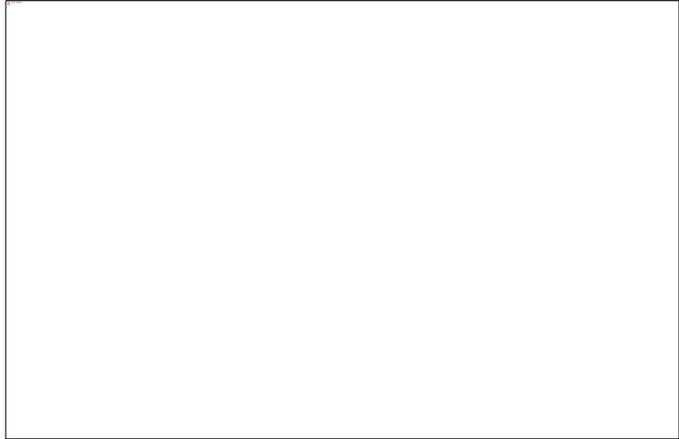
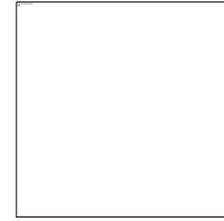
微生物计数：平皿法



	倾注法	涂布法
操作	先加入一定量的菌液，然后加入培养基，混匀冷却后倒置培养	将培养基冷却后，加一定量的菌液，用涂布器均匀涂布后，待菌液被渗透吸收，倒置培养
特点	<ul style="list-style-type: none">· 操作方便快捷· 接种量为1 mL或更多样品· 不可使用预制培养基· 培养基表面适宜好氧菌，内部适宜兼性厌氧菌培养	<ul style="list-style-type: none">· 操作较繁琐，增加污染几率· 接种量为0.1~0.3 mL· 可以使用预制培养基但计数不准确· 表面生长，适合好氧菌培养



