

编写说明

近年来,随着医药食品科技业的进步和发展,我国医药业借鉴国外药品生产质量管理规范(简称 GMP)的成功经验,开展了 GMP 认证工作,取得了很大的成果。到 2004 年 7 月 1 日止,共有近 7 成的医药企业取得了 GMP 认证,从而使我国的药品生产走上了规范化管理。GMP 认证工作的开展,推动了验证技术的发展。众所周知,GMP 的管理使人们从传统的成品检验把关,上升到验证及对生产全过程进行有效监控的现代质量管理,它是管理加验证。因此验证技术,构成现代质量控制与管理的中心。而微生物检测作为一种有别于数理检验的特殊检测技术与方法,涉及面广,影响因素多,更需要有验证技术与方法作依据来证明(或说明)其所进行的微生物检测或检验的可靠性、准确性与可行性。鉴于目前国内此项验证技术的工具书和参考书缺乏,尤其是能指导生产一线上操作者使用的指导书、实用书更少,我们参照《现代医药工业微生物实验室质量管理与验证技术》与《药品生物检定技术》等书的有关内容,重点围绕实验室微生物检测内容,突出配合《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)(2005 年版)所要求开展的药品无菌检查、微生物限度检查验证工作,并配合各高等和中等职业技术学院开设的选修课组织有关专家编写了该书。希望本书的出版发行,能对微生物检测工作者起到一定帮助作用,并为推动医药、食品、化妆品等行业开展验证技术工作发挥积极应有的作用。

本书突出了微生物检测在医药、食品、化妆品等行业上所涉及有关内容验证的项目与内容,如微生物检测用仪器、设备、消毒剂、培养基、灭菌法、无菌检查、微生物(细菌、霉菌及酵母菌)计数检查、抗生素效价的微生物检定、细菌内毒素检查、控制(致病)菌的检查等所要求进行的验证(包括方法、方案和具体的实操方法)。作者本着注重实用性与可操作性的原则进行编写,并紧密结合了最新《中国药典》(2005 年版)的要求,融合了编者多年的实操经验与做法。特别是为配合实验室开展微生物检测实验数理的统计工作,作者结合多年利用 Office 办公软件 Excel 电子表格的经验,编写了紧密结合微生物检测的有关统计软件程序,为读者自行建立统计模式提供参考,因而具有较强的实用性、可操作性和指导性。

全书由汪穗福(广州市医药中专学校高级讲师)和张新妹(中国药品生物检定所副研究员)担任主编和副主编,蔡芷荷(广东省环凯微生物科技有限公司副研究员)、邓金花(广东省微生物研究所工程师)、刘国斌与何慧贞(广州市医药中专学校讲师)、赵军和洪其明(上海市医药学校高级讲师、讲师)参编。具体的编写分工是:汪穗福第一章、第二章和第三章;邓金花第四章;蔡芷荷第五章;何慧贞第六章;张新妹第七章;刘国斌第八章;赵军和洪其明第九章;最后由汪穗福、张新妹统稿。由于编者水平有限,可能有不足之处,敬请读者指出。在此也对编写时参考使用到的有关参考书籍和文献的著(作)者表示致谢。

目 录

第一章 绪论	(1)
一、验证的概念与内涵.....	(2)
二、验证的类型.....	(2)
三、药品微生物检测验证的特点与影响因素.....	(3)
(一) 微生物学检测对象的特点.....	(4)
(二) 微生物学检测的特点.....	(4)
(三) 微生物学检测的影响因素.....	(5)
四、药品微生物检测验证技术的内容.....	(5)
第二章 微生物检测实验室的设施与设备验证	(7)
一、实验室设施与验证.....	(7)
(一) 洁净室(无菌室)	(8)
(二) 毒菌种处理和微生物鉴别局部 100 级控制室.....	(11)
(三) 抗生素微生物检定、细菌内毒素检查、抑菌实验的半无菌室.....	(12)
(四) 其他室(培养室, 试液及培养基的配制室或灭菌室, 器皿洗涤、烘干室, 实验室, 办公休息室)	(12)
二、实验室设备与验证.....	(12)
(一) 仪器设备的管理原则.....	(13)
(二) 实验室设备的质量保证和管理要求.....	(14)
(三) 超净工作台的监控规程与使用指南.....	(22)
三、实验室操作所用玻璃器具(容器)的校正(验证)	(23)
(一) 容量瓶容积的校正.....	(23)
(二) 移液管(刻度管)容积的校正.....	(24)
(三) 滴定管容积的校正	(24)
(四) 校正容量仪器时的注意事项	(25)
(五) 常见容量仪器的容量允差.....	(26)
(六) 微量加样器的校验.....	(26)
第三章 微生物检测用标准物质的使用及管理	(28)
一、概述	(28)
(一) 标准品或对照品的来源.....	(28)
(二) 标准品或对照品的保管.....	(29)
(三) 标准品或对照品的存储和领用.....	(29)

(四) 标准品或对照品的销毁及使用记录·····	(29)
(五) 定期对标准品或对照品进行抽样检查·····	(29)
(六) 特殊的标准品——菌种·····	(29)
二、抗生素标准品·····	(29)
(一) 使用与保存·····	(29)
(二) 效价复核·····	(30)
(三) 效价复核数据的统计学分析实例·····	(32)
(四) 效价复核数据的计算机统计处理·····	(35)
三、微生物菌种的使用、保存与管理、验证·····	(36)
(一) 制定菌种使用、保藏管理程序·····	(36)
(二) 严格控制菌种的传代、做好保藏工作·····	(37)
(三) 常用菌种保藏方法·····	(38)
(四) 菌种保藏标签的规范与要求·····	(40)
(五) 严格菌种的质量控制, 确保菌种的质量·····	(40)
(六) 菌种处理的注意事项与有关记录·····	(41)
四、细菌内毒素标准品与鲎试剂·····	(43)
(一) 细菌内毒素国家标准品和工作标准品·····	(43)
(二) 细菌内毒素验证品·····	(44)
(三) 凝胶鲎试剂灵敏度复核·····	(46)
(四) 光度法标准曲线的可靠性试验·····	(49)
第四章 消毒剂的使用及效力验证·····	(51)
一、消毒剂与灭菌剂的划分·····	(51)
(一) 卫生处理与卫生洗涤剂·····	(51)
(二) 消毒与消毒剂·····	(51)
(三) 灭菌与灭菌剂·····	(52)
二、微生物对消毒因子的敏感性·····	(52)
三、消毒剂的效力等级与消毒效力评价·····	(52)
四、影响消毒剂效力的主要因素·····	(53)
(一) pH·····	(53)
(二) 温度·····	(53)
(三) 有机物·····	(53)
(四) 表面活性剂和金属离子·····	(53)
(五) 水·····	(53)
五、消毒剂的作用方式·····	(54)
(一) 使蛋白质变性、凝固·····	(54)
(二) 破坏或损伤细胞膜·····	(54)
(三) 阻断食物摄取和废物排泄·····	(54)

(四) 钝化关键酶的活性·····	(54)
六、细菌对消毒剂的耐受性·····	(55)
(一) 具耐受性的细菌和不能完全致死的消毒剂剂量·····	(55)
(二) 分泌多聚糖样物质黏附细菌, 共同形成生物膜·····	(55)
(三) 清洁剂之间的交互作用钝化消毒剂效力·····	(55)
七、消毒剂的选择和交替使用·····	(56)
八、制药工业常用的消毒剂·····	(56)
(一) 醇类·····	(56)
(二) 酚类化合物·····	(57)
(三) 季铵盐类化合物·····	(57)
(四) 液体灭菌剂和杀芽孢剂·····	(57)
九、消毒剂的效力确认·····	(59)
(一) 确认时需要考虑的因素·····	(60)
(二) 现场考察·····	(60)
(三) 实验室考察·····	(60)
(四) 定量悬浮试验·····	(61)
(五) 载体浸泡定量试验·····	(63)
十、消毒剂稀释液的效期确认·····	(63)
十一、培训和安全教育·····	(64)
十二、消毒剂消毒效果验证实验(定量悬浮试验)实例·····	(64)
(一) 验证原理·····	(64)
(二) 验证材料·····	(64)
(三) 验证方法(定量悬浮试验)·····	(65)
第五章 培养基、缓冲液、稀释剂、淋洗液和试剂的验证 ·····	(67)
一、培养基的概念与分类·····	(67)
二、培养基的制备、融化程序的确认及注意事项·····	(67)
(一) 培养基的制备·····	(67)
(二) 培养基融化程序的确认·····	(68)
(三) 培养基制备应注意事项·····	(69)
三、培养基的储存·····	(70)
四、培养基的质量控制·····	(71)
(一) 外观检查·····	(71)
(二) pH 检查·····	(72)
(三) 培养基的无菌性检查·····	(72)
(四) 培养基的灵敏度检查(促菌生长性)·····	(72)
五、染色液与各种生化反应试液的验证·····	(79)
六、缓冲液、稀释液与淋洗液·····	(81)

(一) 无菌检查用稀释液、淋洗液及其制备方法·····	(81)
(二) 微生物限度检查用稀释剂及其制备方法·····	(82)
七、文件管理与标签·····	(82)
八、有效期的确认·····	(83)
九、培养基灵敏度的验证试验实例·····	(84)
(一) 无菌检查培养基灵敏度的验证试验实例·····	(84)
(二) 微生物限度检查培养基灵敏度的验证试验实例·····	(85)
附一 无菌检查用培养基及其制备方法·····	(88)
附二 微生物限度检测用培养基及其制备方法·····	(89)
附三 微生物限度检测用试药、试液与指示液·····	(92)
附四 抗生素效价测定用培养基及灭菌缓冲液的制备方法·····	(94)
附五 微生物检测用生化试验培养基及试剂的制备方法·····	(96)
附六 微生物检测用试液、指示液、染色液的配制及染色法·····	(99)
第六章 灭菌法 ·····	(101)
一、灭菌方法·····	(101)
(一) 湿热灭菌法·····	(102)
(二) 干热灭菌法·····	(103)
(三) 辐射灭菌法·····	(103)
(四) 气体灭菌法·····	(104)
(五) 过滤除菌法·····	(104)
(六) 无菌生产工艺·····	(105)
二、生物指示剂·····	(105)
(一) 制备生物指示剂用微生物的基本要求·····	(106)
(二) 生物指示剂的制备·····	(106)
(三) 生物指示剂的应用·····	(106)
(四) 常用生物指示剂·····	(106)
三、湿热灭菌法验证试验实例·····	(107)
(一) 产芽孢梭菌芽孢 - 生物指示剂验证乳剂类产品的灭菌工艺实例·····	(107)
(二) 生物指示剂验证实例·····	(109)
(三) 常用消毒灭菌效果评价实验操作实例·····	(109)
第七章 药品微生物检验方法的验证 ·····	(111)
一、确保药品微生物检测方法验证准确性的关键因素·····	(112)
(一) 验证实验用微生物的种类及其生理特性·····	(112)
(二) 验证用微生物接种液的制备·····	(112)
(三) 验证试验条件·····	(113)

二、验证试验的原理与方法	(116)
(一) 验证的原理	(116)
(二) 验证的合格标准	(116)
(三) 药品无菌检查方法的验证	(117)
(四) 药品细菌、霉菌及酵母菌计数检查方法的验证	(118)
(五) 药检控制菌检查法的验证	(119)
(六) 药检中各控制菌检测的注意事项	(120)
三、验证实验结果的评价与报告	(122)
四、验证实验实例	(123)
实例(一) 氟喹诺酮类药物的无菌检查方法验证	(123)
实例(二) $\times \times$ 注射液的无菌检查(薄膜过滤法)方法的验证方案示例	(126)
实例(三) 微生物限度检查方法(平皿菌落计数法)的验证方案示例	(129)
实例(四) 大肠埃希菌检查方法的验证方案示例	(132)
第八章 微生物检测数据的趋势分析和统计处理	(134)
一、检测数据的趋势分析	(134)
(一) 检测数据趋势分析的目的	(134)
(二) 微生物检测进行趋势分析的常规项目	(134)
(三) 趋势分析的意义	(134)
二、微生物检测数据的统计处理	(135)
(一) 统计学常用的变异指标数值	(136)
(二) 正态(常态)分布(曲线)	(137)
(三) t 检验与 t 分布	(139)
(四) F 检验(方差分析)	(141)
(五) χ^2 (读作卡方) 分析	(142)
三、制备趋势分析图进行分析	(144)
四、微生物检测数据的统计处理	(146)
(一) 特异反应检测值的剔除	(146)
(二) t 检验实例	(148)
(三) F 检验实例	(149)
(四) χ^2 检验实例	(152)
(五) 试验结果的合并计算	(153)
五、统计例题的微机运算	(157)
(一) 配对试验 t 检验微机运算	(158)
(二) 多因素 F 检验微机运算	(159)
(三) 配对试验 χ^2 (卡方) 检验	(162)
(四) 量反应平行线测定随机区组设计(3, 3)法的微机运算	(163)
(五) 常规检定中的合并计算微机运算	(168)

六、微生物检测数据分析应注意的问题·····	(172)
第九章 有关微生物检测 (查) 的操作方法	(173)
一、抗生素微生物检定·····	(173)
(一) 管碟法·····	(173)
(二) 浊度法·····	(176)
二、细菌内毒素检查·····	(179)
(一) 凝胶法操作·····	(180)
(二) 凝胶半定量试验·····	(183)
(三) 光度测定法操作·····	(183)
三、无菌检查·····	(186)
(一) 薄膜过滤法·····	(188)
(二) 直接接种法·····	(189)
(三) 无菌检查结果判断·····	(190)
四、微生物限度检查·····	(191)
(一) 供试液的制备·····	(191)
(二) 细菌、霉菌及酵母菌计数·····	(192)
(三) 控制菌检查·····	(193)
(四) 微生物限度检查结果判断·····	(199)
附(一) 《中国药典》(2005 年版)(一部) 微生物限度标准	(200)
附(二) 《中国药典》(2005 年版)(二部) 微生物限度标准	(201)
五、鲜乳中抗生素残留量检验·····	(202)
参考文献	(203)

第一章 绪 论

微生物检测（如药品的无菌检查，药品、食品、化妆品的微生物限度检查以及其他有关卫生学的检查等）是保证生产厂家产品质量安全的一项重要检查项目。由于微生物自身具有的特性，使得它的检查与常规理化检查有着与众不同的特点，为了保证产品检查的真实性与重现性，近年来，随着药厂 GMP 认证的开展，药品的生产管理，由传统的产品质量控制从出厂前检验，发展到“通过验证确立控制生产过程的运行标准，通过对已验证状态的监控，控制整个工艺过程，确保质量”的验证质量体系。众所周知，一个实验室在建立一个新方法或第一次使用一个新方法时，都要对该方法的适用性和可靠性进行测定，这就是验证。大量的实践证明，验证技术使药厂 GMP 的实施水平跃上一个新的台阶。同时验证技术（方法）也逐步深入到药典的各种检测方法中，虽然现在 GMP 认证在药厂以外行业尚没有全面推行实施，但验证技术（方法）的思想与体系同样适用于其他行业，它对保证质量起着重要作用。本书就验证技术在微生物检测中的原理、方法、应用所涉及的知识与技术等将做进一步的叙述。

我国的《药品生产质量管理规范》（1998 年修订）在第七章验证中规定：“第五十七条：药品生产验证应包括厂房、设施及设备安装确认、运行确认、性能确认和产品验证。第五十八条：产品的生产工艺及关键设施、设备应按验证方案进行验证。当影响产品质量的主要因素，如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等发生改变时，以及生产一定周期后，应进行再验证。第五十九条：应根据验证对象提出验证项目、制定验证方案，并组织实施。验证工作完成后应写出验证报告，由验证工作负责人审核、批准。第六十条：验证过程中的数据和分析内容应以文件形式归档保存。验证文件应包括验证方案、验证报告、评价和建议、批准人等”。

此外，《中国药典》从 2000 年版和 2005 年版就开始收载《药品质量标准分析方法验证指导原则》。在《药品质量标准分析方法验证指导原则》中明确指出：“药品质量标准分析方法验证的目的是证明采用的方法适合于相应检测要求，在建立药品质量标准时，分析方法需经验证；在药品生产工艺变更、制剂的组分变更、原分析方法进行修订时，则质量标准分析方法也需进行验证。方法验证理由、过程和结果均应记载在药品标准起草说明或修订说明中。

需验证的药品质量标准分析项目有：鉴别试验，杂质定量检查或限度检查，原料药或制剂中有限成分含量测定，以及制剂中的其他成分（如防腐剂等）的测定。药品溶出度、释放度等功能检查中，其溶出量等的测试方法也需做必要验证。

验证内容有：准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。”

以上这些法规从不同方面对检验方法做了规定，它们是我们实施检验方法验证的重要依据，也是实施办法的准则，因此必须坚决执行。

一、验证的概念与内涵

WHO 的 GMP 中,对验证的定义为:“能证明任何程序、工艺、设备、物料、活动、或系统确实能导致预期结果的文件证明的行为”。而验证一词在美国 FDA 官员编写的《药品生产验证》中,他们认为验证与确认这两个词是同义词。“确认”这个词往往用于有技术规格及运行参数的设备或系统。当设备或系统获得产品或接近最终结果降级时,才使用“验证”这个词。我国的《药品生产质量管理规范》(1998 年修订)在第十四章第八十五条中将它界定为:“证明任何程序、生产过程、设备、物料、活动或系统确实能导致预期结果的有文件证明的一系列活动”。可见,验证是药品生产及质量管理中的一个全方位的质量活动,它是实施 GMP 的基础,可用图 1-1 来简述各项验证及它们的相关性。

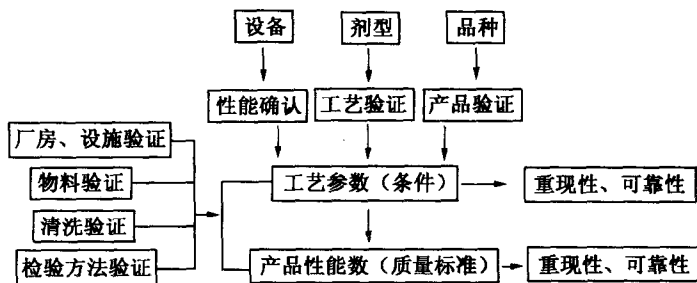


图 1-1 各项验证的相关性

二、验证的类型

一般根据产品和工艺、方法的要求以及设备变更、工艺修订等特点可以把验证分为 4 种类型。

(1) 前瞻性验证 就是在方法正式投入使用前按照预定的方案进行研究,并收集实验数据,以证实检定方法是否达到预期要求的行为。该验证方法是一种常用的最好验证方法,一般用于产品要求高,没(或缺)历史资料,靠生产控制及成品检查不足以确保重现性及产品质量的生产工艺或过程,如无菌产品生产中所采用的灭菌工艺(蒸汽灭菌、干热灭菌、无菌过滤)等都必须通过验证——以物理试验及生物指示剂试验来验证。

(2) 同步验证 就是已经在生产中实施的某项工艺运行中同时进行的验证。这种情况下验证数据的收集来源于工艺的实际运行过程中,一般要通过几次运转才能获得足够的数据来证明工艺的可靠性。采用这种验证方式的先决条件是:①有完善取样计划,即生产及工艺条件的监控比较充分;②有经过验证的检定方法,方法的灵敏性、特异性及选择性比较好;③对所验证的产品或工艺已经有相当的经验及把握。

(3) 回顾性验证 如果某一产品已经生产了很长一段时间,但没有按照前瞻性验证的要求进行过验证,而又不能进行同步验证(如储备的原液可以使用几年或设备正用于其他的用途),此时可以采用回顾性验证。通过对产品、生产步骤和检验步骤进行检测和分析,以证明生产步骤和生产工艺的一致性和完整性。对于检定方法,如果有足够的数据或有充

分的历史数据可以利用时,也可以采用这种回顾性验证的方式进行验证。同前瞻性验证的几批或一个短时间运行获得的数据相比,回顾性验证所依托的积累的资料比较丰富,从对大量历史数据的回顾分析中可以看出工艺控制状况的全貌,因而其可靠性也更好。它通常必须具备有 20 个连续批次的数据;检验方法经过研制,并且检验的结果可以用数值表示,可用于统计分析;批记录符合 GMP 的要求,有明确的工艺条件;有关的工艺变量必须是标准化的,并一直处于控制状态,如原料标准、生产工艺的洁净级别、分析方法、微生物控制等。

同步验证、回顾性验证通常用于非无菌工艺的验证,一定条件下二者可以结合使用。

(4) 再验证 系指一项生产工艺、一个系统或设备或者一种原材料经过验证并在使用一个阶段以后,旨在证实其“验证状态”没有发生漂移而进行的验证。

当影响产品质量的主要因素,如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等发生改变时,以及生产一定周期后,应进行再验证。它是旨在证实已验证状态没有发生漂移,表明该工艺仍能达到预定的要求。

一旦一个系统或一个工艺得到了验证,在操作过程未发生改变时,则认为达到了原定的要求。当发生改变、或出现错误、或更换设备或设备位置发生改变时,则需要再进行再验证。

根据再验证的原因,可分为 3 种类型:①药监部门或法规要求的强制性再验证;②发生变更时的“改变”性再验证;③每隔一段时间进行的“定期”再验证。

三、药品微生物检测验证的特点与影响因素

在化学测试中,药品含量测定方法需要验证,与此相应,微生物检测方法也需要验证,尽管药品的微生物学检测方法在各国药典中均有规定。但是,不同的检品、不同的仪器或材料及实验环境条件均可能对检验结果产生影响。例如,当检测药品具有抑菌性时,它们会掩盖无菌药品已受污染的事实或造成低于实际污染水平的菌检结果;选用不适当的培养基,其促菌生长能力不符合要求,也会造成类似的后果。另外,为了保证药品使用的安全性,有些药品加了一定的防腐剂,当对防腐剂的防腐性能进行验证试验时,微生物的种类、生长的状态、介质的 pH 等因素又对验证的结果产生影响,此外微生物学检测除具有一般的理化检查的特点与要求外,还有自身特点与要求,为了使微生物学检验方法的结果准确可靠,需要对每个品种的具体检验方法进行验证,本书重点讨论的微生物检验方法验证的内容包括:微生物检测实验室的设施与设备验证,菌种的使用保存与管理验证,消毒剂的使用及效力验证,培养基、缓冲液和试剂验证及有效期的确认与验证,灭菌方法的验证,药品微生物学检验方法学验证,微生物检测数据的趋势分析和统计处理等知识。同化学检验方法验证的原理相似,将药品的微生物学检验方法具体应用于某一品种时,需进行方法验证,摸清微生物学检验方法适用的条件,即通过试验,寻找并确定合适的稀释材料、条件和方法。在这一工作的基础上,通过验证试验,最终确认检验方法,批准成为正式检验方法。

