

药品微生物限度与无菌检查

中检院

微生物检测室

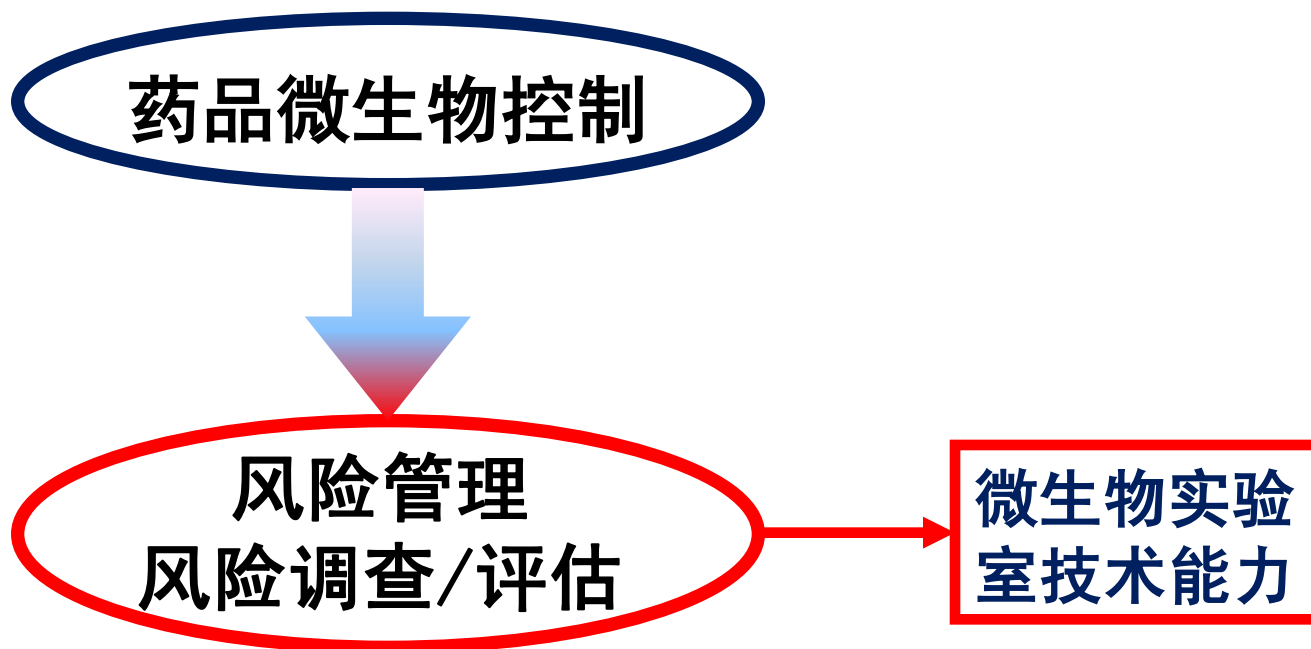
戴翠



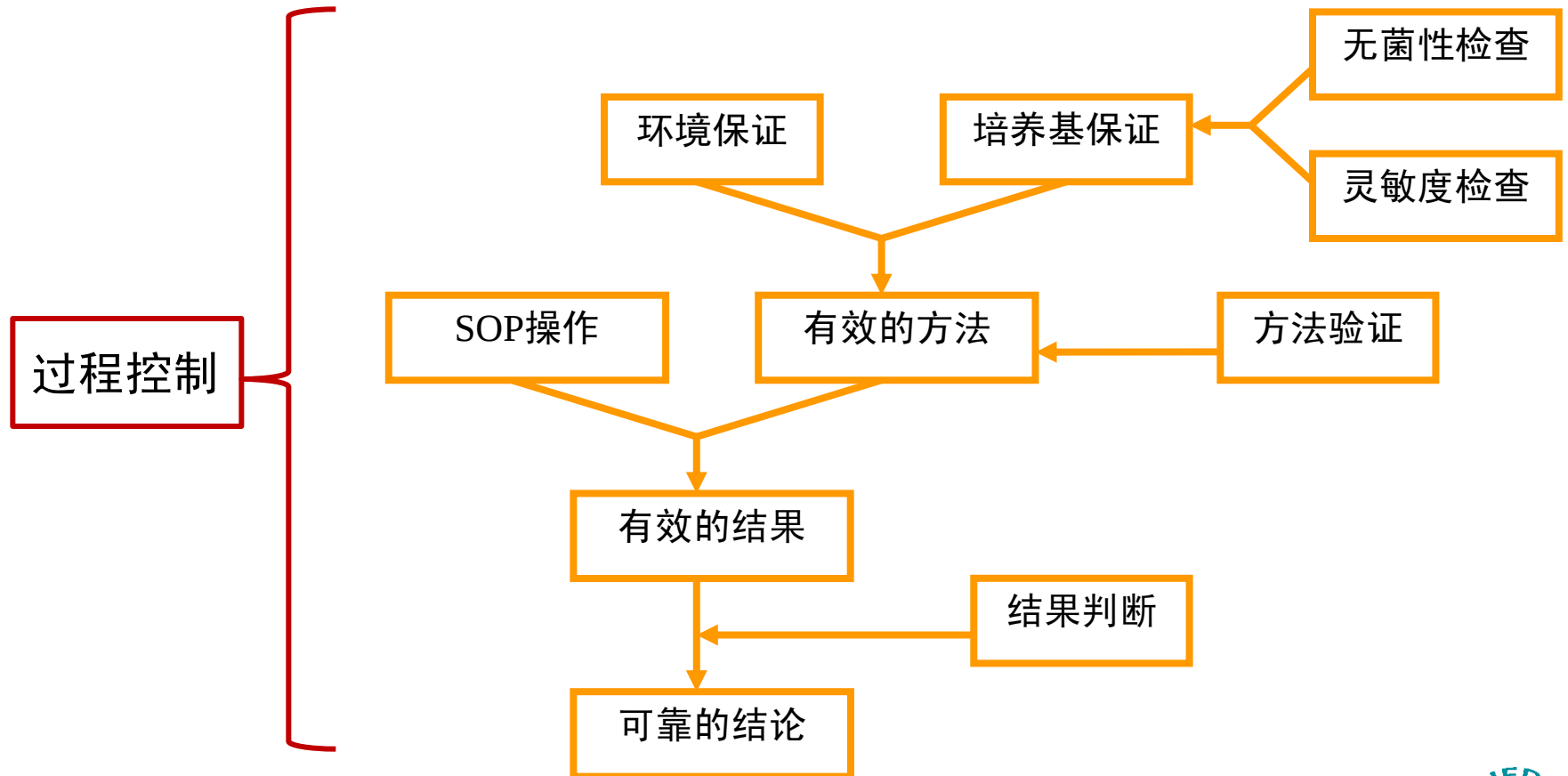
中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control

风险管理、风险调查/评估

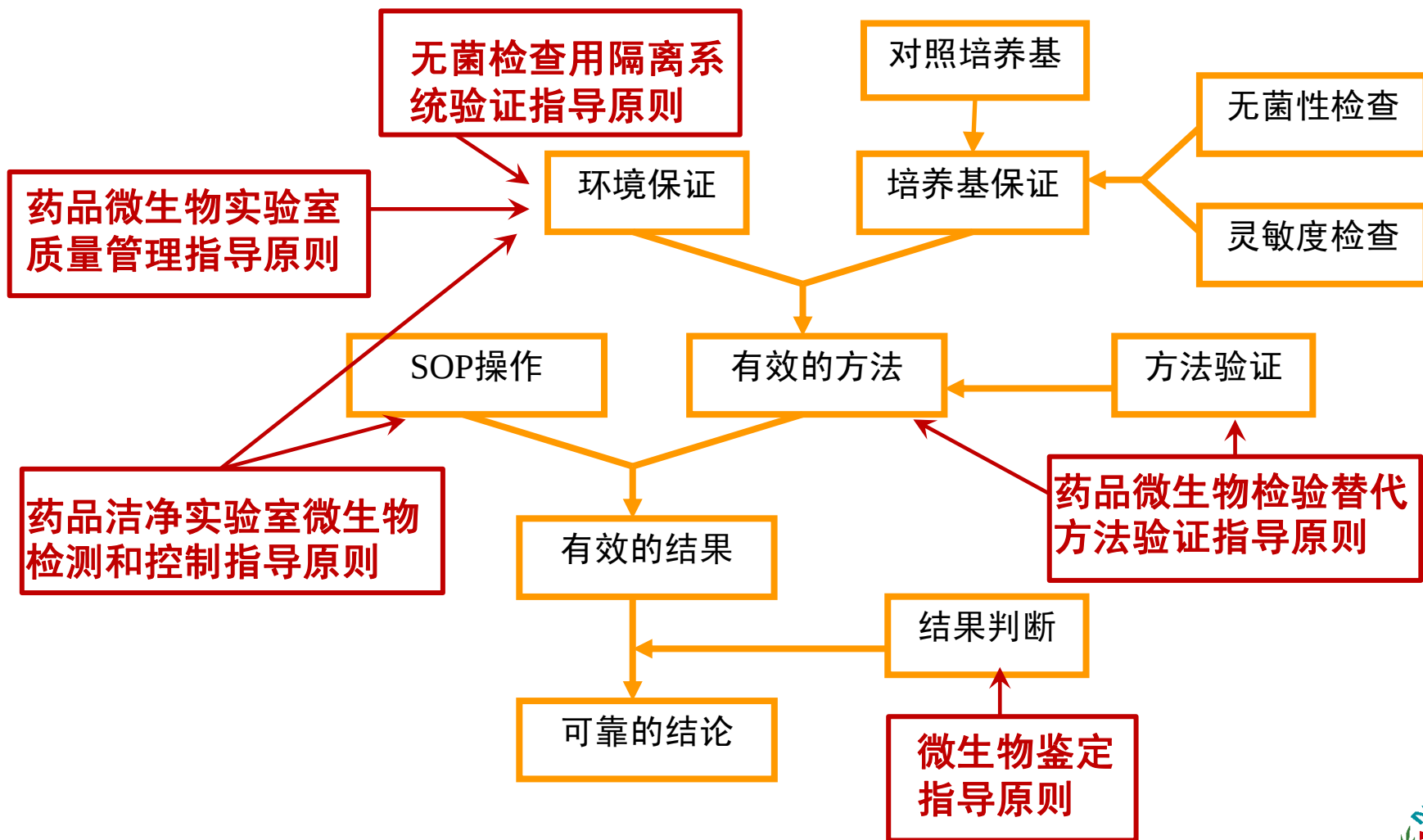


药品微生物检验的过程控制

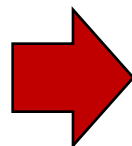


USP35部分章节	《中国药典》2015年版
<51>Antimicrobial Effectiveness Testing	抑菌效力检查法
<55>Biological Indicators-Resistance Performance Tests	生物指示剂抗性检查法
<61>Microbiological Examination of Nonsterile Products: Microbial Enumeration Tests	非无菌产品微生物检查：微生物计数法
<62>Microbiological Examination of Nonsterile Products: Tests for Specified Microorganisms	非无菌产品微生物检查：控制菌检查法
<1111>Microbiological Attributes of Nonsterile Pharmaceutical Product	非无菌药品微生物限度标准
<63>Mycoplasma Tests	支原体检查法
<71>Sterility Tests	无菌检查法
<1035>Biological Indicators for Sterilization	灭菌用生物指示剂指导原则
<1112>Aplication of Water Activity Determination to Nonsterile Pharmaceutical Products	水活度检查法用于非无菌药品微生物评价
<1113>Microbial Characterization, Identification, and Strain Typing	微生物鉴定指导原则
<1116>Microbiological Evalution of Clean Rooms and Other Controlled Environments	药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则
<1117>Microbiological Best Laboratory Practices	药品微生物实验室质量管理指导原则
<1208>Sterility Testing-Validation of Isolator Systems	无菌检查用隔离器系统验证指导原则
<1211>Sterilization and Sterility Assurance of Compendial Articles	灭菌法
<1223>Validation of Alternative Microbiological Methods	药品微生物检验替代方法验证指导原则
/	非无菌药品微生物限度检测指导原则
/（日本药典收载）	中药饮片微生物限度检查法？

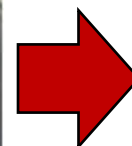
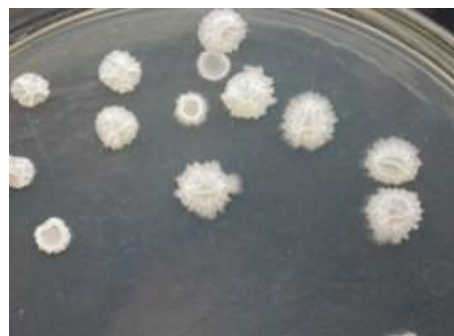
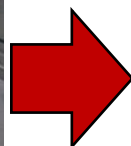
药品微生物检验的过程控制



案例

[illegible]

阳性结果与玻璃安瓿表面采样菌高度相似

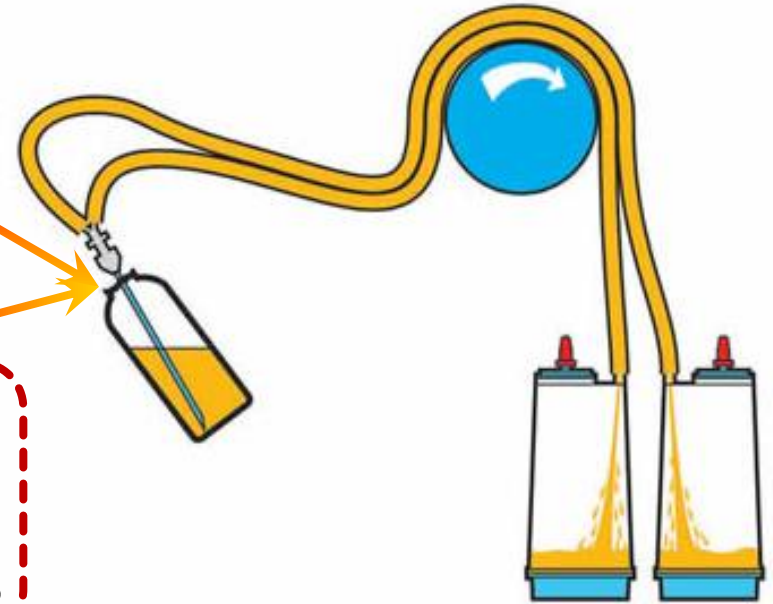
[illegible]

Nationa

无菌检查过程微生物控制



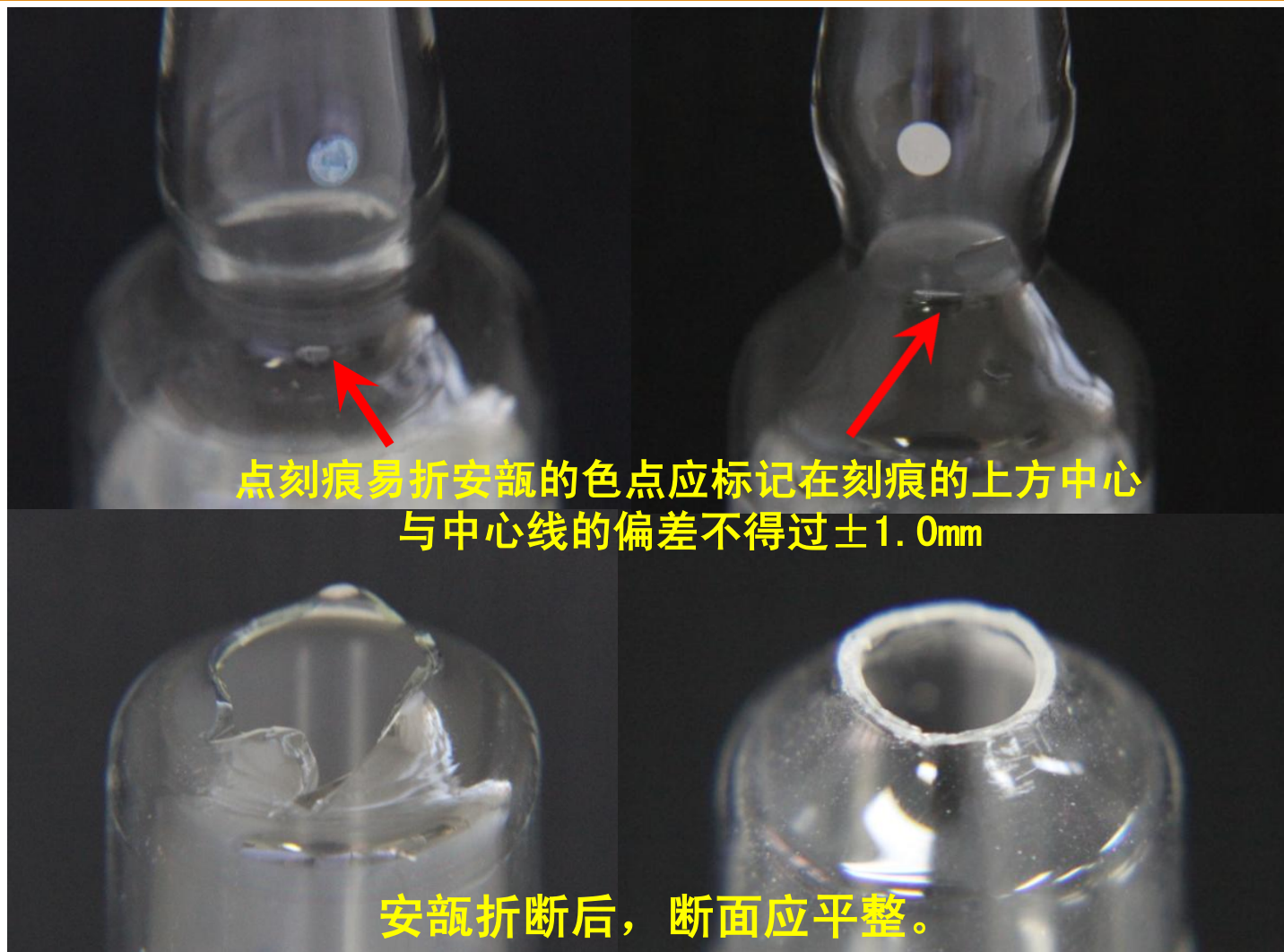
✓ 空气微生物
浮游菌
沉降菌



✓ 表面微生物
样品包装表面
操作人员手部



点刻痕易折玻璃安瓿



①刻痕工艺控制不好

深浅、长短、高低位置不一
色点和刻痕位置偏离

②规格尺寸不规范

瓶身外径精度不够
刻痕不易控制
瓶颈壁厚不均匀
折断后断面不平整

③玻璃材质不佳

低硼硅玻璃：48.6%
中性硼硅玻璃：7.7%
我国90%以上低硼硅玻璃

④易折方式影响折断力

色环：通过在瓶颈喷涂与玻璃膨胀系数不同的色釉产生应力，从而使断面平整

⑤灌装工艺落后造成折断力差

为防止灌装中安瓿断头

National Institutes for Food and Drug Control



玻璃安瓿与不溶性微粒



视频提供：大冢制药

National Institutes for Food and Drug Control



玻璃安瓿表面消毒方案比较

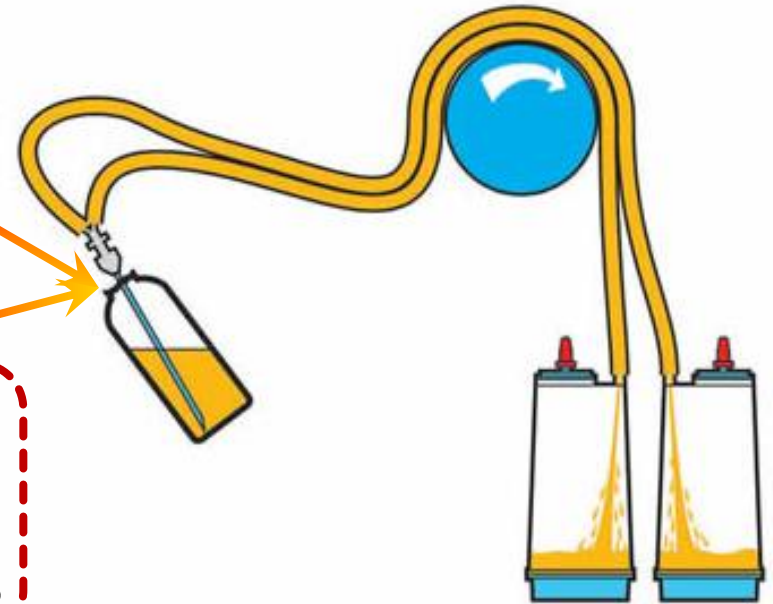
- 杀孢子剂（过氧乙酸）喷洒后立即（3min、5min、10min）用75%乙醇钝化，再用湿棉签擦拭取样
- 酒精灯过火1秒钟（3秒钟、5秒钟、10秒钟）后直接用湿棉签擦拭取样

表面消毒方案	作用时间	残留菌落数	菌属类型
杀孢子剂	立即	2cfu	<i>Bacillus</i>
	3min	0cfu	/
	5min	0cfu	/
	10min	0cfu	/
棉签擦拭&过火	1秒钟	4cfu	<i>Bacillus</i> 、 <i>Brevibacillus</i>
	3秒钟	10cfu	<i>Bacillus</i> 、 <i>Paenibacillus</i> 、 <i>Brevibacillus</i>
	5秒钟	0cfu	/
	10秒钟	0cfu	/