微生物计数：薄膜过滤法

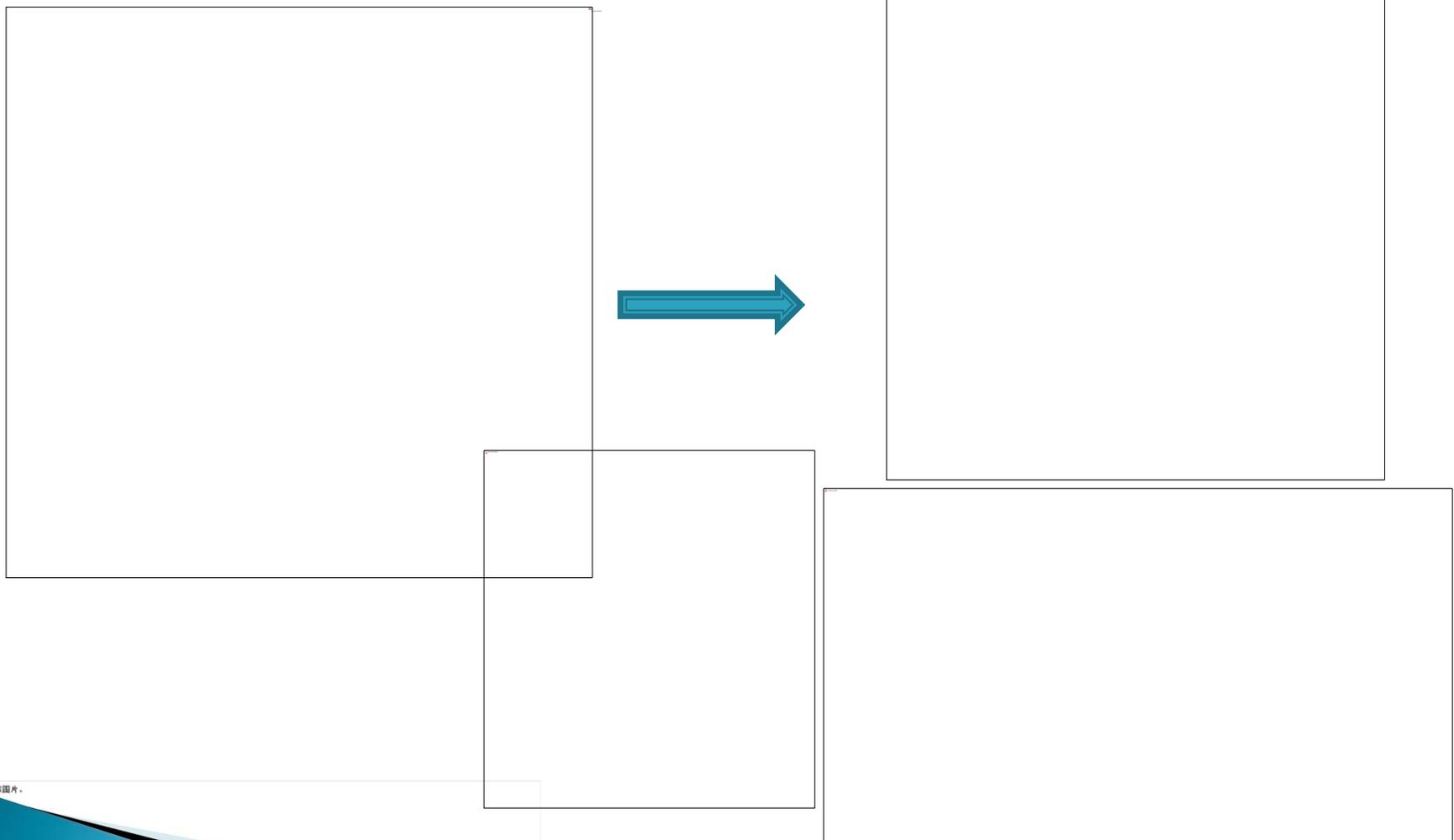


供试品特点

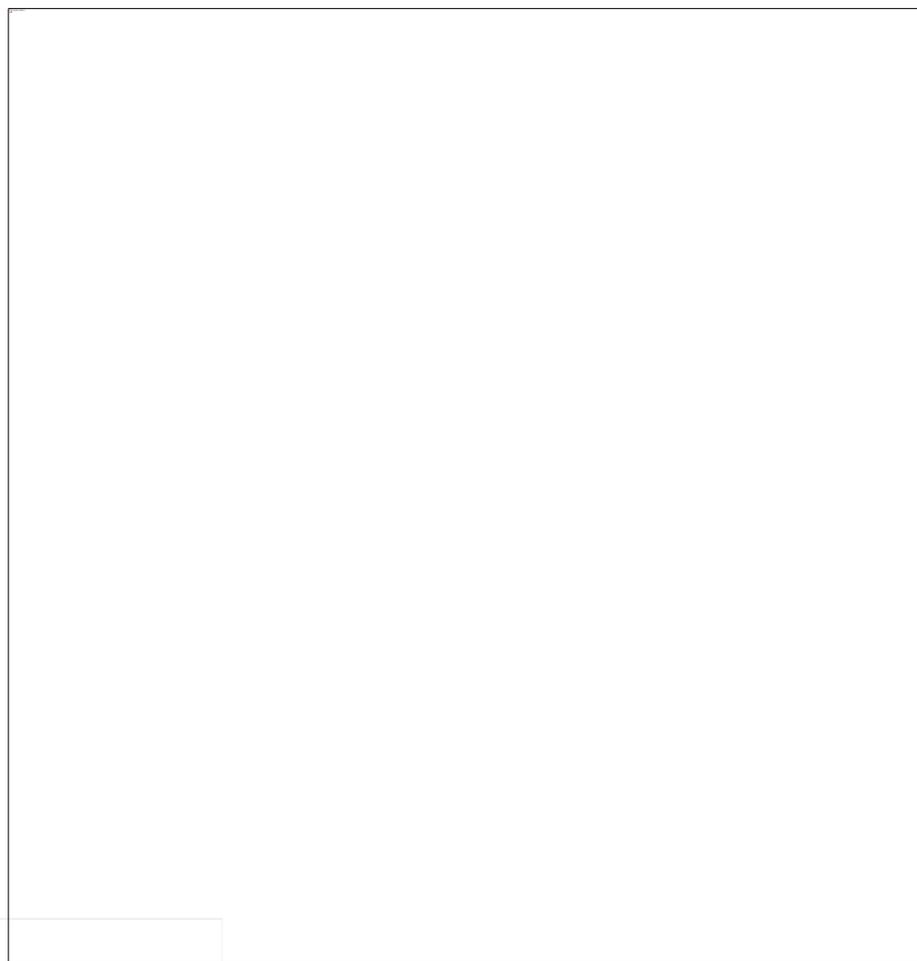
- 水溶性或油性
- 抑菌性
- 标准较严

- 薄膜孔径不大于0.45 μm
- 直径一般为50mm
- 每张滤膜每次冲洗量一般为100mL
- 总冲洗量不得超过1000mL

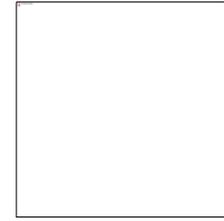
薄膜过滤法



微生物计数：薄膜过滤法



微生物计数：MPN法

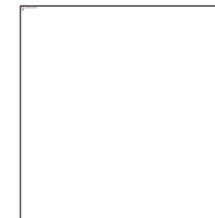


▶ MPN称为最大或然数（most probable number）：
应用概率理论来估算细菌浓度的方法。

- 首先将待测样品作系列稀释，然后每个稀释度取3 ~5次重复接种于适宜的液体培养基中
- 培养后，将有菌液生长的最后3个稀释度（临界级数）中出现细菌生长的管数作为数量指标
- 查最大或然数表，得近似值，再乘以稀释倍数，得出样品单位体积中

细菌数近似值

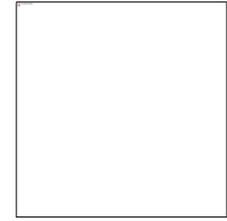
微生物限度检查：控制菌检查法



序号	15版药典	10版药典
1	耐胆盐革兰氏阴性菌	大肠菌群
2	大肠埃希菌	大肠埃希菌
3	沙门菌	沙门菌
4	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌
5	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌
6	梭菌	梭菌
7	白色念珠菌	白色念珠菌

注：培养基体系有明显变化

微生物限度检查：控制菌检查法



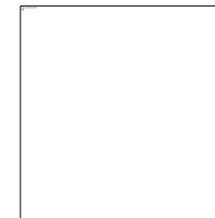
▶ 稀释液

- pH7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液
- PBS: pH7.2, pH6.8 (肠溶制剂) pH7.6 (结肠溶制剂)
- 胰酪胨大豆肉汤培养基: TSB

注：TSB：用于耐胆盐革兰氏阴性菌、沙门菌供试液制备，其他控制菌检查，供试液制备不限稀释剂。

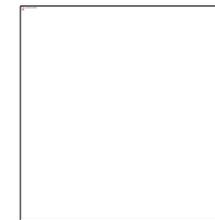


微生物限度检查：控制菌检查法



控制菌	培养基	特性	试验菌株
耐胆盐革兰氏阴性菌	EE肉汤 VRBG琼脂	+/- +&指示	大肠、铜绿/金葡 大肠、铜绿
大肠埃希菌	麦康凯肉汤 麦康凯琼脂	+/- +&指示	大肠/金葡 大肠
沙门菌	RVS增菌肉汤 XLD琼脂	+/- +&指示	沙门/金葡 沙门、大肠
铜绿假单胞菌	溴化十六烷基三甲胺琼脂	+ -	铜绿 大肠
金黄色葡萄球菌	甘露醇高盐琼脂	+&指示 -	金葡 大肠
梭菌	梭菌增菌培养基 哥伦比亚琼脂	+	生孢梭菌
白色念珠菌	SDB/SDA	+ / +&指示	白色念珠菌

耐胆盐革兰氏阴性菌分类学地位



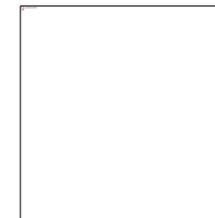
▶ 耐胆盐革兰氏阴性菌

- 需氧及兼性厌氧，可以耐受胆盐的革兰氏阴性无芽孢杆菌

▶ 大肠菌群

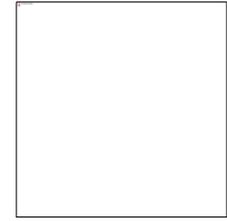
- 需氧及兼性厌氧，在37 °C能分解乳糖产酸产气的革兰氏阴性无芽孢杆菌
- 大肠菌群不是细菌学上分类命名，而是一组与粪便污染有关的细菌。这群细菌包括：埃希氏菌属、柠檬酸杆菌属、克雷伯菌属和肠杆菌属等
- 该菌群主要来源于人畜粪便，作为粪便污染评价的指示菌

耐胆盐革兰氏阴性菌检查方法



	检查方法
15版药典	定性 or 定量 1: 10 TSB 供试液 (20~25°C 2h, 恢复不增殖) 肠道增菌肉汤 (EE) → 紫红胆盐葡萄糖琼脂 (VRBG) (24h~48h) (18h~24h)
10版药典 大肠菌群	取1: 10供试液至乳糖胆盐发酵培养基管 18h~24h 曙红亚甲基蓝琼脂或麦康凯琼脂 18h~24h

大肠埃希菌分类学地位



界：细菌界

门：变形菌门

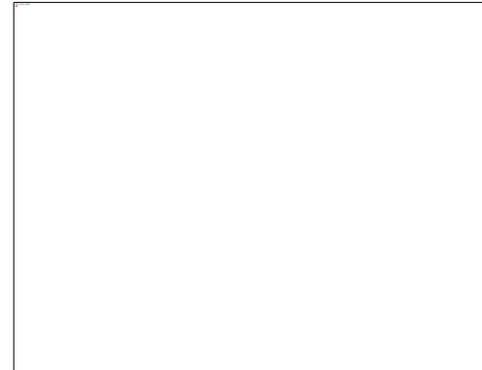
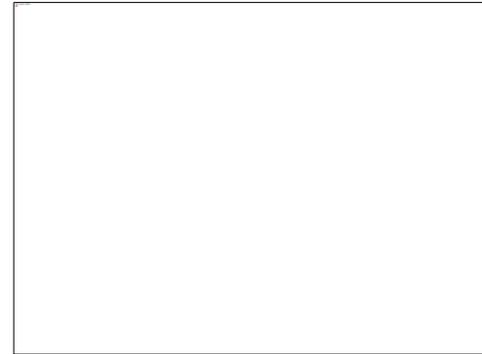
纲： γ -变形菌纲