（一）微生物学检测对象的特点

微生物学检验除具有一般的理化检查的特点与要求外，如准确度、精密度（包括重复性、中间精密度和重现性）、专属性、检测限、定量限、线性、范围和耐用性。还有自身特点与要求，造成药品微生物限度检验中的困难。除微生物制剂外，药品微生物限度检查与药品中有效成分的含量测定显著不同，其检查对象具有以下特点：

（1）活体易变性 菌体细胞在药品中处于不稳定状态，随存放时间延长死亡，也可在适宜条件下增殖。一批液体制剂若不含防腐剂，它可能是出厂时合格，保存时不合格，最终又可能“合格”。当保存条件稳定时，其污染量在一定时间内处于动态平衡，总体污染状况可以标准化的条件予以正确评估。

（2）分布不均匀性 除产品在生产前期污染外，通常是局部的。一批产品中不同瓶（盒）中污染状态会出现差异，其污染特别是致病菌通常是少量的。正确的检验有赖于合理的抽样方法。

（3）多数处于受损坏状态 药品中微生物，受到原料处理、加工等过程的影响，或者药品本身对微生物的抑杀作用，使其受到一定程度的损坏，这些受到损坏的微生物用一般的方法检查，往往会出现假阴性或计数偏低的结果。

（4）生态环境多样复杂 污染菌的来源多样，种类多样，加之药品种类繁多、剂型成分复杂，同一种菌在不同的药剂中所测定的结果各不相同。

（二）微生物学检测的特点

以上检查对象的这些特点就造成药品微生物学检验具有以下特点：检查对象的未知性、不确定性、不均匀性、特殊性、影响因素的多样性。

（1）检验对象的未知性 药品的无菌检查与微生物限度检查（控制菌检测）因和大多数理化检测不同，它们往往都是未知的，不知是否有菌或含有检测菌，全凭检测结果判断，难度大。

（2）检查对象的不确定性 药品受外来微生物的污染，这种污染是可无可有；在有中又可多可少；其种类可以多样。污染的情况依生产、设备、原材料、管理、剂型等条件而定，非药品本身所固有，所以微生物限度检验的对象是不确定的。药品所规定的项目，除了无菌检查和热原检查具有上述性质外，其他检查项目均无此特征。这一点往往被忽视。污染对药品而言是一个意外事件。污染批号中的不合格品是一个随机变量。

（3）检查分布的不均匀性 不均匀性是不确定性的另一种表现形式，在一个批号内产品有的被污染，有的不被污染，分布不匀；在被污染的部分中有的数量极多，有的较少，种类上可以复杂或较单一。这种不均匀性源于污染源的复杂性，原辅料污染、工艺污染、空间污染和操作人员污染等，构成污染量的多少差异，形成不均匀性。再者微生物具簇团性，簇团大小、紧密程度是可遗传的，簇团的分散性差异极大，该特点无疑强化了不均匀性。

（4）特殊性 由于以上的特点造成了它与一般的理化检查不同的特殊性，如出分析结果慢、检查操作步骤繁杂等。

(5) 影响因素的多样性 见后(二)微生物学检测的影响因素所述。

因此,微生物限度检查必须遵循以下原则:①样品正式检验前必须保持原污染状态。防止第二次污染和防止污染微生物的繁殖或死亡;②应有适当的供试液制备方法。供试液的正确制备是保证检验结果准确可靠的前提;③检验方法准确可靠;④检验结果判断无误。

做好微生物限度检验,检验人员的职业道德和业务素质至关重要。建立科学的质量保证体系,是获取检验结果正确可靠的基本保证。

(三) 微生物学检测的影响因素

在药品微生物学检验中,不管是微生物限度检查、无菌检查还是药品防腐剂的抑菌效力测定、灭菌法、消毒剂的使用及效力验证、检测结果受多种因素影响,其中菌种制备、培养基、灭菌方法、抑菌的因素等备受关注。在药检实践中,以下几种因素均可对微生物学检测产生影响:①药品本身的抑菌性或药品中防腐剂的抑菌性;②标准菌种制备与传代、种类及生长状态是否符合规范;③培养基的促菌生长能力;④培养条件(温度、湿度及需氧或厌氧);⑤消毒或灭菌方法;⑥过滤系统(滤器、滤膜性质、材质)性能;⑦检验方法的正确与否。以上种种因素等都会影响微生物的检测结果。

众所周知,培养基成分的不同来源,如不同品种的蛋白胨、牛肉膏、牛肉浸液对细菌的生长影响是有差异的;又如细菌总数测定,其中抽样及误差分析均缺少科学数据要求,增加了测定结果的不稳定因素。在空气洁净度的菌落计数测定中,不同的测定方法其结果差异是很大的。由于微生物检验方法,不少项目是执行国家标准的法定检验,同一个品种同一批号检测的不同结果,可能引起争议,其后果可想而知,同时也会造成与国际接轨的困难。因此微生物培养条件是影响供试品菌检计数准确与否的重要因素。同时应注意影响结果的两个方面:一是培养基本身的性质;二是培养条件。通俗来说,培养基应具备广谱性,即有助于检品中所存活微生物的生长,因此要通过培养基灵敏度验证试验。另外,应注意采用最佳培养条件,以确保微生物充分生长并使计数结果呈良好的重现性。建立合适检验方法的标准化与验证问题,成为一项迫切的任务。

一些无菌药品中,如注射剂或滴眼剂,往往添加抑菌剂,以保证它们在一段时间可安全使用。而抑菌剂的有效性要用微生物验证试验来证实。验证试验用微生物菌种的制备方法,又影响抑菌性产品的检验。因为试验用微生物的生长和制备方式决定着细胞的生理状态,这种状态又直接影响抑菌效力测定的结果。此外,检验方法的正确与否也影响微生物的检测结果。

综上所述,这些因素的存在,大大增加了微生物检测的难度,对此微生物检测工作者要有充分的认识。

四、药品微生物检测验证技术的内容

验证技术是一门涉及方方面面的应用与实用技术,单就微生物检测应用领域而言,其验证主要包括:微生物检测实验室的有关设施与设备验证,检验中的菌种使用、保存与管理的验证,消毒剂的使用及效力的验证,培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液和试剂的

验证,所使用的灭菌方法验证,药品无菌检查和微生物限度检验的方法学验证,以及微生物检测数据的趋势分析和统计处理和有关微生物检测的标准操作规范等内容。本书就以上内容做了进一步的论述与阐明,供读者在生产过程中参考使用。

验证技术虽然不是一门新知识、新技术,仅是近年来在医药工业上强调的一门涉及多门学科的综合知识技术,其起步在医药行业的 GMP 认证中得到全面的应用和使用推广,已被医药界肯定。但验证是能证明任何程序、工艺、设备、物料、活动或系统确实能导致预期结果的文件证明行为。因而其管理与质量监控的精髓无不可同样地适用到其他诸如食品、卫生、化妆品等行业,虽然现在这些行业有些尚没有强制实行或还没有试行 GMP 认证,但实践证明,验证是保证检测方法学准确的重要措施与有效质控手段;而作为各行业的微生物检测,具有更多的相同性与共通性,因此微生物检测工作者要充分认识到它的重要性与相通性。同时我们相信验证技术今后在药厂以外的行业也会被借鉴执行,因为在微生物检测中进行验证技术的贯彻执行,对提高检测质量会起到重要保障作用。

第二章 微生物检测实验室的设施与设备验证

毫无疑问,微生物检测实验室的设施与设备是开展微生物检测的物质基础和保证。因此开展微生物检测实验,离不开实验室设施与设备。但光有实验室设施与设备,而没有对实验室设施与设备的性能进行检测的验证,同样起不到保证作用。微生物检测实验室的设施与设备主要包括有:①保证检测的无菌环境设施与器械——如洁净室(无菌室)、无菌隔离系统、净化工作台等;②保证检测用实验用品与用具的无菌(灭菌)设施或设备——如高压蒸汽灭菌器(或手提高压蒸汽灭菌锅)、电热恒温干燥箱等;③保证检测细菌内毒素反应的器械用具——如各种细菌内毒素反应测定仪;④保证检测中微生物能恒温生长与菌种保存的恒温设备——如恒温培养箱、冰箱;⑤各种实验操作所用仪器——全封闭薄膜过滤装置、电动匀浆仪、电热恒温水浴箱、离心机、天平、显微镜等;⑥实验操作所用的玻璃器具——各种刻度吸管、移液管、容量瓶、试管、三角烧瓶、双碟培养皿等常用玻璃器具;⑦保证测量各类样品中微生物菌落数或抑菌直径的有关测量仪——如空气浮游菌采样器、空气悬浮粒子计数器、zY-300IV多功能微生物自动测量分析仪等。

以上微生物检测实验室的设施与设备如何做好管理与验证,确保质量标准,在总体管理上,要建立实验室的设施与设备明细目录,包括名称、型号、厂商(家)、购置时间、验收、调试或校验、仪器保管负责人、使用操作规范、使用或维修记录、最后到报废等一系列的仪器设备质量保证档案。

一、实验室设施与验证

由中国实验室认可委员会(简称CNACL)1999年制定实验室认可准则(CNACL201-09)中的设施与环境中规定:“设施和环境实验室的设施、工作区域、能源、照明、采暖、通风等应便于校准或检测工作的正常运行。校准或检测所处的环境不应影响校准或检测结果的有效性或对其所要求的测量准确性产生不利的影响,在非固定场所进行校准和检测时尤应注意。适当时,实验室应配备对环境条件进行有效监测、控制和记录的设施。实验室应注意周围因素(例如微生物菌种、灰尘、电磁干扰、湿度、电网电压、湿度、噪声、振动级……),以免影响检测或校准工作质量。相邻区域的活动相互之间有不影响时,应采取有效的隔离措施。进入和使用有影响工作质量的区域应有明确的限制和控制。应有充分的措施保证做好实验室的内务管理。实验室应有符合有关健康和安全的要求”。

国家药品监督管理局2000年9月颁发的《药品检验所实验室质量管理规范(试行)》中第十八条规定:“无菌检查、微生物限度检查与抗生素微生物检定的实验室,应严格分开。无菌检查、微生物限度检查实验室分无菌操作间和缓冲间。无菌操作间应具备相应的空调净化设备和环境,采用局部百级措施时,其环境应符合万级洁净度要

求。进入无菌操作间应有人流净化和物流净化的设备。无菌操作间应根据检验品种的需要,保持对邻室的相对正压或相对负压,并定期检测洁净度。无菌操作间内禁放杂物,并应制定地面、门窗、墙壁、设施等定期清洁、灭菌规程。抗生素微生物检定实验室分为半无菌操作间和缓冲间。半无菌操作间设有紫外线灯,操作台宜稳固,并保持水平。实验室内应光线明亮,并有控制温度、湿度的设备。实验室内应注意防止抗生素的交叉污染”。

《中国药典》(2005年版)无菌检查法规定:“无菌检查应在环境洁净度 10000 级和局部洁净度 100 级的单向流空气区域内或隔离系统中进行,其全过程必须严格遵守无菌操作,防止微生物污染。单向流空气区、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证。隔离系统按相关的要求进行验证,其内部环境的洁净度要符合无菌检查的要求”。

《中国药典》(2005年版)微生物限度检查法规定:“微生物限度检查应在洁净度为 100 级的单向流空气区域内进行,其环境的洁净度 10000 级。检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染。单向流空气区域、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证”。

根据以上的法规规定,为保证、满足微生物检测和进行实验的要求,微生物检测实验室除应具备有以下功能外:①能开展无菌检查,微生物限度检查和无菌采样各自严格分开的无菌室或者隔离系统;②能开展菌种处理与微生物检测鉴别的独立的局部 100 级的无菌洁净室;③能开展抗生素效价的微生物检定或能进行细菌内毒素检查(凝胶法或定量法)、抗菌作用测定的各自分开的半无菌实验室;④能进行微生物生长培养的培养室;⑤可以进行配制试液及培养基的配制室;⑥能进行高压灭菌的灭菌室;⑦实验器皿洗涤、烘干室;⑧人员办公休息室;⑨大型实验室还可设有实验用品、易耗品储藏室;还要对这些设施与设备实施有效的监控与验证,以保证整个微生物检测实验室的布置要符合规范要求,并应有合理的通风设施,按照各房间的使用要求配置适当的空气净化系统,以提高实验室的总体质量。

以下就微生物检测实验室实验设施与设备的要求与如何开展验证分别介绍。

(一) 洁净室(无菌室)

洁净室(无菌室)是微生物检测的重要场所与最基本的设施。它是微生物检测质量保证的重要物质基础。因此它的设计要按国家标准 - 2001《洁净厂房设计规范》、国家药品监督管理局颁发的《药品检验所实验室质量管理规范(试行)》中第十八条规定执行。微生物实验室洁净室的施工、安装、验收应按国家行业标准 JGJ71 - 1990《洁净室的施工及验收规范》执行。对于微生物检测工作者和使用管理者来讲,更大量的工作是进行正常管理到日常的使用。

洁净室(无菌室)的标准要符合 GMP 洁净度标准要求。具体级别标准见表 2-1。

表 2-1 我国 GMP 实施指南提出的级别

空气洁净度 级别	$\geq 0.5\mu\text{m}$ 的微粒数 (个/ m^3)	$\geq 5\mu\text{m}$ 的微粒数 (个/ m^3)	沉降菌 (90mm 皿, 沉降 0.5h) 菌落/皿	浮游菌 (个/ m^3)
100	≤ 3500	0	≤ 1	≤ 5
1 万	≤ 350000	≤ 2000	≤ 3	≤ 100
10 万	≤ 3500000	≤ 20000	≤ 10	≤ 500
30 万	≤ 10500000	≤ 60000	≤ 15	

洁净室（无菌室）的使用管理要做到以下工作：

1. 洁净室（无菌室）要符合规范要求 无菌室应采光良好、避免潮湿、远离厕所及污染区。面积一般不超过 10m^2 ，不小于 5m^2 ；高度不超过 2.4m 。由 1~2 个缓冲间、操作间组成（操作间和缓冲间的门不应直对），操作间和缓冲间之间应具备灭菌功能的样品传递箱。在缓冲间内应有洗手盆、毛巾、无菌衣裤放置架及挂钩、拖鞋等，不应放置培养箱和其他杂物；无菌室内应六面光滑平整，能耐受清洗消毒。墙壁与地面、天花板连接处应呈凹弧形，无缝隙，不留死角。操作间内不应安装下水道。

无菌操作室应具有空气除菌过滤的单向流空气装置，操作区洁净度 100 级或放置同等级别的超净工作台，室内温度控制 $18\sim 26^\circ\text{C}$ ，相对湿度 $45\%\sim 65\%$ 。缓冲间及操作室内均应设置能达到空气消毒效果的紫外灯或其他适宜的消毒装置，空气洁净级别不同的相邻房间之间的静压差应大于 5Pa ，洁净室（区）与室外大气的静压差大于 10Pa 。无菌室内的照明灯应嵌装在天花板内，室内光照应分布均匀，光照度不低于 300lx 。缓冲间和操作间所设置的紫外线杀菌灯 ($2\sim 2.5\text{W}/\text{m}^2$)，应定期检查辐射强度，要求在操作面上达 $40\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。不符合要求的紫外杀菌灯应及时更换。

2. 建立使用登记制度 药厂各个微生物检测检验室都要建立使用登记制度。在登记册中可设置以下项目内容：如使用日期、时间、使用人、设备运行状况、温度、湿度、洁净度状态（沉降菌数、浮游菌数、尘埃粒子数）、报修原因、报修结果、清洁工作（台面、地面、墙面、天花板、传递窗、门把手）、消毒液名称等。

3. 建立使用标准操作规范 (SOP) 并严格管理 SOP 内容至少要有以下几点：

(1) 规定净化系统运转时间要求 每次实验前应开启净化系统运转至少 1h 以上，同时开启净化台和紫外灯。

(2) 物品进入洁净室（无菌室）基本要求 凡进入洁净室（无菌室）的物品必须先在第一缓冲间内对外部表面用消毒剂消毒灭菌，再经物流缓冲间、传递窗 1h 以上，及无菌空气吹干后送入无菌室。注意带纤维、易发尘物品不得带进净化实验室。无菌室内固定物品不得任意搬出。

(3) 人员进入洁净室（无菌室）要求 实验人员进入洁净室（无菌室）不得化妆、带手表、戒指等首饰；不得吃东西、嚼口香糖。应清洁手后进入第一缓冲间更衣，同时换上消毒隔离拖鞋，脱去外衣，用消毒液消毒双手后戴上无菌手套，换上无菌连衣帽（不得让头发、衣等暴露在外面），戴上无菌口罩。然后，换或是再戴上第二副无菌手套，在进入第二缓冲间时换第二双消毒隔离拖鞋。再经风淋室 30 s 风淋后进入无菌室。

(4) 温湿度观察要求 观察温度计、湿度计上显示的温湿度是否在规定的范围内, 并作为实验原始数据记录在案。如发现问题应及时寻找原因, 及时报修和及时报告实验室主管, 并将报修原因和结果记录归档。

(5) 沉降菌落计数与浮游菌测定要求 在每次实验同时, 对操作室和层流台做微生物沉降菌落计数, 将结果记录在使用登记本上, 并作为实验环境原始数据记录在实验报告上。每周 1 次, 或在无菌检查等必要时, 在每次实验同时对操作室和净化台进行浮游菌测定, 将结果记录在使用登记本上, 并作为实验环境原始数据记录在实验报告上。

(6) 消毒要求 无菌室每周和每次操作前用 0.1% 新洁尔灭或 2% 甲酚液或其他适宜消毒液 (常用消毒剂的品种有: 5~20 倍稀释的碘伏水溶液、0.1% 新洁尔灭溶液、1:50 的 84 消毒液、75% 乙醇溶液、3% 碘酒溶液、5% 石炭酸 (来苏儿) 消毒溶液、2% 戊二醛水溶液、尼泊金乙醇消毒液 (处方: 对羟基苯甲酸甲酯 21.5g; 对羟基苯甲酸丙酯 8.6g, 75% 乙醇 10.0ml) 等, 所用的消毒剂品种与使用要进行有效性验证方可使用, 并定期更换消毒剂的品种) 擦拭操作台及可能污染的死角, 方法是用无菌纱布浸渍消毒溶液清洁超净台的整个内表面、顶面、及无菌室、人流、物流、缓冲间的地板、传递窗、门把手。清洁消毒程序应从内向外, 从高洁净区到低洁净区。逐步向外退出洁净区域。然后开启无菌空气过滤器及紫外灯杀菌 1~2h, 以杀灭存留微生物。在每次操作完毕, 同样用上述消毒液擦拭工作台面, 除去室内湿气, 用紫外灯杀菌 30min。

(7) 其他要求 如遇停电, 应立即停止实验, 离开无菌室。关闭所有电闸。重新进入无菌室前至少开启机房运转 1 h 以上。

4. 洁净度检查的要求与方法 无菌室在消毒处理后, 无菌试验前及操作过程中需检查空气中菌落数, 以此来判断无菌室是否达到规定的洁净度, 常有沉降菌和浮游菌测定方法。

(1) 沉降菌检测方法及标准 以无菌方式将 3 个营养琼脂平板带入无菌操作室, 在操作区台面左、中、右各放 1 个; 打开平板盖, 在空气中暴露 30min 后将平板盖好, 置 $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 培养 48h, 取出检查, 3 个平板上生长的菌落数平均小于 1 个。

(2) 浮游菌检测方法及标准 用专门的采样器, 宜采用撞击法机制的采样器, 一般采用狭缝式或离心式采样器, 并配有流量计和定时器, 严格按仪器说明书的要求操作并定时校检, 采样器和培养皿进入被测房间前先用消毒房间的消毒剂灭菌, 使用的培养基为营养琼脂培养基或药典认可的其他培养基。使用时, 先开动真空泵抽气, 时间不少于 5min, 调节流量、转盘、转速。关闭真空泵, 放入培养皿, 盖上采样器盖子后调节缝隙高度。置采样口采样点后, 依次开启采样器、真空泵, 转动定时器, 根据采样量设定采样时间。全部采样结束后, 将培养皿置 $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 培养 48h, 取出检查, 浮游菌落数平均不得超过 $5 \text{ 个}/\text{m}^3$ 。

每批培养基应选定 3 只培养皿做对照培养。

无菌操作台面或超净工作台还应定期检测其悬浮粒子, 应达到 100 级 (一般用尘埃粒子计数仪) 检测, 并根据无菌状况必要时置换过滤器。

5. 定期进行洁净度再验证 定期 (每季度、半年、1 年) 或当洁净室设施发生重大改变时, 要按国家标准 GB/T16292 - 16294 - 1996《医药工业洁净室 (区) 悬浮粒子、浮游

菌和沉降菌的测试方法》进行洁净度再验证,以确保洁净度符合规定,保存验证原始记录,定期归档保存,并将验证结果记录在无菌室使用登记册上,作为实验环境原始依据及趋势分析资料。并定期对洁净室的环境检测数据进行趋势分析和评估,根据评估结果,了解洁净室设施环境质量的稳定状况及变化趋势,决定是否有必要修订相应的警戒和纠偏限度。

6. 定期更换新的紫外灯管、更换净化系统的初效、中效、高效头 定期(至少每年1次)更换新的紫外灯管,以确保紫外灯管灭菌持续有效。并同时在使用登记本上做好更换记录,定期归档保存。至少2年1次,或按洁净度验证实际情况,定期更换初效、中效、高效头。以确保净化系统的功能持续有效,并同时在使用登记本上做好更换记录,定期归档保存。

7. 使用过程中应尽可能减少人员的走动或活动 平时实验室内应尽可能减少人员的走动或活动,同向洁净室的门要关闭或安装自动闭门器使其保持关闭状态。

8. 洁净度不符合规定时立即停止使用 发现洁净度不符合规定时,应立即停止使用,寻找原因,彻底清洁、必须经洁净度再验证符合规定后,才再使用,并同时将情况记录在无菌室使用登记册上,定期归档保存。

9. 对进入的外来人员或维修人员进行指导和监督 非微生物室检验人员不得进入洁净室(无菌室),对必须进入的外来人员或维修人员要进行指导和监督。

10. 洁净室(无菌室)的日常管理 建立安全卫生值日制度,一旦发现通风系统、墙壁、天花板、地面、门窗及公用介质系统等设施有损坏现象,要及时报告并采取相应的修复措施,并保存记录及时归档。从洁净室(无菌室)环境中检测到的微生物应能鉴别至属或种,保留鉴别实验原始记录及菌种,作为无菌生产、无菌检查洁净室环境质量、消毒剂有效性评估及污染源调查的依据,并且也是为无菌检查阳性结果的调查提供第一手资料。