无菌检查过程微生物控制



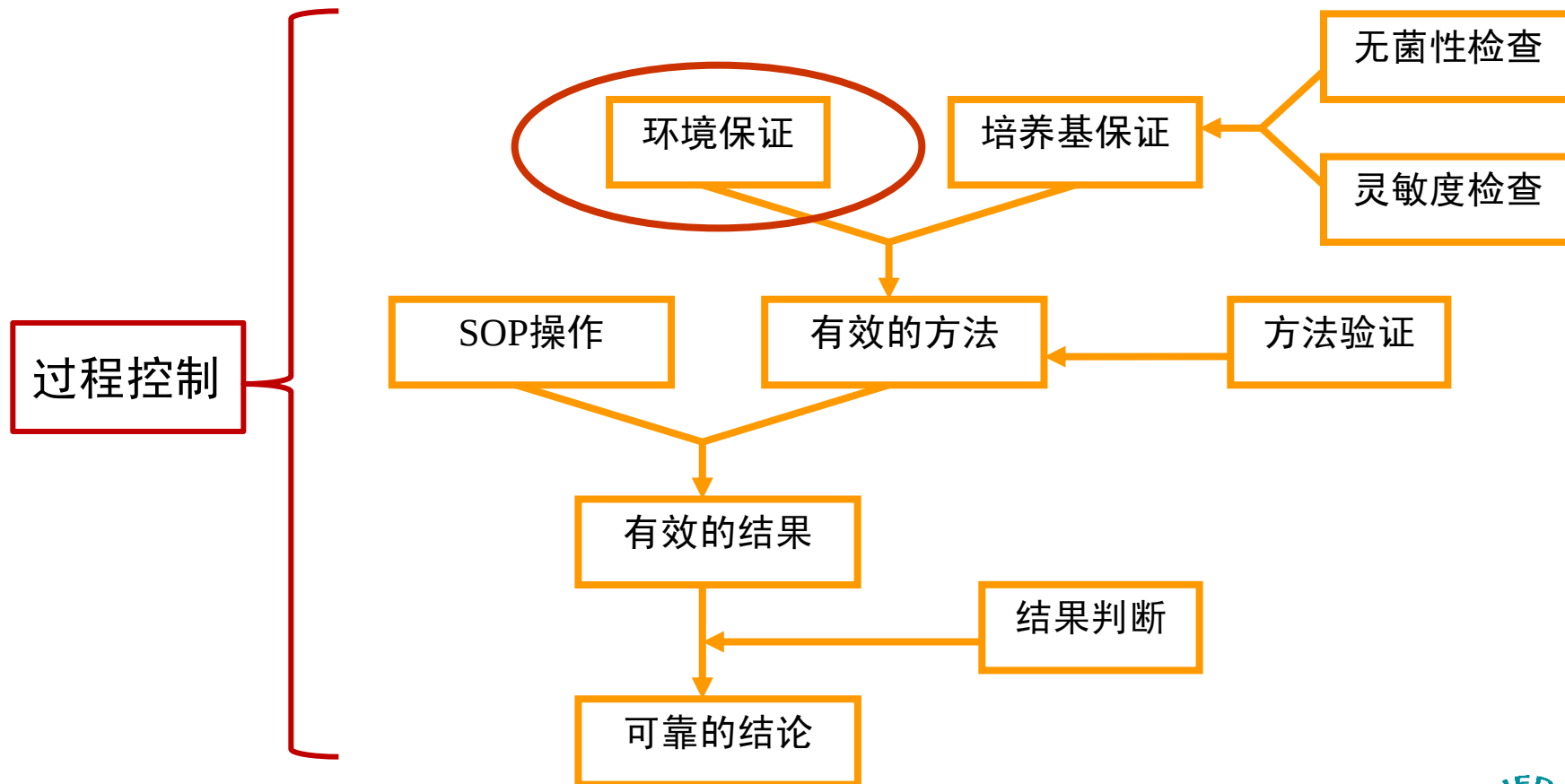
✓ 空气微生物
浮游菌
沉降菌



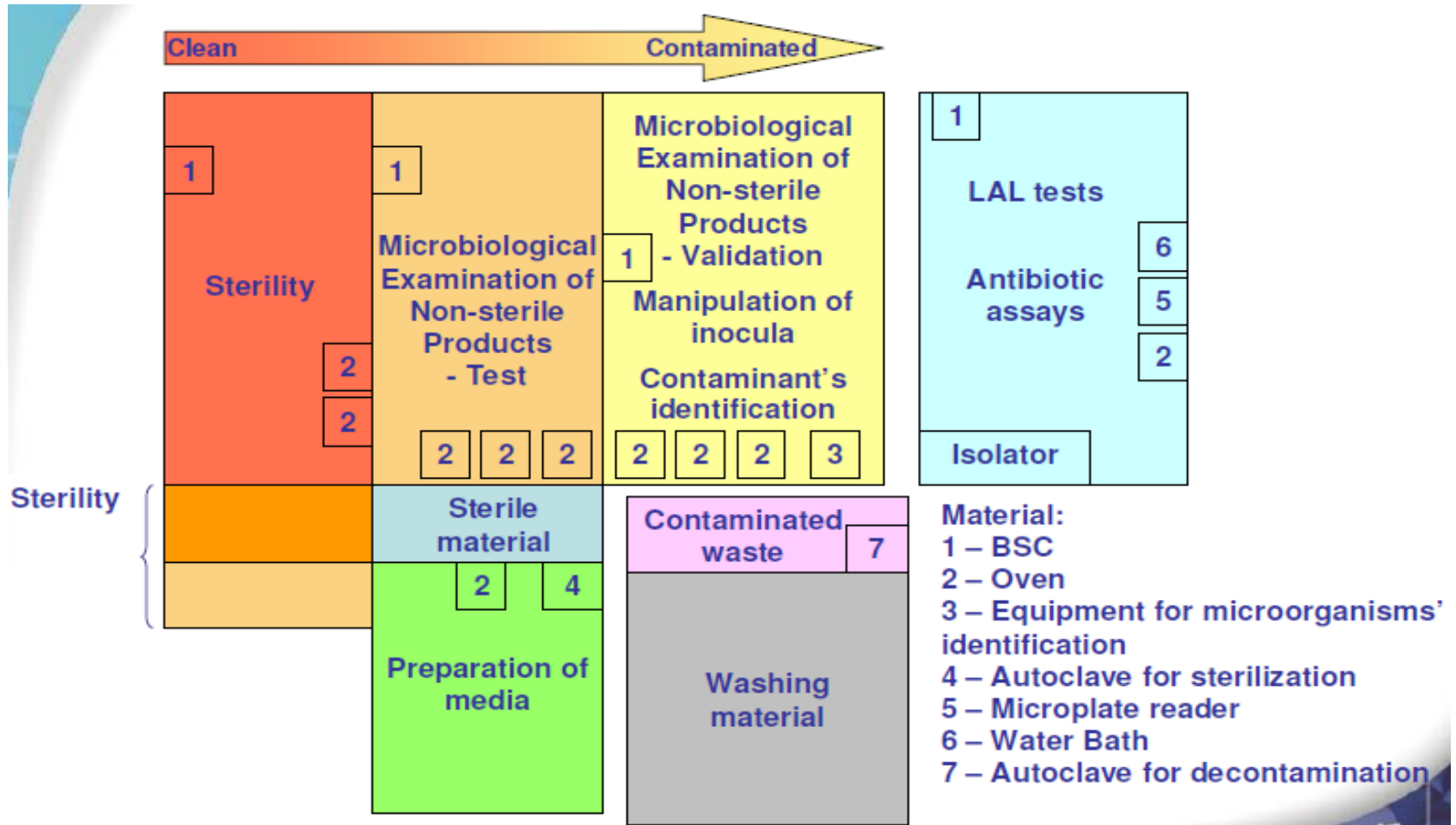
✓ 表面微生物
样品包装表面
操作人员手部



微生物检验的过程控制



微生物实验室工作流程



环境保护

WHO GPML 各区域等级

区域	设置级别	建议
样品接收	无级别要求	无级别要求
培养基制备	无级别要求	无级别要求
压力灭菌器装载	无级别要求	无级别要求
压力灭菌器卸载, 无菌检查区一面	B	ISO5 (混流), $<10\text{cfu}/\text{m}^3$
无菌检查——UDAF	A	ISO5 (层流), $<1\text{cfu}/\text{m}^3$
无菌检查——UDAF 背景	B	ISO5 (混流), $<10\text{cfu}/\text{m}^3$
无菌检查——隔离器	A (NVP, 仅微生物)	ISO5 (层流), $<1\text{cfu}/\text{m}^3$
无菌检查——隔离器背景	无级别要求	无级别要求
培养箱	无级别要求	无级别要求
菌落计数测定	无级别要求 ^a	无级别要求 ^a
去污染	无级别要求	无级别要求

cfu: 集落形成单位。^a关键步骤应在层流下进行。

微生物限度 & 无菌检查环境要求

无菌检查:

- 环境洁净度B级背景下的局部A级洁净度的单向流空气区域内或隔离系统中
- B+A or 隔离系统

《中国药典2010版》
万级下的百级

《中国药典2015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

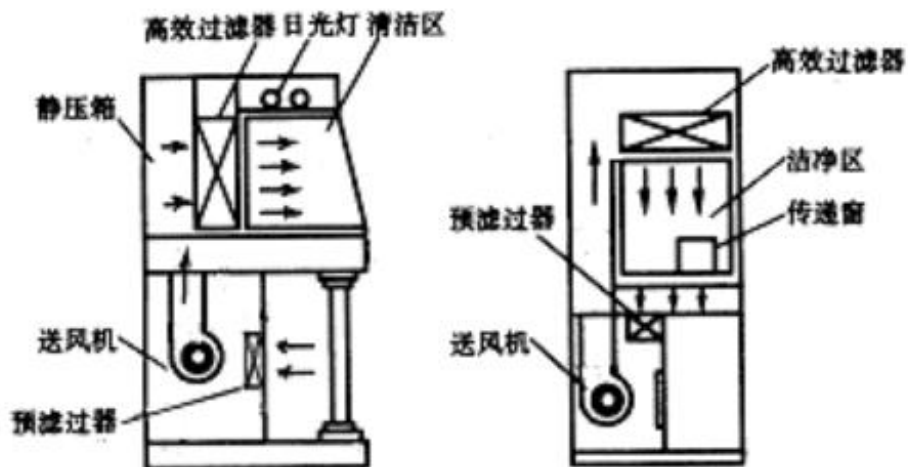
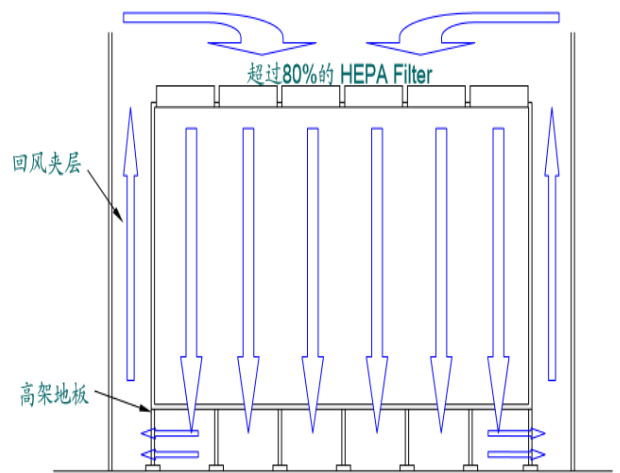
微生物限度检查:

- 受控洁净环境下的局部洁净度不低于B级的单向流空气区域内
- D+BSC II 生物安全柜

洁净室/台工作原理

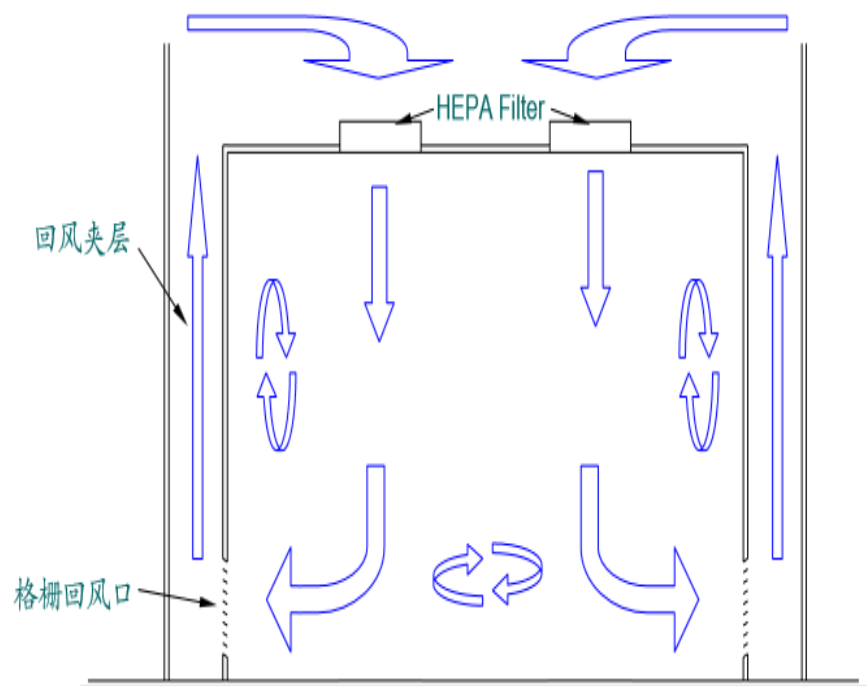
层流

Laminar flow



混流

Conventional (mixed flow) cleanroom



相关洁净标准比较

Compare ~~FED STD 209E~~ to ISO 14644-1

ISO 14644-1	FED STD 209E	
Class	English	Metric
ISO 1		
ISO 2		
ISO 3	1	M1.5
ISO 4	10	M2.5
ISO 5	100	M3.5
ISO 6	1,000	M4.5
ISO 7	10,000	M5.5
ISO 8	100,000	M6.5
ISO 9		

ISO 14644讨论了洁净室和受控环境的设计与建设

按ISO 14644的**分类**是建立在环境中每单位体积的总体**粒子数**的基础上

分类不区分非生物粒子或生物粒子

National Institutes for Food and Drug Control



相关洁净标准比较

ISO 14644-1

CLASS	Number of Particles per Cubic Meter by Micrometer Size (颗粒数/立方米)					
	0.1 um	0.2 um	0.3 um	0.5 um	1 um	5 um
ISO 1	10	2				
ISO 2	100	24	10	4		
ISO 3	1,000	237	102	35	8	
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
ISO 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
ISO 7				352,000	83,200	2,930
ISO 8				3,520,000	832,000	29,300
ISO 9				35,200,000	8,320,000	293,000

2010版GMP洁净度级别标准

洁净度级别	悬浮粒子最大允许数/立方米			
	静态		动态	
	≥0.5μm	≥5μm	≥0.5μm	≥5μm
A级	3520	20	3520	20
B级	3520	29	352000	2900
C级	352000	2900	3520000	29000
D级	3520000	29000	不作规定	不作规定

“静态”百级，“动态”万级

相关洁净标准比较

ISO 14644-1

CLASS	Number of Particles per Cubic Meter by Micrometer Size (颗粒数/立方米)					
	0.1 um	0.2 um	0.3 um	0.5 um	1 um	5 um
ISO 1	10	2				
ISO 2	100	24	10	4		
ISO 3	1,000	237	102	35	8	
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	
ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	29
ISO 6	1,000,000	237,000	102,000	35,200	8,320	293
ISO 7				352,000	83,200	2,930
ISO 8				3,520,000	832,000	29,300
ISO 9				35,200,000	8,320,000	293,000

Schedule of Tests to Demonstrate Continuing Compliance			
Test Parameter	Class	Maximum Time Interval	Test Procedure
Particle Count Test	<= ISO 5	6 Months	ISO 14644-1 Annex A
	> ISO 5	12 Months	
Air Pressure Difference	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B5
Airflow	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B4

2015版 建议的洁净实验室环境监测频次及项目

受控区域	洁净级别	采样频次	检测项目
隔离系统	内部	每次试验	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌
	相邻外部	每半年	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌
微生物洁净实验室	A级	每次试验	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌
	B级	每周	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌
	C级	每季度	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌
	D级	每半年	粒子、浮游菌、沉降菌、表面菌

按ISO 14644的**定级**是建立在环境中每单位体积的总体**粒子数**的基础上

定级不区分非生物粒子或生物粒子

“B级”与“C级”的异同

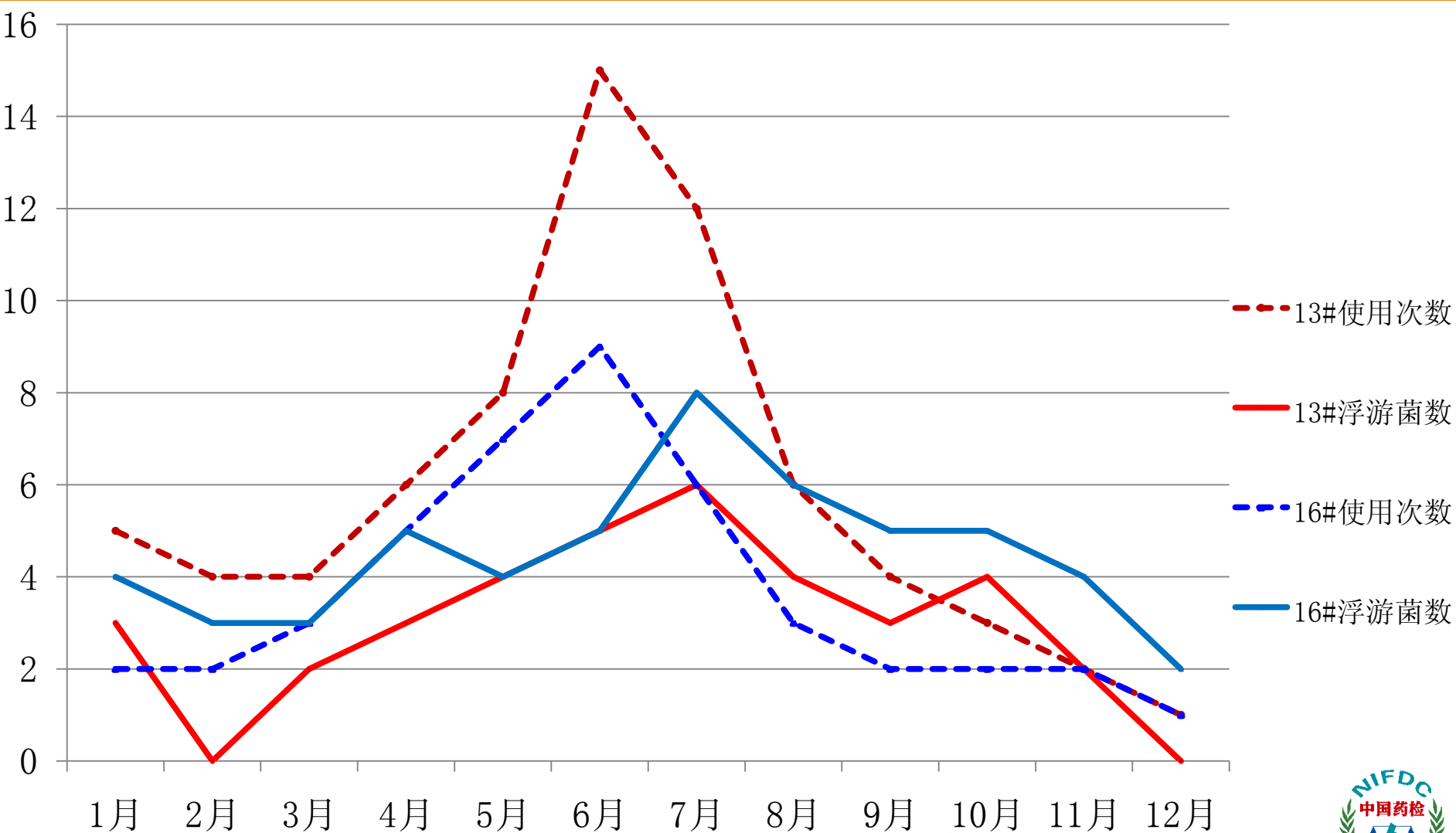
相同点	1、洁净室结构相同 2、都有终端HEPA 3、回风利用率低 4、与相邻低级别房间压差相同 5、依靠气锁维持压差
不同点	1、B级换气次数更多 2、B级人员服装要求更高 3、B级单位人员数量更少 4、B级环境清洁和维持的规格更高

Schedule of Tests to Demonstrate Continuing Compliance			
Test Parameter	Class	Maximum Time Interval	Test Procedure
Particle Count Test	<= ISO 5	6 Months	ISO 14644-1 Annex A
	> ISO 5	12 Months	
Air Pressure Difference	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B5
Airflow	All Classes	12 Months	ISO 14644-1 Annex B4

悬浮粒子与环境微生物

- ✓非生物粒子数量和活的微生物浓度之间的关系在科学上未达成绝对的一致
- ✓当操作人员是粒子的来源时，以下的结论是成立的，即**洁净室中的粒子越少，空气中微生物存在的可能性就越小**。
- ✓实验**设备**运行时大量产生的粒子污染和**人员**产生的粒子污染之间是无法明确区分的
- ✓大量的药物除了微生物以外还有粒子限度的要求
- ✓几乎肯定的是，部分悬浮粒子与微生物有关
- ✓因此，洁净室监测应包括**微生物**与**粒子**数两方面

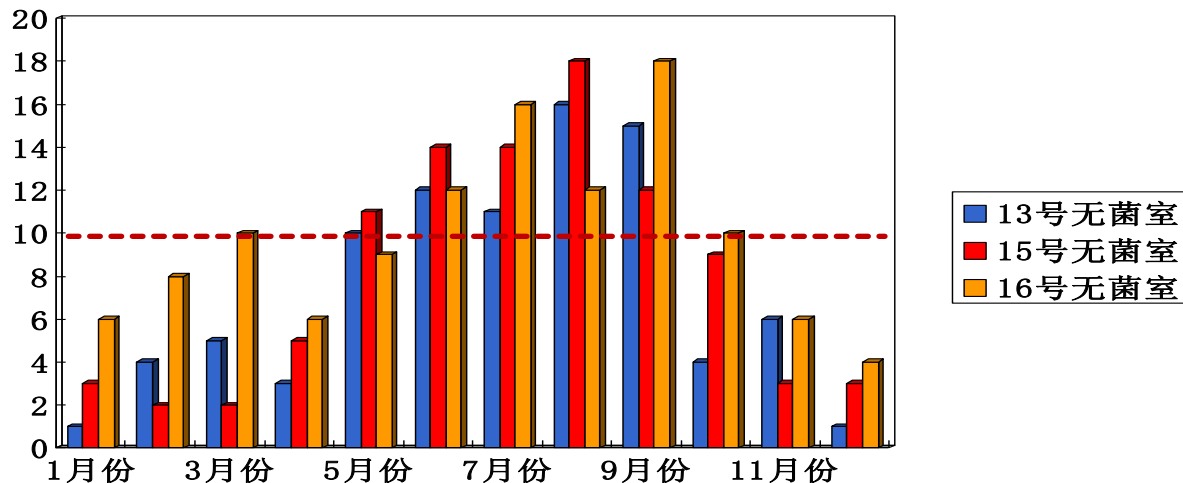
洁净室使用次数与浮游菌数关系



National Institutes for Food and Drug Control



2012、2013年无菌室C级浮游菌分布图比较

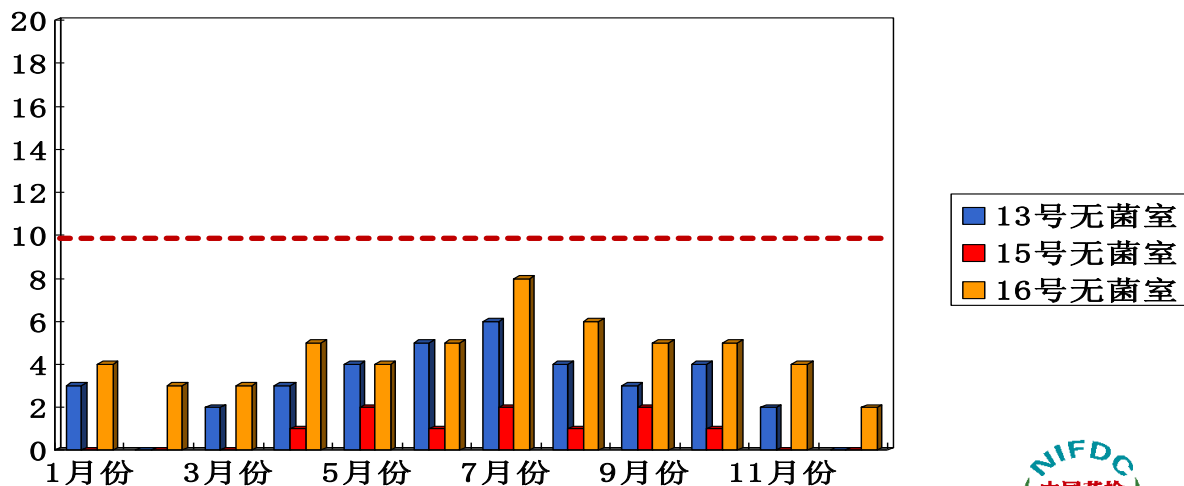


浮游菌标准:

A级: $<1 \text{ CFU/m}^3$

B级: $\leq 10 \text{ CFU/m}^3$

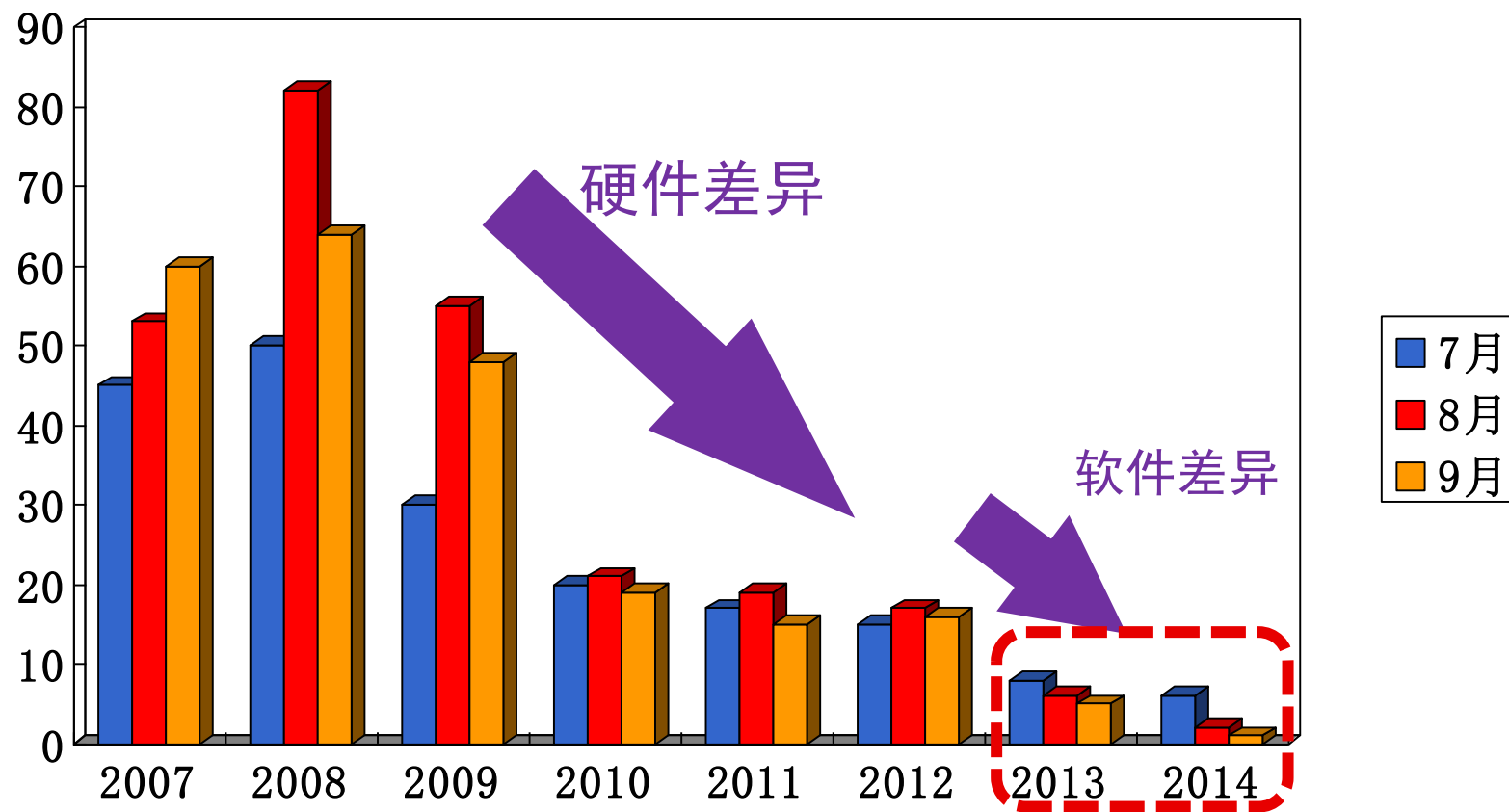
C级: $\leq 100 \text{ CFU/m}^3$



National Institutes for Food and Drug Control



近8年无菌室C级浮游菌高限图

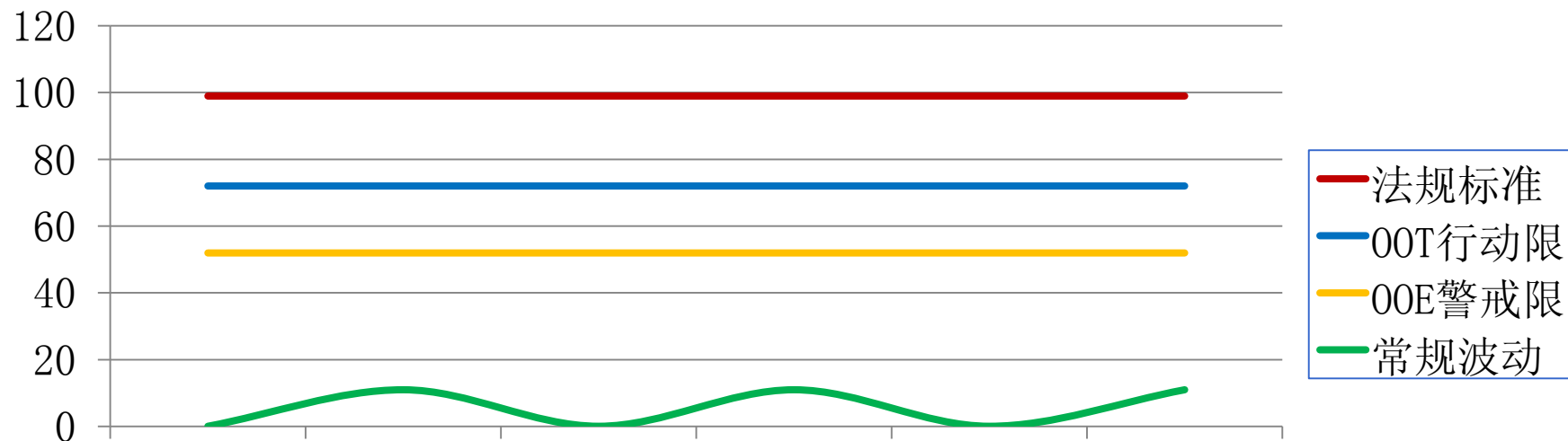


洁净区微生物监测水平

洁净区微生物监测限度									
中国新版GMP & EU GMP					FDA Guidance for Industry			USP<1116>	
洁净级别	浮游菌 cfu/m ³	沉降菌 (φ90mm) cfu/4小时	表面微生物		洁净级别	浮游菌 cfu/m ³	沉降菌 (φ90mm) cfu/4小时	表面微生物	
			接触碟cfu/碟	五指手套cfu/手套				接触碟cfu/碟	衣服手套cfu/碟
A	< 1	< 1	< 1	< 1	100	1	1	3(含地面)	3(手套) 5(衣服)
-	-	-	-	-	1000	7	3	-	-
B	10	5	5	5	10000	10	5	5 10(地面)	10(手套) 20(衣服)
C	100	50	25	-	100000	100	50	-	-
D	200	100	50	-	-	-	-	-	-

USP35
<15 cfu
信息性，
非标准性

监控基于风险评估



Laboratory environment	Monitor for airborne and surface microbial contamination using, e.g. air samplers, settle plates, contact plates or swabs	Based on risk assessment, an appropriate environmental monitoring programme should be established
------------------------	---	---

WHO good practices for pharmaceutical microbiology laboratories

Appendix 4

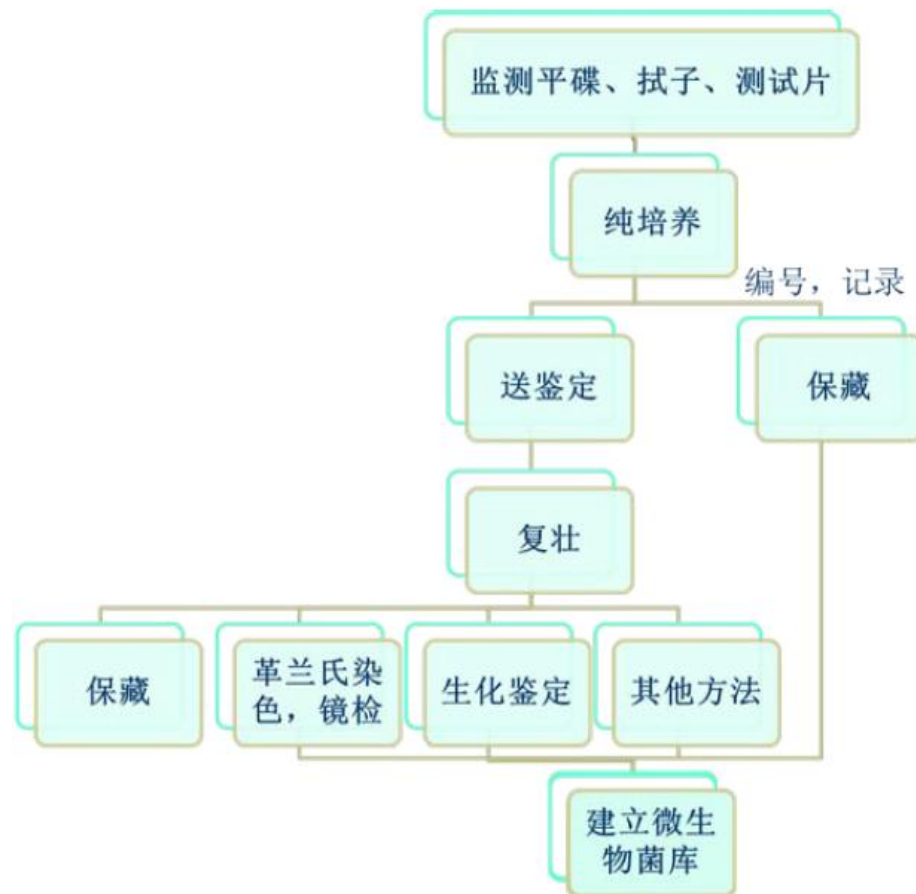
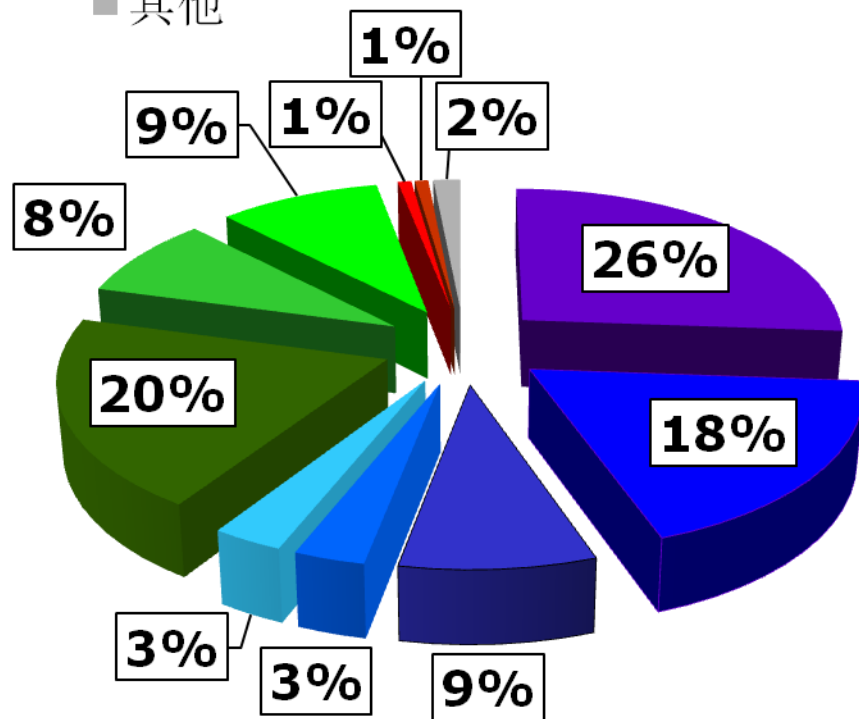
Examples of equipment qualification and monitoring

National Institutes for Food and Drug Control



环境微生物归属

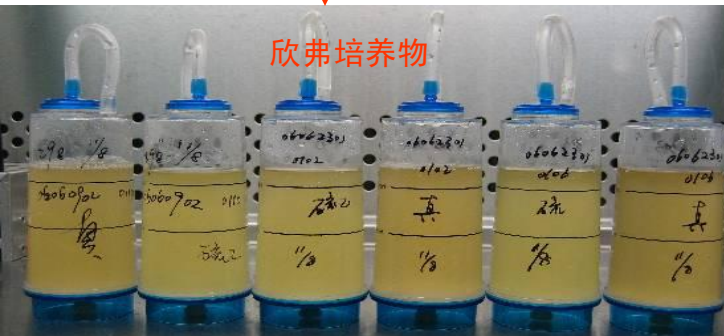
- *Staphylococcus* ■ *Micrococcus*
- *Kocuria* ■ *Dermacoccus*
- *Kytococcus* ■ *Bacillus*
- *Paenibacillus* ■ *Brevibacillus*
- *Acinetobacter* ■ *Pseudomonas*
- 其他



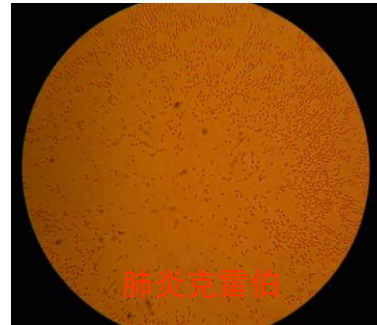
欣弗事件



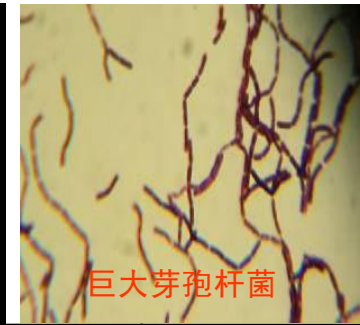
夺命的欣弗



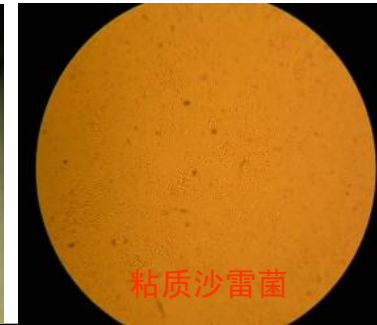
欣弗培养物



肺炎克雷伯



巨大芽孢杆菌



粘质沙雷菌

编号	鉴定结果
0206L	1、肺炎克雷伯 (<i>K.pneumoniae</i>) ; 2、粘质沙雷菌 (<i>S.marcescens</i>)
0206G	1、肺炎克雷伯 (<i>K.pneumoniae</i>) ; 2、粘质沙雷菌 (<i>S.marcescens</i>)
298L; 298G	1、肺炎克雷伯 (<i>K. pneumoniae</i>) ; 2、粘质沙雷菌 (<i>S.marcescens</i>)
303L; 303G	1、肺炎克雷伯 (<i>K.pneumoniae</i>) ; 2、阴沟肠杆菌 (<i>Enter. cloacae</i>)
305L; 305G	1、肺炎克雷伯 (<i>K. pneumoniae</i>) ; 2、粘质沙雷菌 (<i>S.marcescens</i>)
306L/6G	肺炎克雷伯 (<i>K.pneumoniae</i>)
307G	肺炎克雷伯 (<i>K.pneumoniae</i>)
308L	粪产碱杆菌 (<i>Al.faecalis</i>)
309L	粪产碱杆菌 (<i>Al.faecalis</i>)
304G	嗜麦芽寡养单胞菌 (<i>S.maltophilia</i>)



洁净环境常见菌:

头状葡萄球菌 (*Staphylococcus capitis*)
 溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)
 缓症链球菌 (*Streptococcus mitis*)
 科氏葡萄球菌 (*Staphylococcus cohnii*)
 藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*)
 山羊葡萄球菌 (*Staphylococcus caprae*)

不同生物安全水平对设施的要求

	生物安全水平			
	一级	二级	三级	四级
实验室隔离 ^a	不需要	不需要	需要	需要
房间能够密闭消毒	不需要	不需要	需要	需要
通风				
——向内的气流	不需要	最好有	需要	需要
——通过建筑系统的通风设备	不需要	最好有	需要	需要
——HEPA 过滤排风	不需要	不需要	需要/不需要 ^b	需要
双门入口	不需要	不需要	需要	需要
气锁	不需要	不需要	不需要	需要
带淋浴设施的气锁	不需要	不需要	不需要	需要
通过间	不需要	不需要	需要	—
带淋浴设施的通过间	不需要	不需要	需要/不需要 ^c	不需要
污水处理	不需要	不需要	需要/不需要 ^c	需要
高压灭菌器				
——现场	不需要	最好有	需要	需要
——实验室内	不需要	不需要	最好有	需要
——双门	不需要	不需要	最好有	需要
生物安全柜	不需要	最好有	需要	需要
人员安全监控条件 ^d	不需要	不需要	最好有	需要

不同保护类型及生物安全柜的选择

保护类型	生物安全柜的选择
个体防护，针对生物危险等级1～3级微生物	I级、II级生物安全柜
个体防护，针对生物危险等级4级微生物， 手套箱型实验室	III级生物安全柜
个体防护，针对生物危险等级4级微生物， 防护服型实验室	I级、II级生物安全柜
实验对象保护	II级生物安全柜，柜内气流是层流的III级生物安全柜
少量挥发性放射性核素 / 化学品的防护	II级B1型生物安全柜，外排风式 II级A2型生物安全柜
挥发性放射性核素 / 化学品的防护	I级、II级B2型、III级生物安全柜

I级安全柜适用于一级，二级和三级安全实验室，
II级和III级安全柜则适用于所有级别安全实验室。

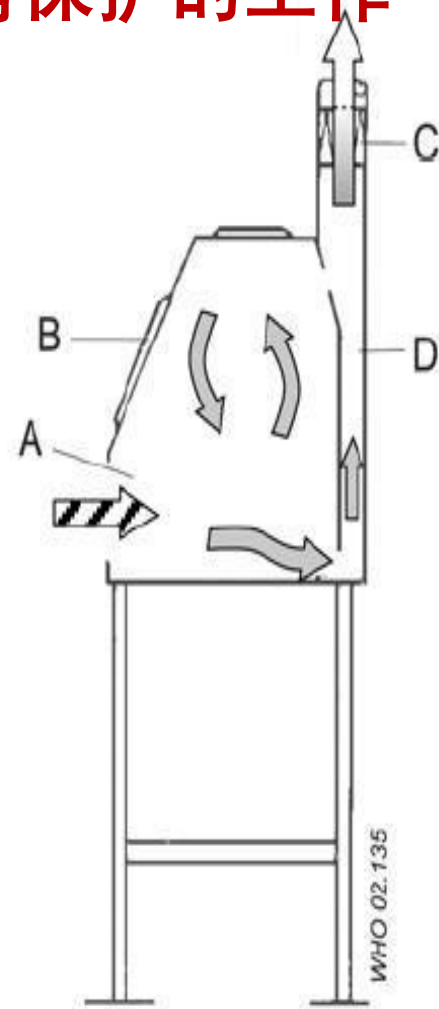
I 级、II 级以及III级生物安全柜之间的差异

生物安全柜	面风速 (m/s)	气流百分数 (%)		排风系统
		循环部分	排出部分	
• I 级	0.38	0	100	硬管
• II 级A1	0.38~0.50	70	30	排到房间或套管连接处
• II 级A2型	0.50	70	30	排到房间或套管连接处
• II 级B1型	0.50	30	70	硬管
• II 级B2型	0.50	0	100	硬管
• III级	NA	0	100	硬管

Class I 生物安全柜

适用于样品不需保护的工作

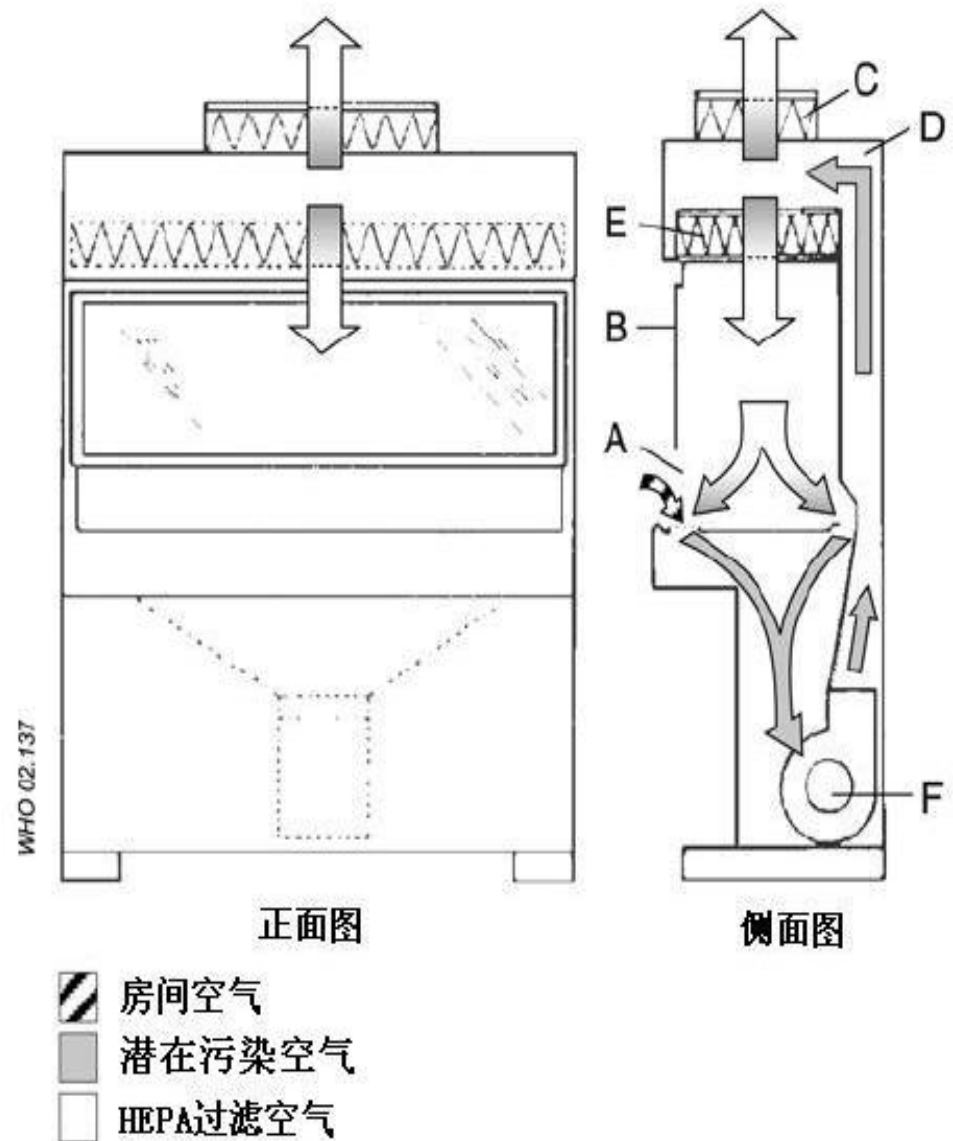
- 1、从前窗口吸入的负压气流，用以保护人员的安全；
- 2、排出的气流经HEPA过滤器过滤，用以保护环境，不受污染；
- 3、对受试样本，不能提供切实可靠的保护。