目：肠杆菌目

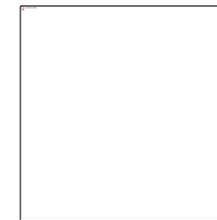
科：肠杆菌科

属：埃希氏菌属

种：大肠埃希菌 *Escherichia coli*



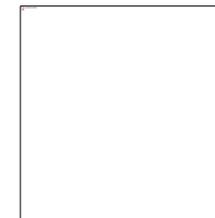
大肠埃希菌概述



大肠埃希菌通常称为大肠杆菌，是德国儿科医生Escherich在1885年发现的。

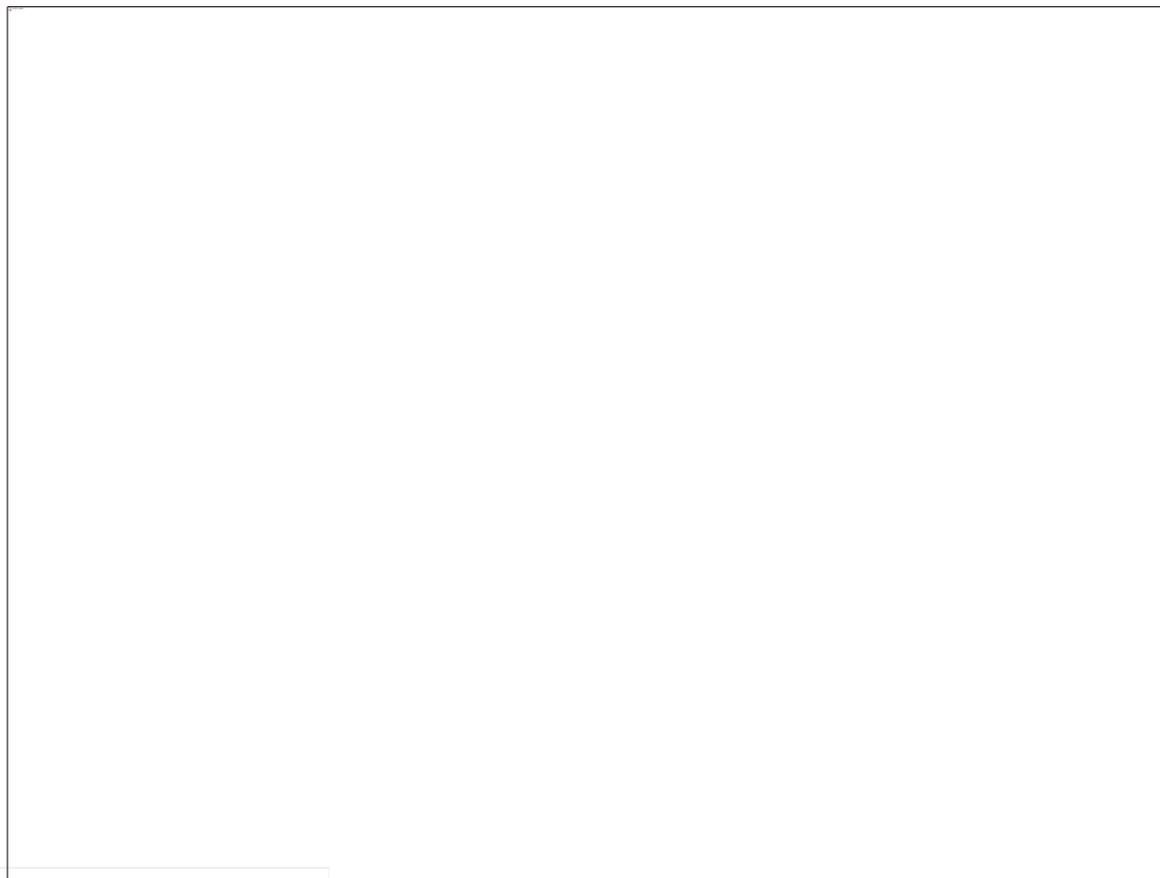
广泛存在于人和温血动物的肠道中，能在44.5°C发酵乳糖产酸产气的革兰氏阴性杆菌。特殊血清型的大肠杆菌对人和动物有病原性，尤其对婴儿和幼畜（禽），常引起严重腹泻与败血症。