(二) 毒菌种处理和微生物鉴别局部 100 级控制室

微生物检测实验室离不开对标准菌种以及所检测的菌种进行各种处理,如转接种、制备、鉴定、保藏和进行方法学验证;或对培养基灵敏度检查及阳性对照用菌株的接种以及抗生素效价测定用菌种的制备等;或必要时对样品中检出的或从洁净环境中分离到的微生物进行分类鉴别,此外有些实验还要自制生物指示剂。这些主体活动就直接要接触处理微生物菌种,如果菌种控制或操作不当,会导致实验室环境污染或菌种间交叉污染。因此,菌种处理和微生物鉴别室必须与其他的微生物检查用洁净室严格分开。通常应是由1个半无菌操作间和1个缓冲间组成的无菌室设施。室内安装灭菌紫外灯。按实验微生物性质的需要保持对该室的相对正压或相对负压。半无菌操作室的洁净度要求为10000级,净化层流台作为操作时的局部要求为100级洁净度,必要时,可改用生物安全柜内进行,有关微生物暴露性操作活动尽可能在生物安全柜内进行。菌种处理和微生物鉴别室的环境检测及使用管理的要求与洁净室的基本要求相同。每次试验结束后要对无菌室、层流台或生物安全柜及整个实验室环境进行消毒,人员离开后,打开紫外灯消毒。所有与菌种相关的试验废弃物均应经过灭菌处理(在121℃下处理30min以上)后方可丢弃。

使用管理中应注意制定与菌种处理相关的标准操作规程。此外,还包括生物安全柜的使用标准操作规程、带菌废弃物的处理标准操作规程以及环境消毒等的标准操作规程。

(三) 抗生素微生物检定、细菌内毒素检查、抑菌实验的半无菌室

以上三室除抗生素微生物检定室《中国药典》有规定外,其余未有明确规定。但一般来说,均由半无菌操作间和一个缓冲间组成,在同样的环境要求条件下进行相关操作。室内设有灭菌紫外灯,洁净度要求一般100000级。半无菌实验室内应光线明亮,不可放过多杂物,内设固定操作台,且操作台宜稳固和保持水平(用水平尺校准),并可就近安置用于实验需要的钢管放置器、培养箱、恒温水浴箱等设备。

各实验室的环境检测及使用管理的要求应参照洁净室(区)的基本要求,并根据用途的不同,制定出相应的标准操作规程,特别应注意制定带菌废弃物的处理标准操作规程、防止抗生素交叉污染或细菌内毒素的污染的标准操作规程。

(四) 其他室(培养室、试液及培养基的配制室或灭菌室、器皿洗涤、烘干室、实验室、办公休息室)

培养室用来放置培养各类微生物生长的细菌培养箱和真菌培养箱以及菌种保藏用的冰箱。如有条件也可用面积不大于5m²的具有恒温装置的密闭小室代替培养箱。室内应保持清洁,不得堆放杂物,为防止培养过程发生污染,培养室的洁净度要达到100000级。同时室内应注意避免抗生素污染和避免使用强效、挥发性、喷雾行消毒剂,以防止影响微生物生长。试液及培养基的配制室、烘干室、实验室、办公休息室要求条件不高,为一般的清洁环境室。配制室应严格防止抗生素、消毒剂对试剂、试药、培养基原料及配制用器皿和溶剂的污染。清洁环境室应具有防止灭菌后物品再污染的有效措施。同时应制定有各试液及培养基配制的标准操作规程、环境清洁标准操作规程。此外抗生素微生物检定实验所用烧杯、漏斗、移液管、容量瓶、滴管、小钢管等器皿应与其他器皿分开洗涤,防止抗生素污染用于微生物培养的器皿;所有染菌物品、培养物均应经高压灭菌处理后再清洗;抗生素微生物检定平板与其他培养基平板也应分开洗涤。室内应保持清洁、干燥、防止微生物滋生和污染。应制定出实验器皿洗涤标准操作规程。灭菌室是放置高压灭菌器,进行灭菌物品的工作室。注意应有适当措施防止灭菌后物品的第二次污染问题。对于已灭菌过的物品和没有灭菌过的物品在放置区域和标志上应有明显区别。实验室还可设有实验用品、易耗品储藏室,为一般清洁环境室。办公休息室为一般清洁环境室。

二、实验室设备与验证

由中国实验室认可委员会(简称CNACL)1999年制定实验室认可准则(CNACL201-09)设备和标准物质规定:“实验室应配备正确进行校准和检测所需的所有设备(包括标准物质)。如果使用实验室永久控制范围以外的设备,则应保证本准则的有关要求得到满足。所有设备应得到正常维护,应有文件化的维护程序。如果任一设备有过载或错误操作、或显示的结果可疑、或通过检定(验证)或其他方式表明有缺陷时,应立即停止使用,并加上明显标识,如可能应将其贮存在规定的地方直至修复,修复的设备必须经校

准、检定（验证）或检测，满足要求后方可投入使用，实验室应检查由于上述缺陷对以前所进行的校准或检测工作的影响。每一台设备（包括标准物质）应有明显的标识表明其校准状态。应保存对校准和检测有意义的所有标准物质和每一台设备的档案，档案内容应包括：设备的名称；制造商名称、型号、序号或其他惟一性标识；接受日期和启用日期；目前放置地点（如果适用）；接收时的状态（例如全新的，用过的，经改装的）；制造商使用说明书的复制件（如果有）；校准和/或检定（验证）的日期和结果以及下次校准和/或检定（验证）的日期；迄今所进行的维护和今后维护计划的细节；损坏、故障、改装或修理的历史”。

在《药品检验所实验室质量管理规范（试行）》（2000年9月）中对实验室仪器设备有以下原则要求：“第二十条 仪器设备的种类、数量、各种参数，应能满足所承担的药品检验、复核、仲裁等的需要，有必要的备品、备件和附件。仪器的量程、精度与分辨率等能覆盖被测药品标准技术指标的要求。第二十一条 仪器应有专人管理，定期校验检定，对不合格、待修、待检的仪器，要有明显的状态标志，并应及时进行相应的处理。仪器使用人应经考核合格后方可操作仪器。第二十二条 凡精密仪器设备应建立管理档案，其内容包括品名、型号、制造厂名、到货、验收及使用的日期、出厂合格证和检定合格证、操作维修说明书、使用情况、维修记录、附件情况等，进口仪器设备的主要使用说明部分应附有中文译文。第二十三条 精密仪器的使用应有使用登记制度”。

（一）仪器设备的管理原则

微生物检测实验室在新的设备仪器购买后，首先要对该设备或仪器进行安装确认，基本程序是：开箱验收、安装、运行性能确认程序。安装确认的主要内容有：①要登记仪器名称、型号，生产厂商名称、生产厂商的编号，生产日期，公司内部的固定资产设备登记及安装地点；②收集汇编和翻译仪器使用说明书和维护保养手册；③检查并记录所验收的仪器是否符合厂方规定的规格标准；④检查并确保有该仪器的使用说明书、维修保养手册和备件清单；⑤检查安装是否恰当，气、电及管路连接是否符合要求；⑥制定使用规程和维修保养制度，建立使用日记和维修记录；⑦制定清洗规程；⑧明确仪器设备技术资料（图、手册、备件清单、各种指南及该设备有关的其他文件）的专管人员及存放地点。最后对确认的结果经过进行评估，有效地制定出设备的校验、维修保养、验证计划、以及相关的标准操作规程。校验的目的是为了确保计量仪表在其量程范围内运行良好，并且测量结果符合既定标准。根据生产商的建议要求和该仪器的用途来确定校验或维修频率。同样，根据生产商建议要求和仪器在使用时重要程度确定其测量误差的允许范围。如果仪器设备经校验不符合规定要求，则应予充分调查，并且要撰写相关超标结果的偏差报告。还要对该问题设备自上一次校验之后产生的所有试验数据进行全面回顾，对这些数据的合理性做出评估。由此可见，提高校验和维修频率将会保证设备的良性运行并且可以避免产生大量的问题数据。因此，实验室的主要仪器设备每台要配备一本使用和维修日志，这些日常记录通常是偏差调查的关键依据。

一般来说，验证时，至少要有连续3次的重复性试验结果支持说明该台设备通过验证，并且能被官方（如美国FDA、中国SFDA等）的认可。完成这些工作后，要按以上相

关法规的规定,对仪器设备的管理应做到:

(1) 备有仪器设备的清单 备有1份所有仪器设备清单,每台仪器设备要有惟一性的内部控制编号、专门保管人,如果某设备已不在实验室,则应在清单上注明其最后一次使用时间和原因。

(2) 仪器设备贴有明显标识 每台仪器设备上要贴有明显标识,标记主要有“合格”、“准确”、“限用”、“封存”、“停用”几类。标记要标明其内部控制编号、名称、型号、生产厂家、保管人及所处的状态。对需定期校验的设备经校验合格则贴上绿色合格证,并标明最近校验日期和下次校验日期及校验人员的签名,使用前,检验人员务必要先确认其处于校验有效期内。“准用”标记表明测量无检定规程,按校正规范为合格状态,颜色为黄色。“限用”标记表明使用仪器的部分功能或限量,经检定或计量确认处理合格状态,清楚地标出“限用”两字,颜色为蓝色。“封存”标记表明暂不使用,需使用时,应启封检定。凡校验不合格、过期、需报修的设备仪器应贴有红色停用证,并标明停用日期;不需校验的设备则在确认其运行正常后贴上白色状态良好标识即可。

(3) 建立仪器设备的标准操作规程 每台仪器设备要建立标准操作规程,保证每人可以正确使用。

(4) 建立使用登记、维修、保养记录 建立使用登记本和维修、保养记录。这些日常记录是偏差调查的关键依据。

(二) 实验室设备的质量保证和管理要求

实验室设备按是否需校验可分为无需校验、需校验的设备、安装后性能确认并且需要连续监控的设备、需要验证和持续监控的设备四大类进行质量保证和管理要求,现分述如下:

1. 无需校验的设备 微生物检测实验室常用到的此类设备主要有:用于细菌内毒素检测混合时使用或样品混合时的自动旋涡混合器(图2-1)、菌落计数器、往复轨道振荡器,用于无菌检查用的全封闭智能集菌仪(图2-2、图2-3)、真空泵、搅拌加热器、效价测定用的管碟投放器、制备固体样品或水溶性软膏用的电动匀浆仪、蠕动泵和光学显微镜等。只需确认其运行正常,贴上绿色状态良好标识即可(现在实验室通常用3种颜色的标识表明仪器的校准状态。合格证——绿色;准用证——黄色;停用证——红色)。同时应制定此类设备的使用和维护规程。



图 2-1 自动旋涡混合器
(天津药典标准设备厂)

供试品通过集菌仪的定向蠕动加压作用,实施正压过滤并在滤器内进行培养,以检验供试品是否含菌。供试品通过进样管连续被注入集菌培养器中,利用集菌培养器内形成的正压,通过 $0.45\mu\text{m}$ 或 $0.22\mu\text{m}$ 孔径的滤膜过滤,供试品中可能存在的微生物被截留收集在滤膜上,通过冲洗滤膜除去抑菌成分。然后把所需培养基通过进样管直接注入集菌培养器

中, 放置规定的温度培养, 观察是否有菌生长。

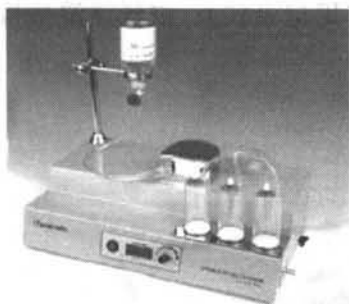


图 2-2 HTY-III (A) 型全封闭智能集菌仪
(杭州泰林生物技术设备有限公司)



图 2-3 HTY-2000A 型全封闭智能集菌仪
(杭州泰林生物技术设备有限公司)

现今较好的薄膜过滤装置为全封闭自动过滤系统。在无菌检查中, 冲样品过滤集菌、灌入培养基直至培养前的全部操作, 均由一台仪器自动完成。由于是全封闭的无菌检测系统, 避免了检测过程中的外源性污染, 使检验结果更为可靠。目前国内外均有这类产品出售。

现简介我国杭州泰林生物技术设备有限公司生产的 HTY 全封闭无菌检测系统。该系统由智能集菌仪和全封闭无菌培养器组成。

操作时, 先接通仪器电源, 将滤瓶插在槽中, 将所连接的管道放入蠕动泵的规定位置中, 卡紧蠕动泵, 备妥废液接收瓶。将供试品瓶口及周围用消毒剂处理后, 将双针插入供试品瓶中, 开启仪器, 调节蠕动泵转速至适当值, 倒置供试品于托架上, 待供试品全部滤过, 停机。将空气滤器的密封帽取下, 套在瓶底出液口上, 卡住分液管道, 将双针头插入培养基瓶中, 开启仪器, 调节转速, 倒置培养基瓶, 使瓶中灌注到规定体积后, 正放培养基瓶, 稍待片刻, 关机。封闭滤瓶, 并去适宜温度培养。使用时应注意: ①仪器置无菌室后, 室内禁止化学熏蒸消毒, 以免损坏电子部件及金属配件; ②自始至终应保持取样针上的过滤膜干燥, 以保证气流畅通、过滤及进液顺利进行; ③更换供试品或培养基瓶及完成过滤时, 应及时停机, 否则会使滤瓶内压力过高, 软管脱离; ④若进液管内出现过多气泡, 应将泵速降低, 并检查滤膜是否湿或进液管是否畅通; ⑤运转时切勿将手伸入泵头内, 待扣上定位卡后再开机。

2. 需校验的设备种类 在实验室设备需定期校验的设备仪器中, 微生物检测涉及的仪器或仪表、设备有: 天平、砝码、pH 计、分光光度计、温度或压力仪表、消毒压力容器、灭菌柜安全阀、以及游标卡尺等。需定期校验的设备仪器又分可以送有关单位校验, 或在本单位有能力、有资格校验的非强检仪器设备及必须由法定计量单位进行量值溯源校验的“强检”仪器或仪表和设备校验 3 种情况。有关计量仪表或设备的使用和管理, 请参照国家《产品质量检验机构计量认证技术考核规范》(JJF1021-1990) 执行定期校验的非强检仪器设备为需要在特定的参数下运行, 并且(或者)用于定量测定时出具数据的, 微生物检验室的这类设备有: 天平、pH 计、分光光度计(图 2-4)、多功能微生物自动测量分析仪(图 2-5)、微生物效价测定仪(图 2-6)、无菌隔离系统

(图 2-7)、HTY 微孔滤膜孔径测定仪(图 2-8)、移液器、电热干燥器或烤箱(细菌内毒素测试用)、玻璃温度计、循环记录仪(如温湿度周记录仪)、空气浮游菌检测仪、空气悬浮粒子计数器等。

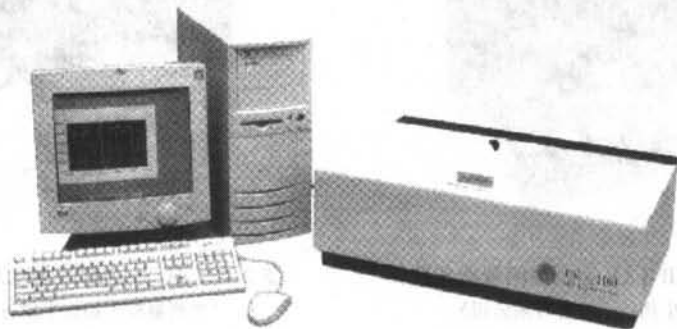


图 2-4 UV-2100 双光束紫外-可见分光光度计
(广一和科学仪器有限公司经销)



图 2-5 ZY-300 IV 多功能微生物自动测量分析仪
(北京先驱威技术开发公司)

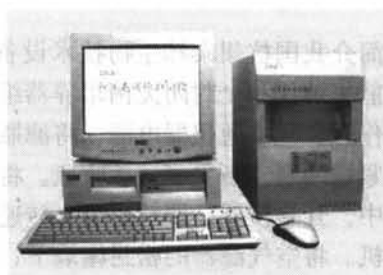


图 2-6 CHB-1 型抗生素效价测量分析仪
(北京海淀潮声技术公司)

(1) 天平 这类产品国内市场很多, 型号也较多。但微生物实验室的天平按使用要求可分两类: 一类用于抗生素微生物检定中标准品、样品的精密称量天平, 这类天平必须是能精确到 $1/10\text{mg}$ (0.01mg) 或 $1/100\text{g}$ (0.001g) (小数点后 5 位有效数字) 的电子分析天平, 称量范围在 0.01mg 至 180g ; 另一类主要用于培养基、试剂配制、微生物限度检查固体样品的称量等, 这类天平只需精确到 $1/100\text{g}$ (小数点后两位有效数字) 即可。明确标明每台天平的量程, 可称量的最小值和最大值均需经过校验。天平应放置在专用天平室内, 温湿度应相对稳定, 温度一般应控制在 $15\sim 25^{\circ}\text{C}$, 湿度一般应控制在 $50\%\sim 70\%$ 。用变色硅胶保持天平处于干燥环境中。天平安置在稳固、水平的位置上, 并防震。

每台天平必须配有标准操作规程, 使用登记本和维修、保养记录。

严格禁止称量超过称量范围的物品。每次称量结束后, 必须将天平清理干净, 以避免交叉污染和对操作人员的潜在危害。应定期强检, 专人负责。

(2) pH 计 在对 pH 计进行校验和日常校正时, 采用 2 点校准线。校正用标准溶液的

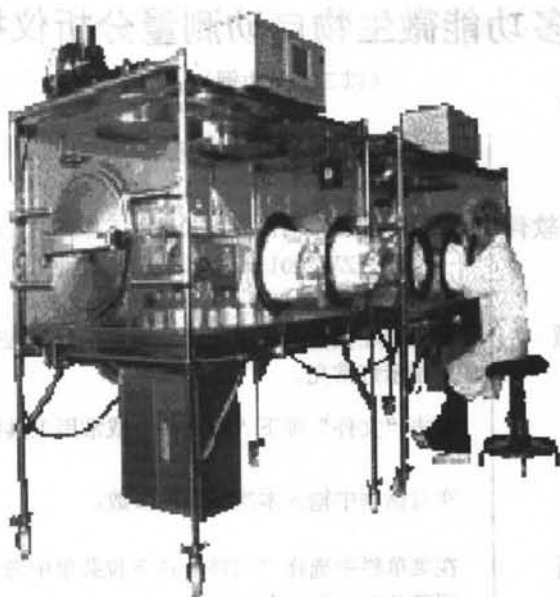


图 2-7 无菌隔离系统
(杭州泰林生物技术设备有限公司)

pH 之差不得超过 4 个单位, 并且要涵盖使用时的测量范围。所进行的日常校正均应记录于使用日志并且要定期回顾这些校正记录。应妥善保存 pH 计电极, 每次使用前应用蒸馏水淋洗电极。应对 pH 计的使用、校验、日常校正以及维修保养等方面制定相应的规程。

(3) 分光光度计 紫外分光光度计在微生物检测分析或测定中主要用于抗生素效价的浊度法测定和制备标准菌液浓度。与化学药品分析测定时的主要不同是所测溶液含微生物。型号有 UV-2100 双光束紫外-可见分光光度计(图 2-4)、VIS-723G 可见分光光度计等(广一和科学仪器有限公司经销)。在操作中应注意微生物溶液对仪器的污染及对污染的处理, 特别是比色皿的消毒处理。可用甲醛稀释液(福尔马林)或 0.1% 新洁尔灭溶液对污染部位及比色皿进行消毒处理。

紫外分光光度计需要校验其波长和光度测定的准确性。在每次使用前, 分析人员必须用空白试剂将仪器的吸收值校准至零点(即透光率为 100%)。比色皿要保持洁净以免结果不准确。对于配有软件系统的分光光度计来说, 设备在投入使用前, 应确认其软件系统的可靠性。

每台分光光度计均应定期校验, 专人负责, 有标准操作规程, 建立使用登记本和维修、保养记录, 还应在具体的检测方法中描述分光光度计的标准操作规程。

(4) 微生物效价测量分析仪 微生物效价测量分析仪(图 2-5, 图 2-6)是一种专门用于抗生素类药品的微生物效价测定仪器。国内目前已有厂家生产, 如北京先驱威技术开发公司开发的 ZY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪和北京海淀潮声技术公司开发的 CHB-I 型抗生素效价测定仪。

ZY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪的操作规范按以下进行:

ZY-300IV 多功能微生物自动测量分析仪操作规范

(以二剂量为例)

启动计算机
↓
启动 ZW2001 测量软件
↓
打开测量仪电源
↓
建立新文件
↓
输入参数
↓
扫描区域设置
↓
放入检品
↓

正式扫描
↓

实验报告
↓
打印
↓

关机

计算机启动并引导至桌面

用鼠标双击桌面快捷方式进入工作界面，或依次单击“开始→程序→ZW2001→ZW2001”，启动工作系统。

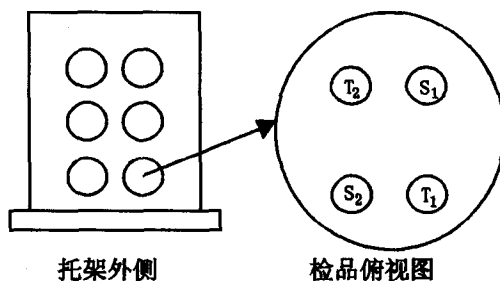
测量仪左侧指示灯将闪烁，测量仪此时进行自检，自检结束后指示灯常亮。

单击“文件”项下“新文件”或常用工具栏中  按钮。

在对话框中输入本次测量的参数。

在菜单栏中选择“扫描”，在下拉菜单中选择“扫描区域设置”，调节各项参数保存退出。

将测量仪托架拉出，将检品放在托架上的测量池内，摆放方向如下图：



托架外侧

检品俯视图

此时单击左侧导航栏中“抑菌圈图像”后，再单击“扫描”项或工具栏中的图  标。在扫描对话框中选择本次实验菌种所对应的测量模式，单击“扫描”按钮测量检品。一批检品未测完，可单击“下一组”按钮，更换检品后，单击“扫描”按钮至结束。全部测量完成，单击“离开”返回。

扫描完成后在实验导航栏中点击“实验报告”，查看各项数值

在菜单栏“文件”中选择“打印”或按 。如果需要打印报头，单击“实验登记”处，输入报告信息，并选择“打印报头”。

从测量池中取出检品，退出ZW2001 软件，关闭测量仪开关，关闭计算机

(5) 层流净化工作台 层流净化工作台是微生物检验使用最普遍和广泛的一和无菌操作工作台, 主要用于制药、食品等行业上, 国内有多间工厂生产。

(6) 无菌隔离系统 已由杭州泰林生物技术设备有限公司吸收国外先进的设计制造技术而独立研制开发生产, 主要应用于无菌操作, 内置无菌检测系统、自动灭菌系统等, 基本达到了“品质超越进口设备, 使用成本低于进口设备”的制造目标, 具有较大的技术优势和服务优势, 无菌隔离系统(图 2-7)已作为《中国药典》(2005 年版)无菌检查法指定为可使用的设施。