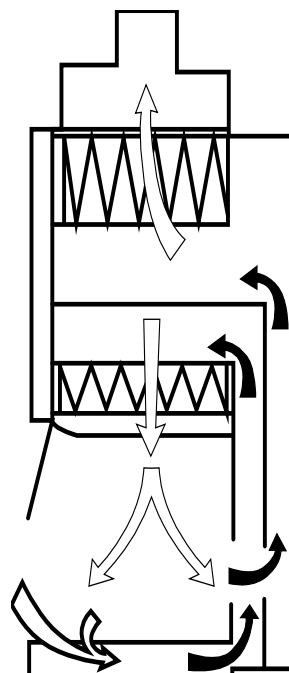
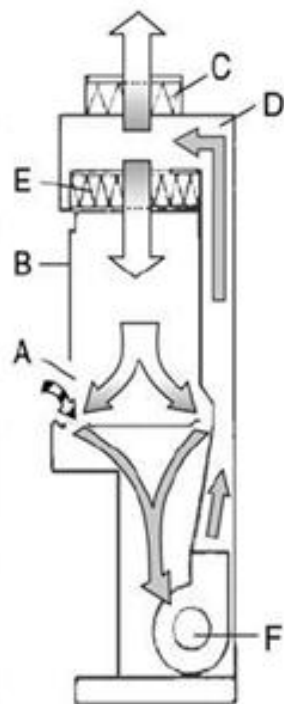
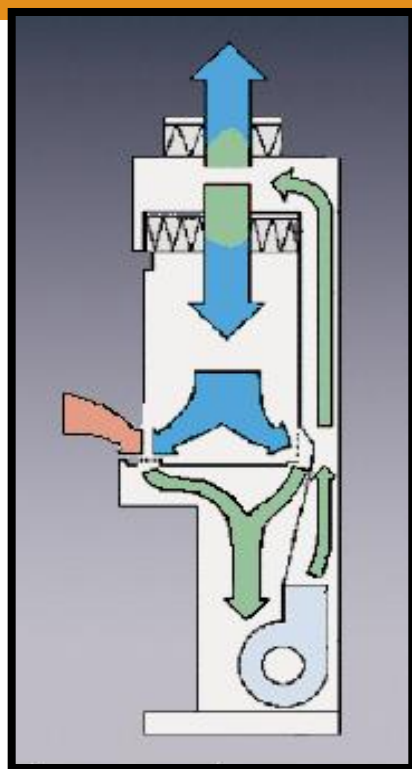


侧面图

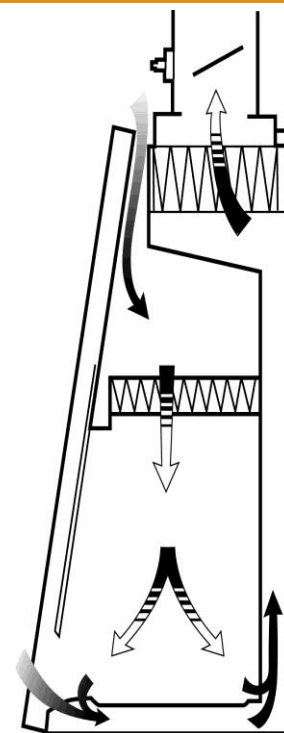
II级A2型生物安全柜

- 前窗进风气流平均流速 $\geq 0.50\text{m/s}$
- 生物安全柜排风管道接口与建筑物排风系统相连接
- 可以从事少量的挥发性有毒化学物质或放射性的工作。

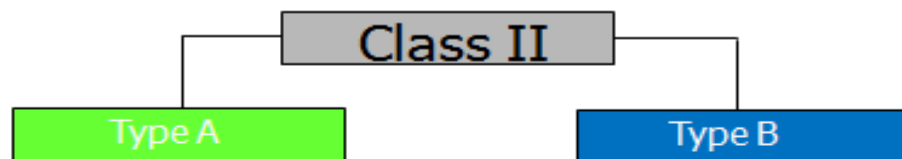




→ HEPA Filtered Air
 → Room Air
 → Contaminated Air



→ HEPA Filtered Air
 → Room Air
 → Contaminated Air



最小平均表面流速 0.38 m/s (A1) 或 0.5 m/s (A2)

气体排入实验室或室外

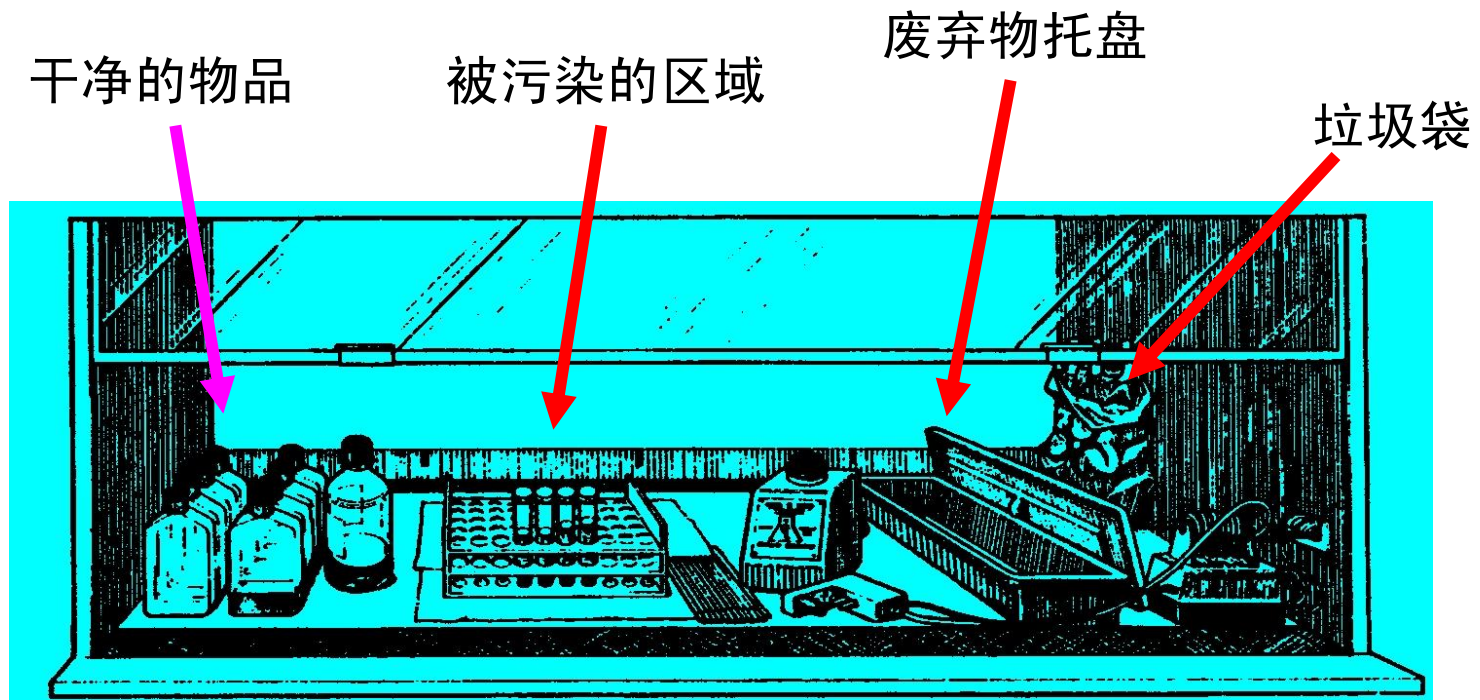
最小平均表面流速为 0.5 m/s

必须经排风系统将气体排至室外



在生物安全柜上工作

工作台摆放



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；	仅通穿戴手套/半身工作服即可；	低	可能性极小

隔离器



2x3-glove Isotest



H_2O_2 溶液被泵入蒸发器

液态 $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow$ 气态 H_2O_2

10^{-6} SAL表面杀灭效率

ational Institutes for Food and Drug Control



隔离器

9206 无菌检查用隔离系统验证指导原则

1. 操作验证
2. 完整性验证
3. 灭菌验证
4. 灭菌循环验证
5. 内部洁净度验证
6. 仪器仪表验证



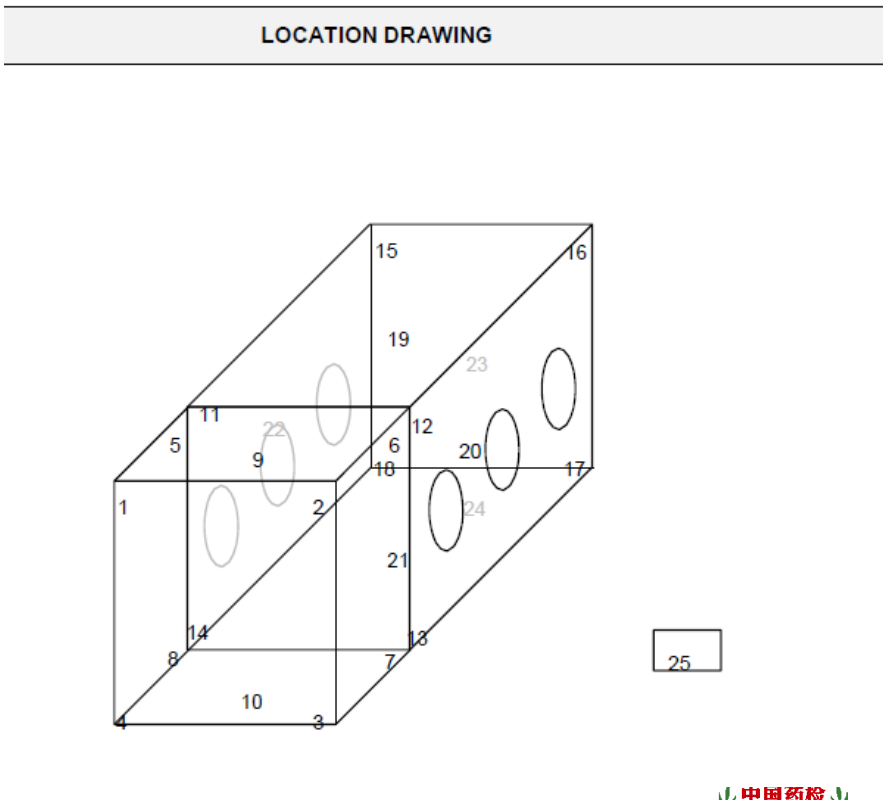
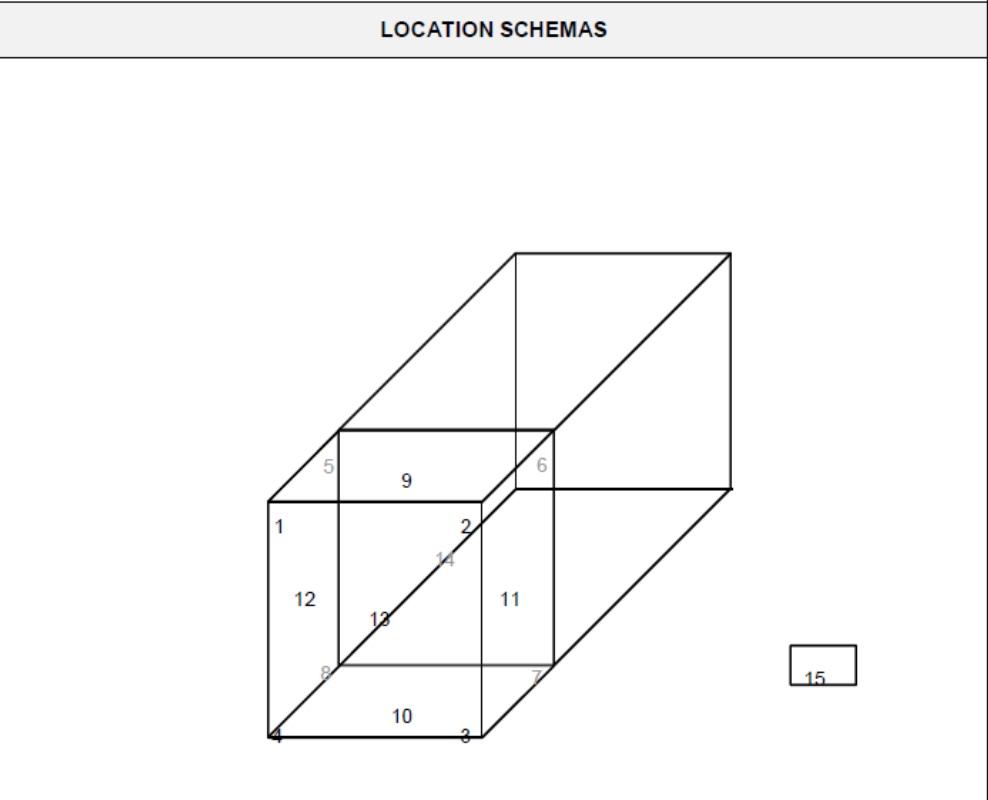
隔离器-灭菌循环验证



隔离器-灭菌循环验证

ASSEMBLY	TEST PROCEDURE	SERIAL NUMBER
Isotest (Loaded transfer hatch)	NTA 3022/1	

ASSEMBLY	TEST PROCEDURE	SERIAL NUMBER
Isotest	NTA 3022/1	



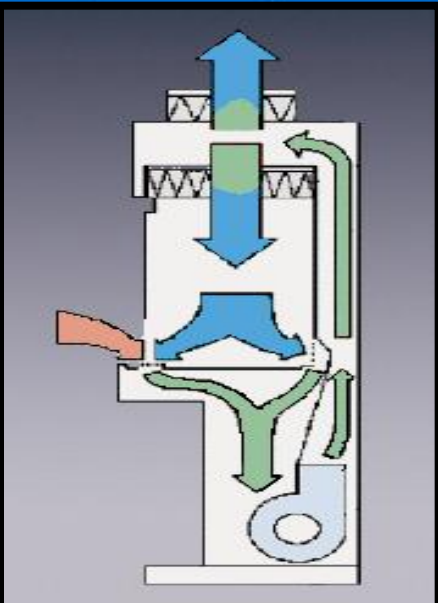
内部洁净度验证





中国食品药品检定研究院
National Institutes for Food and Drug Control

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	☆☆	☆☆☆	☆

微生物检验的过程控制



ChP无菌检查培养基与USP、BP的比较

硫乙醇酸盐流体培养基（Fluid Thioglycollate Medium）

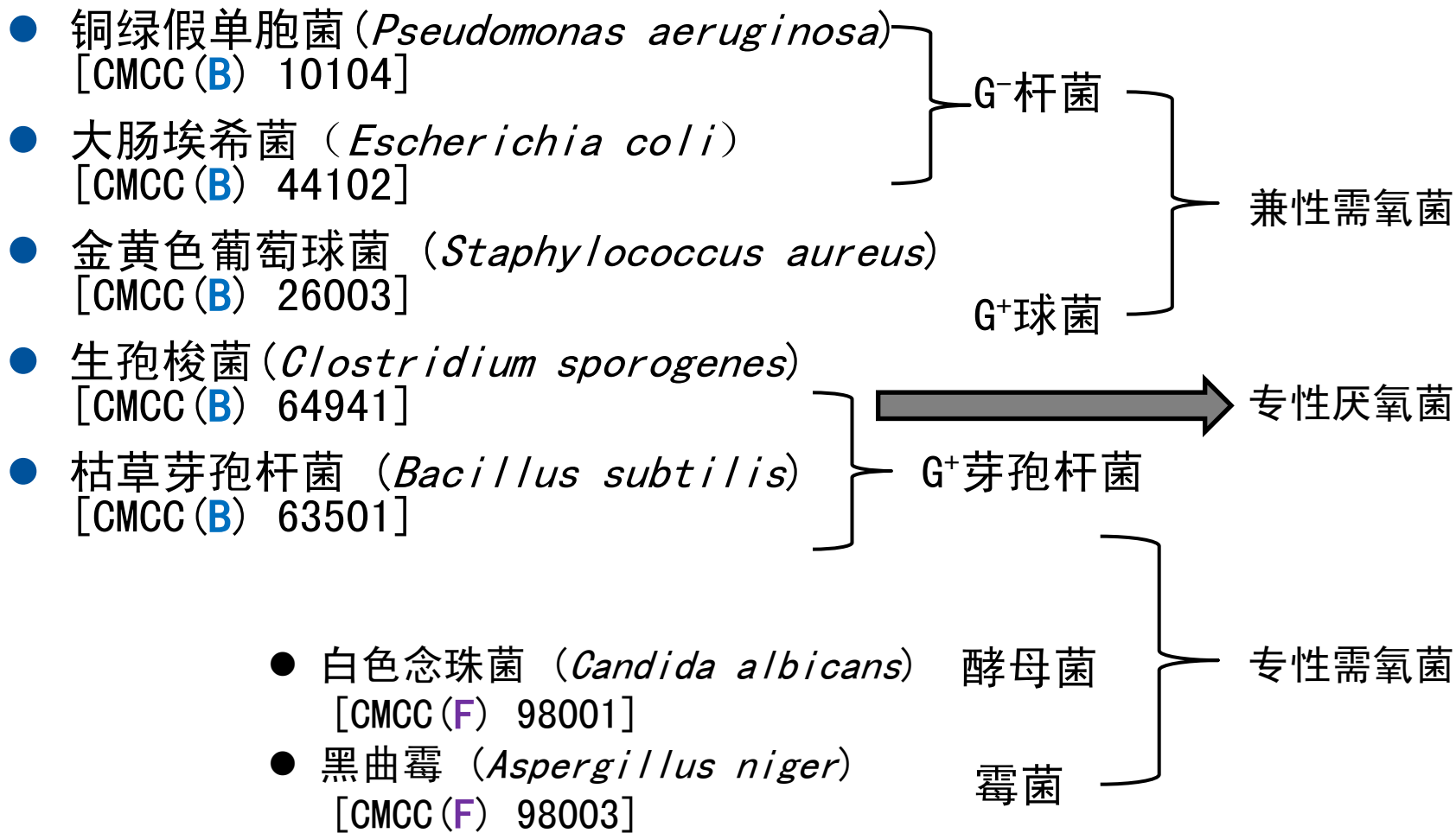
药典	USP	BP	中国药典-2015
名称	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基	Fluid Thioglycollate Medium 硫乙醇酸盐流体培养基
目的	培养需氧、厌氧和微需氧微生物（主要是厌氧菌）	培养需氧、厌氧和微需氧微生物（主要是厌氧菌）	培养需氧、厌氧微生物
培养条件	14天于30-35 ° C及20-25 ° C		
配方	Pancreatic Digest of Casein(胰酪蛋白胨)..... 15.0 g Yeast Extract(酵母浸出粉)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

ChP无菌检查培养基与USP、BP的比较

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 (MgSO ₄ ·7H ₂ O)....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/无水葡萄糖2.5g /2.3g
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 ° C及20-25 ° C		14天于20-25 ° C	14天于30-35 ° C及20-25 ° C

微生物实验室常用菌株



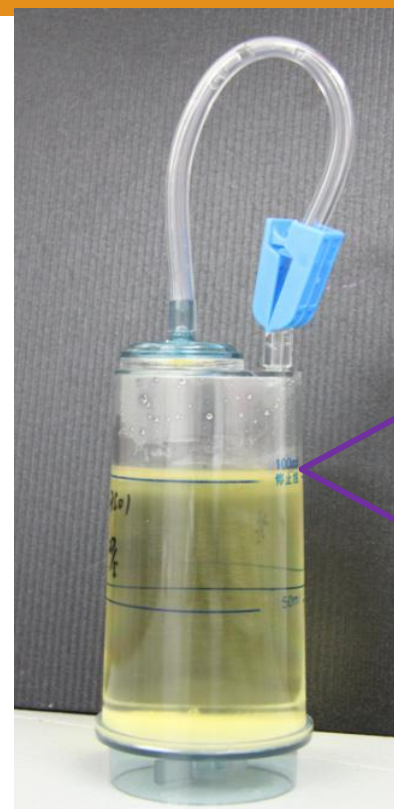
在硫乙中生长差异



需氧层厌氧层均生长



仅在厌氧层生长



仅在需氧层生长

●枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)
[CMCC (B) 63501]

●生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*)
[CMCC (B) 64941]

●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]

National Institutes for Food and Drug Control



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100 cfu的

金黄色葡萄球菌、
大肠埃希菌、
枯草芽孢杆菌、
生孢梭菌

4种菌

改良马丁培养基接入小于100 cfu的
白色念珠菌、
黑曲霉。

2种菌

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

金黄色葡萄球菌、
大肠埃希菌、
生孢梭菌各2管

3种菌

胰酪大豆胨液体培养基接入小于100CFU的

枯草芽孢杆菌、
白色念珠菌、
黑曲霉。

3种菌

微生物计数定义变化

修订前	修订后内容
细菌数 —营养琼脂	(1) 需氧菌总数 (TAMC)。 (2) 霉菌和酵母菌总数 (TYMC)。
霉菌和酵母菌数 —玫瑰红钠琼脂	(3) 需氧菌总数：生长在胰酪大豆胨琼脂 (TSA) 上所有菌落 (包括霉菌和酵母菌)。 (4) 霉菌和酵母菌总数：一般指生长在沙氏葡萄糖琼脂 (SDA) 上的所有菌落 (包括细菌)。如果由于细菌的生长而使霉菌和酵母菌的计数结果不符合微生物限度要求，可使用含有抗生素的SDA重新计数。

对照培养基

单剂量免称量独立包装

专利号:

ZL200920108836.8

培养基质量控制:

USP—之前验证过的

中国药典—**对照培养基**



$$\text{回收率} = \frac{\text{待测培养基平均菌落数 (cfu)}}{\text{对照培养基平均菌落数 (cfu)}} * 100\%$$

50%~200%

National Institutes for Food and Drug Control



培养基适用性检查

范围	液体、固体培养基
加菌量	不大于100cfu
培养温度	胰酪大豆胨琼脂：30~35℃ 培养； 胰酪大豆胨肉汤：30~35℃ 培养； 沙氏葡萄糖琼脂：20~25℃ 培养。
培养时间	细菌不大于72h，真菌不大于5天。
可接受标准	固体培养基：50%~200%（0.5~2） 液体培养基：生长良好。

培养基适用性检查

培养基名称	胰酪大豆胨肉汤（TSB）
无菌性检查	取已灭菌的TSB，于30-35℃培养不少于3天，培养基应澄清。
试验用菌株	枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌
接种方法	分别接种各试验用菌悬液于该培养基中，接种量不大于100cfu，摇匀，培养。
适用性检查	接种试验用菌株后，30-35℃培养不超过72小时，与对照培养基比较，试验菌应生长良好。 <u>（建议：培养基呈混浊的液体，或划线于相应的分离平板上，培养后呈现典型菌落）</u>

备注：该培养基同时用于稀释液的制备和控制菌检查时，需要考虑同时满足计数和控制菌检查培养基适用性检查控制要求。

培养基适用性检查

培养基名称	胰酪大豆胨琼脂（TSA）
无菌性检查	取已灭菌TSA注皿，于30-35℃培养3~5天，应无菌落生长。
试验用菌种	枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、黑曲霉
接种方法	涂布法：表面接种不大于100cfu试验用菌悬液于TSA平板表面； 倾注法：接种不大于100cfu试验用菌悬液于无菌平皿，倾注该培养基，轻轻摇匀。
适用性检查	枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌于30-35℃培养不超过3天；白色念珠菌、黑曲霉于30-35℃培养不超过5天。 与对照培养基比较，恢复率在50%~200%之间。

培养基适用性检查

培养基名称	沙氏葡萄糖琼脂（SDA）
无菌性检查	取已灭菌的SDA注皿，于20-25℃培养5~7天，应无菌落生长。
试验用菌种	白色念珠菌、黑曲霉
接种方法	涂布法：表面接种不大于100cfu试验用菌悬液于SDA平板表面。 倾注法：接种不大于100cfu试验用菌悬液于无菌平皿中，倾注该培养基，轻轻摇匀。
适用性检查	白色念珠菌、黑曲霉于20-25℃培养不大于5天。 与对照培养基比较，恢复率在50%~200%之间。
备注：如该培养基用于控制菌白色念珠菌的检查时，同时需要满足控制菌项下培养基适用性检查要求。	