大肠埃希菌检查方法

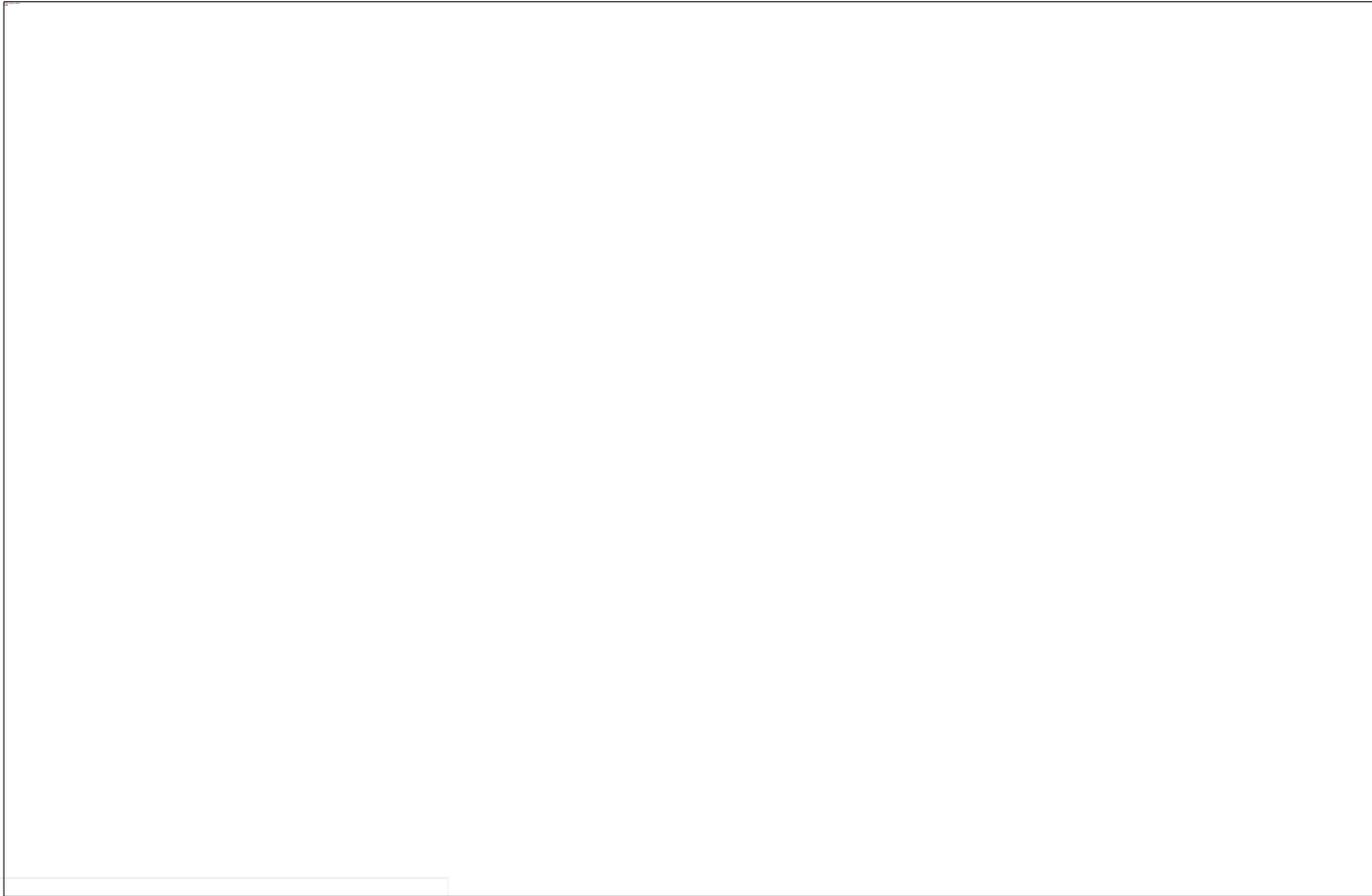


	检查方法
15版药典	1: 10供试液至TSB (适宜体积) 18h~24h 麦康凯液体培养基 \longrightarrow 麦康凯琼脂培养基 (42°C~44°C、24h~48h) (30°C~35°C、18h~72h)
10版药典 大肠菌群	取1: 10供试液至胆盐乳糖培养基 (BL) 培养18h~24h MUG培养基 5h、24h在366nm紫外光下观察, 靛基质试验 曙红亚甲基蓝琼脂或麦康凯琼脂培养18h~24h