无菌隔离系统主要技术特点和优势: ①完全屏蔽的双门传递技术 保证洁净空间不受物料传递和人员操作的影响, 解决了传统无菌室 100 级洁净度无法有效保持的难题。此项技术已达到当今国际最先进技术水平, 已应用于药品检验及制药行业。精心设计的双门传递软连接系统, 按标准成人双臂长度设计的传递装置, 解决了国外隔离器产品必须由两人完成传递操作的缺陷, 使实验操作更方便、更自由、更高效; ②内置隐形无菌检测系统 使 HTY 生物隔离舱可顺利完成检品过滤细菌截留、加装培养基等多种用途。大部分用户需要在隔离舱内做无菌实验或检测, 因此, 舱内设计安装了无菌检测系统, 经过巧妙设计, 在闲置不用时可完全隐藏, 还其完整的操作平面, 使隔离舱既可用于无菌实验, 又可用于其他需要高洁净度的多种研究和实验, 实现一舱多用, 具有不可比拟的性价比; ③远程控制系统 实现了无菌舱内环境控制的智能化、数字化, 可在 1km 之内实现远程控制。达到了无菌实验环境技术指标的可控性、有效性、实时性, 能对舱内压力、湿度等重要环境指标进行自动(或手动)控制, 并可追溯, 大大提高实验可信度; ④灭菌方法先进, 成本低廉 参照 USP25 要求, 实现了“无消耗、无污染、自动灭菌”, 灭菌剂的分解、排放达到国家标准, 无任何污染, 还可大大降低实验消耗; ⑤日常维护成本低廉 软舱体材料、手套、袖套、软连接传递套等易损易耗物件, 公司充分考虑用户使用成本, 委托有关专业厂家批量定制, 成本降低到进口配件的五分之一或更低, 大大降低使用部门的消耗开支; ⑥万向轮、双面操作使用更方便, 更灵活 万向轮的安装, 使隔离舱的移动更加灵活、方便, 让操作人员可以根据工作环境的需要任意移动设备; 双面操作实现了一台设备可满足多个用户或多个部门的需要, 增强了设备的通用性和使用效率; ⑦隔离舱的大小规格、外观及配置可根据用户要求定制, 按客户实际使用需要进行系统配置, 大大提高产品人性化, 同时减少浪费与功能闲置; ⑧舱体材料为软性材料, 软舱体隔离器, 透明度好, 适用面广, 非常适合用户工作所需; ⑨良好地售后服务, 每年提供 1~2 次的免费上门维修、验证。HTY 无菌隔离系统与进口同类产品相比, 以上各项在技术和设计上均占有较大优势, 使用更方便、更安全、更经济。

(7) HTY 微孔滤膜孔径测定仪 由杭州泰林生物技术设备有限公司自主开发的微孔滤膜专用测试仪器(图 2-8), 其原理是运用气泡点法测定各种材质的微孔滤膜的孔径, 对各种培养器使用的滤膜进行批批检测, 以保证滤膜最大孔径及孔隙率指标达到无菌检测要求, 从而符合验证要求。

该测定仪具有的特性: ①可测定各种材料的微孔滤膜的孔径; ②微孔孔径测定范围 $0.15 \sim 0.8 \mu\text{m}$; ③气泡点法测定, 可直观判断滤膜孔隙率状况; ④测试迅速, 从加压至得出结果, 仅需 1min 左右即可完成 4 个特性。

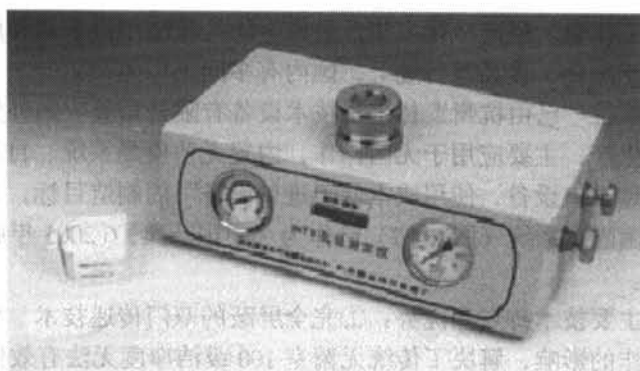


图 2-8 HTY 微孔滤膜孔径测定仪

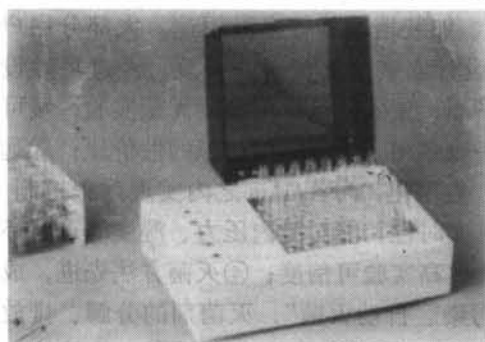


图 2-9 TAL-40 型试管恒温仪
(湛江安度斯生物有限公司经销)

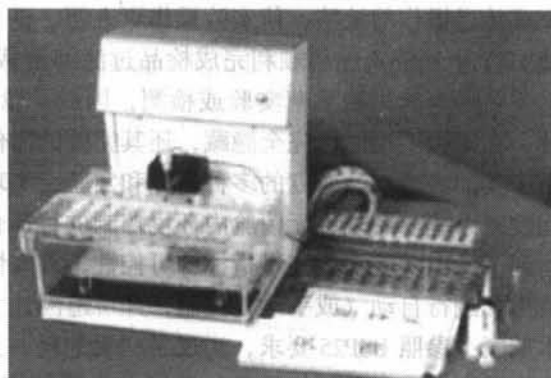


图 2-10 HTY 型细菌内毒素测定仪
(天津药典标准设备厂)



图 2-11 BET-16 型细菌内毒素检查测定仪
(天大天发科技有限公司)



图 2-12 BET-72 型细菌内毒素检查测定仪
(天大天发科技有限公司)

微孔滤膜孔径测定仪的操作规范：

气泡法 先将滤膜浸入水中，使完全湿润，然后用镊子夹住一片滤膜放于气泡点测定装置或滤膜孔径测定仪上，膜上放一块与滤膜大小相同的尼龙筛网，再加上多孔板，将螺

旋固定圈旋紧,在多孔径板上加3~5mm深的水(注意排除气泡)关闭放气阀,启动空压机或氮气瓶阀,使压力缓缓上升,注意观察水面上产生第一个气泡时,记录压力表的压力,气泡点压力不应小于 $2.2\text{kg}/\text{cm}^2$ (0.2MPa)

3. 安装后性能确认并且需要连续监控的设备 微生物检测室常用温控设备有:培养箱(室)、冷藏箱、冷冻冰箱及水浴箱、细菌内毒素检查法(凝胶法用)的TAL-40型试管恒温仪(图2-9,湛江安度斯生物有限公司经销)和HTY型细菌内毒素测定仪(图2-10)、细菌内毒素检查法(定量法用)的测定仪(图2-11,图2-12,天大天发科技有限公司研制与经销),(图2-13,湛江安度斯生物有限公司经销的ATI)等恒温仪。这些温控仪器具有控制性腔室环境,是上述这些温控设备的共同特点。在管理上要求如下:

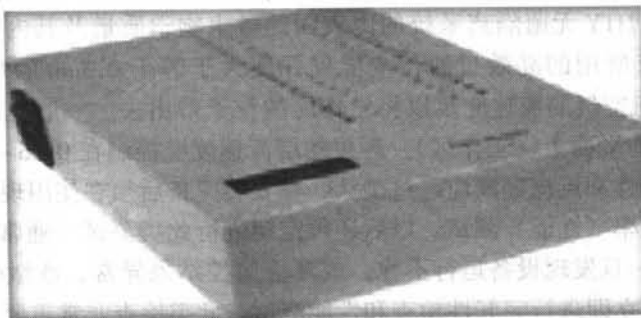


图2-13 ATI细菌内毒素检查测定仪

(湛江安度斯生物有限公司经营)

(1) 在投入使用前,要对设备(或设施)的性能进行确证 然后在每次使用时都要进行连续监控。为了确保设备腔室内的温度状况符合规定要求,每次都予以记录,作为原始资料,为日后分析提供充足依据。现在有不少实验室采用计算机系统来自动监控腔室的环境温度,并保存实时监控的结果。监控用的软件管理系统应经过验证,并且要定期(至少每半年1次)校验测温探头及记录/显示仪表,以确保仪器符合规定要求。

(2) 对没有自动监控系统,进行腔室内的温度状态观测 没有自动监控系统的仪器,则需在设备的每个腔室内放置玻璃温度计(要经校准过)或周期性温度记录仪,每天专人负责检查。一旦发现偏差,须及时调查原因并采取相应的纠偏措施,并要对偏差所产生的影响加以分析和评估,撰写偏差分析报告。须及时调查原因并采取相应的纠偏措施,要对偏差所产生的影响加以分析和评估,撰写偏差分析报告。

(3) 定期用中性的清洁剂或消毒剂清洗 对这些培养箱(或室)、冷藏箱(或室)、冷冻冰箱及水浴的腔室内的表面,要定期用中性的清洁剂或消毒剂清洗。同时要为这些设备制定使用、校验、维护、清洁和温度监控等方面相应的标准操作规程。

4. 需要验证和持续监控的设备 在微生物检测实验室里,需要验证和持续监控的设备主要包括有:灭菌用的高压灭菌柜(或锅),除热原的电热恒温干燥箱等和培养微生物生长用的培养箱等设备相比,为了确保实验结果的准确、有效,对这些设备需要进行更深层次的确认试验和作为常规的持续质量监控检查。无论是硬件系统还是软件系统均需经过严格的确认和验证,具体方法可参见第六章灭菌法内容。

所有的灭菌验证或除热原验证的工艺记录均应妥善保存。记录应能清楚地反映出主要的工艺参数,如温度、时间、压力等。由热敏纸打印的记录要及时复印并存档。每台灭菌或除热原设备均应配备使用日志,记录至少应包括:运行参数(温度和时间)、程序结束时间、运行状况及使用者的签名等。实验室有必要对被灭菌物品或除热原物品的有效期予以确认或验证。

(三) 超净工作台的监控规程与使用指南

超净工作台是微生物检测实验室使用很广泛的设备,应建立监控规程与使用指南。

1. 监控规程 超净工作台在管理上应制定相应的监控规程,其主要内容是:① 定期监测超净工作台、HTY 无菌隔离系统的内表面的微生物学质量及其内部的空气质量(粒子和微生物)要求所用的高效过滤器应能确保使大于等于 $0.3\mu\text{m}$ 的粒子的截留率达到 99.97% 以上。层流空气的流速应足以将工作区的粒子带出去。一般说来,在距离过滤器下游 15~30cm 处的平面上(工作区),理想的层流速度应控制在 $0.36\sim 0.54\text{m/s}$ 之间;② 高效过滤器的完好性和层流速率应经过确认,在安装完备后须在使用现场进行完好性(泄漏)检查和过滤效率(性能)测试。以后还须定期进行此类测试(通常每半年至少检查 1 次);③ 日常管理一旦发现设备运行不稳,或环境监控结果异常,或微生物检验结果偏差呈上升趋势,均须立即进行完好性检查和性能测试。此类检查非常重要,这样可以有效避免给无菌操作带来的潜在污染风险。无菌作业时,应同时监控操作区空气以及操作台表面的微生物学质量,在实验时,应同时做阴阳性对照试验。

2. 使用指南 层流净化工作台使用指南的主要内容有:应在人员走动相对较少,并且是在离门较远的位置安置层流净化工作台,目的是使设备周围环境的气流相对稳定,不影响操作区,更不得对操作区层流产生干扰。

设备开启后,操作人员应首先检查压差指示表的读数是否正常,与常规压差相比,压差偏小或偏大均表明设备运行异常,需立即调查并采取必要的纠偏措施。

如果操作区内安装有紫外灯,操作前必须关闭紫外灯直至完成所有的无菌作业。防止紫外线对操作人员的损害及对样品中可能存在的微生物的损伤。

操作人员戴无菌乳胶手套和无菌袖套后方可在层流区操作。开启工作台后,应采用无菌消毒剂(70%无菌乙醇)对其表面消毒,至少等待 5min 后,方可开始操作。无菌操作前,置于工作台内的所有物品均应经过充分消毒并直至风干。工作区内的所有物品均应排放整齐,以免干扰气流方向。应即时将工作台内的闲置物品撤离出去,并且不得堵住气流的进口。

操作人员应当熟悉层流净化工作台的设计、工作原理及其气流模式。

普通层流净化工作台内的气流最终直接对着操作者而排向周围环境。因此,此类净化工作台不得用于处理感染性物品、有毒物品或敏感物品等。它们只适用一般性的无菌操作活动,如无菌物品的装配、常规物品的微生物检查、培养基的制备等。尽管从表面上看,垂直层流净化工作台的工作区气流未经任何人员及周围环境,势必给操作人员及周围环境造成潜在性污染;操作要避免对周围环境和操作人员产生污染。使用层流工作台时,务必要确保高效过滤器未被堵塞,从而保证洁净空气吹向并覆盖整个工作区。为防止扰乱层

流, 操作人员应尽可能避免将手和手臂在层流区移进或移出, 即便移动, 也应小心谨慎, 所有活动尽可能地在无菌物品暴露区的下游(顺着层流方向)进行。实验室配备一台净化工作台最好是生物安全柜, 专用于常规性微生物菌种的处理, 如微生物的鉴别、生物指示剂的制备与培养、阳性对照或培养基灵敏度检查用标准菌株的制备、保藏和使用等。

在洁净区内, 如条件许可, 尽量使层流净化工作台始终处于运行状态。但是, 一旦停止运行而重新启动后, 要对工作区进行彻底性消毒并且在使用前至少要预运行 5min。此外, 在每次使用前和使用后, 均应对工作台面采取清洁和消毒措施。

要对室内各类层流工作台的运行、清洁和消毒、校验和维修等制定详细的标准操作规程。为每台风流工作台、HTY 无菌隔离系统配备使用和维修记录。使用记录的内容包括: 使用日期及时间、仪器使用前后的状态、清洁或消毒状态及使用人的签名等; 维修记录内容包括: 故障说明、维修情况及维修人员和设备责任人的签名等。定期对设备的清洁或消毒记录和环境监控记录进行回顾性审查, 以评估层流台内工作区的维护状况。

三、实验室操作所用玻璃器具(容器)的校正(验证)

微生物实验室操作所用玻璃器具(容器)很多, 和化学试验用的玻璃器具一样, 通常需要对容量瓶容积与移液管所取移液、滴定管所取体积进行校正。

(一) 容量瓶容积的校正

最简单校正容量瓶的方法, 是在既干燥又清洁并已知重量的容量瓶内, 用测量过温度的蒸馏水准确的注至瓶的标线处, 然后置能准确称至 0.01g 的大天平上称其重量。此重量与空瓶的重量差, 就是瓶中水的重量。用在该温度时的相对密度除水的重量, 就是容量瓶容积的毫升数。

测定时一般进行 2 次, 从 2 次测定得到的平均水重计算容量瓶的容积。

例如在 21℃ 时, 充满到 250ml 容量瓶标线处的水重为 250.11g。从水的相对密度表(表 2-2)可知水在该温度时的密度为 0.99700g/ml, 因此该容量瓶的容积为: $250.11g / 0.99700 = 250.8ml$

表 2-2 不同温度下水的密度表

温度 (℃)	相对密度 (g/ml)	温度 (℃)	相对密度 (g/ml)	温度 (℃)	相对密度 (g/ml)
10	0.99839	17	0.99765	24	0.99639
11	0.99831	18	0.99751	25	0.99618
12	0.99823	19	0.99734	26	0.99594
13	0.99814	20	0.99718	27	0.99570
14	0.99804	21	0.99700	28	0.99545
15	0.99793	22	0.99680	29	0.99519
16	0.99780	23	0.99661	30	0.99492

可将此真实容量, 用钻石笔刻在瓶壁上, 供以后计算时校正用。或者在称空瓶重量

后, 根据当时水温, 由表 2-3 计算出该容量瓶装蒸馏水时应有的重量, 在天平一端加好砝码, 再将蒸馏水加入置于天平另一端的容量瓶中, 使达平衡; 取下容量瓶, 视水液的弯月面最低处是否与原刻度吻合, 若与原刻度不符合, 可用纸条与水液的弯月面成切线贴成圆圈, 然后倒去内容水, 在纸圈上、下涂以石蜡薄层, 在沿纸圈用别针刻一圆圈, 涂上氢氟酸, 几分钟后, 洗去过量的氢氟酸, 并除去石蜡及纸圈, 即见容量瓶上的新刻度。容量瓶也可以用校正过的移液管校正。

(二) 移液管(刻度管)容积的校正

在洗净的移液管(刻度管)内吸入蒸馏水使水弯月面恰好在标线处, 然后把水放入预先称量好重量(应准确称至 0.01g)的具塞小锥形瓶(重量不超过 50 克)中, 塞好后, 称取瓶及水的总重量, 根据其放出水的重量, 从水的温度及水相对密度计算, 就可得出移液管的转移的体积。也应 2 次实验, 使用 2 次测得的平均水重为放出的重量。

例如: 在 17.5℃ 时测得从某 25ml 移液管所放出水的重量为 24.96g, 从水的相对密度表得 1ml 水在 17℃ 时重 0.99765g, 而在 18℃ 时为 0.99751; 因此, 温度从 17℃ 升到 18℃ 时, 1ml 水减少 0.00014g, 所以当温度升高 0.5℃ 时, 每 1 ml 水的重量应减少 0.00007g, 从而可以算出 17.5℃ 时每 1ml 水的重量应为: $0.99765 - 0.00007 = 0.99758$ g。

因此该移液管(刻度管)转移的体积应为: $24.96(g) / 0.99758(g/ml) = 25.02ml$ 。

在实际操作中, 移液管(刻度管)常和容量瓶平行使用, 假若要校正 250ml 容量瓶, 就把 5 个 50ml 移液管(已校正过的)的水注入干燥的容量瓶内, 若水面与容量瓶的标线并不符合, 就在瓶颈水面处另做一记号(可用上法用氢氟酸刻上新刻度)

(三) 滴定管容积的校正

校准滴定管时应先在洗净的滴定管中注入蒸馏水, 使弯月面最低处与刻度零位相切(先排除尖端气泡使滴定管的尖端必须充满水)。然后由滴定管中放出 5ml 水到已称过重量的有塞锥形瓶中, 将瓶塞塞好, 再称出它的重量, 由称得水的重量及操作温度下的相对密度算出水的实际体积, 这就是滴定管中该部分管柱的实际容积。

然后用同样的方法称量放出的 10ml、15ml 及 20ml 等的重量, 并计算滴定管各部分的实际毫升数及其校正值。例假定实验时温度为 17℃, 某滴定管的校正结果见表 2-3。

表 2-3 滴定管容积校正表

观察容积 (ml) 假定从零开始	瓶及水重 (g) 空瓶重 32.60	水重 (g)	该滴定管的 实际容积 (ml)	校正值 (ml)
5	37.62	5.02	5.03	+0.03
10	42.53	9.93	9.95	-0.05
15	47.53	14.93	14.96	-0.04
20	52.54	19.94	19.98	-0.02
25	57.47	24.87	24.93	-0.07
30	62.43	29.83	29.89	-0.11

续表

观察容积 (ml) 假定从零开始	瓶及水重 (g) 空瓶重 32.60	水重 (g)	该滴定管的 实际容积 (ml)	校正值 (ml)
35	67.53	34.93	35.01	+0.01
40	72.45	39.85	39.94	-0.06
45	77.44	44.84	44.94	-0.06
50	82.44	49.84	49.96	-0.04

在方格纸上以滴定管的校正值为横坐标，滴定管读数的毫升数为纵坐标，画出整个滴定时任何体积的校正值都可以从曲线上查出，计算结果，应将此校正值加在所观察的体积中（图 2-14）。

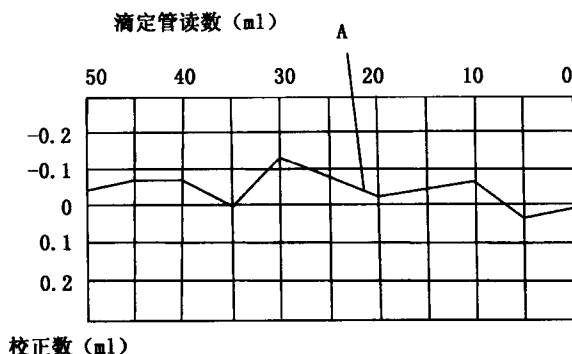


图 2-14 滴定管的校正曲线

例如：若滴定管的读数为 22.50ml，此体积位于校正曲线的 A 点，其校正值相当于 -0.04ml。因此，该部分的真实体积应为： $22.50 - 0.04 = 22.46\text{ml}$

（四）校正容量仪器时的注意事项

- （1）需校正的滴定管或移液管，只需洗净不必干燥，容量瓶洗净后，必须干燥后才能校正。
- （2）容器必须洗净，溶液流下时，器壁内不能挂水珠。
- （3）校正时用来称水的小锥形瓶，必须干净，瓶外干燥。
- （4）校正容量仪器时所用的蒸馏水及欲校正的量器至少需在室内放置 1h 以上，直至与室温相同，才可进行校正操作，以减少校正的误差。
- （5）开始放水前，滴定管管尖端外面的水必须除去。
- （6）如室温有变化，需在每次放蒸馏水时，记录水的温度，并加以校正。
- （7）滴定管校正时要控制蒸馏水流速，使每秒钟流下 3~4 滴（1min 约 10ml），水液面放至需校正量上的 1cm 时，须慢慢放下，使恰至所需要量，读取读数时液面应与视线在同一水平面上，否则每次结果会因读数不正确而引起误差。

(8) 称量水重所用天平的精度应达到所称水重有 5 位有效数字的程度。例如校正 500ml 的量瓶可用能称准至 10mg 的工业天平。校正 50ml 的滴定管, 则应该用称准至 1mg 的分析天平。

(9) 一般每个容量仪器应同时校正 2~3 次, 取其平均值。

(五) 常见容量仪器的容量允差

常见容量仪器的容量允差见表 2-4、表 2-5、表 2-6、表 2-7。条件均是在标准温度 20℃ 时。

表 2-4 滴定管的允许偏差 (ml)