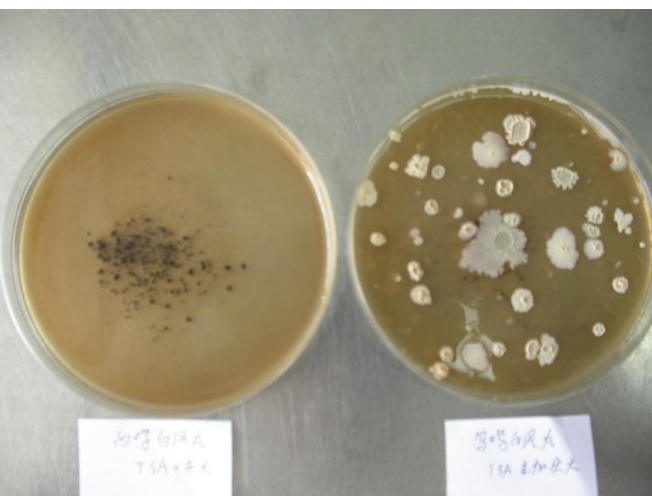
培养基适用性检查

培养基名称	沙氏葡萄糖琼脂+抗生素 (当细菌超标引起霉菌和酵母菌总数超标用)
无菌性检查	取已灭菌的SDA注皿，于20-25℃培养5~7天，应无菌落生长。
试验用菌种	抑菌性检查：枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 促生长能力：白色念珠菌、黑曲霉
常用抗生素	1、庆大霉素：广谱。对G-，G+菌有较好的抗菌作用。 2、氯霉素：广谱。对G-菌作用强；对G+菌作用不及青霉素与四环素。
接种方法	抑菌性：接种不少于100cfu试验用菌。 促生长能力：接种不大于100cfu试验用菌。
适用性检查	白色念珠菌、黑曲霉于20-25℃培养不大于5天。与对照培养基比较，恢复率在50%~200%之间。 枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌应不得生长。

乌鸡白凤丸

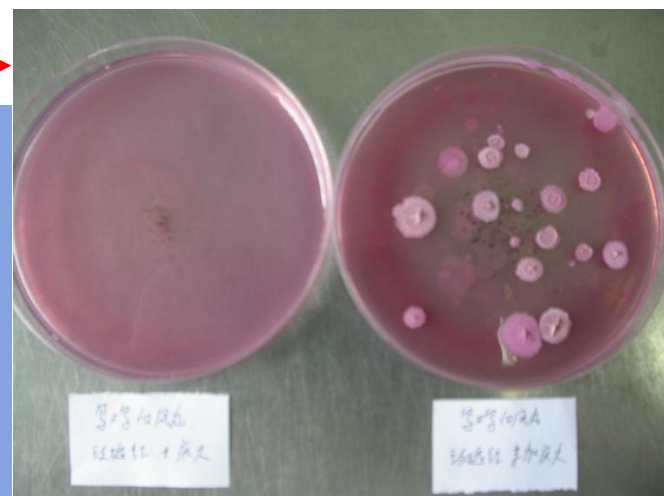
样品： 乌鸡白凤丸

疑似菌落做革兰染色
革兰阳性杆菌
不属于霉菌或酵母菌。



将无菌硫酸庆大霉素
(相当于20mg庆大霉素)

胰酪胨大豆琼脂培养基
玫瑰红钠琼脂培养基。



National Institutes for Food and Drug Control



胰酪大豆胨琼脂培养基

玫瑰红钠琼脂培养基

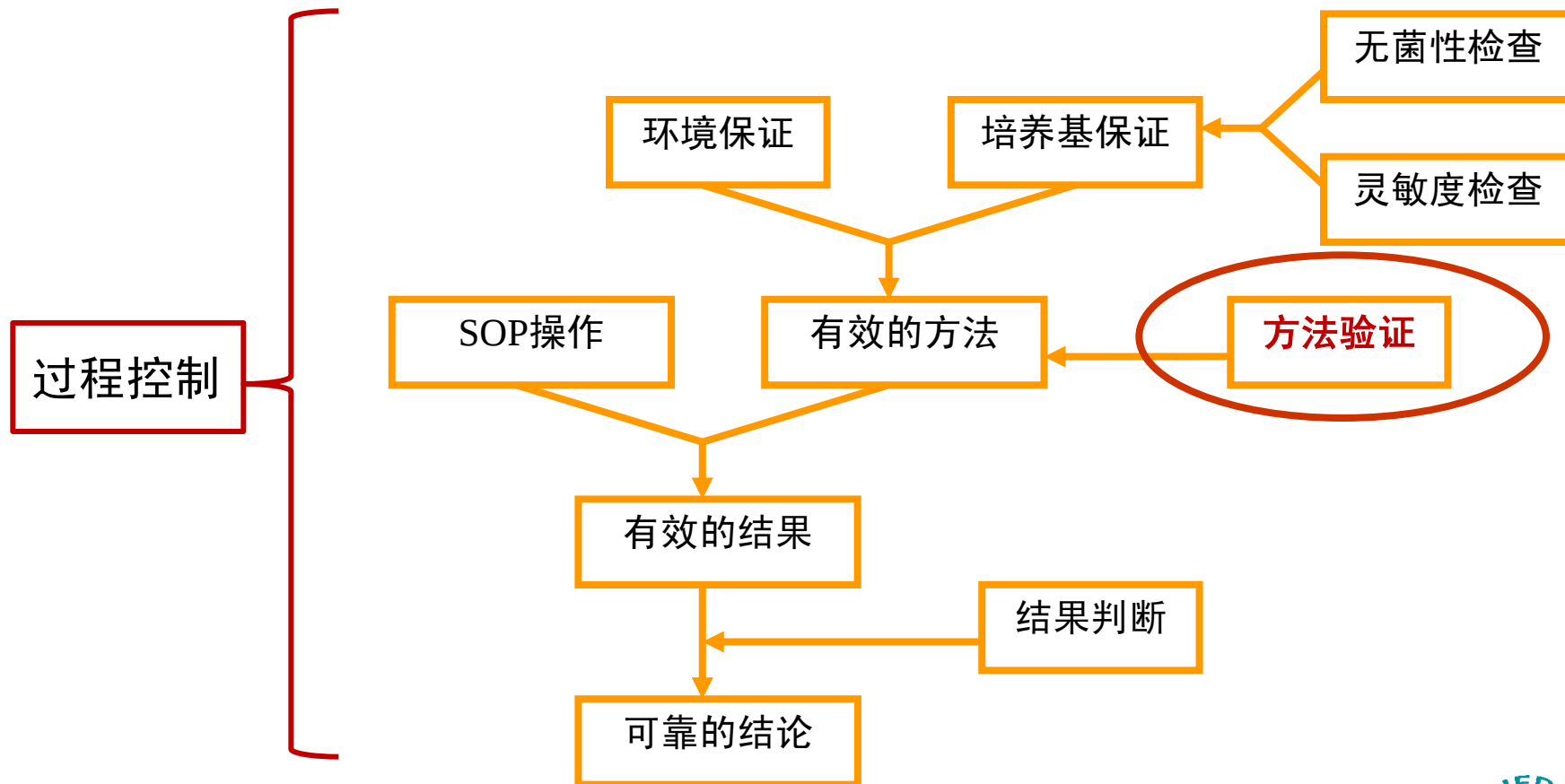
选择性培养基适用性

控制菌检查	培养基	特性	试验菌株
大肠菌群	乳糖胆盐发酵培养基	促生长能力	<i>E. coli</i>
		抑制能力	<i>S. aureus</i>
	乳糖发酵培养基	促生长能力+指示能力	<i>E. coli</i>
	EMB或麦康凯琼脂	促生长能力+指示能力	<i>E. coli</i>
大肠埃希菌	胆盐乳糖培养基	促生长能力	<i>E. coli</i>
		抑制能力	<i>S. aureus</i>
	MUG、EMB或麦康凯琼脂	促生长能力+指示能力	<i>E. coli</i>
沙门菌	营养肉汤培养基	促生长能力	<i>S paratyphi B</i>
	四硫磺酸盐亮绿培养基	促生长能力	<i>S paratyphi B</i>
		抑制能力	<i>S. aureus</i>
	DHL或SS琼脂、EMB或麦康凯琼脂	促生长能力+指示能力	<i>S paratyphi B</i>
	三糖铁琼脂	指示能力	<i>S paratyphi B</i>

选择性培养基适用性

控制菌检查	培养基	特性	试验菌株
铜绿假单胞菌	胆盐乳糖培养基	促生长能力	<i>P. aeruginosa</i>
		抑制能力	<i>S. aureus</i>
	溴化十六烷基三甲铵琼脂	促生长能力	<i>P. aeruginosa</i>
		抑制能力	<i>E. coli</i>
	绿脓菌素测定用培养基	促生长能力+指示能力	<i>P. aeruginosa</i>
金黄色葡萄球菌	亚碲酸盐肉汤培养基	促生长能力	<i>S. aureus</i>
		抑制能力	<i>E. coli</i>
	甘露醇高盐琼脂或卵黄氯化钠琼脂	促生长能力+指示能力	<i>S. aureus</i>
		抑制能力	<i>E. coli</i>
梭菌	梭菌增菌培养基	促生长能力	<i>Cl. sporogenes</i>
	哥伦比亚琼脂	促生长能力	<i>Cl. sporogenes</i>
白色念珠菌	沙氏葡萄糖肉汤	促生长能力	<i>C. albicans</i>
	沙氏葡萄糖琼脂	促生长能力+指示能力	<i>C. albicans</i>
	念珠菌显色培养基	促生长能力+指示能力	<i>C. albicans</i>
		抑制能力	<i>E. coli</i>
	1%聚山梨酯80-玉米琼脂培养基	促生长能力+指示能力	<i>C. albicans</i>

微生物检验的过程控制



方法验证、转移、确认

<1224>

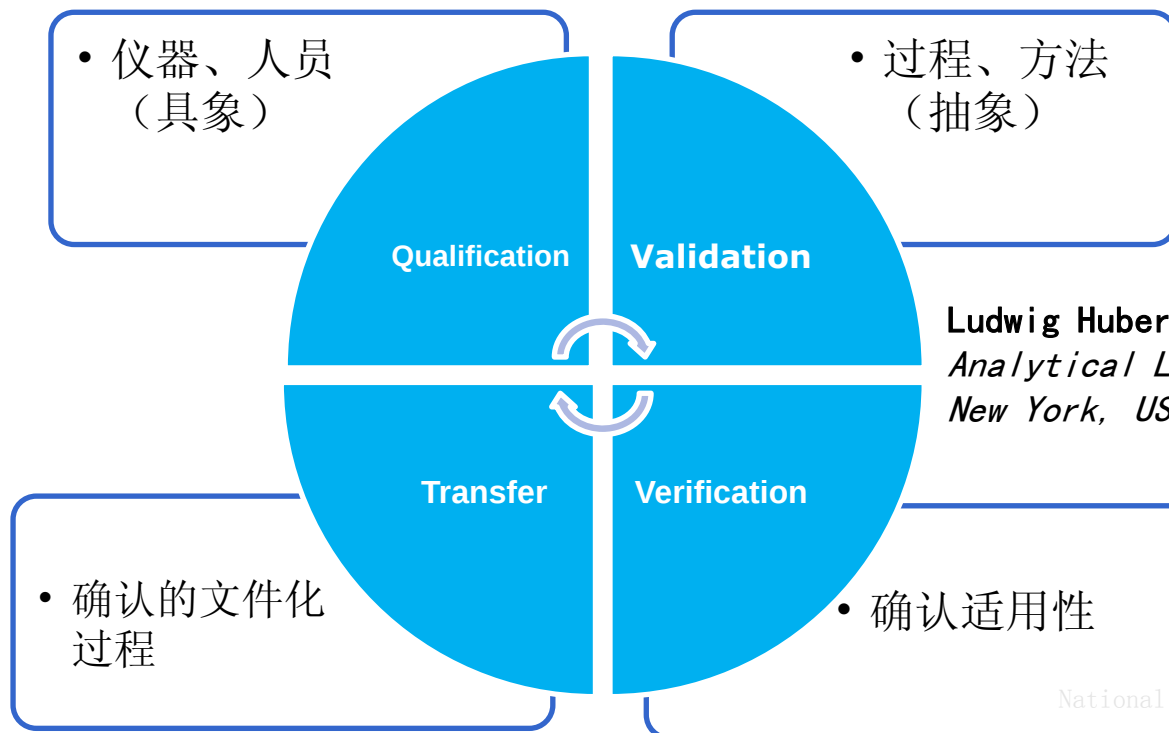
• **TRANSFER** OF ANALYTICAL PROCEDURES

<1225>

• **VALIDATION** OF COMPENDIAL PROCEDURES

<1226>

• **VERIFICATION** OF COMPENDIAL PROCEDURES



Ludwig Huber, *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*
New York, USA, 2007

National Institutes for Food and Drug Control



药典方法需做适用性试验



参数	备注
专属性	USP, ICH
选择性	ISO 17025
精密度	USP, ICH
重复性	ICH, ISO 17025
中间精密度	ICH
重复性	ICH, USP, ISO 17025 中定义为耐用性
准确度	USP, ICH, ISO 17025
线性	USP, ICH, ISO 17025
范围	USP, ICH
检测限	USP, ICH, ISO 17025
定量限	USP, ICH, ISO 17025
耐用性	USP, ICH中称为方法开发程序, ISO
稳定性	USP, ICH中定义为重现性

US FDA cGMP 法规在 21 CFR 211.194 (a) (2) 中规定:

“如果应用的方法收载于现行的美国药典或其他认可的标准方法中，或在批准的新药应用中有详细方法且未改变这一参考方法时，有指明方法和参考文献的声明即满足要求。所有检测方法的适用性应在实际应用条件下得到证实。”

Ludwig Huber

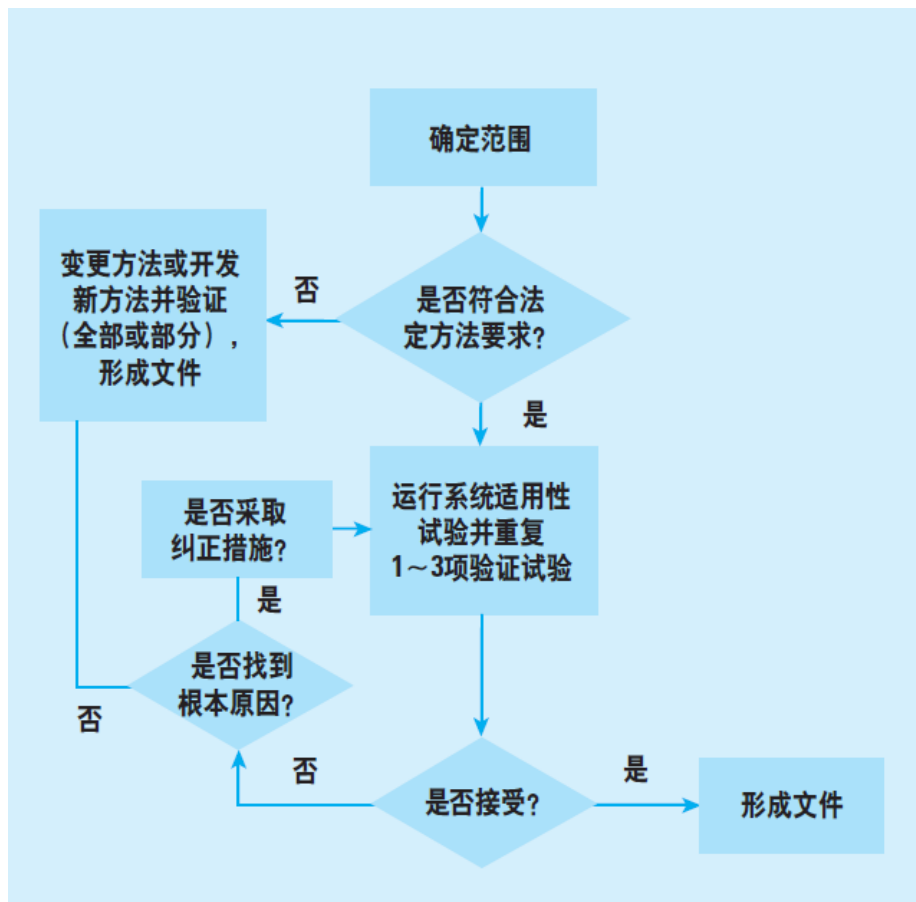
Validation and Qualification in Analytical Laboratories

New York, USA, 2007

National Institutes for Food and Drug Control



方法适用性



接种法、薄膜过滤法均为药典方法

方法适用性针对环节:

①样品制备过程:
表面活性剂、中和剂的微生物无毒性
处理方法的微生物兼容性

②样品检查过程:
可用的去除活性或中和活性的方法

Suitability test based on Recovery Validation

检测方法验证

标准（药典）检测方法

实验室在进行常规检测前应证明该实验室可以满足标准检测方法中的某些性能指标（即**方法确认**），并证明某一方法适用于某产品的检测（方法适用性包括**阳性对照**和**阴性对照**）。

新建方法  方法验证与方法适用性

药典方法  方法转移与方法确认

（其他成熟方法）

（部分菌株的验证）

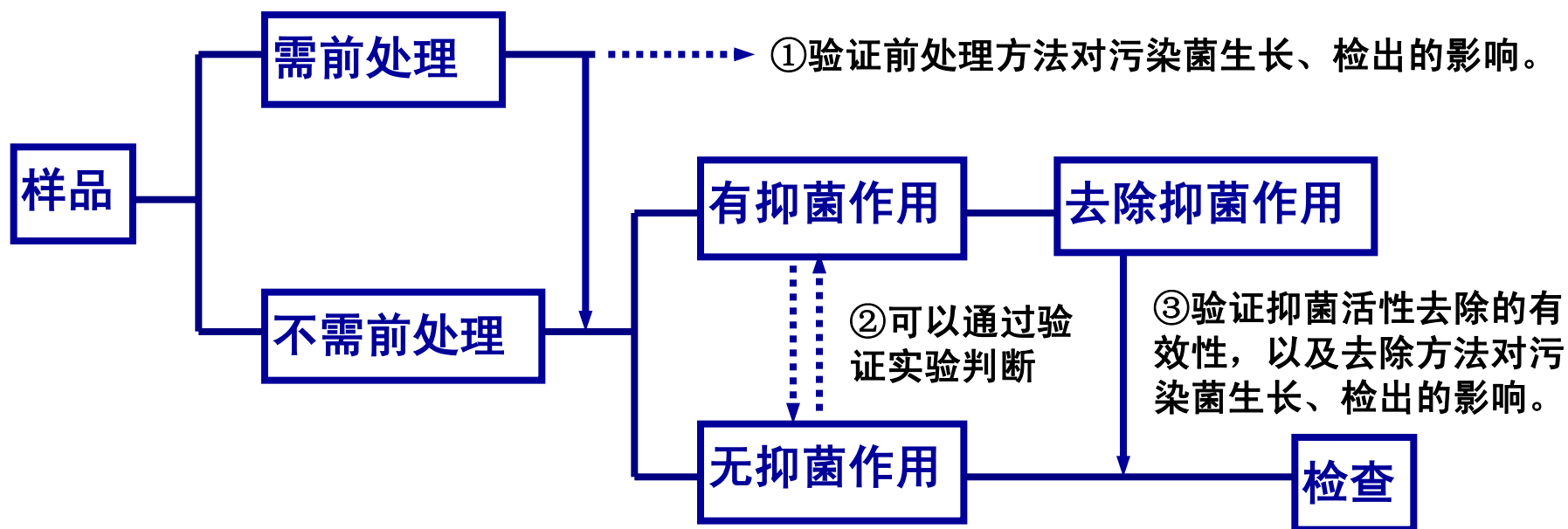
有案可查、溯源性； 建立实验室自身的方法依据体系

其他

准确度、精密度、专属性、检测限、定量限、线性、粗放性

验证的一般程序与环节

利用供试品与微生物的差异，降低或消除供试品的影响
通过模拟实验对降低或消除效果加以检验。



药品微生物检查方法验证的一般程序与环节

National Institutes for Food and Drug Control



盐酸莫西沙星氯化钠注射液

常规方案

250ml/瓶 无菌检验量6瓶

每张膜3瓶:

$$250\text{ml} \times 3 = 750\text{ml} / \text{膜}$$

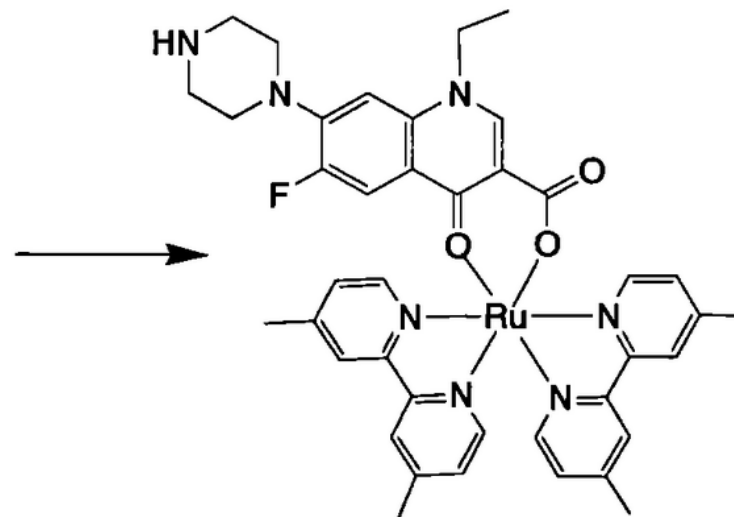
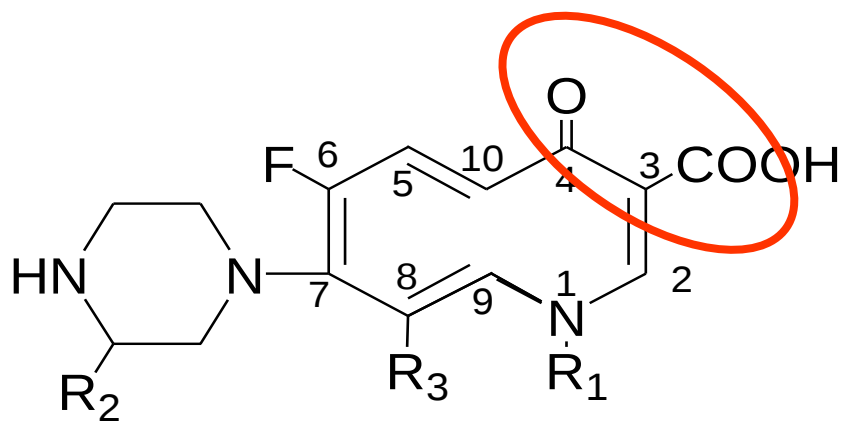
采用分膜的取样方案:

3瓶/套双联滤器

$$750\text{ml} \div 2 = 375\text{ml} / \text{膜}$$



多价金属阳离子对喹诺酮类的螯合作用



五种喹诺酮类抗生素的结构，并且由3、4位上的羰基与镁、锰等金属离子配位生成稳定的六元环螯合物，药物与金属离子的螯合比为2: 1

R ₁	R ₂	R ₃	
	H	H	环丙沙星
CH ₂ CH ₃	CH ₃	F	洛美沙星
CH ₂ CH ₃	H	H	诺氟沙星
	CH ₃	OCH ₃	加替沙星
	CH ₃	CHF ₃	卡德沙星