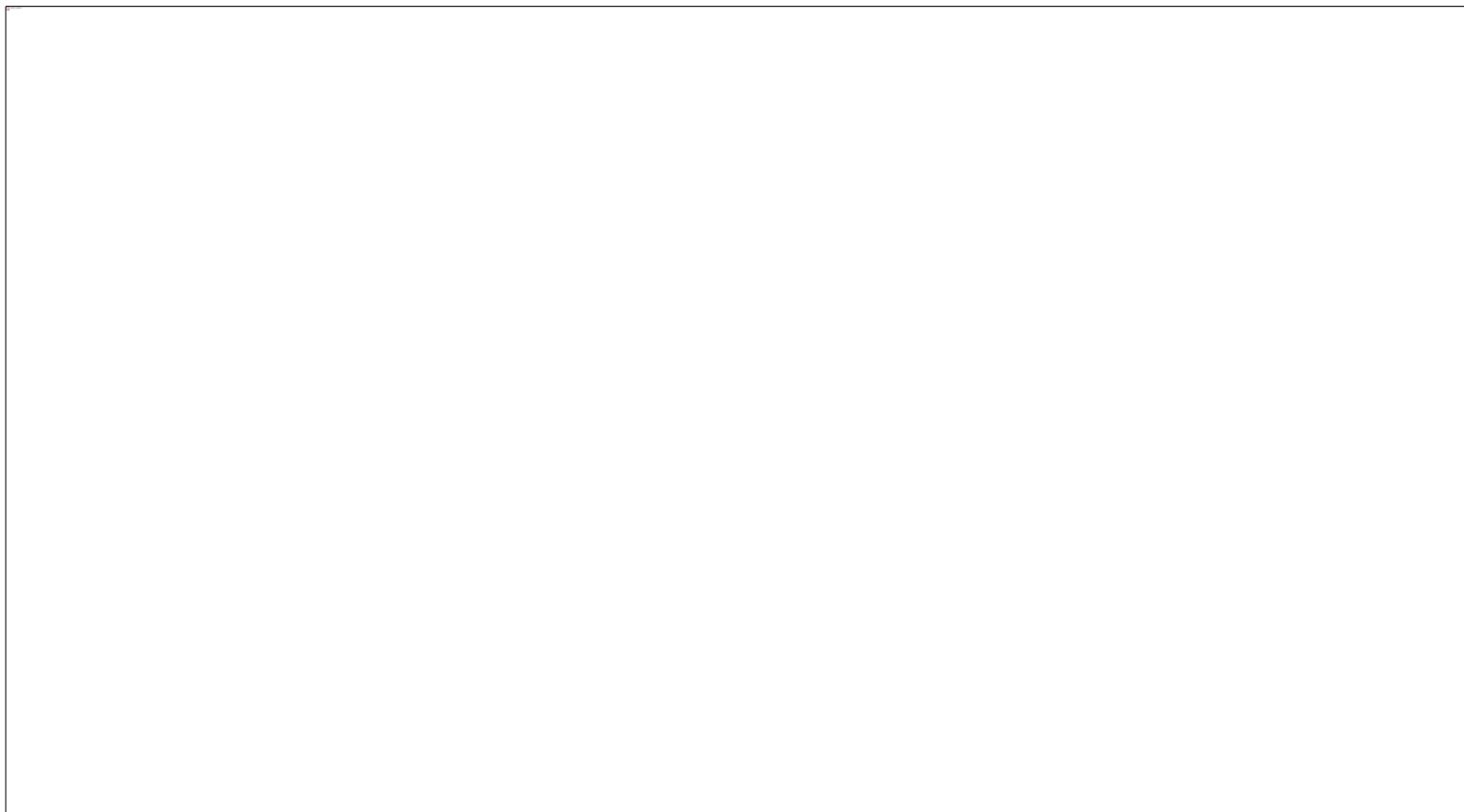
大肠埃希菌增菌



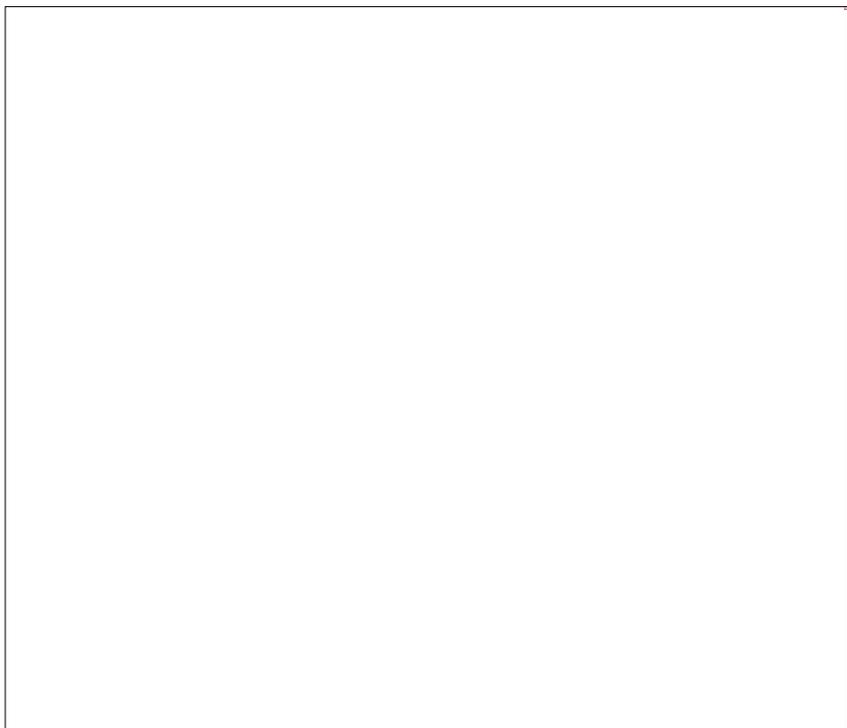
划线法——适合做单一菌落 (Single colony) 的分离



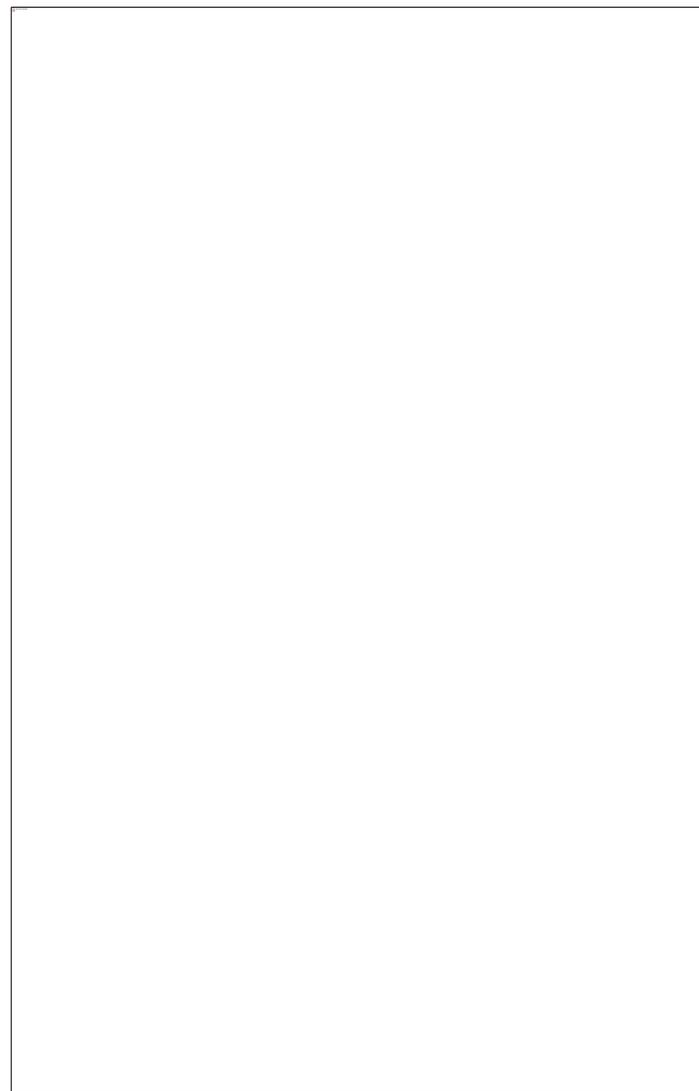
大肠埃希菌



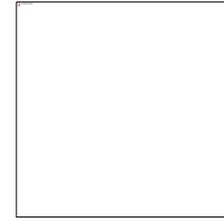
大肠埃希菌生化鉴定



革兰氏阴性杆菌鉴定系统A



沙门菌分类学地位



界：细菌界

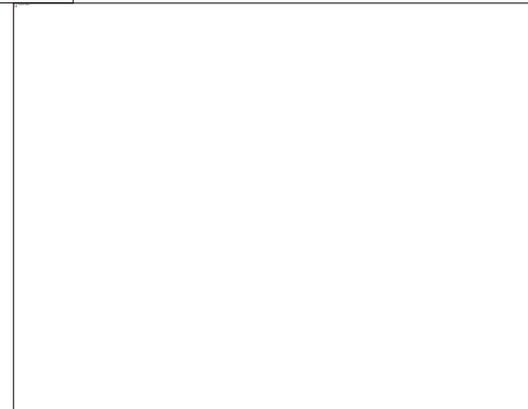
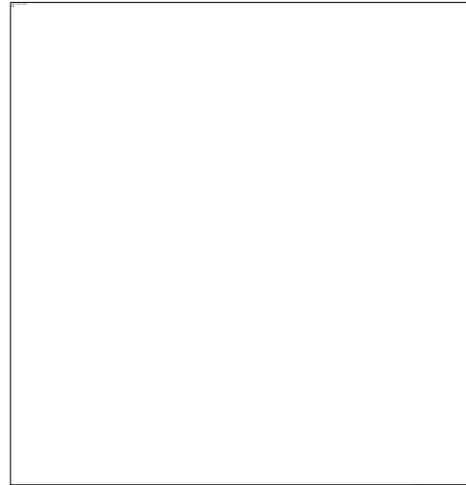
门：变形菌门

纲： γ -变形菌纲

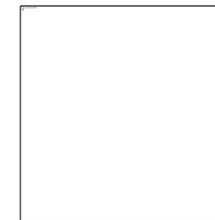
目：肠杆菌目

科：肠杆菌科

属：沙门氏菌属



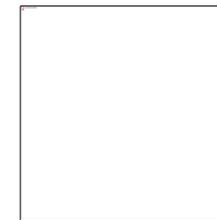
沙门菌概述及生物学特征



- ▶ 1885年Salmon氏等在猪霍乱流行时，分离出的猪霍乱沙门菌
- ▶ 沙门菌属是肠杆菌科中最重要的病原菌，是一群抗原结构、生化特性相似的革兰氏阴性杆菌。血清学繁多，目前已发现的沙门菌有2500多个血清型和变种
- ▶ 革兰氏阴性杆菌，无芽孢，一般无荚膜，除鸡瘟沙门菌和鸡沙门菌外均有动力，为周身鞭毛，并多数由菌

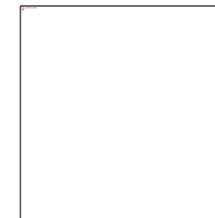
毛

沙门菌生物学特征



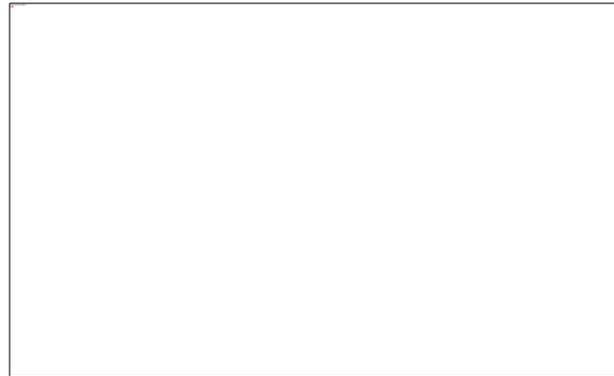
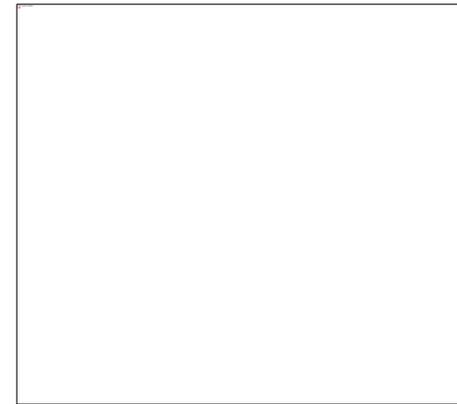
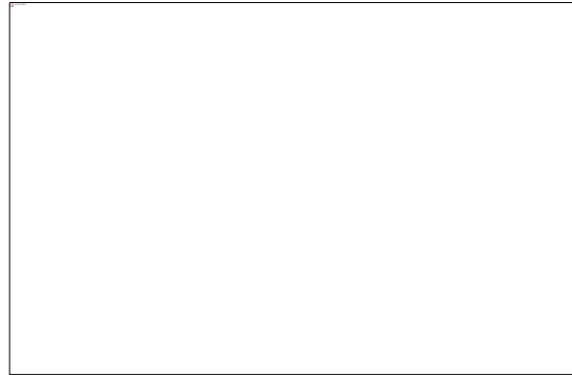
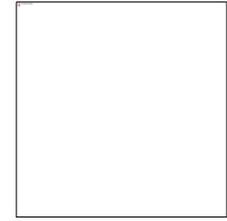
- ▶ 沙门菌为兼性厌氧菌，对营养需求不高，在普通营养培养基上均能生长，能够利用柠檬酸盐作为碳源
- ▶ 在肠道选择性平板上大多数可形成无色或产 H_2S 的菌落
- ▶ 不分解乳糖，大部分菌株产 H_2S ，发酵葡萄糖产酸产气
- ▶ 耐受胆盐，在粪便、土壤、食品、水中可生存5个月至二年之久