规格	允许偏差 (单位)				
	5ml	10ml	25ml	50ml	100ml
一等	±0.01	±0.02	±0.03	±0.05	±0.10
二等	±0.03	±0.04	±0.06	±0.10	±0.20

表 2-5 容量瓶的允许偏差 (ml)

规格	允许偏差 (单位)							
	10ml	25ml	50ml	100ml	200ml	250ml	500ml	1000ml
一等	±0.02	±0.03	±0.05	±0.10	±0.10	±0.10	±0.15	±0.30
二等		±0.06	±0.10	±0.20	±0.20	±0.20	±0.30	±0.60

表 2-6 移液管 (无分度吸量管) 的允许偏差 (ml)

规格	允许偏差 (单位)									
	1ml	2ml	5ml	10ml	15ml	20ml	25ml	40ml	50ml	100ml
一等	±0.006	±0.006	±0.01	±0.02	±0.03	±0.03	±0.04	±0.05	±0.05	±0.08
二等	±0.015	±0.015	±0.02	±0.04	±0.06	±0.06	±0.10	±0.12	±0.12	±0.16

表 2-7 刻度吸管 (吸量管) 的允许偏差 (ml)

规格	允许偏差 (单位)					
	1ml	2ml	5ml	10ml	25ml	50ml
一等	±0.01	±0.01	±0.02	±0.03	±0.05	±0.08
二等	±0.02	±0.02	±0.04	±0.06	±0.10	±0.16

注: ①滴定管与吸量管是指在管的任一个刻度上最多可能有上述那么大小的偏差; ②以上允差是国家计量局规定的标准。

(六) 微量加样器的校验

微量加样器又称微量吸管, 用于吸取微量液体, 在细菌内毒素检查中常使用。其规格型号较多, 生产厂家亦较多。通常可在一定范围内调节几个体积, 并标有使用范围 (图 2

-15), 如 1~10ml、2~20ml、20~100ml 等。购回后应校验, 看使用能否准确, 并熟悉其操作。其方法是: ①将合适的塑料吸嘴或毛细管牢固地套在样器的下端; ②旋转调节键(图 2-15a), 使数字显示器(图 2-15b)显示出所需吸取的体积; ③用大拇指按下调节键并将吸嘴插入液体中(图 2-15c); ④缓慢放松调节键, 使液体进入吸嘴, 并将其移至接收试管或安瓿瓶中; ⑤按下调节键, 使液体进入管或瓶中; ⑥按下排除键, 将吸嘴或毛细管脱卸。

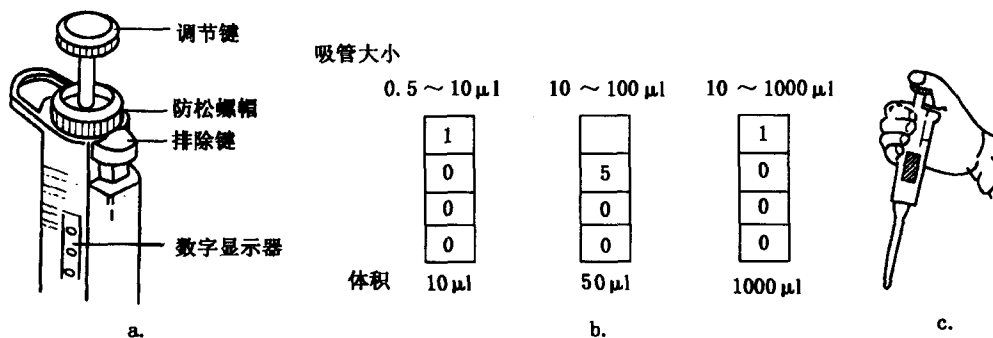


图 2-15 微量加样器

a. 结构 b. 数字显示器 c. 按下调节键

第三章 微生物检测用标准物质的使用及管理

一、概述

标准物质是用来标定仪器、验证测量方法或鉴定其他物质的，是具有一种或多种性能的材料物质。而药品标准物质是执行药品标准的基础，是用于检查药品质量的一种特殊的专用量具，是一类与其他领域不同的特殊标准物质。国际上将标准物质根据不同的使用对象与测定方法，分为生物标准物质与化学标准物质两类，再根据使用要求不同又分为国际、国家、工作用三级标准物质。分别由 WHO、国家、研究生产单位制备，供各自使用。作为微生物检测用的标准物质属于生物标准物质范畴。生物标准物质是用于那些不能用化学或物理量表示强度，而只能用生物方法测定效价的品种。只有当被测物质纯度提高，结构清楚后用理化方法控制质量分析条件成熟后，该品种的化学测定用标准物质即应建立，生物标准物质则完成其使命而被停用。微生物检测用的标准物质也要遵循由中国实验室认可委员会 1999 年制定的实验室认可准则（CNACL201-09）中的量值溯源和校准中的对标准物质规定：标准物质应溯源到国家（或国际）计量基准或溯源到国家（或国际）的标准物质（如可能）。医药工业微生物检验室，常用的标准品或对照品包括：①用于抗生素效价测定的抗生素国家标准品、工作标准品；②用于鲎试验的细菌内毒素国家标准品、工作标准品；③去热原工艺验证用细菌内毒素验证品；④微生物检验用标准菌株或菌种和生物指示剂等对照物质。

检验室使用的标准品或对照品，均应具有可追溯性。凡检验中使用了标准品或对照品（标准贮备液、生物指示剂或贮备菌悬液），检查人员应能查到所有与该标准品相关的历史资料。就微生物检测方面的要求而言，所查的历史资料应包括：供应商、批号、制备日期、质量复核数据、从原始菌种复溶到试验中所用菌悬液的各环节中培养基、培养条件、相关仪器设备和操作人员等。

因此，标准品或对照品的管理首先应制定控制程序，以规范检查用标准品或对照品在来源、保管、储存和领用上的要求，确保标准品和对照品的溯源性和稳定性，并建立完善的文档。在此基础上定期对标准品或对照品进行抽样检查，对标准品或对照品的使用管理情况进行有效地监督。标准品或对照品的一般控制包括以下方面。

（一）标准品或对照品的来源

（1）标准品或对照品作为计量物质应由权威法定机构提供，对在“中国药典标准品、对照品目录”（每年由中国药品生物制品检定所向各省级药品检验所发送）中收录的和“进口药品口岸检验用对照品目录”中注明由中国药品生物制品检定所提供的标准品、对照品，应由微生物主管负责提出采购预算。通过采购供应部门向中国药品生物制品检定所购买。

（2）上述目录中没有收录的，由生产厂商提供的标准品、对照品，必须经省级以上

(含省级)药检所标化认定,或必须提供标明该物质有关质量指标的品质证书。

(3) 经中国药品生物制品检定所认可的部分外国制药企业的药品检查用标准品或对照物质,可直接向国外生产厂家索取。

(二) 标准品或对照品的保管

(1) 微生物检验室指定专人负责标准品、对照品的保管。

(2) 订购的标准品或对照品到货后,由负责标准品或对照品保管的人员检查验收并及时填写标准品、对照品接收及使用记录。记录内容应包括:编号、品名、批号、来源、数量(支)、购进日期、领用数量、领用日期、领用人、结余、备注。

(三) 标准品或对照品的存储和领用

(1) 微生物检验室的标准品和对照品应置于冰箱中存储,必要时可用专用冰箱并加锁存储,抗生素标准品还必须用 -20°C 的低温冰箱存储,并由专人每周(冷冻)或每天(冷藏)登记冰箱温度,如遇停电情况应于次日记录温度并评估可能会对标准品或对照品造成的影响。

(2) 检验人员若需要使用标准品或对照品,应向管理员提出,由管理员按先进先出的原则取出标准品或对照品交给检验人员,并由检验人员和管理人员及时在标准品、对照品接收及使用记录上的领用数量、领用日期、领用人、结余项进行记录。

(四) 标准品或对照品的销毁及使用记录

标准品或对照品使用完毕或过期之后都应及时销毁,并在标准品、对照品接收及使用记录上填好销毁及使用记录。

(五) 定期对标准品或对照品进行抽样检查

定期抽样检查至少每季度1次,应填写标准品或对照品检查表并归档保存,标准品或对照品检查表的内容为:检查日期、抽样品名、批号、登记数量、实际数量、品质证书(有、无)、存储条件(对、不对)、冰箱温度计录(有、无)、管理员签名、检查员签名。

(六) 特殊的标准品——菌种

菌种作为特殊的标准品,除了遵从以上标准品使用和管理的通则以外,还应遵守关于菌种复活、保藏和传代等方面的特殊要求,具体要求见三、“菌种的保存与管理”。

以下分别论述微生物检验室的抗生素标准品或对照品。

二、抗生素标准品

(一) 使用与保存

按规定,目前我国的抗生素国家标准品是由中国药品生物制品检定所组织标定和分发的,在各省市,可分别由各省市药检所统筹安排上报订购,或厂家直接向中国药品生物检

定所定购。标准品安瓿的标签上标明：编号、品名、纯度、批号。一般无有效期，应每年对照“中国药典标准品、对照品目录”，凡有新批号推出，老批号标准品自动作废。企业内部所用工业标准品也必须符合以上标准品管理中对来源的规定。无论是国家标准品还是工作标准品，均应严格按照标准品供应商或生产商的要求进行使用和溶解。

由冰箱中取出的标准品或对照品在使用时，必须先置干燥器中放置至少 30min，使与室温平衡防止吸湿。特别应注意在标准品安瓿管的开启中注意避免带入玻璃屑和水分。开启后应立即将标准品转移到预先洗净、晾干并于 105℃ 干燥 2h 后置干燥器中保存至室温的西林瓶中，立即用同样处理过的橡胶塞盖紧瓶口，用胶带封口，置有硅胶的干燥容器中，再保存于 -20℃ 的低温冰箱中。

1. 安瓿管的开启 用砂轮在安瓿管颈部割痕，取环形针拉直，将一端弯曲成与安瓿管颈部直径一致的半圆形钩，执另一直端，将半圆形钩在乙醇灯火焰中烧炙红后立即紧贴套在颈部割痕处，直至听到割痕处发出轻微的爆裂声。取下半圆形钩，用手轻轻完整地掰开安瓿管头部，可避免带入玻璃屑。

2. 标准品称量 标准品称量要用精确度要求达到 1/10 万的分析天平来称取，在称取之前应预先计算好稀释步骤，包括所用容量瓶的毫升数、所用溶剂、称取标准品的量。称取量一般不得低于 15mg。由于抗生素吸湿性强，称量时极易吸收周围空气中的水分而影响精确度及标准品的重量，因此，操作要快，不必苛求称到某一精确重量，只要称量值不超过预定重量的 5%。然后，在稀释步骤中予以校正到一定的浓度。称量时禁止用药勺等工具伸入标准品的容器中取用，以免污染标准品。

3. 标准品的接收、贮存和配制 标准品的接收、贮存和配制均应有完善的文档管理。贮备液和工作液的配制记录中应包括以下内容：标准品品名、来源、批号、纯度、称量数量、天平编号型号、配制日期、贮存条件、有效期（如需要）、干燥条件（如需要）、稀释剂及相关配制记录、以及配制人。对有干燥要求的标准品，在其配制记录中还应明确干燥设备、温度、时间以及真空度等。存有标准贮备液的容量瓶外面务必标明名称、来源、浓度、配制日期、效期、存贮条件以及配制人姓名。但是，由于抗生素的不稳定性，特别是在溶液中更容易降解，一般不提倡贮备液保存。

（二）效价复核

必须按《中国药典》抗生素微生物检定法中的三剂量法要求对工作标准品进行效价复核实验。每次实验均应称取 2 份国家标准品和 2 份需测工作标准品进行平行试验，每组实验应不少于 9 个平皿，实验结果的可信限率应不得大于 5%，结果取平均值。该实验需反复多次地在不同操作人员间进行，以积累充分多的数据满足统计需要。最后，将所得结果进行统计合并计算（不是求平均值，具体方法可参见本书第八章的内容或《中国药典》生物检定统计法中的实验结果的合并计算），才能得出被测工作标准品较为客观的效价。各实验室自行标定的工作标准品只能在本室内使用。

复核试验应由具有一定实验操作经验的人员进行。根据所要分析的抗生素类型，来确定采用管碟法还是采用比浊分析法。本文以管碟法为例，介绍工作标准品的复核和评价方法。

按《中国药典》(2005年版)要求,用标准贮备液稀释制备3种不同浓度的标准液,如80%、100%和125%。这3种浓度的对数值间是等距离的,因此在检测结果的统计学计算中可采用一常数表示。国家标准品的浓度分别用 U_1 、 U_2 和 U_3 表示低、中、高3种浓度。

本法采用随机编码方式,在平皿内的琼脂培养基表面摆放6个不锈钢小管,向每个管内加入不同浓度的溶液。每个工作标准品的称量样品要求做12个平皿。在规定条件下培养,培养时间结束后,目测检查每个平皿,看是否抑菌区不正常或不含抑菌区的平皿,并剔除不正常的平皿,从目测结果良好的平皿中随机选取其中的9个,用适当的仪器(如ZY-300IV多功能微生物自动测量分析仪)准确量出每个抑菌圈的直径。

无论是在进行抗生素效价复核还是平时进行效价的正式测定操作之前,都应先进行菌液浓度的预测试验。其目的是选择适宜的菌液浓度,使被测抗生素标准品溶液所致的抑菌直径在《中国药典》(2005年版)规定范围内,2.2法标准品溶液高浓度所致的抑菌圈直径在18~24mm;3.3法标准品溶液中心浓度所致的抑菌圈直径在15~18mm。

其操作方法是:①按无菌操作往双碟内加入加热融化后的底层培养基20ml,用陶瓦盖覆盖,待其凝固;②取加热融化后的菌层培养基20ml,待其降至规定温度将试验菌加入培养基内,摇匀,吸取5ml均匀摊布在底层培养基上,用陶瓦盖覆盖,静置约10~20min;③在制备好的双碟上等距离放置小钢管2~3个,在小钢管内滴加欲测抗生素的标准溶液;④滴加完毕,用陶瓦覆盖,小心移置培养箱内,按规定的温度和时间进行培养;⑤取出培养好的双碟,用卡尺测量抑菌圈直径。若所试抑菌圈直径超过规定范围,可调整加菌量或调整抗生素标准品溶液的浓度,重新测试。

1. 管碟法的统计学分析方法

(1) 列举出管碟法的原始数据和数值范围 包含了一组国家标准品与一组工作标准品进行对比试验的所有原始数据。将最高值减去最低值得出每一例的数值范围。比率(R)计算, $R = \text{数值范围的最高值} / \text{所有数值范围的总和}$ 。最大范围与所有范围的总和的比率应不超过0.273(针对9个平皿的分析试验,并且 $P = 0.05$)。倘若超过了该值,则要检查列中最大范围的异常反应。

(2) 确定抑菌圈直径测量值是否为异常值 如果某平皿的抑菌圈直径测量值异常,应根据《中国药典》(2005年版)生物检定统计法中所讲述的特异值剔除方法进行计算,以后再判断该平皿是否被保留或剔除。

(3) 计算效价的对数值、效价的百分比 只有至少6个平皿的所有数据均完整无缺时,方可进行计算。将表中的所有数据分别进行横向和纵向相加,按如下方法计算效价的对数值。

$$M = \frac{\alpha (U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3)}{S_3 + U_3 - S_1 - U_1}$$

α 为一常数,取决于各剂量的比率(表3-1)。例如,如果浓度为80%、100%、125%,比率为1:1.25,相应地该常数为0.12921。对大多数抗生素而言,不管是采用管碟法,还是浊度法,进行复核试验时建议采用1:1.25比率。

效价的百分比(p)计算: $p = 100\% \times \lg^{-1} M$

表 3-1 三剂量分析的效价和 $L/2$ 常量

α	1:1.12	1:1.2	1:1.25	1:1.33	1:1.5
P	0.06563	0.10557	0.12921	0.16513	0.23479
$L/2$	0.00646	0.01672	0.02504	0.04090	0.08268

(4) 按《中国药典》(2005 年版) 生物检定统计法进行可利用测验和效价计算。

(三) 效价复核数据的统计学分析实例

新霉素效价测定——杯碟法 量反应平行线测定随机设计 (3.3) 法

S 为新霉素标准品 稀释液 d_{S_1} : 8.0 U/ml d_{S_2} : 10.0 U/ml d_{S_3} : 12.5 U/ml

T 为新霉素, 标示量 A_T : 670U/mg 稀释液 d_{T_1} : 8.0 U/ml d_{T_2} : 10.0U/ml d_{T_3} : 12.5 U/ml $r = 1:0.8$ $I = 0.0969$

反应 (y): 抑菌圈直径 (mm)

(1) 列举测定结果 (列举出管碟法的原始数据) 见表 3-2。

表 3-2 新霉素效价测定结果

剂量	d_{S_1}	d_{S_2}	d_{S_3}	d_{T_1}	d_{T_2}	d_{T_3}	Σy_m
U/ml	8.0	10.0	12.5	8.0	10.0	12.5	
y	16.05	16.20	16.50	15.80	16.35	16.60	97.50
	16.20	16.45	16.65	16.20	16.45	16.70	98.65
	16.00	16.45	16.70	16.05	16.35	16.70	98.25
	15.95	16.35	16.60	16.00	16.25	16.60	97.75
	15.70	16.25	16.60	15.85	16.25	16.60	97.25
	15.55	16.20	16.55	15.70	16.20	16.60	96.80
	15.65	16.20	16.40	15.80	16.15	16.40	96.60
	15.90	16.10	16.45	15.80	16.10	16.50	96.85
	15.60	16.00	16.30	15.70	15.95	16.30	95.85
总和	142.60	146.20	148.75	142.90	146.05	149.00	875.50
$\Sigma y_{(k)}$	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	
范围	0.65	0.45	0.40	0.50	0.5	0.40	

随机区组设计 (3.3) 法, $K = 6$

不同双碟 (碟间) 是剂量组内所加的因级限制, 共 9 个双碟, $m = 9$ 。

(2) 比率 (R) 计算, $R =$ 数值范围的最高值/所有数值范围的总和。

$$= 0.65 / (0.65 + 0.45 + 0.40 + 0.50 + 0.5 + 0.40)$$

$$= 0.224$$

例子中的比率 0.224 未超过 0.273 限值 (表 3-1), 因此所有测定值均是合理的。

(3) 计算效价的对值数、效价的百分比

效价的对数值:

$$\begin{aligned} M &= \frac{\alpha \times (U_1 + U_2 + U_3 - S_1 - S_2 - S_3)}{S_3 + U_3 - S_1 - U_1} \\ &= \frac{0.12921 \times (142.60 + 146.20 + 148.75 - 142.90 - 146.05 - 149.00)}{149.00 + 148.75 - 142.90 - 142.60} \\ &= 0.0063286 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{效价的百分比计算: } p &= 100\% \times \lg^{-1} M \\ &= 100\% \times \lg^{-1} 0.0063286 \\ &= 101.47\% \end{aligned}$$

(4) 按《中国药典》生物检定统计法进行可靠性测验和效价计算

① 计算各项差方和

$$\begin{aligned} \text{差方和}_{(\text{总})} &= \sum y^2 - (\sum y)^2 / mK \\ &= 16.05^2 + 16.20^2 + \cdots + 16.50^2 + 16.30^2 - (875.5)^2 / (9 \times 6) = 5.4709 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f_{(\text{总})} &= mK - 1 \\ &= 9 \times 6 - 1 = 53 \end{aligned}$$

$$\text{差方和}_{(\text{剂间})} = \sum [\sum y_{(k)}]^2 / m - (\sum y)^2 / mK$$

$$\begin{aligned} \text{差方和}_{(\text{剂间})} &= \frac{(142.60)^2 + (146.20)^2 + \cdots + (146.05)^2 + (149.00)^2}{9} - [(875.5)^2 / (9 \times 6)] \\ &= 4.1926 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f_{(\text{剂间})} &= K - 1 \\ &= 6 - 1 = 5 \end{aligned}$$

$$\text{差方和}_{(\text{碟间})} = \sum [\sum y_m]^2 / K - (\sum y)^2 / mK$$

$$\begin{aligned} \text{差方和}_{(\text{碟间})} &= (97.50)^2 + (98.65)^2 + \cdots + (96.85)^2 + (95.85)^2 / 6 - (875.5)^2 / (9 \times 6) \\ &= 1.0018 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f_{(\text{碟间})} &= m - 1 \\ &= 9 - 1 = 8 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{差方和}_{(\text{误差})} &= \text{差方和}_{(\text{总})} - \text{差方和}_{(\text{剂间})} - \text{差方和}_{(\text{区组间})} \\ &= 5.4709 - 4.1926 - 1.0018 = 0.2765 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} f_{(\text{总})} &= f_{(\text{总})} - f_{(\text{剂间})} - f_{(\text{区组间})} = (K - 1)(m - 1) \\ &= 53 - 5 - 8 = 40 \end{aligned}$$

② 剂间变异分析及可靠性测验 按表 3-3 (k, k) 法正交多项系数计算表进行剂间变异分析; 按表 3-4 随机区组设计 (3.3) 法进行可靠性测。结果分别见表 3-5, 表 3-6。

表 3-3 (k,k) 法正交多项系数计算表

差异来源	正交多项系数 (C_i)								$m \sum C_i^2$	$\sum [C_i \sum y_{(k)}]$
	S_1	S_2	S_3	S_4	T_1	T_2	T_3	T_4		
(2.2) 试品间	-1	-1			1	1			4m	$T_2 + T_1 - S_2 - S_1$
回归	-1	1			-1	1			4m	$T_2 - T_1 + S_2 - S_1$
偏离平衡	1	-1			-1	1			4m	$T_2 - T_1 - S_2 + S_1$

表 3-4 随机区组设计 (3.3) 法可靠性测

变异来源	f	差方和	方差	F	P
试品间	1	公式 (2-42)	差方和/ f	方差/ s^2	
回归	1	公式 (2-42)	差方和/ f	方差/ s^2	
偏离平衡	1	公式 (2-42)	差方和/ f	方差/ s^2	
二次曲线	1	公式 (2-42)	差方和/ f	方差/ s^2	
反向二次曲线	1	公式 (2-42)	差方和/ f	方差/ s^2	
剂间	$K-1$	公式 (2-35)	差方和/ f	方差/ s^2	
区组间	$m-1$	公式 (2-36)	差方和/ f	方差/ s^2	
误差	$(K-1)(m-1)$	公式 (2-37)	差方和/ $F(s^2)$		
总	$mK-1$	公式 (2-34)			