梯度冲洗找到敏感菌株

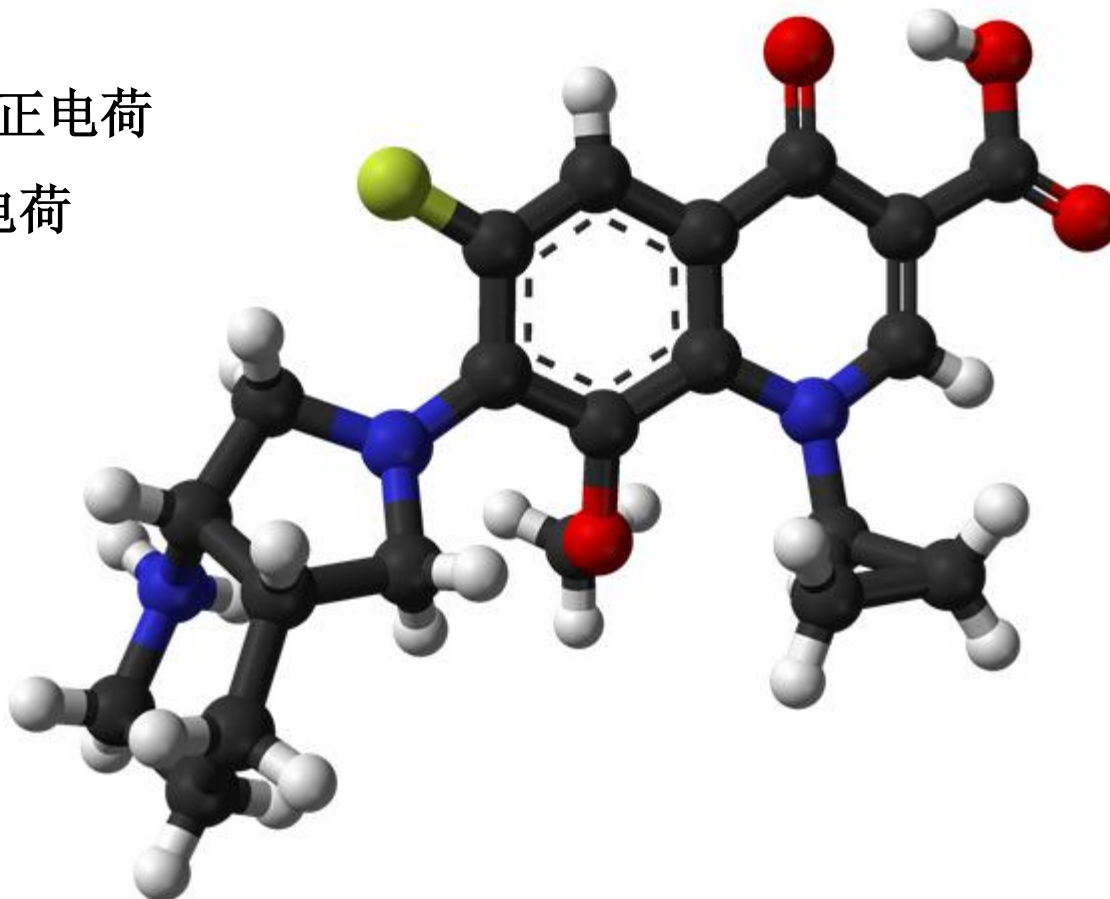
菌株	63501	26003	64941	10104	98001	98003
冲洗量						
300	—	—	—	—	—	—
400	—	—	—	+	+	+
600	—	—	—	/	/	/
800	—	—	—	/	/	/
1000	—	—	—	/	/	/
1200	—	+	+	/	/	/

培养体系中添加0.2mol/L MgSO_4

莫西沙星结构

RH端N原子带正电荷

羧基端带负电荷



+

—

常用中和剂比例

- 0.1%大豆卵磷脂
- 0.7%吐温80
- 卵磷脂、吐温80及L-组胺酸用于中和醛类及酚类化合物
- 卵磷脂及吐温80中和季铵盐
- 卵磷脂中和氯己定
- 吐温80中和双三氯酚及汞化合物

以敏感菌株确认冲洗量

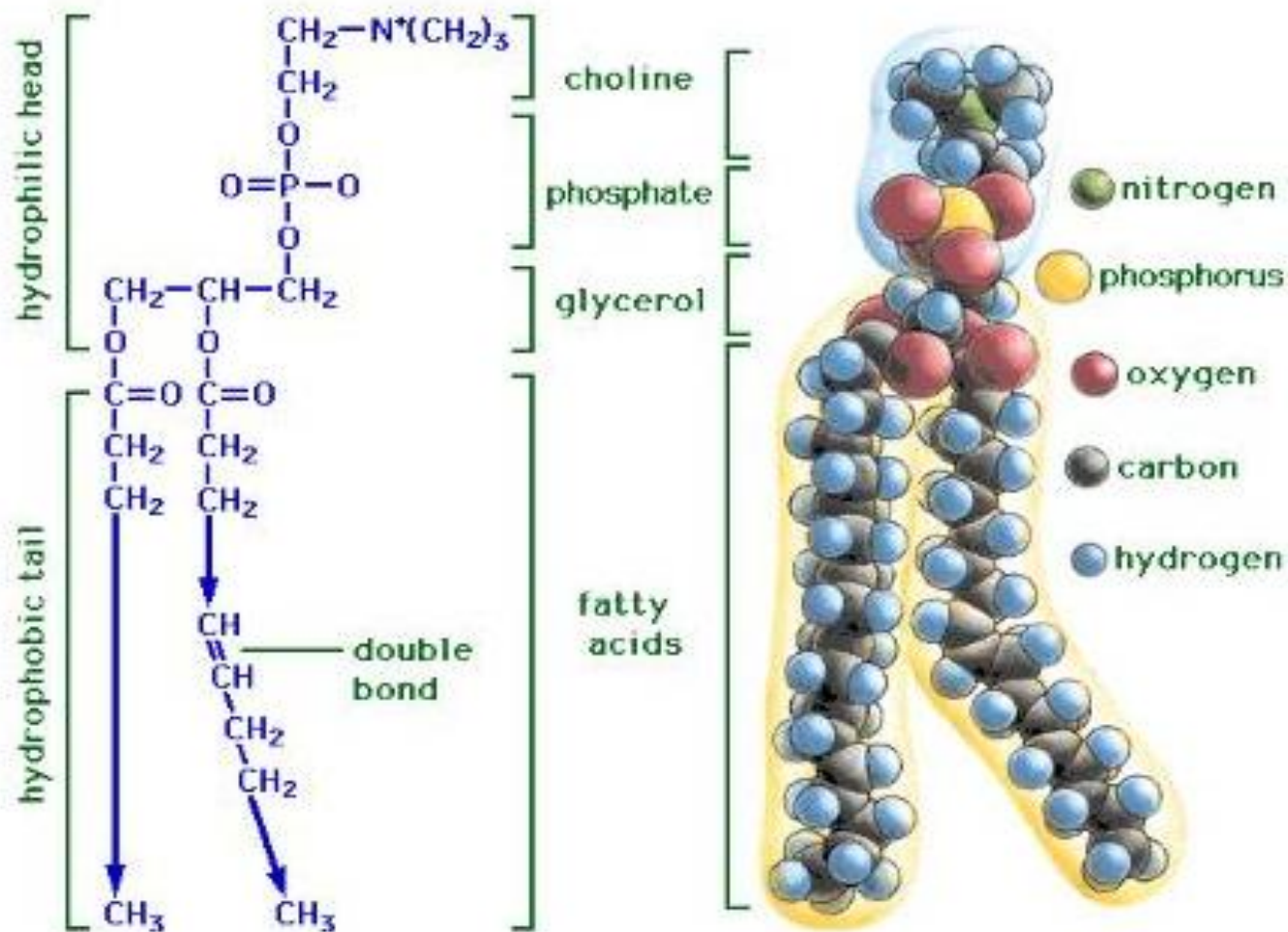
种类 冲洗量	0.1%大豆卵磷脂	0.7%吐温80	0.1%大豆卵磷脂+0.7%吐温80
400	—	—	—
500	—	—	—
600	—	—	+
700	—	—	/
800	—	—	/

针对非油性样品，使用单纯的表面活性剂会导致冲洗过程中产生过多泡沫影响冲洗效果

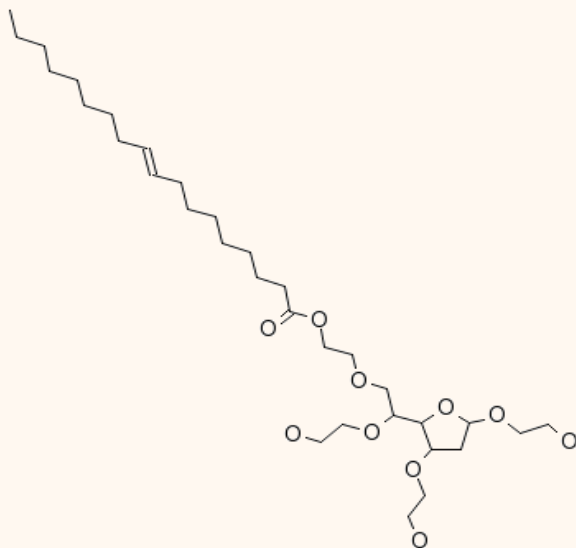
方法适用性结论

- 取本品，照中国药典2010年版二部附录XI H薄膜过滤法，滤过，每张滤膜不得超过375ml 供试液
 - 以含0.1%大豆卵磷脂0.7%吐温80的无菌氯化钠溶液为冲洗液，100ml/次冲洗滤膜6次，每膜约冲洗600ml
 - 最后再加入1ml 无菌的0.2mol/L的 $MgSO_4$ 溶液
 - 以枯草芽孢杆菌为阳性对照菌，应符合规定
- 样品通量
- 冲洗液种类
冲洗量
- 中和剂
- 阳性对照菌

大豆卵磷脂结构



吐温80结构



乳化剂降低了混合体系中各组分的界面张力，并在微滴表面形成较坚固的薄膜

由于乳化剂给出的电荷而在微滴表面形成双电层，阻止微滴彼此聚集，而保持均匀的乳状液。



乳化剂的选择

- 选择乳化剂的根据是亲水亲油平衡值，简称为HLB (Hydrophilic-Lipophilic Balance) 值
- 表面活性剂的HLB值越接近20，其亲水倾向越强，相反越接近0，亲油倾向越强。

乳化剂名称	HLB值	离子型	亲油部分	溶解性		ADI值	最高用量/(g/kg)	
				油中	水中		FAO/WHO	GB
卵磷脂(大豆磷脂)	3~4	两性	脂肪酸基	可溶	可分散	不限	5~10	GMP
吐温80	15.4	非	脂肪酸基	可溶	可溶	0~25	10	10

计数方法适用性试验

稀释度依据样品特性，质量标准制定

根据供试品的理化特性与生物学特性，采取适宜的方法制备合适的供试液。

分装5份
9.9ml
供试液

+ 0.1ml 金黄色葡萄球菌液



+ 0.1ml 铜绿假单胞菌液



+ 0.1ml 枯草芽孢杆菌液



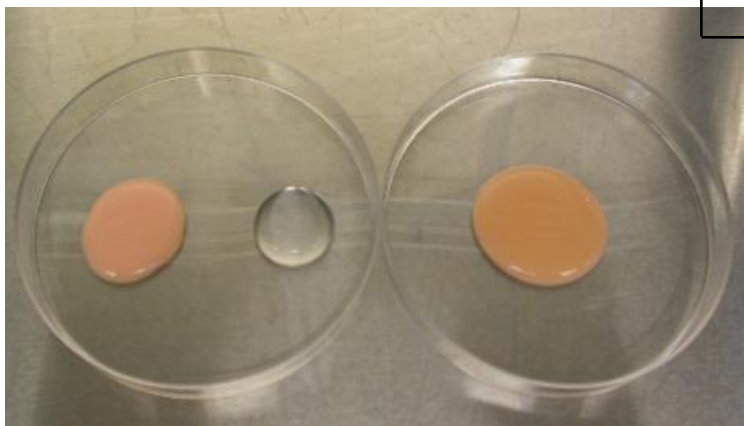
+ 0.1ml 白色念珠菌液



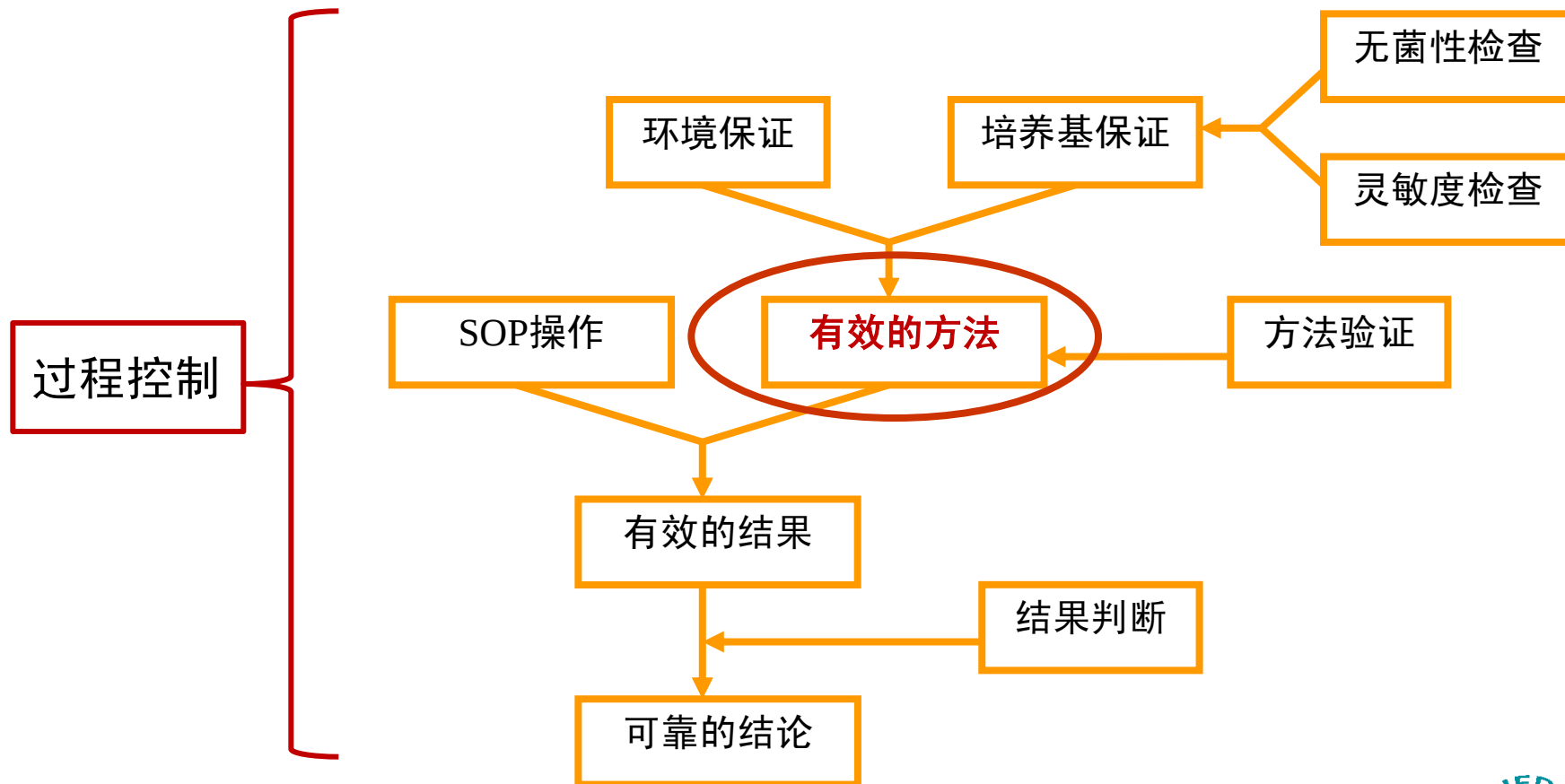
+ 0.1ml 黑曲霉菌液



保证平皿中的菌数不大于100cfu



微生物检验的过程控制



微生物限度案例

某板蓝根冲剂，标准为细菌数不得过1000cfu/g，某药检所细菌数结论1200cfu/g，送中检院仲裁。

(1) 方法适用性

平皿法（1：10供试液）	1ml/皿	0.5ml/皿	0.2ml/皿
计数结果（cfu/g）	650	910	1380

合格

不合格

左奥硝唑注射液（ 10mL： 0.25g/支）

初始供试液浓度下降



取样量及 样品浓度	样品量	冲洗量	阳性对照菌 (生孢梭菌) 生长情况			滤膜通过量
10ml × 10支 C: 250mg/ml	50mL	800ml	—	—	+	850ml
		1000ml	—	+	—	1050ml
10ml × 10支 溶解于400ml 0.1%无菌蛋 白胨溶液 C: 50mg/ml	250mL	300ml	—	+	—	550ml
		400ml	+	—	—	650ml

滤膜通过量下降



阳性对照生长提前

National Institutes for Food and Drug Control



注射用盐酸克林霉素（0.3g/支）

初始供试液浓度下降



取样量及 样品浓度	样品 量	冲洗量	阳性对照菌 (金黄色葡萄 球菌)生长情 况			滤膜通过 量
0.3g×10支 每支溶解于 5ml 0.9% NaCl溶液 C: 60mg/ml	25mL	800ml	—	—	—	825ml
		1000ml	—	—	—	1025ml
0.3g×10支 全部溶解于 500ml 0.9 %NaCl溶液 C: 6mg/ml	250mL	400ml	—	+	—	650ml
		500ml	+	—	—	750ml

滤膜通过量下降



阳性对照生长提前

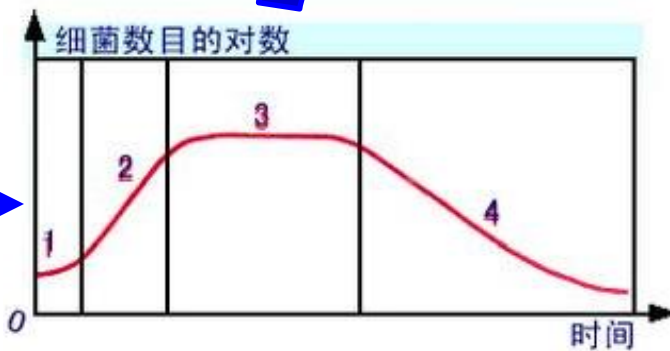
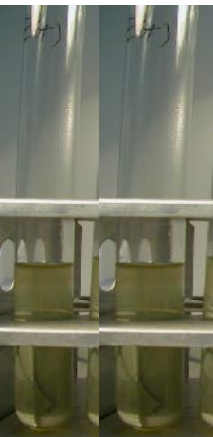


菌种传代保藏流程

1 BioBall

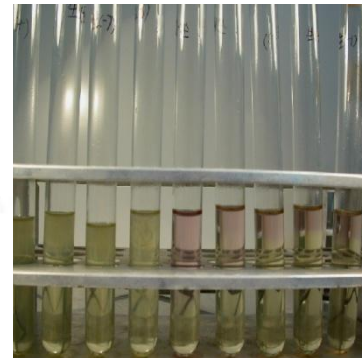


3 推荐方式



细菌的生长曲线

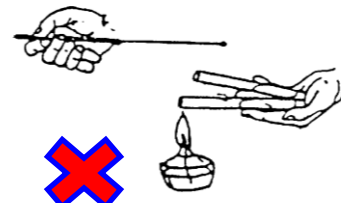
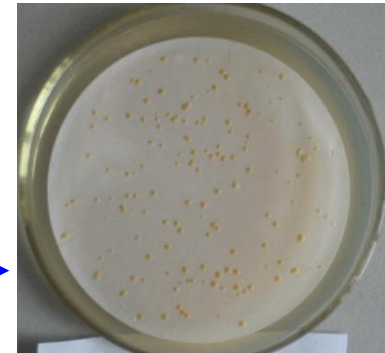
1. 调整期
2. 对数期
3. 稳定期
4. 衰亡期