沙门菌检查方法

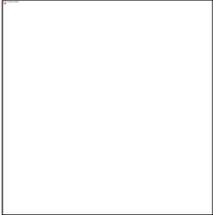


	检查方法
15版药典	10g供试液接种至TSB（适宜体积）18h~24h RV沙门增菌液体培养基（18h~24h） → 木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂（18h~48h）
10版药典 大肠菌群	10g供试液接种至营养肉汤培养基中 18h~24h 四硫磺酸钠亮绿培养基（18h~24h） → 胆盐硫乳琼脂/麦康凯琼脂（18h~48h）

沙门菌生物学特征



铜绿假单胞菌分类学地位



界：细菌界

门：变形菌门

纲： γ -变形菌纲

目：假单胞菌目

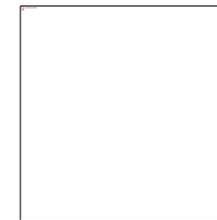
科：假单胞菌科

属：假单胞菌属

种：铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*

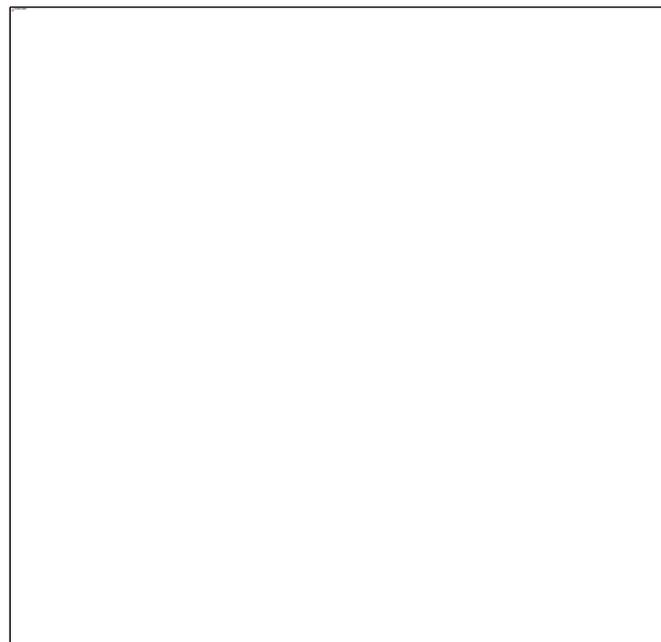
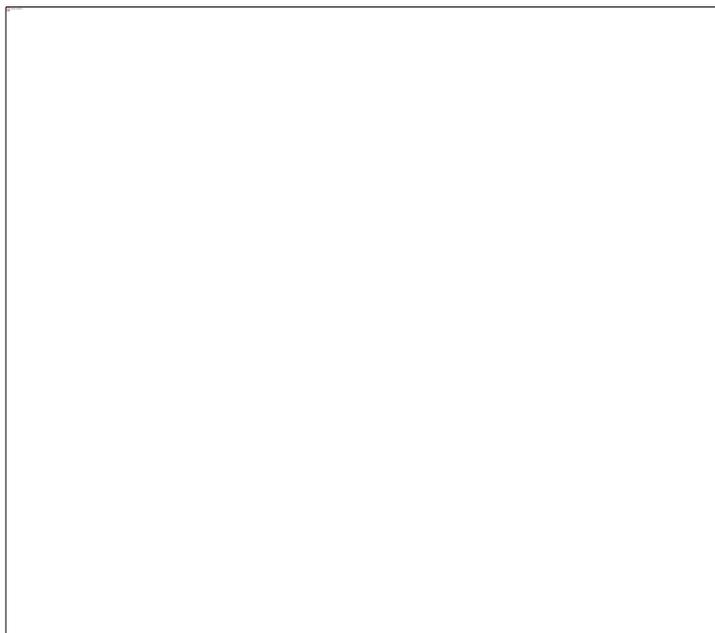


铜绿假单胞菌概述

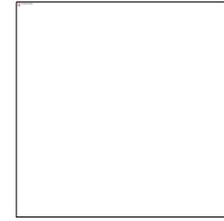


- ▶ 俗称绿脓杆菌，是假单胞菌属的代表菌种，是一种常见的条件致病菌，在琼脂平板上能产生蓝绿色绿脓素
- ▶ 专性需氧菌，生长温度范围25 ~42 °C，最适生长温度25 ~30°C，特别是该菌在4 °C不生长而在42 °C可以生长的特点可以用以鉴别
- ▶ 营养要求低，潮湿处易生长。研究表明，水与铜绿假单胞菌存在联系紧密。医院内长期潮湿的地方及湿的物品时铜绿假单胞菌贮存的场所

铜绿假单胞菌



铜绿假单胞菌检查方法

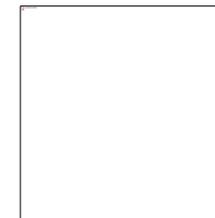


	检查方法
15版药典	1: 10g供试液至TSB（适宜体积）18h~24h 划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂 (18h~72h)
10版药典 大肠菌群	1: 10供试液接种至胆盐乳糖培养基中 18h~24h 划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂 (18h~72h)

10版与15版选择性培养基相同，增菌液有差异！



金黄色葡萄球菌分类学地位



界：细菌界

门：厚壁菌门

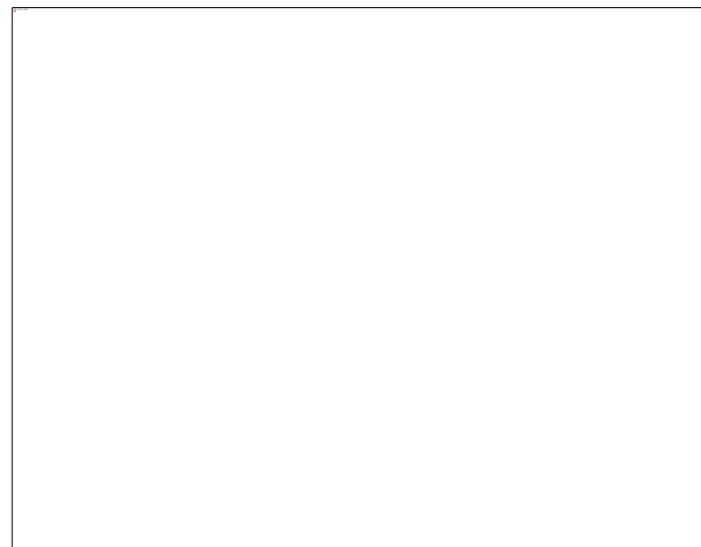
纲：芽孢杆菌纲

目：芽孢杆菌目

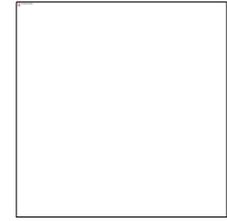
科：微球菌科

属：葡萄球菌属

种：金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus*

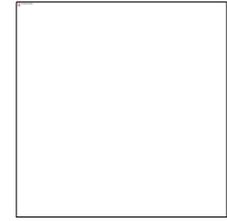


金黄色葡萄球菌概述



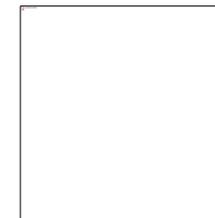
- ▶ 葡萄球菌属微球菌科，本菌有19个菌种，从人体上可检出12个种
- ▶ 葡萄球菌属主要与人皮肤腺体和温血动物的粘膜相关，有些种是人及动物的条件致病菌
- ▶ 可引起人的化脓性炎症，又称为化脓性球菌

金黄色葡萄球菌生物学特性



- ▶ 金黄色葡萄球菌的典型形态呈球形，直径0.4~1.2 μm ，大小不一，平均直径为0.8 μm
- ▶ 革兰氏染色阳性，呈葡萄串状排列，无鞭毛，无芽孢
- ▶ 需氧或兼性厌氧，最适生长温度37 $^{\circ}\text{C}$ ，耐盐性强，在含10%~15%的氯化钠培养基中仍能生长，可用于筛选菌种
- ▶ 血平板上可形成明显透明溶血环，为 β 型溶血

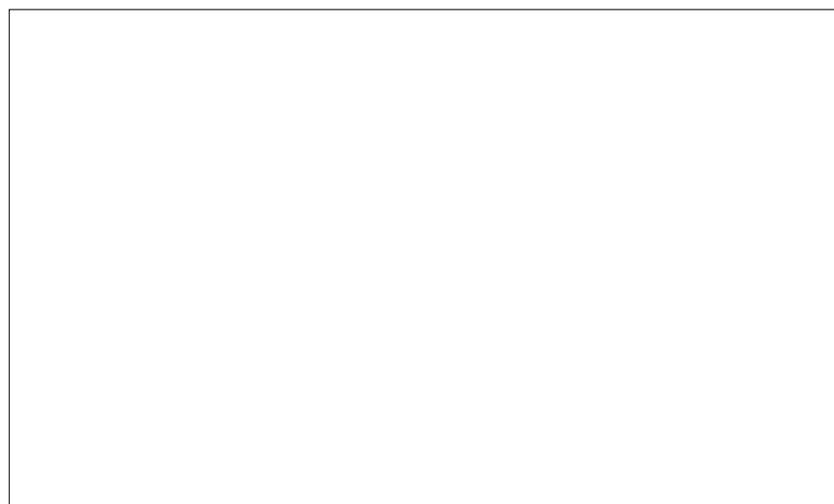
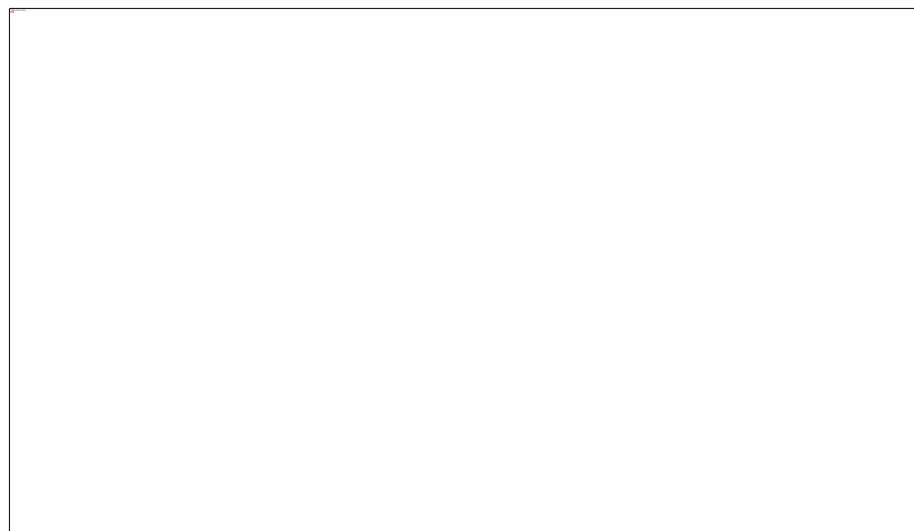
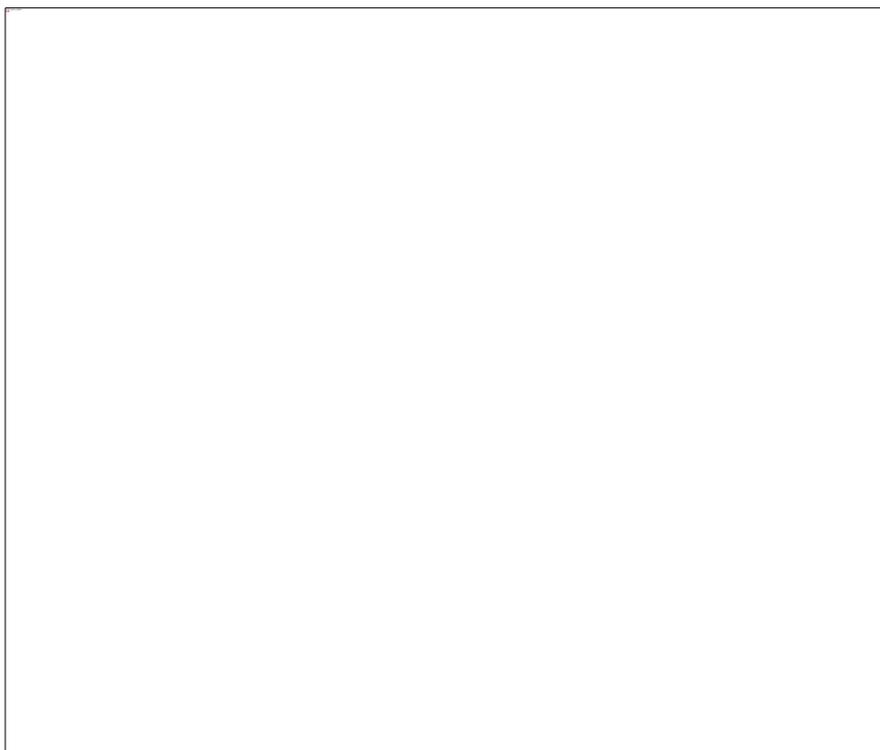
金黄色葡萄球菌检查方法



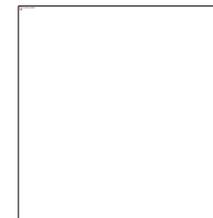
	检查方法
15版药典	1: 10g供试液至TSB（适宜体积）18h~24h 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基 (18h~72h)
10版药典 大肠菌群	1: 10供试液接种至营养肉汤或亚硝酸盐肉汤培养基中 18h~ 24h 划线接种于甘露醇氯化钠琼脂 (14h~72h)