表 3-5 新霉素 (3.3) 法剂间变异分析结果

变异来源	$\sum y_{(k)}$						$m \sum C_i^2$	差方和	
	S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3		$\sum [C_i \sum y_{(k)}]$	$[\sum C_i \sum y_{(k)}]^2 / m \sum C_i^2$
	142.60	146.20	148.75	142.90	146.05	149.00			
正交多项系数 (C_i)									
试品间	-1	-1	-1	+1	+1	+1	9×6	0.4000	0.002963
回归	-1	0	+1	-1	0	+1	9×4	12.25	4.168
偏离平衡	+1	0	-1	-1	0	+1	9×4	0.05000	0.00006944
二次曲线	+1	-2	+1	+1	-2	+1	9×12	1.250	0.01447
反向二次曲线	-1	+2	-1	+1	-2	+1	9×12	0.8500	0.006690

表 3-6 新霉素效价测定 (3.3) 法可靠性测验结果

变异来源	f	差方和	方差	F	P
试品间	1	0.002963	0.002963	<1	>0.05
回归	1	4.168	4.168	602.9	<0.01
偏离平行	1	0.000069	0.00006944	<1	>0.05
二次曲线	1	0.01447	0.01447	2.1	>0.05
反向二次曲线	1	0.006690	0.006696	<1	>0.05

续表

变异来源	f	差方和	方差	F	P
剂间	5	4.1926	0.8385	121.3	<0.01
碟间	8	1.0018	0.1252	18.1	<0.01
误差	40	0.2765	0.006912 (s^2)		
总	53	5.4709			

结论：回归非常显著 ($P < 0.01$)，偏高平行、二次曲线、反向二次曲线均不显著 ($P > 0.05$)，实验结果成立。组内（碟间）差异非常显著 ($P < 0.01$) 分离碟间差异，可以减少实验误差。

③ 效价 (P_T) 及可信限 (FL) 计算

已知： $r = 1:0.8$ $I = 0.0963$ $s^2 = 0.006912$ $f = 40$ $t = 2.02$ ($P = 0.95$) $A_T = 670 \text{ U/mg}$

P_T 及其 FL 计算

$$V = 1/3 (T_1 + T_2 + T_3 - S_1 - S_2 - S_3)$$

$$= 1/3 (142.90 + 146.05 + 149.00 - 142.6 - 146.2 - 148.75) = 0.1333$$

$$W = 1/4 (T_3 - T_1 + S_3 - S_1)$$

$$= 1/4 (149.0 - 142.9 + 148.75 - 142.6) = 3.0625$$

$$g = t^2 s^2 m / 4 W^2$$

$$= 2.02^2 \times 0.006912 \times 9 / (4 \times 3.0625^2) = 0.007$$

$$R = D \lg^{-1} (IV/W)$$

$$= (12.5/12.5) \lg^{-1} [(0.1333/3.0625) \times 0.0969] = 1.01$$

$$P_T = A_T R$$

$$= 670 \times 1.01 = 676.70 \text{ U/mg}$$

$$S_M = [I/W^2 (1 - g)] \sqrt{ms^2 [(1 - g) AW^2 + BV^2]} = 0.969 / [3.0625^2 \times (1 - 0.007)] \times \sqrt{9 \times 0.006912 [(1 - 0.007) (2/3) \times 3.0625^2 + 1/4 \times 0.1333^2]}$$

$$= 0.006469$$

$$R \text{ 的 } FL = \lg^{-1} [\lg R (1 - g) \pm t S_M]$$

$$= \lg^{-1} [\lg 1.010 / (1 - 0.007) \pm 2.02 \times 0.006469]$$

$$= 0.980 \sim 1.041$$

$$P_T \text{ 的 } FL = A_T \lg^{-1} [\lg R \pm t S_M]$$

$$= 670 (0.980 \sim 1.041) = 656.60 \sim 697.47 \text{ U/mg}$$

$$P_T \text{ 的 } FL\% = [P_T \text{ 高限} - P_T \text{ 低限} / 2 P_T] \times 100\%$$

$$= [(697.47 - 656.60) / (2 \times 676.70)] \times 100\% = 3.0\%$$

(四) 效价复核数据的计算机统计处理

见第八章的四、量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

三、微生物菌种的使用、保存与管理、验证

微生物菌种的使用、保存与管理是微生物检验室的一项重要工作,检验室必须保藏一批形态、生物化学、血清学特性稳定的标准对照菌株,以便用于中国药典规定的无菌检查、微生物限度检查、抗生素微生物(效价)测定及测定、评价防腐剂和抗菌剂的抗菌效果,以及确认灭菌工艺的效果、检验方法的验证、培养基的促菌生长能力(灵敏度)、样品检验时的阳性对照等许多的检测工作中。因此,菌种是微生物实验使用频率最高的对照物质,相当于在化学或者仪器分析中使用的标准品。微生物实验室对菌种的管理除了与化学标准品一致的管理要求外,还因微生物的特性有一些特殊的要求。菌种是活的微生物,在菌种的使用保藏过程中需定期传代,并防止变异;因此,菌种保藏和传代是微生物检验工作中的一项重要技术。不然的话,因菌种管理不善,将会给试验结果带来很大的差异,给生产带来重大影响。下面分述有关事项。

(一) 制定菌种使用、保藏管理程序

微生物检定室应制定出本室菌种的使用、保藏管理规程来规范菌种的来源、申购、使用、保管、接种传代、存储和领用等方面的要求,确保菌种溯源性和稳定性;防止试验用菌种因使用过程中多次传代而失去典型生物学特征发生变异或死亡,保证菌种长期正确、稳定,从而确保实验的灵敏度和重现性。

1. 做好菌种的来源登记,确保溯源性清楚 制药行业微生物检验用的标准菌株主要来自中国药品生物制品检定所医学菌种保藏中心(China Medical Culture Collection, CMCC)的系列,或美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)系列等国际法定菌种保藏机构。此外还有来自其他保藏单位或同行相互转让的有关菌种。由中国药品生物制品检定所医学微生物菌种保藏管理中心提供的冷冻干燥菌种的标签CMCC(B)代表细菌(bacteria),CMCC(F)代表真菌(fungi)。每种菌种都具有固定的编号,如金黄色葡萄球菌CMCC(B)26003、生孢梭菌CMCC(B)64941、白色念珠菌CMCC(F)98001、大肠杆菌CMCC(B)44102、沙门菌CMCC(B)50094、铜绿假单胞菌CMCC(B)10104等。无论来自何处的菌种,一定要保存好菌种溯源性的原始记录。接着就可进行下一步工作。

2. 菌种的接收与复活 从菌种保藏中心购买的原始菌种管是玻璃安瓿装的冻干粉剂,同时随菌种附有相关资料。菌种购到实验室后,应按安瓿的数量和名称和每一支安瓿的完整性在相应的菌种接收记录上记上所购菌种的信息,如名称、数量和接收日期等。将安瓿贴好标签并储存于-20℃,直到需要时使用。一般安瓿冻干品可在5年之内使用。

原始菌种使用时,首先需复活冻干菌种,按(菌种保藏中心提供的)相关资料的要求进行复溶、培养和保存。一般包括以下几个步骤:

(1) 冷冻菌种的复活 清洁安瓿(可用75%的乙醇)后,用砂轮在安瓿的上部划线,将安瓿掰开。用一无菌吸管吸取1~2ml适量的液体培养基(生孢梭菌用液体硫乙醇酸盐培养基;金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌和枯草芽孢杆菌用营养肉汤;白色念珠菌、黑曲霉菌用液体真菌培养基)滴加到安瓿中,轻轻旋转安瓿使冻干菌种和液体培养基充分混合并完全溶解,再将安瓿内的菌液转移至相应的培养基试管中,根据菌种类型

将其放入适宜的培养条件(细菌培养温度 $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, 18~24h; 真菌培养温度 $25.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$, 3~5d)下培养, 观察培养基是否浑浊, 浑浊说明菌种复活生长(如不浑浊, 细菌应延长培养时间至7d以上, 真菌应延长培养时间至14d以上, 仍不浑浊, 按相关规定灭菌处理, 并且丢弃之前应灭菌处理并详细记录)。在应用前, 还应确认菌种的纯度和特性。

(2) 菌种确认 用无菌接种环取上述培养物, 在相应的培养基平板(营养琼脂、大豆胰蛋白胨琼脂)上或相应的细菌鉴别平板(如伊红亚甲蓝、麦康凯、十六烷基三甲胺、甘露醇高盐)上划线分离单个菌落, 置适宜条件下培养(若该类微生物为厌氧菌, 则培养条件应为厌氧条件)。以同样方法取真菌和酵母菌培养物至SDA(萨布罗培养基)平板上或玫瑰红钠培养基平板上, $23 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 下培养7d; 培养后观察是否具有典型的菌落状态, 然后挑取单一的纯菌落, 进行革兰染色、镜检, 观察其染色特征及菌体形态, 并进一步做生化鉴定实验以确定菌种。也可使用API鉴定系统做鉴定。对已鉴定确认的菌种进行菌种传代和保藏。

(3) 污染处理 假如在该平板上发现有其他菌落生长, 则说明操作有污染或菌种不纯。要将该污染培养物做灭菌处理, 寻找原因, 重新分离挑选纯菌落。

(二) 严格控制菌种的传代、做好保藏工作

《中国药典》(2005年版)做出“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)”的明确规定。另外我国GMP认证中对传代次数也有要求, 要按照实验室制定的菌种使用与管理规程进行传代与保藏。各个微生物实验室放弃传统单一的斜面传代保存法, 用简便易行的方法来传代保藏, 保证菌种的长期有效, 避免频繁购买菌种及复壮等费时、耗力的工作。

微生物菌种的传代保藏过程:(图3-1)

1. 复溶菌种并转种 按菌种说明书要求复溶所转菌种并转接于适当的增菌培养基内(F_1), 经复壮后转接至平板上, 适温培养一定时间, 分离出单个纯种菌落, 此为第2代(F_2)。

2. 鉴定菌种后制甘油冷冻管 经菌种特性鉴定后, 挑取纯菌落制成浓菌悬液用于制备甘油冷冻管, 同时挑取纯菌落转接斜面菌种作为工作用菌种。此时, 保藏菌种为第2代(F_2), 但工作用菌种则为第3代(F_3)。

3. 将第2代(F_2)菌种管冷冻保存, 将工作用菌(F_3)以适当温度下培养适当时间后可用于试验。

4. 取1支冷冻保存的 G_2 代种转种于平板和斜面培养基上, 平板上的菌种制成冷冻包藏管第3代(F_3)斜面培养基, 经适当温度下培养适当时间后用作工作用菌种(F_3)。

5. 将第3代菌种(F_3)冷冻或低温保存, 将生长、转种后的 F_2 菌种经灭菌处理后丢弃。

6. 当工作用菌种代数小于5时, 可直接用上一代工作用菌种转接下一代工作用菌种, 如 F_3 可直接转接为 F_4 。

7. 按上述程序操作, 直至 F_4 转为 F_5 为止, 需重新开启安瓿, 再重复上述操作程序,

用无菌接种环轻轻刮取菌苔，并通过接种环与试管壁之间的轻轻摩擦而使细菌充分扩散到预先装于试管中的无菌蒸馏水中，调整菌液浓度，使其等同于麦氏比浊管第 10 号管，向已制备好的菌悬液中加入等体积、浓度为 20% 的无菌甘油，得到 10% 甘油菌悬液。注意甘油浓度不宜过高，否则会影响细菌细胞渗透压，引起细菌死亡。轻轻振摇小管，使内容物充分混合，分装于无菌小试管，制好的甘油冷冻管最好在 -30°C 条件下贮存，从冷冻之日起一般可保存 2 年。该保藏管制法简单，保存不占太多位置。但是在制作过程中，应注意使用纯菌悬液而不是含有培养基的增菌液，这样可保证不带入培养基营养成分；同时菌液浓度要达到 10%，以防止在长时间保存中不至于因自然死亡后造成菌数下降过量。保存厌氧菌和霉菌不宜采用该法。

2. 试管熔封（密封）保藏法 其保藏原理是低温或缺乏营养与隔绝空气。笔者曾采用试管熔封法，室温与冰箱条件下保存十多种细菌菌种，该法简便实用，效果很好。现推荐介绍如下：

用各种琼脂斜面（普通肉汤等）常规灭菌后，经接种，室温培养 24~48h 后，将接种菌生长旺盛的试管用喷灯将其管口熔封，分别置室温和冰箱下保存。到使用时，用砂轮在管口划一圈，并在乙醇灯下火焰灭菌后敲开管口即可转接到另一斜面上。由于试管经熔封后，可防止培养基水分蒸发，又可减缓细菌的代谢速度，并能防止杂菌污染。经试验此法可用来保存金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、藤黄微球菌、大肠埃希菌、产气杆菌、副伤寒杆菌、沙门杆菌 sp、铜绿假单胞菌、枯草杆菌、短小芽孢杆菌、胶冰样芽孢杆菌。室温保存期最长达 3 年，特别是适宜保存一些因培养物陈旧极易死亡的铜绿假单胞菌。该法的优点是制作简单方便，不易污染，适应面广，转种容易，成本低。由于熔封后，隔绝氧气，隔绝杂菌污染。经保存后细菌生物学性状良好，形态、G 染色及各种色素，生化反应特性不变，故是一种经济、简便实用的有效保存方法。

密封法保藏将需保藏菌种按无菌操作要求接种至固体培养基（细菌采用肉汤琼脂、酵母采用蔡氏培养基、放线菌采用高氏 1 号培养基）上，经适温培养后（细菌 1~2d，芽孢菌、放线菌 5~7d，酵母菌 3d），塞紧棉花塞，放在干燥器内，干燥器密封处涂上凡士林，盖紧后使之与真空泵相连接。开动真空泵抽真空 30min 至 1h（此时真空度约为 640），关闭密封口，拔出胶塞，置于室温下保存。待使用时，打开盖，取出菌种，接种至培养基上即可。笔者经试验保存 17 个月后，培养基未见干枯，仅有少部分试管的琼脂斜面有开裂口现象。经实验本法适宜保存大肠埃希菌、副伤寒菌、金黄色葡萄球菌、藤黄八叠球菌、磷细菌、酵母 21189、酵母 211190 等 10 种微生物。但此法不适宜保存铜绿假单胞菌、谷氨酸发酵菌（ T_{6-13} ）。实践证明，此法具有简便实用的特点，值得试用。

3. 液体石蜡覆盖保藏法 此法是传代培养的变相方法，可适当延长保藏时间，将菌种穿刺接种于半固体高层培养基中，在适宜条件下培养，然后，无菌操作，在层流台下用无菌吸管吸取无菌液体石蜡至培养好的菌种管内，并使石蜡高出菌种表面约 1cm，将试管直立，置于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 冰箱中或室温下保存。需要指出的是，有些菌种在室温下比在冰箱保存的时间还要长，如铜绿假单胞菌。覆盖在菌种表面的液体石蜡，一方面可防止因培养基水分蒸发而引起菌种死亡；另一方面可阻止氧气进入以减弱菌种代谢作用。此法制备简单，不需要其他特殊设备，并且效果也好，用此法保藏霉菌、放线菌、芽孢杆菌可保藏 2

年以上不死,酵母菌可保藏1~2年,一般无芽孢细菌也可保藏1年左右,且不需要经常移种。但是此法的缺点是保存时必须直立放置,所占位置较大,同时也不便携带;从液体石蜡下面取培养物接种时,当接种环在火焰上灼烧时,培养物容易与残留液体石蜡一起飞溅,应特别注意或是使用一次性无菌接种环。

4. 斜面低温保藏法 此法为实验室工作用菌种的最常用的保藏方法,操作简单,使用方便,不需特殊设备。操作时,将菌种接种在适宜的固体斜面培养基上,待菌生长充分以后,转移至2~8℃冰箱中保藏。保藏时间依微生物的种类而有所不同,霉菌、放线菌及芽孢菌保存2~4个月,移种1次;酵母菌2个月移种1次,细菌最好每月移种1次。此法的缺点是菌种容易变异,因为培养基的物理、化学特性不是严格恒定的,传代过多会使微生物的性状和代谢发生变异,在传代过程中,污染各种杂菌的机会也较多。因此,此法仅能用于工作用菌种的短期保藏,并应随时检查是否污染杂菌和变异等情况,传代代数超过5代的菌种应灭菌处理后抛弃。

5. 芽孢液保藏法 对于产芽孢的微生物可以收集芽孢,制成芽孢菌悬液后保藏。其原理是利用芽孢抗性强的自然特点来进行保存,制备方法如下:

无菌操作,分别将微生物孢子液适量接入适合芽孢生长的茄型瓶或培养皿内,使菌液均匀分布于培养基表面。在适当温度下培养2~7d或更长时间以能达到50%以上的芽孢,这样可确保得到浓度较高的芽孢悬浮液。如需较长时间或较高温度(55℃)培养,最好将培养皿进行适当密封,以免培养基失水干裂,培养结束后,在层流台下,取3.0~5.0ml氯化钠磷酸盐缓冲液(pH7 NaCl-PBS)加入培养后的各个集菌培养皿内。用无菌玻璃L棒在琼脂表面轻轻刮下菌苔,注意不要划破培养基。倾斜培养皿,使菌悬液集中于培养皿一端,用无菌注射器或无菌吸管吸取菌悬液,收集到大小合适,便于封口的无菌西林瓶或试管中。再将芽孢液放在80~90℃水浴中加热15min(目的杀死营养细胞)冷却。按菌种保藏标签规范贴上标签和做好标记,然后放至2~8℃冰箱中保藏,可保存1年。每次使用该原始菌液时,不论直接使用或用其配置工作菌液,都应事先用平皿法重新标定其浓度,前一次标定浓度仅供参考。

以上实验室内常用的简单易行的菌种保藏方法,无论使用哪种方法,都应对所采用的保存方法进行验证,以确保在相应保存条件下的菌种不会变异并且性能稳定。

(四) 菌种保藏标签的规范与要求

菌种保藏标签必须规范、清晰,所有保藏的菌种容器表面均应贴有相应的标签,容器表面的标签或标记必须字迹清晰可见,不得模糊不清或因潮湿或其他原因而致模糊或损坏。标签上应注明:菌种的名称,系列号(CMCC号或ATCC号),传代的次数,接种时间等。需要指出的是,一旦新一代菌种制备成功,务必要将上一代菌种处理掉。处理过程应记录下来并存档。

(五) 严格菌种的质量控制,确保菌种的质量

菌种的质量对检验至关重要,对实验室贮备的菌种而言,除了在起始阶段要对菌种进行纯度和属性确认外,还应对每一次传代都要进行确认的质量控制系统。因为当微生物菌

种从上代传至下代时,很可能发生污染或变异,因此每次传代中至少要对菌种进行形态学观察(在可能情况下,用选择性培养基进行生长检查)和革兰染色检查,必要时应做菌种鉴定实验,一旦出现偏差,应做进一步调查,所有被确认受到污染的菌种应及时销毁,不得用于常规实验。

为保证试验的可靠性和准确性,实验室还应严格按照规程制备和使用菌种,并对每种微生物的存贮条件(需氧或厌氧状态、温度和时间)进行确认,一般来说,低温保存($2\sim 8^{\circ}\text{C}$)时细菌和酵母菌的菌悬液应在制备后的24h内使用(用于抗生素效价测定的除外),霉菌孢子液应在制备后的7d内使用。不管菌悬液制备后的时间为多长,在使用时(在24h之内)均应同时进行菌数复核检查。可采用分光光度法或麦氏浊度法估计当时的菌液浓度。可以制备不同浓度的菌悬液,用分光光度计在550nm或580nm波长处测出不同菌液浓度下的光吸收值。然后,将菌液浓度与对应的吸收值作图,便得到了相应菌液浓度与吸收值之间的标准曲线图。由于不同微生物的细胞大小不同,细胞大小会影响其吸收值,要分别制定出每种微生物的标准曲线图。有了标准曲线后,可用来估测相应菌液的浓度。需说明的是此法只是用于实验时的即时估测,并不能作为菌液的实际结果。所以实验时用标准平板稀释法复核菌液浓度是必不可少的。对于生物指示剂或商购的菌悬液,也应在使用前或使用同时复核其浓度。

(六) 菌种处理的注意事项与有关记录

菌种是特殊的标准品,在一定条件下,许多种类都是病原菌,如金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、白色假丝酵母菌等,这就要求处理菌种时有一些有别于其他标准品的特殊要求。一般的要求是以下几点:

(1) 根据菌株对人和动物的致病力、毒性流行传染的危害程度等把菌种进行分类(一般为四类)和分级,设置专门机构,实行严密安全的保藏管理。

(2) 有关裸露菌种的所有操作都应在生物安全柜中进行,并且仅有微生物实验分析人员和技术人员才能处理活的微生物,所有的与菌种有关联的事情,例如菌种的接收、检查和保藏等都应由专门的微生物分析员处理和控制,并建立进出账目,填写菌种记录,记录内容包括:菌种名称、编号、来源、形态特征、培养特性、生化与血清学鉴定、传代次数、最适培养基和培养条件、保藏方法、储存条件及保藏库址等。

(3) 在操作过程中,必须严格遵守实验室和实验人员防止传染的安全防护措施规程,采取有效预防措施进行自我保护。如工作时必须穿工作服、佩带无菌手套,实验完成后应消毒实验的区域、实验仪器和器具。

(4) 为了防止菌种污染或将污染传播到别处,其他部门的人员未经允许不得进入微生物实验室。所有的意外情况,如菌种泄漏或人员受伤,都必须立即向主管或上级领导报告以便得到及时解决。

(5) 相关记录 在菌种的使用制备与保藏过程中,应建立菌种制备、保藏和使用的记录格式(表3-7、表3-8),供验证时检查确认。

表 3-7 微生物菌种制备、保藏和使用的记录表

1. 菌种名称_____ ATCC (或 CMCC) No. _____
菌种来源_____ 实验室编号_____
传代代数_____
2. 菌种制备
培养基_____ 批号_____ 接种日期_____ 接种容器_____ 数量_____
培养条件_____ 温度_____ 时间_____
纯化分离鉴定结果_____ 操作人_____ 日期_____
3. 菌种保藏
菌种保藏方法_____ 保藏数量_____ 保藏培养基_____ 批号_____
培养条件_____ 培养温度_____ 培养时间_____
4. 菌种使用记录