s for Food and



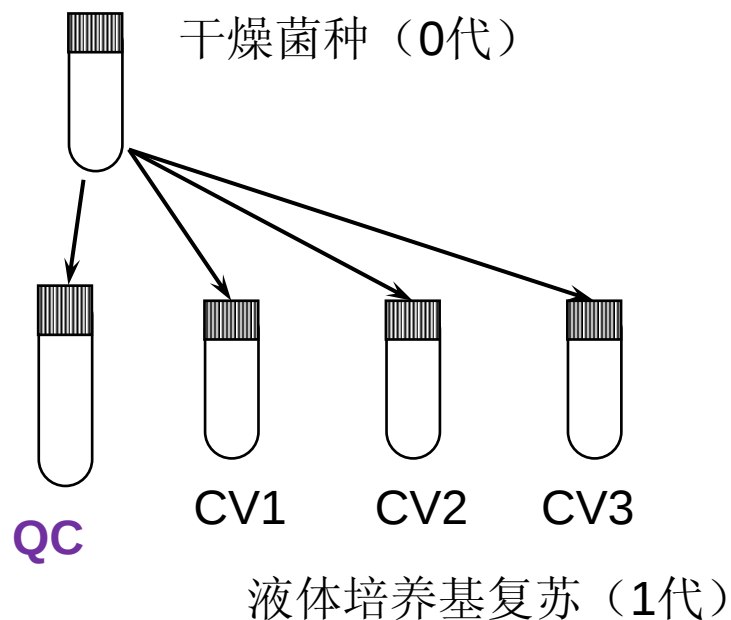
2 自动稀释



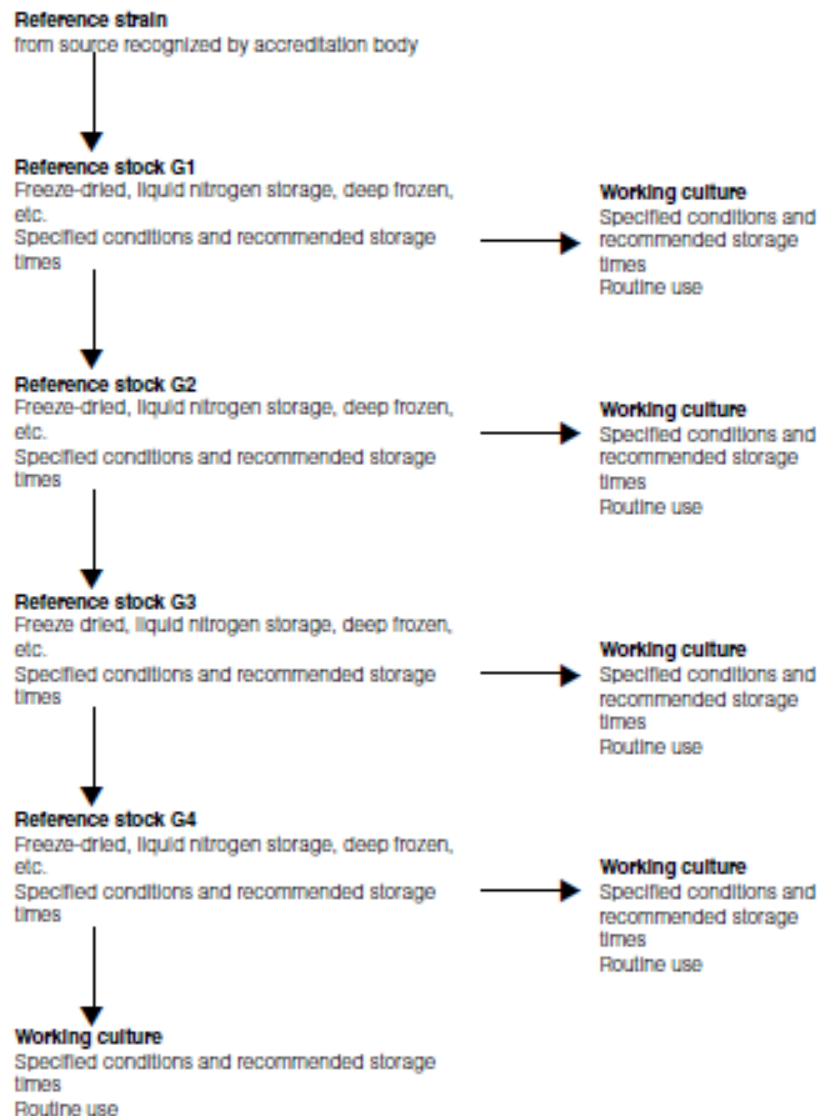
工作菌株传代保藏规程

试验用菌株的传代次数不得超过5代（从菌种保存中心获得的冷冻干燥菌种为第0代）。

代的定义：每接种一次即为一代（有在新鲜的培养基上生长过程）
传代示意图：

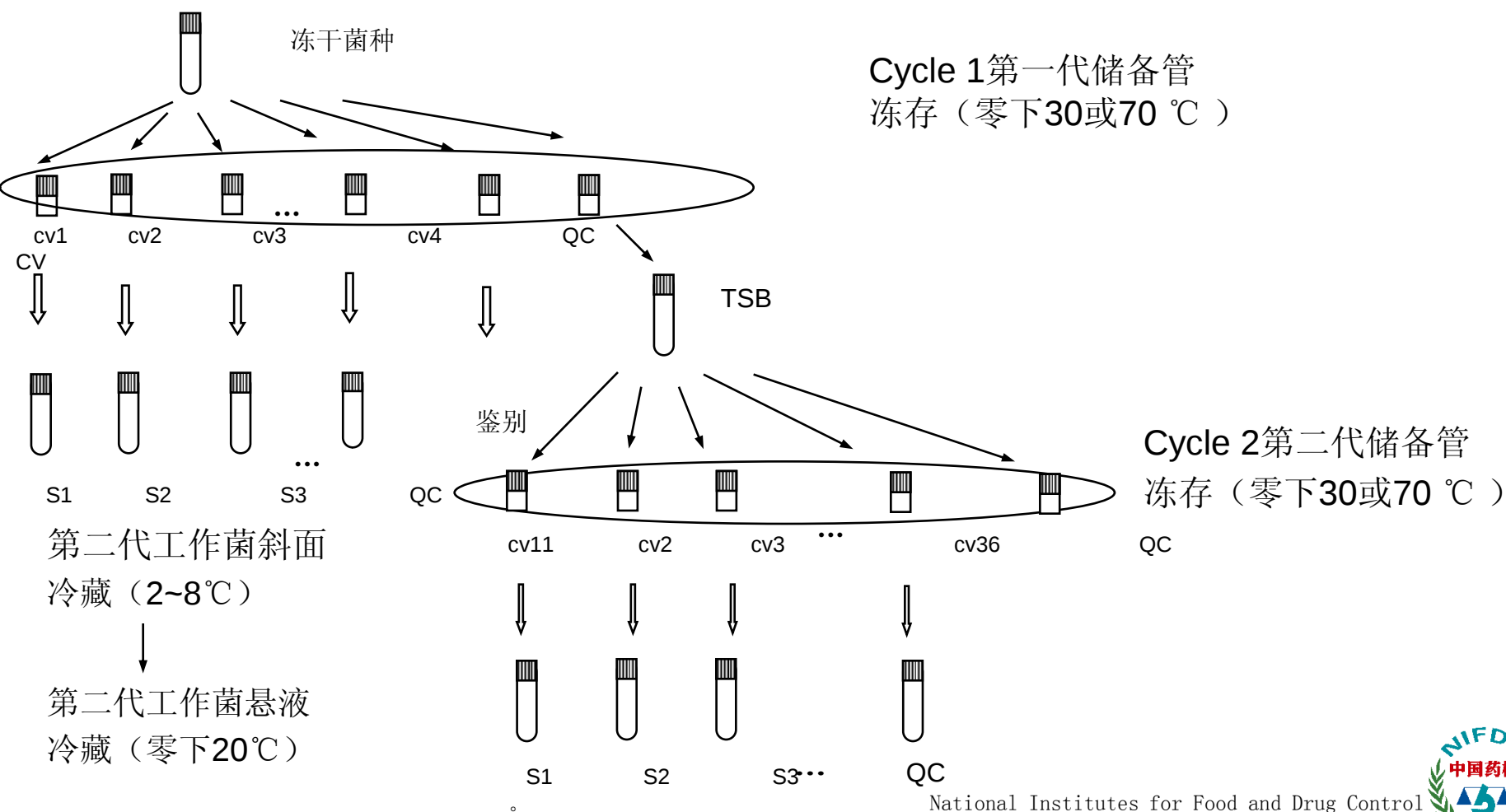


General use of reference cultures

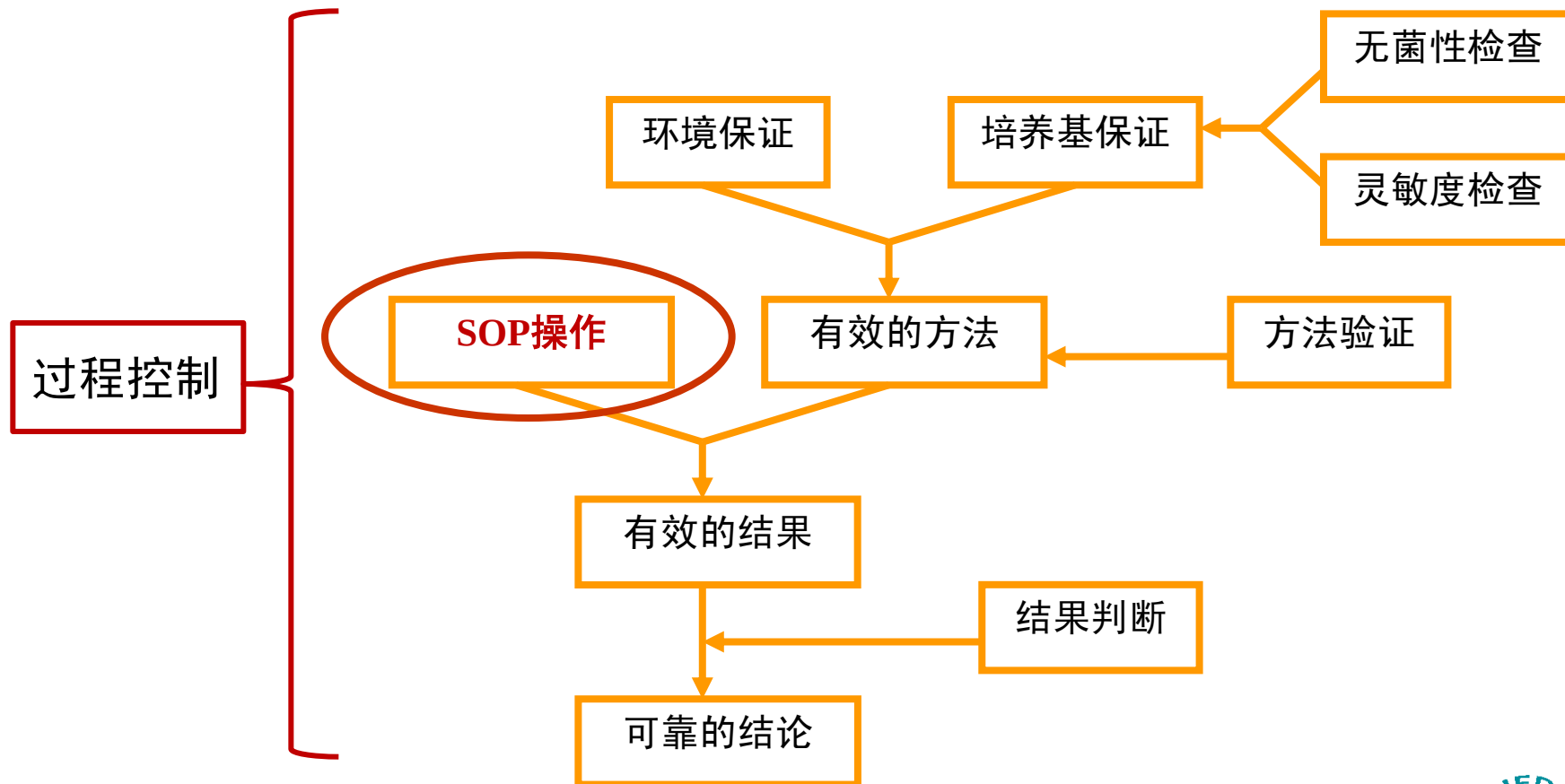


工作菌株传代保藏流程图

菌种传代流程

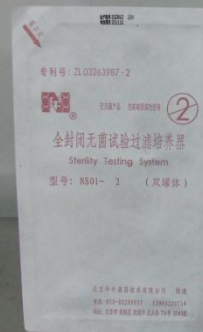


微生物检验的过程控制



实验操作 —— 物料进场

双层无菌包装



2009/04/15 15:18

洁净传递
(风淋、紫外照射)



2009/04/16 14:55

外围消毒剂清洁外表面



2009/04/16 14:54

核心区

外围

National Institutes for Food and Drug Control



实验操作 —— 人员进场



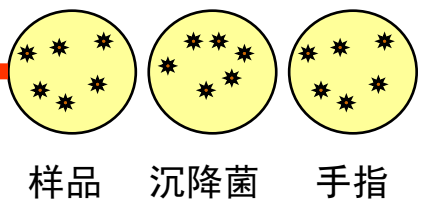
二更



一更

National Institutes for Food and Drug Control





← 监控平板



无菌检验框架示意图

无菌三针单联管



Food and Drug Control



实验过程监控



表面监控



2009/04/16 15:16

手部监控

环境菌监控

National Institutes for Food and Drug Control



2009/04/16 15:19

无菌程序保障



无菌检查样品前处理

分批消毒、实验（混合）→ 统一消毒，统一实验

严格遵守外表面消毒程序

一般环境酚类（phenylphenol/ tertiary amylphenol）→ 洁净环境过氧乙酸+75%乙醇（无菌级）
（苯式苯酚/三级戊基苯酚）

增加过程监控力度

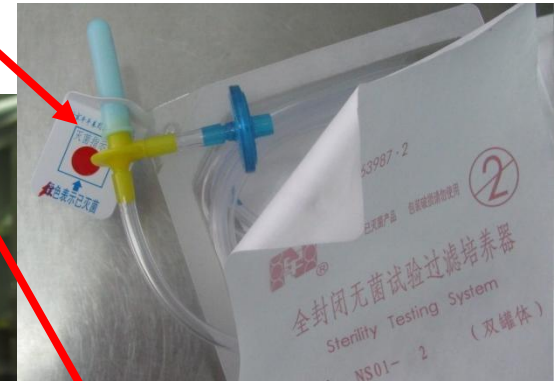
表面菌采样、手部采样（每批）、动态浮游菌采样（下风口）

National Institutes for Food and Drug Control



明确标识

Paper labels are preferred over marker pens.



Food and

原始记录

记录格式编号: R-NIFDC-SOP-A-T-0078-01 发布时间: 2013 年 5 月 24 日 版本: 03.1

中国食品药品检定研究院

无菌检查检验记录

1. 样品信息:

样品名称:	样品编号:
生产厂家:	生产批号:

2. 检验方法:

检验依据: 中国药典 2010 版二部附录XIIH 无菌检查法.
方法来源:

3. 检验时间:

____月____日____时.

检验人员:	环境温度:	环境湿度:
-------	-------	-------

4. 设施及设备:

名称	编号	使用前	使用后
培养室/工作台	15°/AA1556		
生物安全柜/培养基	15°/AA1575		
房间/培养基	15°/AA1607 /AA1608		
房间/生物安全柜	15°/AA1564 /AA1565		

5. 检验:

检验项目	标准规定	检验结果
【检查】	应符合规定.	
无菌	应符合规定.	符合规定.

结论: 本品按中国药典 2010 版二部附录XIIH 无菌检查法检验.

无菌检查结果: 符合规定.

备注: 无过程中需要说明的问题.

.

报告汇总人:		年 月 日.
校 对:		年 月 日.
科室主任审核:		年 月 日.

化学药品无菌检查法检测室

第 1 页 共 3 页.

样品信息&方法信息

仪器信息&状态

检验结论前置
方便核验

校对&复核信息前置

National Institutes for Food and Drug Control



原始记录

记录格式编号: R-NIFDC-SOP-A-T-0078-01 发布日期: 2013 年 6 月 24 日 版本: 03

样品名称: 样品编号:

样品信息一致

6. 1. 培养基

培养基名称	制备记录	培养基适用性记录
硫乙醇酸盐流体培养基	R-SOP-S-W-0002-01	R-SOP-A-T-0078-03
改良马丁培养基	R-SOP-S-W-0002-01	R-SOP-A-T-0078-03

材料信息&试剂信息

6. 2. 无菌检查用滤器

型号	批号	备注
NS01-2 薄膜过滤器		北京牛牛基因技术有限公司

7. 操作 (SOP: NIFDC-SOP-A-T-0078)

7. 1. 供试液制备: ☐ 不涉及

取供试品 瓶 (支) 溶解于 mL

7. 2. 检查法:

a. 直接接种法: ☐ 不涉及

取 mL/支 硫乙醇酸盐培养基 支, 另取一支为空白对照;

取 mL/支 改良马丁培养基 支, 另取一支为空白对照;

b. 薄膜过滤法: ☐ 不涉及

取供试液 mL 过滤 联无菌滤器, 以 为冲洗液, 连续冲洗 mL

7. 3. 阳性对照: ☐ 不涉及

另取供试品 瓶 (支) 同法操作, 作为阳性对照组;

以 菌 () 为阳性对照菌;

检验方法描述

8. 检验结果

8. 1. 无菌检查记录

天数	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	温度
培养基															℃
样品															
阴性对照															
与 样品															
阴性对照															
阳性对照															

检验结果记录

原始记录

记录表式编号: E-NIFDC-SQP-A-T-007B-01 发布日期: 2013 年 6 月 24 日 版本: 03

样品名称:		样品编号:			
8.2. 无菌检查时点环境监控结果					
采样时长 (min)	培养温度 (℃)	培养时间 (Hour)	采样点: (A 瓶 @ 点)	计数结果 (cfu/瓶)	培养基批号
.....			左侧:		
			居中:		
			右侧:		
8.3. 无菌检查培养基偏差记录					
无菌检查结果是否出现偏差:					
出现偏差 ☐			未出现偏差 ☐		
偏差描述:					

样品信息一致

过程监控信息
包括监控方案
培养条件
培养结果
及培养基信息

是否启动偏差调查记录

原始记录

记录格式编号: R-NIFDC-SOP-A-T-0102-01 版数: 03 版次: 03

无菌检查偏差调查表			
样品名称: ,		样品编号: ,	
调查项目:		结论:	
保障	1. 是否注意无菌操作:	是 ☐	否 ☐
	2. 净化工作台是否正常运行:	是 ☐	否 ☐
	3. 动态浮游菌、沉降菌是否符合要求:	是 ☐	否 ☐
	4. 培养基灭菌是否完全符合规定:	是 ☐	否 ☐
检验	1. 检验用品:	培养基灭菌是否符合要求:	是 ☐
		其他检验用品灭菌是否符合要求:	是 ☐
	2. 阴、阳对照:	当月浮游菌检查是否符合要求:	是 ☐
		培养基验证是否符合要求:	是 ☐
		阳性对照显示是否正确:	是 ☐
		阴性对照显示是否正确:	是 ☐
	3. 操作:	检验操作前的清洁消毒是否有效:	是 ☐
		样品预处理是否有效:	是 ☐
		是否有样品批次混淆的可能:	是 ☐
		检验过程是否注意无菌操作:	是 ☐
		微生物鉴别是否严格按照程序进行:	是 ☐
		分装培养基是否准确:	是 ☐
结果	1. 阳性结果与当月环境监测比较是否相同:	是 ☐	否 ☐
	2. 抗生素类产品阳性结果7天后复试是否仍然阳性:	是 ☐	否 ☐
实验人: ,		年 月 日: ,	
核对: ,		年 月 日: ,	

样品信息

环境保护调查
仪器运转
环境监控

检验操作调查
培养基、检验用具
阴性、阳性对照
操作细节

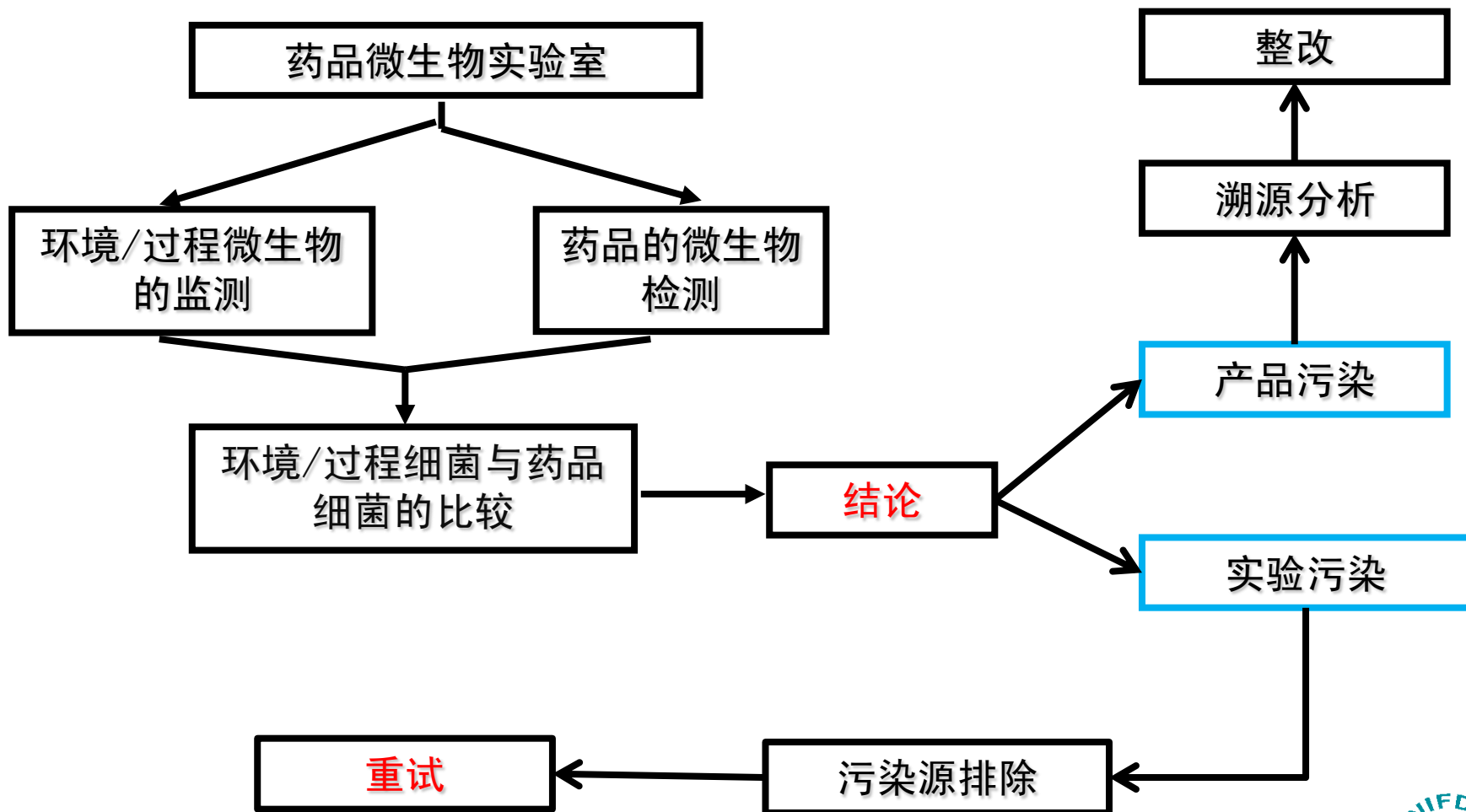
结果判断调查

微生物检验的过程控制

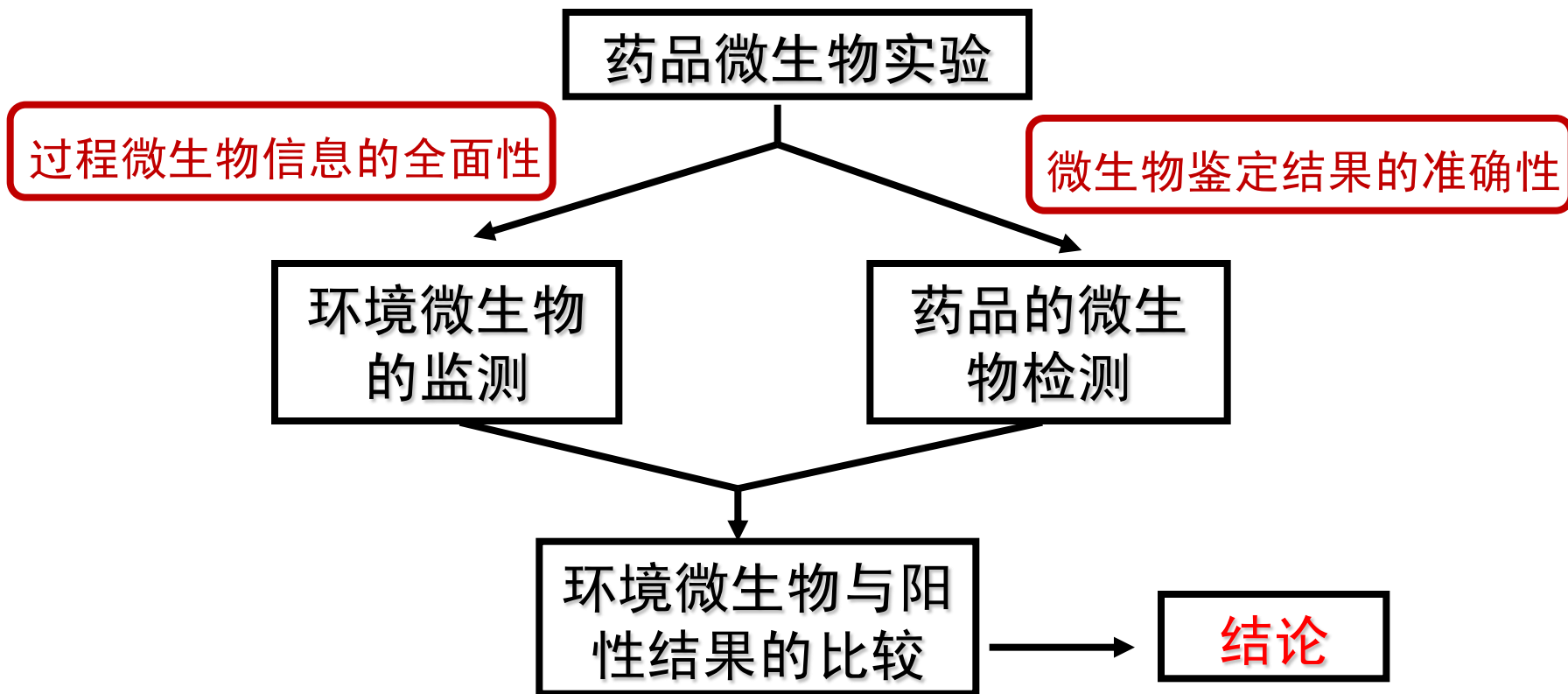


- 阳性 (+) 阴性 (-)
- 供试品管浑浊，即判不合格
除非能充分证明试验结果无效，即生长的微生物非供试品所含
- ✓ 设备，环境的微生物监控结果超标
- ✓ 回顾实验过程，发现污染因素
- ✓ 鉴定微生物，确认是操作引入的
- 无菌试验经确认无效，可重试

药品无菌检验的溯源性分析



保证药品微生物检验结果可靠的有效途径

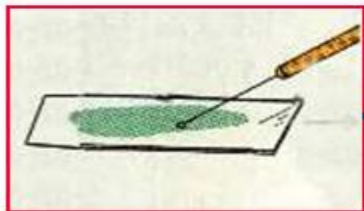


各类常见微生物的菌落特征

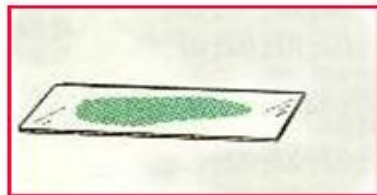
微生物类别 菌落特征			单细胞微生物		菌丝状微生物	
			细菌	酵母菌	放线菌	霉菌
主要特征	细胞	形态特征	小而均匀、个别有芽孢	大而分化	细而均匀	粗而分化
		相互关系	单个分散或按一定方式排列	单个分散或假丝状	丝状交织	丝状交织
	菌落	含水情况	很湿或较湿	较湿	干燥或较干燥	干燥
		外观特征	小而突起或大而平坦	大而突起	小而紧密	大而疏松或大而致密
参考特征	菌落透明度		透明或稍透明	稍透明	不透明	不透明
	菌落与培养基结合度		不结合	不结合	牢固结合	较牢固结合
	菌落的颜色		多样	单调	十分多样	十分多样
	菌落正反面颜色差别		相同	相同	一般不同	一般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