10版与15版选择性培养基相同，增菌液有差异！
抑制能力：大肠埃希菌接种量不大于 10^3 ，接种量
过大，大肠埃希菌可生长！

金黄色葡萄球菌



梭菌分类学地位



界：细菌界

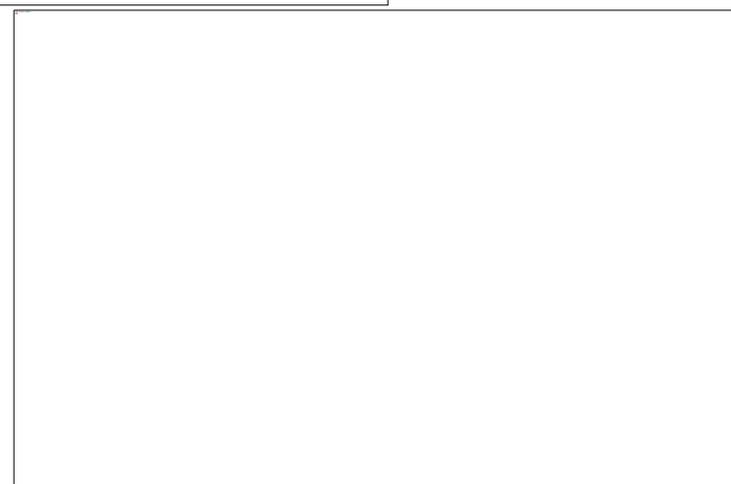
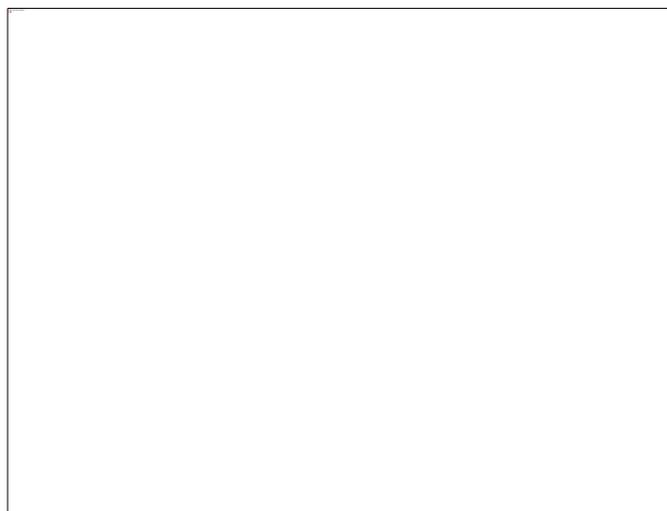
门：厚壁菌门

纲：梭菌纲

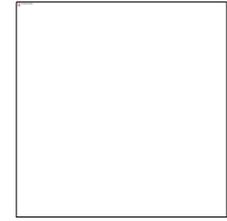
目：梭菌目

科：梭菌科

属：梭菌属

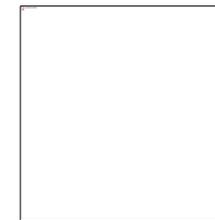


梭菌概述



- ▶ 能形成芽孢、厌氧生长的革兰氏阳性杆菌。因芽孢比菌体大，致使菌体呈梭状而得名。
- ▶ 代表菌种：生孢梭菌、破伤风梭菌、产气荚膜梭菌和肉毒梭菌等。

白色念珠菌分类学地位



界：真菌界

门：子囊菌门

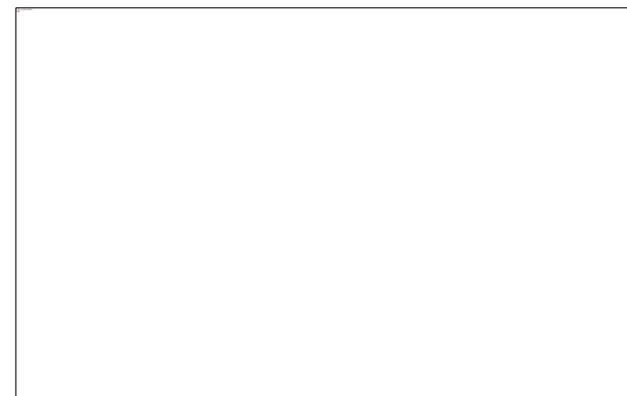
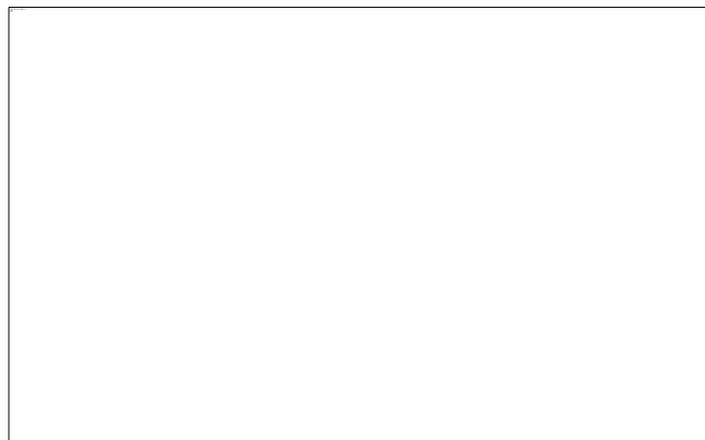
纲：酵母纲

目：酵母目

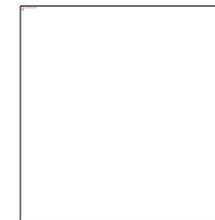
科：酵母科

属：假丝酵母属

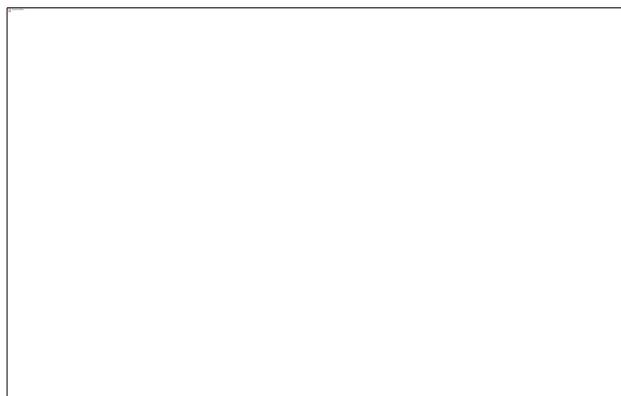
种：白假丝酵母菌 *Candida albicans*



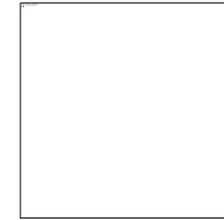
白色念珠菌概述



- ▶ 细胞呈圆形或卵圆形，直径3~6 μm ，革兰氏染色阳性
- ▶ 以出芽方式繁殖，呈链状生长



梭菌&白色念珠菌检查方法



	检查方法
梭菌	取相当于1g样品至梭菌增菌培养基 厌氧培养 48h 涂抹接种于哥伦比亚琼脂平板上厌氧培养48h~72h
白色念珠菌	取相当于1g样品至SDB培养3d~5d 划线接种于SDA培养24~48h

10版与15版梭菌和白色念珠菌检查所用培养基无大变化。



谢谢！

国家食品药品监督管理局广州医疗器械质量监督检验中心