序号	支取日期	数量	操作人	用途	处理
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

当菌种超过有效期或被污染以后应灭菌后丢弃 是_____ 否_____

说明：实验室菌种编号原则为名称 + 传代次数 + 制备日期，例 *E. coli* - 5 - 20030313。

表 3-8 菌种接收记录表

储藏温度：_____

菌种名称	菌种来源	ATCC 或 CMCC 号	数量	接收日期

附件：_____页 备注：_____
接收人：_____ 日期：_____年_____月_____日

四、细菌内毒素标准品与鲎试剂

医药工业微生物实验室使用的细菌内毒素标准品可包括国家标准品（RSE）工作标准品（CSE）和内毒素验证品（挑战品）。鲎试剂是一类专门用于检测细菌内毒素的生物试剂，分为国家参考品（又称鲎试剂国家对照品）与部标鲎试剂两类，鲎试剂国家对照品由中国药品生物制品检定所发放使用，用于标定、仲裁鲎试剂灵敏度，考察内毒素国家标准品和工作标准品的效价稳定性及监督检查者对国家标准品和工作标准品的溶解、稀释过程的准确性。鲎试剂国家对照品的质量标准与鲎试剂部颁标准相比，在水分、自身凝集方面的要求更加严格，并增加了“均一性”测定，灵敏度由中国药品生物制品检定所组织协作标定。部标鲎试剂由各厂家生产标定。根据检查方法，分为凝胶法鲎试剂和定量法鲎试剂。根据鲎试剂与内毒素反应的专一性程度，分为普通鲎试剂和特异性鲎试剂。

（一）细菌内毒素国家标准品和工作标准品

细菌内毒素标准品分国际标准品、国家标准品、工作标准品三档，国外药典所称的“reference standard”（参考标准品）属于国外的工作标准品。

细菌内毒素国际标准品是由世界卫生组织（WHO）标定分发的，效价为 10000EU/瓶（或支）。

我国的细菌内毒素国家标准品是由国家主管部门——中国药品生物制品检定所组织、会同省级以上资深药品检验所协作用国际标准品标定过的标准品，效价一般在 5000EU/瓶（支）以上（目前我国现使用的细菌内毒素国家标准品编号为 981，效价为 9000EU/瓶）。因其价格、效价相对较高而且稀释步骤繁琐，主要用于标定细菌内毒素工作标准品及试剂的灵敏度测定和确定。

细菌内毒素国家标准品和国外参考标准品的效价较高，溶解时需要间断振荡 30min。溶解后的标准品可在冰箱内保存，但不得超过 14d。使用前应充分振荡 3min 以上。配置各稀释度时，每个稀释度至少要振荡 30s。稀释后的内毒素溶液不宜长时间保存，因其吸附性会导致其活性下降，影响对照试验结果。标准品溶解后的保存条件应予验证。

细菌内毒素工作标准品主要用于试剂的灵敏度复核、样品检验的方法验证（抑制和增强试验）以及常规检验的阳性对照。由中国药品生物制品检定所发放的细菌内毒素工作标准品是统一经国家标准品标定过的，效价控制在 50EU/支或 100EU/支。

对新购的细菌内毒素工作标准品，可先用国家标准品复核其效价。而新购的鲎试剂，也要进行鲎试剂灵敏度复核。复核时依照细菌内毒素检查步骤，用规定灵敏度的试剂对细菌内毒素 RSE 和 CSE 的各个稀释度进行凝胶对照试验，每个稀释度用 4 支相同的小试管，分别计算二者的反应终点浓度对数的算术平均值，RSE 的单位为 EU/ml，CSE 的单位为 ng/ml。将二者比较后就得到 CSE 的效价 EU/ng。所有的实验都应被详细记录以备查询。具体复核方法与有关操作可参照本书第九章的细菌内毒素检查法操作规范内容，并按规范要求做好详细原始记录。另外《中国药典》（2005 年版）亦正式收载定量法的操作，对新购的细菌内毒素检测仪器和定量法鲎试剂也要进行验证检查确认。

(二) 细菌内毒素验证品

细菌内毒素验证品(挑战品)是用于干热法去热原工艺验证的对照品。按规定,一个合格的干热去热原工艺,应使细菌内毒素至少下降3个对数单位lgRD(美国药典规定lgRD ≥ 3 干热程序有效,而欧洲药典认为lgRD ≥ 4 才有效)。方法是分别测定内毒素验证品在去热原工艺处理前和处理后的内毒素含量变化的方法,来评价去热原工艺条件的可靠性。其操作过程包括:

1. 稀释标准内毒素 认真阅读标准细菌内毒素瓶标签说明并弄清其效价。通常标签上标有批号、效期、效价(如2.5mg/vial, 6EU/ng)以及加入鲎试验用水的规定量(5.0ml)后内毒素的浓度(如500mg/ml),同时还规定了内毒素复溶后的保存条件(通常为2~8℃下保存4周)。

打开瓶塞(或安瓶),用无热原移液器移取规定量的鲎试验用水于标准内毒素瓶内,塞上瓶塞,于涡旋振荡器上充分间断性振荡30min,以使内毒素充分溶解。根据复溶后的内毒素初始浓度用鲎试验用水做系列稀释,直至浓度为 $(1.5 \sim 3.0) \times 10^4$ EU/ml。

2. 容器分装内毒素验证品 在层流工作台内向每只洁净的容器内加入上述稀释的细菌内毒素溶液0.1ml(细菌内毒素含量为1500~3000EU/容量),再将加有上述内毒素的容器敞口于层流台内风干12h以上,待容器内水分全部风干后,用已去热原的铝箔封口。

3. 验证试验容器的复核 任取上述风干后的验证试验用容器两只,分别加入适量的鲎试验用水,并于涡旋振荡30min,以使内毒素充分复溶,根据细菌内毒素检查,可用半定量法或定量法分别测定其内毒素含量。

如果上述两验证试验容器的测绘结果均在1500~3000EU/容器之间,则可在验证瓶上贴上标签,注明名称、标准内毒素含量及分装日期等,同时做好分装记录(表3-9)。如果上述两验证试验容器至少有1只不在上述范围内(1500~3000EU/容器),则分装的内毒素验证试验容器不合格,不得用于去热原工艺验证。合格的内毒素验证试验瓶在2~8℃下保存,可在4周内使用。

4. 内毒素验证瓶的使用

(1) 验证瓶放置的位置要求 严格按照热分布或热穿透试验(物理验证)时的温度探头分布要求分布放置验证试验瓶,尽可能放置在腔室的最冷点处,每只瓶均应做好相应的分布位置标记,以便于追溯。

(2) 测定内毒素含量 内毒素验证瓶经去热原工艺处理后应立即放入已去热原的洁净容器中,密封后送至实验室。如不能及时检测,应于2~8℃下保存,并在1周内检测完毕。检测时,向每只验证瓶内加入适量的鲎试剂用水,于涡旋振荡器充分间断性振荡15min后,按照细菌内毒素检查法检查,用半定量法或定量法测定内毒素的含量。

(3) 去热原性能的计算 按lgRD = lg 起始内毒素含量值 - lg 去热原处理后的内毒素含量值公式计算出每只验证瓶的起始内毒素含量的对数值以及经去热原处理后的内毒素含量的对数值,然后再计算出两者之差,即为每只验证瓶的内毒素所下降的对数单位(lgRD)。每只验证瓶的内毒素对数下降单位应不得少于3个。验证时要做填写好验证结果记录表(表3-9与表3-10)。

5. 细菌内毒素干热验证示范实例 采用定量法检查干热前后内毒素的衰减，用以验证烘箱的除热原（除内毒素）能力。

干热验证用内毒素 5000EU/瓶，测定实际可回收的内毒素量，取 5 瓶，检测结果如下：

3600 3100 *3300 3100 2900 (EU/瓶) 平均 3200EU/瓶

回收率为 69%，按烘箱大小合理布置内毒素，干热后取出检查，共 9 瓶

结果为 <0.005 <0.005 <0.005 <0.005 <0.005 <0.005 <0.005 <0.005
<0.005 (EU/瓶)

平均值为 <0.005；内毒素的对数衰减单位 $\lg RD = \lg 3200 - \lg 0.005 = 5.81$

$\lg RD$ 至少为 5.81。

内毒素对数下降单位大于 3，烘箱的除热原（除内毒素）能力通过验证。

表 3-9 标准内毒素验证试验瓶制备记录表

验证试验用标准内毒素：

供应商_____ 批号_____ 效价_____ 有效期_____

鲎试剂_____ 供应商_____ 批号_____

灵敏度_____ 有效期_____

内毒素工作标准品

供应商_____ 批号_____ 效价_____ 有效期_____

鲎试剂用水：

供应商_____ 批号_____ 内毒素含量_____ 有效期_____

标准内毒素的复溶与稀释：

复溶体积_____ ml/瓶装_____ 复溶后内毒素浓度_____ EU/ml

系列稀释步骤：

最终稀释浓度_____ EU/ml 操作者_____ 日期_____

内毒素的分装：

每瓶加入标准内毒素最终稀释浓度的体积数_____ ml/瓶

分装瓶数_____ 瓶

层流台内风干时间：_____ 日 _____ 时 _____ 分 至 _____ 日 _____ 时 _____ 分

确认干燥后，用胶塞密封。

验证试验瓶内毒素含量复核（方法号_____）

瓶号	标准要求 EU/瓶	实验结果 EU/瓶	结论
1			
2			
操作人： 日期：			
复核人： 日期：			

贴标签并于 2~8℃ 下保存，备用。

有效的验证瓶总数_____ 瓶 有效期至_____ 年 _____ 月 _____ 日

表 3-10 干热灭菌去热原工艺验证——内毒素验证试验记录

验证设备_____ 程序_____ 验证序号_____
 验证日期_____ 验证时间_____ 运行负责人_____
 验证试验用内毒素：
 供应商_____ 批号_____ 效价_____ 有效期_____
 验证瓶内毒素含量_____ EU/Vial 分装日期_____
 鲎试剂：
 供应商_____ 批号_____ 灵敏度_____ 有效期_____
 内毒素工作标准品：
 供应商_____ 批号_____ 效价_____ 有效期_____
 鲎试剂用水：
 供应商_____ 批号_____ 内毒素含量_____ 有效期_____
 内毒素分析结果：

验证瓶 编号	内毒素含量			验证瓶 编号	内毒素含量		
	处理前	处理后	对数下降值		处理前	处理后	对数下降值
1				11			
2				12			
3				13			
4				14			
5				15			
6				16			
7				17			
8				18			
9				19			
10				20			

细菌内毒素最小下降值_____个对数单位

分析员签名_____ 日期_____ 复核员签名_____ 日期_____

结论_____

实验室主管签名_____ 日期_____

(三) 凝胶鲎试剂灵敏度复核

《中国药典》(2005年版)规定：“当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能影响检验结果的改变时，应进行灵敏度的复核试验”。为什么要进行复核呢？有人认为可以不用进行。其实进行复核的目的最重要的是对检测者的操作、环境条件、试剂、水平条件进行验证。以证实操作正常无误，准确可靠，结果可信。因此每批新的鲎试剂在用于试

验前都要进行灵敏度的复核。

灵敏度复核的具体步骤：

1. 细菌内毒素标准溶液的制备 取细菌内毒素标准品（100EU/支）或工作标准品（10EU/支）1支，轻弹瓶壁，使粉末落入瓶底，再用砂轮在瓶颈上部轻轻划痕，75%乙醇棉球擦拭后启开，启开过程防止玻璃屑落入瓶内。按标准品使用说明书，加入规定量的BET水溶解其内容物，用封口膜将瓶口封严。置旋涡混合器上混合15min，然后进行稀释，制备成4个浓度的细菌内毒素标准溶液，即2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ（制备过程见图3-2），每稀释一步均应在旋涡混合机上混合30s。（详细过程请参照使用说明书，旋涡混合的原理见后述）

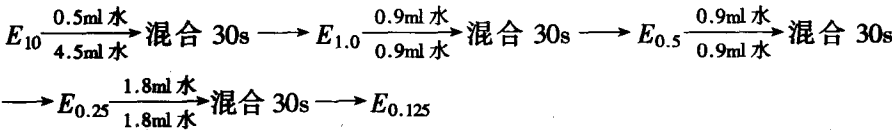


图 3-2 2λ、1λ、1/2λ、1/4λ 浓度的系列溶液稀释

2. 待复核鲎试剂的准备 取规格为0.1ml/支的鲎试剂18支，轻弹瓶壁使粉末落入瓶底。用砂轮在瓶颈轻轻划痕，75%乙醇棉球擦拭后启开备用，防止玻璃屑落入瓶内，加入0.1mlBET水溶解，轻轻动瓶壁，使内容物充分溶解，轻轻动瓶壁避免产生气泡。若待复核鲎试剂规格不是0.1ml/支时，取若干支按标示量加入BET水复溶，充分溶解后将鲎试剂溶液混和在一起，然后每0.1ml分装到10mm×75mm凝聚管中，要求至少分装18支管备用。

3. 加样 将已充分溶解的待复核鲎试剂18支（管）放在试管架上，排成5列，其中4列4支（管），1列2支（管）。4列4支（管）每列每支分别加入0.1ml的2.0λ、1.0λ、0.5λ、0.25λ的内毒素标准溶液；另2支（管）加入BET水。如表3-11所示。

表 3-11 灵敏度复核试验的排列 λ = 0.5 EU/ml

(EU/ml)		$E_{2\lambda}$	E_{λ}	$E_{0.5\lambda}$	$E_{0.25\lambda}$	NC
		1.0	0.5	0.25	0.125	
鲎 试 剂	1 [#]	0.1ml 水	0.1ml 水	0.1ml 水	0.1ml 水	0.2ml BET 水
	2 [#]	+	+	+	+	
	3 [#]	0.1ml $E_{2\lambda}$	0.1ml E_{λ}	0.1ml $E_{0.5\lambda}$	0.1ml $E_{0.25\lambda}$	
	4 [#]					

4. 加样结束后，将鲎试剂用封口膜封口，轻轻振动混匀，避免产生气泡，连同试管架放入36℃±1℃水浴或适宜恒温器中，试管架保持水平状态，保温60min±1min，观察并记录结果。将试管架从水浴中轻轻取出，避免振动，将每管缓缓倒转180°观察，管内的凝胶不变形，不从管壁滑脱者为阳性，记录为（+）；凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为

阴性, 记录为 (-)。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。(图 3-3 试管翻转 180°)

5. 实验结果计算 若最大浓度 2λ 管均为阳性, 最低浓度 0.25λ 管均为阴性, 阴性对照管为阴性时试验为有效。按下式计算反应终点浓度的几何平均值即为鲎试剂灵敏度的复核结果 (λ_c)。

$$\lambda_c = \lg^{-1} (\sum X/4)$$

式中 X 为反应终点浓度的对数值 ($\lg$)。反应终点浓度是指系列递减的内毒素浓度中最后一个呈阳性结果的浓度。

6. 结果判断 当 λ_c 在 0.5λ ~ 2λ (包括 0.5λ 和 2λ) 时判定该批鲎试剂的灵敏度复核合格, 可用于干扰试验和供试品细菌内毒素检查, 并以 λ (标示灵敏度) 为该批鲎试剂的灵敏度。

7. 灵敏度复核试验旋涡混合的原理 操作时为什么要用旋涡混合? 主要是与内毒素的化学成分及结构有关。内毒素的化学成分是脂多糖 (LPS)。LPS 是具有疏水端和亲水端的两性分子, 多糖链具有亲水性, 脂肪链具有疏水性。内毒素溶于水时, LPS 的亲水糖链和水接触, 而疏水性的脂肪链部分聚集成团, 形成直径约为 0.1μm 的双层壳状或泡囊, 导致 Lipid A 藏于聚集团内部或吸附于器皿壁上而 Lipid A 是激活鲎试剂的活性部分, 在水溶液中, 由于其疏水性而不能与鲎试剂充分接触, 造成检测到的内毒素含量偏低。若在检测前利用旋涡装置充分混和, 可以使吸附于器皿壁上的内毒素分子脱落, 聚集团的分子量下降。经振荡后的内毒素溶液重新静置一段时间后, 内毒素仍然会重新聚集成团或吸附在器皿壁上, 所以内毒素溶液存放一段时间后, 在使用前一定需充分混合 (图 3-4)。



图 3-3 试管翻转 180°

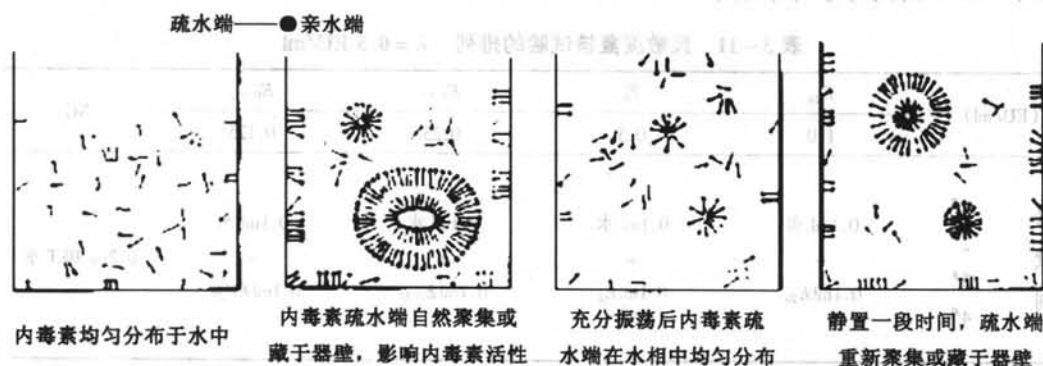


图 3-4 细菌内毒素在水中的状态

8. 灵敏度复核试验计算举例 某鲎试剂 ($\lambda = 0.5 \text{ EU/ml}$) 灵敏度复核试验反应结果如表 3-12 所示, 计算判断灵敏度复核试验是否符合规定。

表 3-12 灵敏度复核反应结果

(EU/ml)	2λ	λ	0.5λ	0.25λ	NC	反应终点	X
	1.0	0.5	0.25	0.125			
1*	+	+	+	-	-	0.25	-0.602
2*	+	+	-	-	-	0.5	-0.301
3*	+	+	-	-	-	0.5	-0.301
4*	+	+	-	-	-	0.5	-0.301

$$\begin{aligned}
 \lambda_c &= \lg^{-1} (\sum X/4) \\
 &= \lg^{-1} \frac{\sum (-0.602) + (-0.0301) + (-0.0301) + (-0.0301)}{4} \\
 &= \lg^{-1} (-0.376) \\
 &= 0.42 \text{ EU/ml}
 \end{aligned}$$

即灵敏度复核值 $\lambda_c = 0.42 \text{ EU/ml}$ 。由于 $0.5\lambda < \lambda_c < 2\lambda$ ，本批鲎试剂的灵敏度标示值正确，符合规定，按标示值 $\lambda = 0.5 \text{ EU/ml}$ 使用。

若复核的结果不是内毒素最大浓度 (2λ) 4 管全阳性，最小浓度 ($1/4\lambda$) 4 管全阴性，本批鲎试剂不能使用，须查找原因。可能是灵敏度标示不准确，或是内毒素效价标示不准确，或是操作不当的原因导致，应重试。

(四) 光度法标准曲线的可靠性试验

光度测定法分为浊度法和显色基质法。浊度法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中浊度变化而测定内毒素含量的方法。根据检测原理，可分为终点浊度法和动态浊度法。终点浊度法的原理是反应混合物的内毒素浓度和其在孵育终止时的浊度（吸光度或透光率）之间存在着量化关系。动态浊度法是检测反应混合物的浊度到达某一预先设定的吸光度所需要的反应时间，或是检测浊度增长速度的方法。

显色基质法是检测鲎试剂与内毒素反应过程中产生的凝固酶使特定底物释放出呈色团的多少而测定内毒素含量的方法。根据检测原理，分为终点显色法和动态显色法。终点显色法依据的是反应混合物的内毒素浓度和其在孵育终止时释放出的呈色团的数量之间存在的量化关系。动态显色法是检测反应混合物的色度到达某一项预先设定的吸光度所需要的反应时间，或检测色度增长速度的方法。

光度测定法需要配置相应的测定仪器（图 2-10、图 2-11、图 2-12）与专用鲎试剂进行。

当使用新批号的鲎试剂或试验条件发生了任何可能会影响检验结果的改变时，必须进行标准曲线的可靠性试验。标准曲线的制备程序如图 3-5 所示。

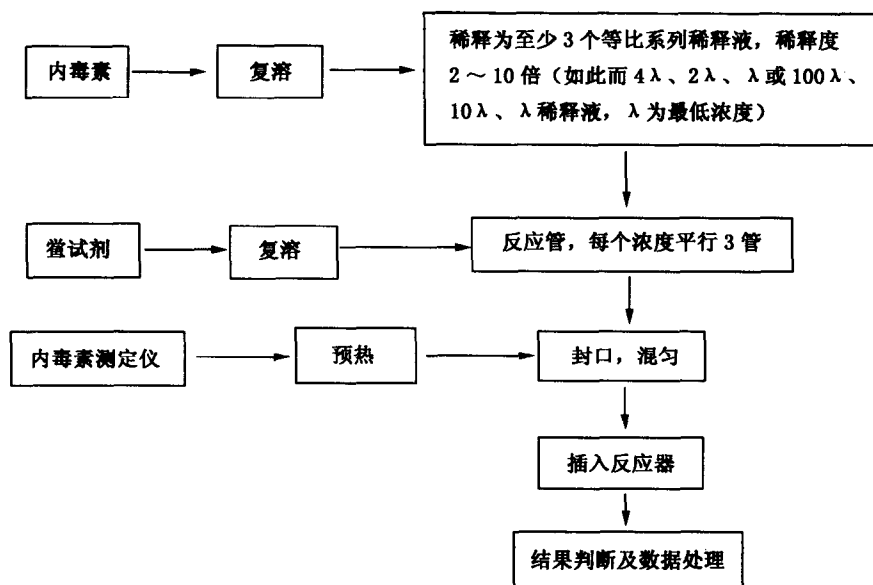


图 3-5 标准曲线的制备程序

用标准内毒素配成溶液并制成至少 3 个浓度的稀释液 (稀释度不得大于 10), 最低浓度不得低于所用鲎试剂的标示检测限。每一稀释步骤的混匀时间同细菌内毒素检查凝胶法的要求, 每一浓度至少做 3 支平行管。同时要求做 2 支阴性对照。当阴性对照的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间时, 将全部数据进行线性回归分析。

根据线性回归分析, 标准曲线的相关系数 $|r|$ 的绝对值应大于或等于 0.980, 试验方为有效。否则须重新试验。

光度法标准曲线的可靠性试验的具体操作可参见第九章二、细菌内毒素检查 (三)。

细菌内毒素检查注意事项: ①实验前, 须用肥皂洗手, 用 75% 乙醇 (最好用叔丁醇代替乙醇) 棉球消毒; ②使用洗耳球、移滴管取样时, 应注意不要将洗耳球中的气体吹入溶液中, 以防止气体中的内毒素进入供试液; ③实验操作应在清净环境中进行, 过程应防止微生物的污染; ④溶解鲎试剂及混匀供试品和鲎试剂时, 不要剧烈振荡, 避免产生气泡; ⑤由于凝集反应是不可逆的, 所以在反应过程中观察结果时应注意不要使试管受到振动, 以免使凝胶破碎产生假阴性结果; ⑥进行干扰试验时, 标准对照系列和内毒素的供试品溶液系列应同时进行; ⑦在进行灵敏度复核、干扰试验和供试品内毒素检查时, 各个实验要求的对照应同时进行, 并在有效的情况下才能进行计算和判断。