革兰染色

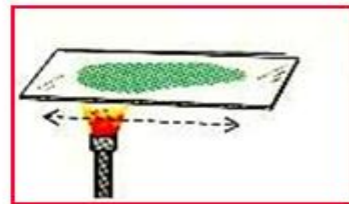
涂片



干燥



固定



初染



结晶紫 1'

冲洗



媒染



碘液 1'

冲洗



脱色



95% 乙醇 30''

冲洗



复染



复红



冲洗



滤纸干燥



油镜观察

革兰染色原理

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。

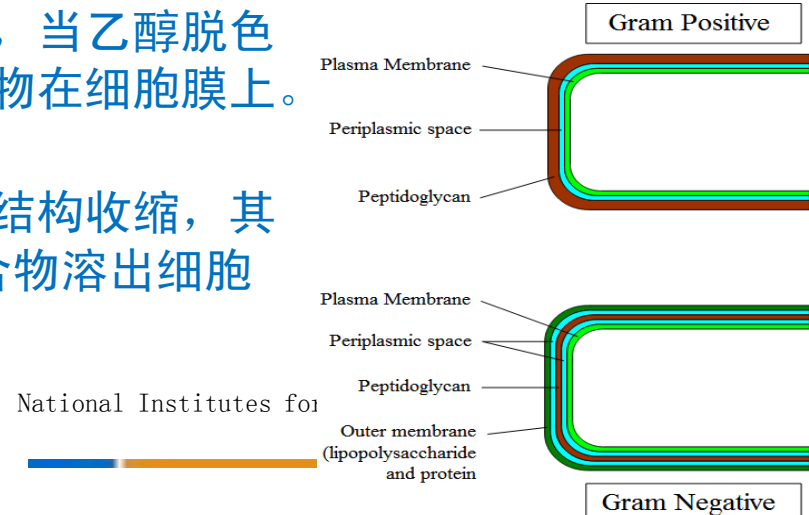
第三步： 酒精脱色，细胞壁成分和构造不同，出现不同的反应。

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。

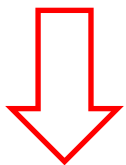
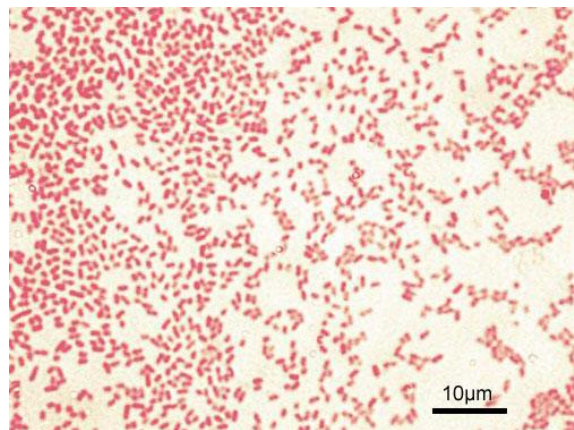
	Microscopic Appearance of Cell		Chemical Reaction in Cell Wall	
Step	Gram (+)	Gram (-)	Gram (+)	Gram (-)
1. Crystal violet				
			Both cell walls affix the dye	
2. Gram's iodine				
			Dye crystals trapped in wall of gm (+) cell	
3. Alcohol				
			Crystals remain in gm (+) cell wall; gm (-) cell wall is partially dissolved, loses the dye	
4. Safranin (red dye)				
			Red dye stains the colorless gm (-) cell; does not affect gm (+)	

G⁺ 菌 细胞壁厚，肽聚糖网状分子形成一种透性障，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。

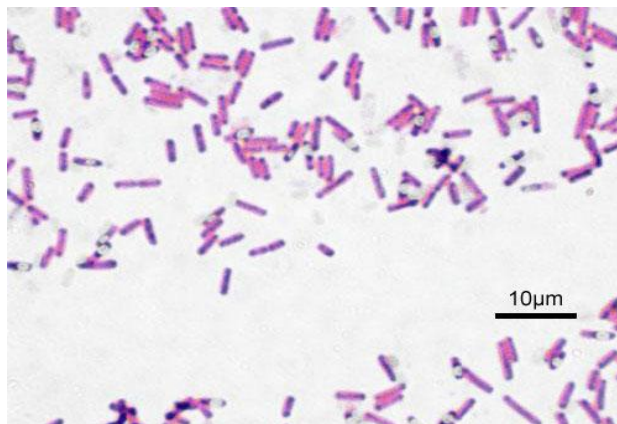
G⁻ 菌 肽聚糖层薄，交联松散，乙醇脱色不能使其结构收缩，其脂含量高，乙醇将脂溶解，缝隙加大，结晶紫-碘复合物溶出细胞壁，番红复染后呈红色。



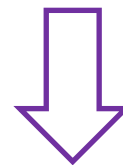
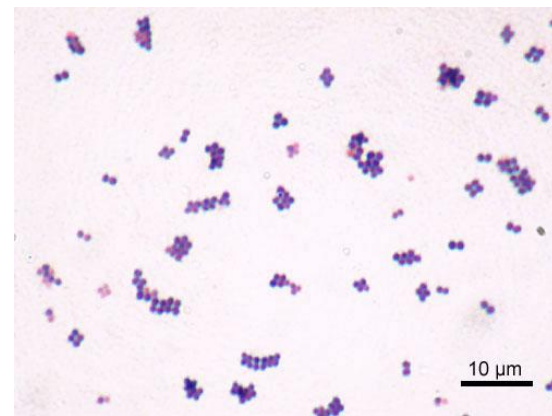
实验室常用细菌革兰染色结果



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*)

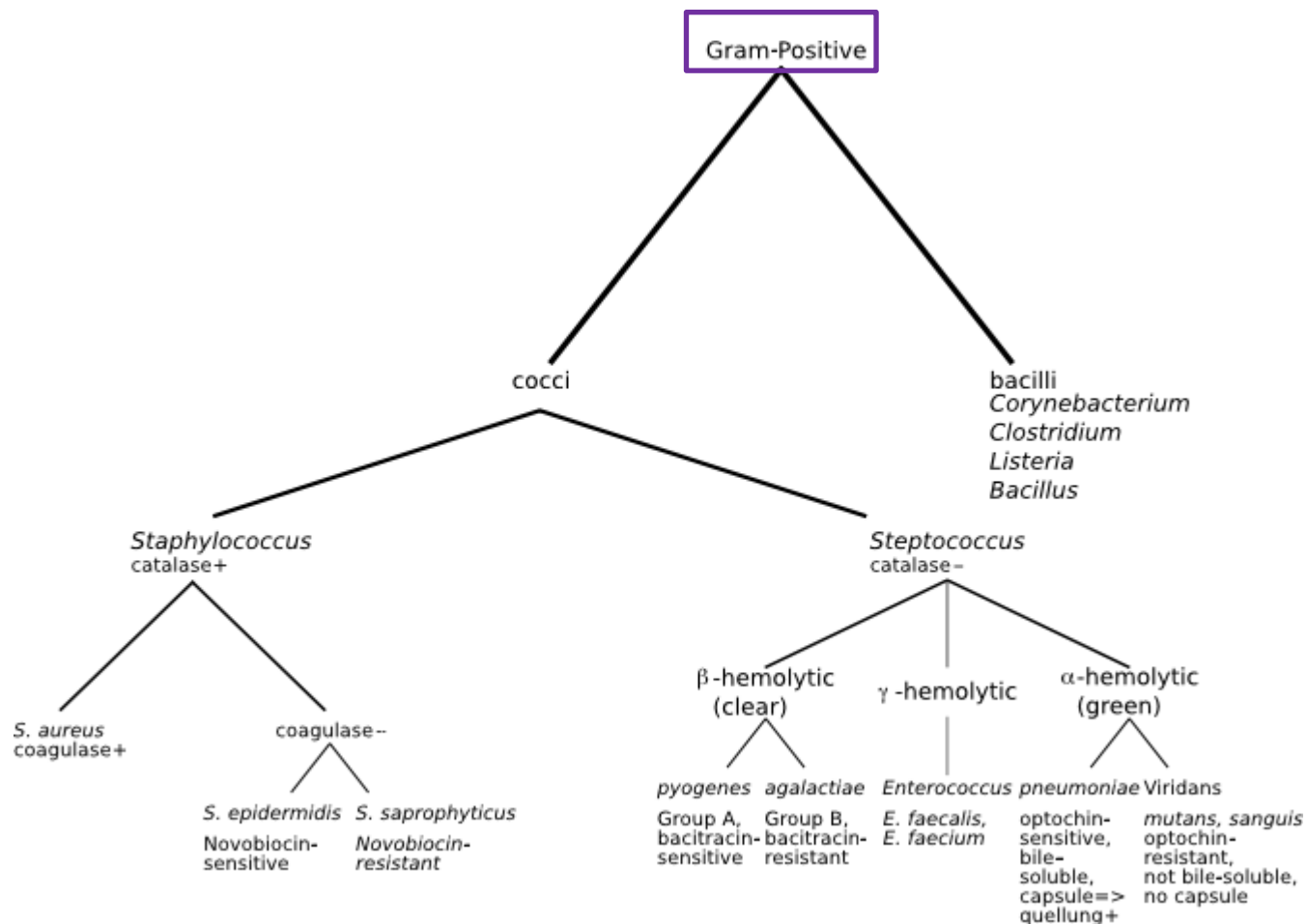
KOH拉丝试验

- 原理：革兰阴性细菌的细胞壁在稀碱溶液中易于破裂，释放出未断裂的DNA螺旋，使氢氧化钾菌悬液呈现粘性，可用接种环搅拌后拉出粘丝来，而革兰阳性细菌在稀碱溶液中没有上述变化。
- 方法：取1滴40g/L氢氧化钾水溶液（应新鲜配制）于洁净玻片上，取新鲜菌落少许，与氢氧化钾水溶液搅拌混匀，并每隔几秒钟上提接种环，观察能否拉出粘丝。
- 用接种环拉出粘丝者为阳性，仍为混悬液者为阴性。

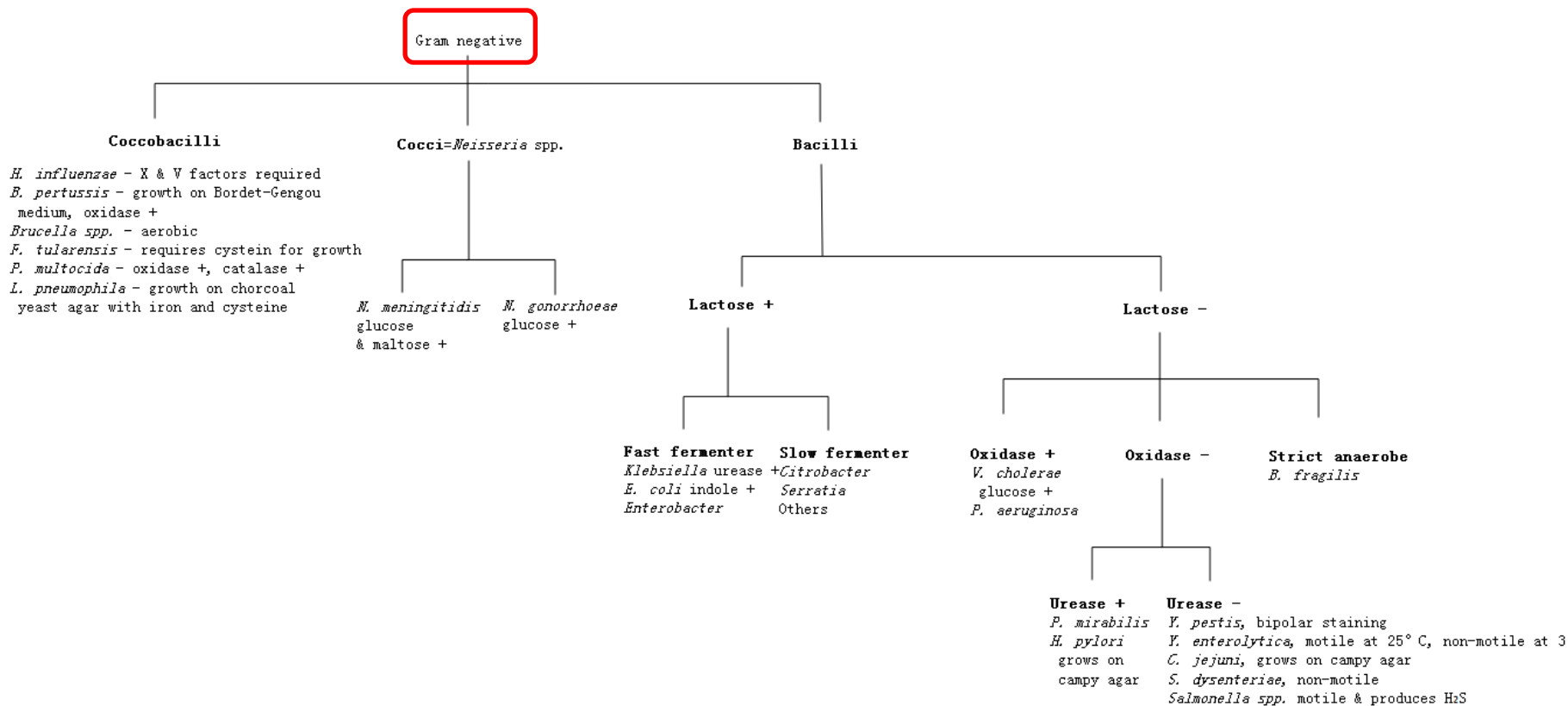


主要用于革兰阴性菌与易脱色的革兰阳性菌的鉴别。大多数革兰阴性菌于5~10s内出现阳性反应，有的则需30~45s，假单胞菌、无色杆菌、黄杆菌、产碱杆菌、莫拉菌等大多数在10s内呈阳性，不动杆菌、莫拉菌反应较慢，大多数菌株在60s内出现阳性，而革兰阳性菌在60s以后仍为阴性。

革兰阳性、阴性菌各自下分



革兰阳性、阴性菌各自下分



细菌鉴定技术

表型鉴定

- 营养物质代谢试验
- 碳源和氮源利用试验
- 各种酶类试验
- API试验条
- 各种自动鉴定系统

表观生物学活性

基因型鉴定

- 16SrRNA分型
- 核糖体分型
- 脉冲场电泳

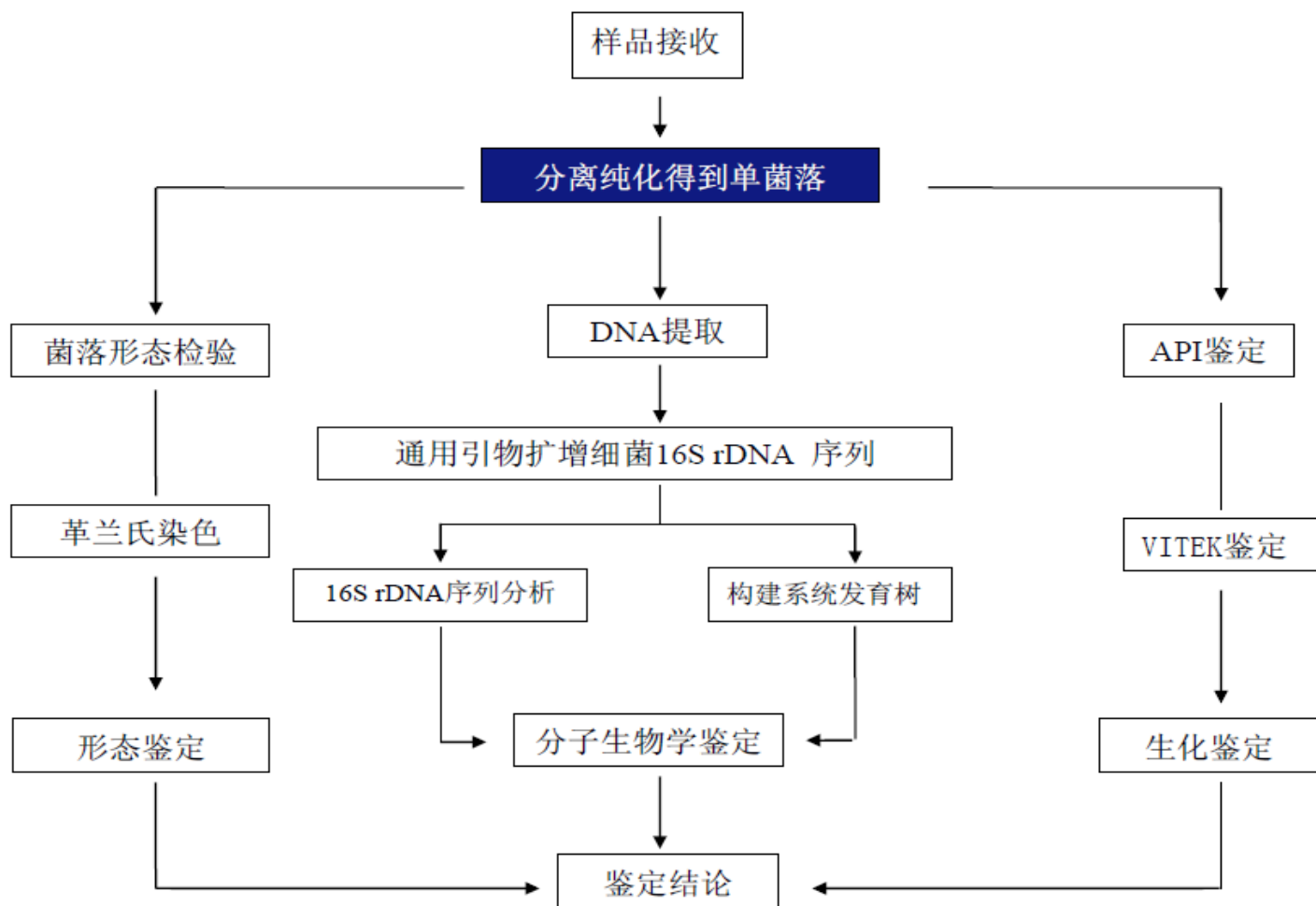
核酸物质

色谱光谱

- 傅里叶变换红外技术

全细胞信息

细菌的鉴定流程



表型鉴定与基因型鉴定

- 需要大量纯的单克隆培养物细胞
- 微生物计数培养中，细胞的恢复及鉴定受到培养时间的局限，甚至有些环境中的微生物并不能用常规微生物生长培养基恢复
- 从初始培养物中刚分离出的，受损的次代培养物可能不能进行完整的基因表达
- 基因型和表型的差异相对比较少见，且基因型的明显差异说明其并非同种或同属
- 理论上，基因型微生物鉴定更可靠（微生物核酸序列高度保守）

基因型鉴定的局限性

- 鉴定系统同样不能鉴定所有的微生物
- 需要昂贵的分析及耗材
- 通常仅有关键的微生物调查才会应用
- 仅凭基因型数据作出的决定，对于考虑微生物特征，测试历史及微生物来源，是没有意义的
- 当今伯杰氏手册中的分类学手段基于遗传物质并非遵循表观水平，导致一些已知的微生物分类学发生改变及重命名。（黑曲霉ATCC16404）

药品微生物实验室微生物鉴定宗旨

- 通过整合，使用多层面的信息，如微生物特征确定，表型及基因型数据，及微生物来源，将多相分类学的概念应用于微生物鉴定
- 建立内部数据库，忠实记录鉴定结论
- 无论哪种方式，在确认过程中，应根据供应商或药典的建议，使用适当的质控菌株

结果判断示例



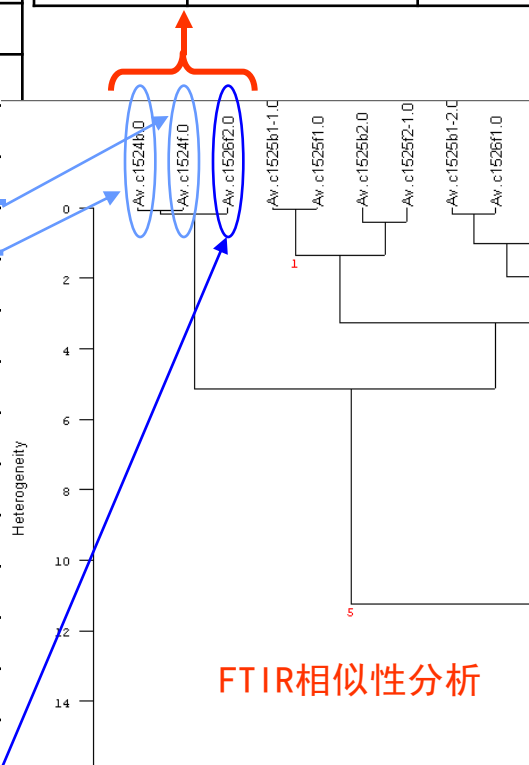
利巴韦林注射液

双黄连注射液

DuPont RiboPrinter 基因指纹分析

Label	DuPont ID Label	Similarity to DuPont ID DUP-14710	RiboPrint™ Pattern
C1525-B1-1	Staphylococcus warneri	0.36	
C1524-F	Staphylococcus haemolyticus	0.88	
C1525-B1-2	Staphylococcus epidermidis	0.20	
C1525-F2-1	Staphylococcus warneri	0.30	
C1525-F2-2	Staphylococcus epidermidis	0.45	
C1526-B1	Staphylococcus epidermidis	0.28	
C1526-B2	Staphylococcus epidermidis	0.26	
C1526-F2	Staphylococcus haemolyticus	0.90	
C1524-B	Staphylococcus haemolyticus	0.89	

菌株	16sRNA鉴定	可信度
C1524-F	<u>S. haemolyticus</u>	<u>99%</u>
C1524-B	<u>S. haemolyticus</u>	<u>98%</u>
C1526-F2	<u>S. haemolyticus</u>	<u>100%</u>



FTIR相似性分析

es for Food and Drug Control



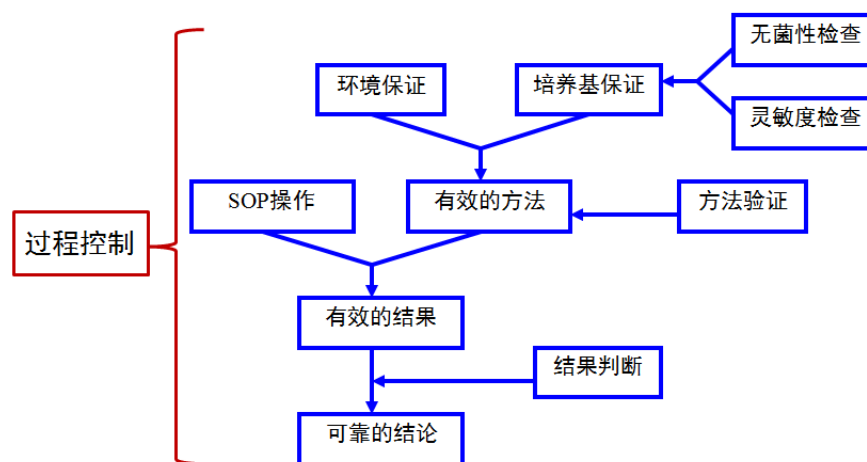
总结

- 药品微生物检查的过程控制

环境保障

培养基保障

操作保障



- 针对微生物结果的溯源性调查

过程微生物信息的全面性

微生物鉴定结果的准确性

That's All!
Thanks For Your Attention!

Question

wsws@nifdc.org.cn