第四章 消毒剂的使用及效力验证

清洁和消毒工艺的监控与评价是良好的微生物检控系统的体现，药品、食品、化妆品等不仅在生产过程中会受到微生物的污染，在检验过程中也会被污染，除非生产和实验室设施的微生物污染处于受控制状态或者完全被消除（如采用隔离技术）。

破坏细菌营养体（细胞）或抑制细菌生长（细胞增殖）是控制微生物生长繁殖的两种最基本方法。而在实际的控制过程中，可采取物理方法、化学方法来控制或处理。物理方法是通过物理手段将携带有微生物的粒子或废物从控制性环境中清除，而化学方法则是用化学消毒剂将环境中的微生物杀灭或降低其在环境中的污染程度。

习惯上，我们将能够杀灭或抑制微生物生长的试剂（通常不能杀死芽孢）统称为消毒剂，而这种方法与措施称之为消毒。能杀灭所有微生物含杀死芽孢的方法与措施称之为灭菌。为了适应现代医药工业、食品工业和化妆品等的卫生管理及控制要求，因此，使用消毒剂杀灭环境中微生物，是一项非常普遍与重要的工作，它对保证生产过程中免受或减少微生物污染起重要保障作用。本章将详细阐述消毒剂的性质、性能、使用和质量控制。

一、消毒剂与灭菌剂的划分

（一）卫生处理与卫生洗涤剂

卫生处理（sanitization）是指用化学试剂减少环境、空气、物料（体）上活性微生物数量的过程。用于卫生处理的化学试剂称为卫生洗涤剂（sanitizer），通常标准是它能使普通微生物的营养细胞数在30s内下降5个对数单位（下降99.999%）或使病原微生物的细胞数在30s内下降3个对数单位（99.9%）。卫生洗涤剂不能杀灭芽孢，并且在土壤存在的条件下不能杀灭活性微生物，它们常用于清洁无生命的物体，如餐具、茶具、厨房用具等。在许多制药企业的实验室或生产区，卫生洗涤剂也常被用于洁净区环境的清洁与卫生。

（二）消毒与消毒剂

消毒（disinfection）是指用化学试剂抑制或杀灭环境、空气、物料（体）上的病原微生物的过程。消毒时所有的化学试剂称为消毒剂（disinfectant），消毒剂能使病原微生物数量在4~10min内下降5个对数单位（99.999%），或使病原微生物数量在30s内下降3个对数单位（下降99.9%）。消毒剂与卫生洗涤剂的主要区别在于，消毒剂具有更强的杀菌效果并且能杀灭致病微生物，消毒剂在土壤中亦能发挥杀菌作用。常用消毒剂有75%乙醇或异丙醇溶液、0.04%~0.1%新洁尔灭、3%过氧化氢溶液等。消毒剂不能用于人体的口服、皮肤与注射，而是只能用于医疗上的化学药物（试剂）。

与消毒剂作用十分类似，我们称之为抗菌剂（antiseptics），当用于对黏膜和皮肤消毒

时, 抗菌剂对黏膜和皮肤安全且无害, 这正是抗菌剂与消毒剂的主要区别所在。例如, 0.05% 碘伏溶液是一种常见的抗菌剂。

(三) 灭菌与灭菌剂

灭菌 (sterilization) 是指用物理或化学的方法清除或杀灭环境、空气、物料 (体) 上的一切活的微生物, 包括致病性和非致病性微生物以及含杀死芽孢在内。美国医学会药物和化学理事会指出: 灭菌是绝对的而不是相对的, 一件物品要么无菌, 要么有菌。灭菌剂 (sterilant) 是指能够杀灭一切微生物 (包括细菌繁殖体、芽孢、真菌、病毒等) 的药剂。常见灭菌剂有: 戊二醛、氧化性试剂 (如环氧乙烷、过氧乙酸、过氧化氢、二氧化氯) 和甲醛等, 从广义上讲, 灭菌剂也应包括那些能达到同样作用的物理方法, 例如, 热力灭菌、电离辐射灭菌、过滤除菌等。所有的灭菌剂均为优良的消毒剂。

二、微生物对消毒因子的敏感性

一般认为, 微生物对消毒因子的敏感性从高到低的顺序为: ①亲脂病毒 (有脂质膜的病毒), 例如乙型肝炎病毒、流感病毒等; ②细菌繁殖体, 例如金黄色葡萄球菌、大肠杆菌等; ③真菌, 例如白色念珠菌、黑曲霉等; ④亲水病毒 (没有脂质包膜的病毒), 例如甲型肝炎病毒、脊髓灰质炎病毒等; ⑤分枝杆菌, 例如结核分枝杆菌、龟分枝杆菌等; ⑥细菌芽孢, 例如炭疽杆菌芽孢、枯草杆菌芽孢等; ⑦朊病毒 (感染性蛋白质)。

三、消毒剂的效力等级与消毒效力评价

根据消毒剂对不同类别的微生物的杀灭效果, 可将消毒剂分为三个级别: 高效消毒剂 (HLD), 可以杀灭一切细菌繁殖体 (包括结核分枝杆菌)、病毒、真菌及其孢子等各种微生物, 对细菌芽孢杀灭达到消毒效果的消毒剂; 中效消毒剂 (ILD), 可以杀灭和去除细菌芽孢以外的各种病原微生物的消毒剂, 包括碘类消毒剂 (碘伏、碘酊等)、醇类、醇类和氯己定的复方、醇类和季铵盐 (包括双链季铵盐) 类化合物的复方、酚类等; 低效消毒剂 (LLD), 只能杀灭细菌繁殖体和亲脂病毒的消毒剂, 包括单链季铵盐类 (苯扎溴铵等)、双胍类消毒剂如氯己定等。表 4-1 是适用于制药工业最常见的消毒剂效力等级分类表。

表 4-1 依微生物类型确定消毒剂的效力等级

效力级别	细菌芽孢	细菌营养细胞	真菌	真菌孢子
低 (LLD)	-	+	±	-
中 (ILD)	- ^①	+	+	-
高 (HLD)	+ ^②	+	+	+ ^②

注: - 表示几乎没有或没有杀灭效果; + 表示有相当杀灭效果; ± 表示杀灭效果较温和; ①某些中效消毒剂, 如次氯酸盐, 也能杀灭芽孢; 像乙醇或酚类等其他消毒剂, 则不能杀灭芽孢; ②用高效消毒剂杀灭高数量的细菌芽孢或真菌孢子时, 须延长其接触时间。

而对消毒剂的消毒效果进行评价, 多数情况下, 通过消毒处理后, 应至少下降 3~5 个对数单位才能证明消毒剂的杀菌效力。USP 认为, 杀芽孢剂 (sporicide) 的效力应能使

细菌芽孢下降 3~5 个对数单位。

四、影响消毒剂效力的主要因素

研究已经表明,有许多因素可以影响消毒剂的消毒效果,了解影响消毒剂效力的主要因素,有助于在配制、贮存和使用过程中对消毒剂加以妥善正确处理,以确保其维持最强的杀菌效力。

(一) pH

pH 的改变可以从两方面影响杀菌效果,一是对消毒剂的作用,可以改变其溶解度、离解程度和分子结构;二是对微生物的影响,大多数微生物能生长的 pH 范围是 6~8, pH 过高或过低对微生物的生长均有影响。例如,戊二醛的杀菌作用与其和氨基反应有关,这种反应在 $\text{pH} \geq 7$ 时最迅速,所以戊二醛虽然在酸性 pH 时稳定,但在碱性 pH 时杀菌作用强。在碱性 pH 时,细菌带的负电荷增多,有利于阳离子型消毒剂发挥作用,对于阴离子型消毒剂来说,在酸性条件下效果好,因为此时细菌表面的负电荷减少。

(二) 温度

温度是影响消毒剂效力的另一重大因素,消毒速度一般随温度的升高而加快,但温度变化对各种消毒剂影响的大小不同。一般来说,如果温度按等差级数增加,则杀菌速度按几何级数增加。

(三) 有机物

有机物常以血清、血液、脓液、痰液、泥土、食物残渣、粪便、培养基成分等形式出现,其存在可干扰消毒剂的杀微生物作用,原因主要有两方面:①有机物在微生物的表面形成一层保护层,妨碍消毒剂与微生物的接触,或延迟消毒剂的作用,甚至使微生物逐渐产生对药物的适应性;②有机物可中和一部分消毒剂,消毒剂被有机物消耗后,则对微生物的作用浓度降低。

(四) 表面活性剂和金属离子

大分子聚合物和非离子表面活性剂可以降低对羟基甲酸脂类和季铵盐类消毒剂的作用,在有吐温存在时,需要加大消毒剂的浓度。阴离子表面活性剂可以降低季铵盐类和洗必泰的消毒作用,因此应注意不能将新洁尔灭等消毒剂与肥皂及阴离子洗涤剂合用。

金属离子的存在对消毒效果也有一定的影响,可以降低或增加消毒作用。在存在低浓度二价阳离子时,阴离子表面活性剂对葡萄球菌的抗菌作用加强,在存在 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Ba^{2+} 离子时,长链脂肪酸的杀菌作用大大降低。由于 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 离子对一些消毒剂的消毒效果有影响,所以目前在消毒学试验中广泛使用硬水,以便使研究的消毒剂在硬水地区也能使用。

(五) 水

消毒剂配制用水的质量会影响消毒剂的杀菌效力。水的硬度、微生物和化学物质均会

对消毒剂的效力产生不良影响,因此,建议用纯化水配制消毒剂;由于消毒剂的稳定性和杀菌效力会随其浓度和储藏条件而变化,因此,使用者必须按照生产商的要求配制、储存和使用消毒剂。

五、消毒剂的作用方式

消毒剂的消毒效力是多个因素作用综合的结果,既包括消毒剂本身的作用,也包括待消毒表面所含有的微生物数量和种类。通常应考虑的主要因素是消毒剂是否易于杀灭营养态的细菌细胞或是否能杀灭对消毒剂具有很强耐受力的芽孢。另一个必须要考虑并需强调的因素是在细菌存在的地方是否还有其他物质存在,如血、粪便和有机物等。这些污染物的存在指示了该表面并不清洁,并且能够迅速钝化一些杀菌剂,减弱它们的效力,如次氯酸盐等。

然而,从消毒剂本身的作用来看,杀菌剂既可通过袭击细菌细胞的某一特殊部位而发生作用,也可通过破坏它的某一组分来发挥作用。根据它们对细菌的作用方式,可把消毒剂分为以下四类:

(一) 使蛋白质变性、凝固

如重金属盐类、酸、碱等化学消毒剂,可以破坏蛋白质的结构,也就是使生物蛋白质变性,同时就意味着蛋白质的生物学功能丧失。蛋白质凝固变性,丧失了生命力,自然就会死亡。细菌含大量蛋白质,蛋白质的变性导致细菌结构的破坏和功能的丧失,最后导致细菌的死亡。

(二) 破坏或损伤细胞膜

杀菌剂,如二氧化氯和过氧乙酸,它们都是强氧化剂,能够全面破坏引起细胞膜的结构与功能,导致细胞膜的关键功能结构丧失,这个过程导致细胞的真正死亡。

(三) 阻断食物摄取和废物排泄

某些消毒剂,如季铵盐类化合物,它们在水溶液中带正电荷,能把自己附着在细胞膜上的某个特殊位置,攻击细胞上带负电荷的部分,最终的结果是季铵盐基团阻断了营养物质运输到细胞内,并阻止了堆积在细胞内的废物向外排泄。实际效果是,细胞饥饿死亡和被细胞内堆积的废物毒死。

(四) 钝化关键酶的活性

酶是一切生物的活性催化剂,细胞的生长和繁殖以及为生长裂殖提供能量的代谢活动都和细胞酶活性有关,这些酶能够支持细胞的生长和代谢活动(代谢能够提供给细胞生长和裂殖提供能量)。酶活性的丧失,生命便可消失。一些消毒剂,如苯酚、酚醛类等,它们能够进入细胞内并和某些关键酶发生化学反应,从而使酶活性丧失,导致细菌的生长和代谢受阻,然而假如钝化作用不够完全,酶活性有可能会被修复,这样受伤的细菌在几个小时以后能够恢复生长能力并重新污染表面。

六、细菌对消毒剂的耐受性

当细菌细胞被作用于消毒剂中时,细菌中的多种结构就会受到不可逆转的损伤或损害作用。如细菌细胞的增殖能力的丧失通常就被称为是微生物死亡。但是在消毒过程中,一些细菌细胞往往能够耐受消毒剂的作用,尽管它们的增殖能力会暂时丧失,但是过一段时间之后,它们的增殖能力又会恢复,从而使消毒过程无效。这就是细菌对消毒剂的耐受性,产生这种耐受性与多种因素有关。通常细菌产生耐受性的几种方式是:

(一) 具耐受性的细菌和不能完全致死的消毒剂剂量

在某一特定的群体中,细菌对于某一特定的消毒剂剂量敏感范围很宽。在正常的接触条件下,消毒剂能够杀灭 99.999% 的细菌。从本质上讲,清洁前含 $1\,000\,000\text{ CFU/cm}^2$ 的表面有望在消毒后仅含 10 个细菌。在这个假想的条件下,细菌数量减至了安全水平,达到了消毒过程目的。问题在于 10 个耐受住了消毒程序的残存菌,会成为再次污染的潜在因素。对表面进行充分地润洗,那么这 10 个残存菌会耐受住第二个消毒过程而残存下来,其他种类的细菌也会发生这个过程。过了一段时间并经历了几次消毒和清洁过程之后,具有了耐受力残存者们有能力进行增殖。当这个过程发生以后,工厂就得重新寻找办法处理那些对这种杀菌剂已经不再有反应的细菌。

(二) 分泌多聚糖样物质黏附细菌,共同形成生物膜

生物膜的形成是细菌耐受消毒剂的另一种机制。某些细菌能分泌一种多聚糖样的物质,这种多聚糖组成了一层薄膜,这些分泌物有着很强的黏性,能把细菌本身牢固地黏附在金属上面,这样就形成了一层含有细菌的膜,也就是我们所指的生物膜。形成生物膜的细菌本身也许是无害的或者不是病原菌,然而,由它们的分泌物形成的凝胶矩阵却能够把它们自己黏附牢并且能够把病原菌包埋其中,如李斯特菌。尽管这些病原菌对于生物膜的形成没有任何作用,然而它们却能污染和该表面接触的产品。

凝胶矩阵对于化学去除剂有非常好的耐受性,因此生物膜一旦形成就难于去除,通常需要高于正常浓度的碱试剂或是具有强氧化性的消毒剂才能奏效,而完全去除生物膜通常需要几种方法并用。

(三) 清洁剂之间的交互作用钝化消毒剂效力

大部分清洁剂既含有非离子型的表面活性剂(乳化剂和清洁剂),也含有阴离子型的表面活性剂或者是两者组合成的混合物。在溶液中,非离子型的表面活性剂电性为中,但是阴离子型的表面活性剂却带有负电荷。当该清洁剂被直接用于含有土壤的表面上时,大部分效力在 15~20min 之内耗尽。然而,极少量消毒剂,也就是那些在水溶液中呈现阴离子状态并最先作用于表面的消毒剂成分却留在了表面上。在施用季铵盐类消毒剂之前,假如该表面没有被充分润洗,那么带正电荷的季铵基团就会与带负电荷的残留消毒剂发生中和反应,这些消毒剂就会被完全钝化,形成了阴离子-季铵基团复合物或无杀菌作用的膜,消毒剂完全丧失了效力,更有甚者,在形成的季铵盐复合膜中也会含有一些利于细菌

生长的营养物质。假如没有仔细检查,这样的复合物实际上就能支持细菌的裂殖。

七、消毒剂的选择和交替使用

目前国际上公认的理想消毒剂的7条标准是:①杀菌谱广,作用快速;②性能稳定,便于储存和运输;③无毒无味,无刺激,无致畸、致癌、致突变作用;④易溶于水,不着色,易去除,不污染环境;⑤不易燃易爆,使用安全;⑥受有机物、酸碱和环境因素影响小;⑦作用浓度低,使用方便,价格低廉。选择消毒剂时务必考虑以下因素:需消毒表面与消毒剂本身的适应性、产品的完整性、人员的安全性、环境中微生物的菌群、消毒剂的使用方法频率等。另一个重要因素是消毒剂要交替使用。定期交替使用不同消毒剂是为了防止环境中的微生物因对同一种消毒剂产生耐受性而影响实际的消毒效果。不得将非同种类的消毒剂联合或混合使用,否则,很可能会引发危险的或致命的化学反应并产生有毒化合物。

很多消毒剂在使用后都有残留,经过不断积累并给消毒效果造成不良影响。此外,残留于设备或设施的消毒剂会影响外观,使设备看上去很脏。因此,在消毒剂的使用过程中,应定期用纯水或乙醇为溶媒的试剂对有消毒剂残留物的设备(设施)表面加以清洗。尤其是当交替使用的消毒剂的化学性质不兼容时,清洗就显得更加重要。有一些消毒剂的效力能被另一种消毒剂的残留物钝化(减弱杀菌效果),季铵盐类化合物和苯酚类化合物尤为如此。清洗用水或试剂在使用前要经过灭菌或除菌处理,以避免已被消毒过的表面因清洗而发生二次污染。

GMP明确要求交替使用消毒剂,并已成为一种惯例,已在制药工业广泛实施。据调查表明在欧美国家交替使用消毒剂的制药企业占到95%以上。在文件ISO TC209中也建议交替使用消毒剂。

八、制药工业常用的消毒剂

在制药工业,最常用的消毒剂主要是醇类、酚类和季铵盐类试剂以及二氧化氯、醛类、过氧化物类和含氯消毒剂等。

(一) 醇类

醇类消毒剂具有悠久的历史,也有其重要的地位。短链脂肪醇具有快速杀灭微生物的作用,其杀菌效果属于中等水平,主要用于皮肤消毒。由于其价格低廉,无色,使用方便,所以得到了广泛的应用,并以乙醇为最好,其次是异丙醇。

乙醇之所以能消毒,其作用机制主要是使微生物的蛋白质变性,而且乙醇具有很强的渗透作用,比较容易渗透到菌体内,使得细菌细胞破坏溶解,乙醇还可通过抑制细菌物酶系统,特别是脱氢酶和氧化酶等,阻碍细菌的正常代谢,从而抑制其生长繁殖。在没有水的情况下,蛋白质不易被变性,因此,在乙醇中加入一些水会使杀菌效力更佳,研究表明,70% (W/W) 乙醇比其他浓度的乙醇更为有效,实际上70% (W/W) 的浓度相当于77% (V/V) 的浓度,为配制方便起见,可改为80% (V/V) 或75% (V/V) 的浓度,大部分药厂都使用75% (V/V) 的乙醇或异丙醇来消毒工作台面、物料和操作人员手套。以

乙醇为基质的化合物之所以被制药企业普遍使用是因为它们蒸发后没有任何残留。乙醇能够迅速杀灭细菌繁殖体,在较高体积分数(80%)时,具有很好的杀病毒作用,乙醇对真菌也有抑制和杀灭作用。然而,乙醇的杀菌效力是有限的,特别是它对从人体表面散发到环境中的一些微生物的消毒效果并不理想,乙醇只能抑制细菌芽孢发芽,但并不能杀灭芽孢,并且乳胶手套上的微孔会削弱乙醇类消毒剂的杀菌效力。要想使洁净区内微生物得到有效控制,务必要使用比乙醇消毒效力更强的消毒剂与乙醇消毒剂交替轮换使用。

由于乙醇易挥发且易燃,在实验室要按照易燃易爆物品的保管要求予以保存。

(二) 酚类化合物

酚类消毒剂是消毒剂中种类较多的一类,而且其使用已有一百多年的历史了。此类化合物的抑菌谱很广,包括对 G^+ 细菌和 G^- 细菌以及真菌均有杀伤作用。酚类消毒剂适宜用水溶液或含乙醇的水溶液配制,多数产品的使用有效浓度为 4 亿分之一到 13 亿分之一之间。酚类化合物对芽孢的杀伤力不强,不宜用作杀芽孢剂。酚类化合物对有机物具有较好的耐受性,但水中钙镁离子会降低其杀菌效果。酚类消毒剂会产生残留物,但能被生物降解,该特性对环境保护、废物处理和生态环境的影响非常重要,研究表明,所有的酚类化合物都能被生活在土壤、堆肥和废水池中的某些微生物降解。目前,在制药业使用最多的酚类消毒剂主要有两种,即酸性酚类消毒剂和碱性酚类消毒剂。国内较常用的酚类消毒剂是煤酚皂溶液(liquid of cresol with soap)又称为来苏尔(Lysol),其主要成分是甲酚,约占 50%,其他成分是植物油、氢氧化钠等,经皂化作用制成。酚类消毒剂适用于消毒地面、墙壁以及那些不与药品接触的表面,它们对人体的毒性较低并且对多数材料的腐蚀性也相对较小。

(三) 季铵盐类化合物

季铵盐类化合物是一类阳离子表面活性剂,季铵盐消毒剂在低浓度下即有抑菌作用,较高浓度时可杀灭大多数种类的细菌繁殖体和部分病毒,但不能杀灭细菌芽孢,属低效消毒剂。季铵盐类消毒剂因其性质稳定、易于贮存、毒性腐蚀性较小、刺激性小,被广泛应用,目前,大约有 30% 的制药公司使用季铵盐类消毒剂,新洁尔灭(苯扎溴铵)是一种常见的季铵盐类消毒剂。这类消毒剂的杀菌效力会被肥皂、阴离子型去污剂和有机物钝化,会因产生泡沫而引发一些问题。如果季铵盐类消毒剂的配制水中含菌量过高,那么其消毒效力就会被削弱。由于季铵盐类消毒剂对 G^- 细菌(包括铜绿假单胞菌)的杀伤力较差, G^- 细菌不仅可在此类消毒剂中存活,而且可能增殖,因此,通常需要在这类产品中加入表面活性剂 EDTA 以增强其杀伤效力,季铵盐类消毒剂也不能杀细菌芽孢和真菌孢子,尽管它在液态下很稳定,但是,使用液在配制后的 3~4 个星期即变得不稳定。

(四) 液体灭菌剂和杀芽孢剂

有些化学试剂在高浓度下延长消毒时间就能将芽孢或真菌孢子杀灭。可用作杀芽孢或孢子的消毒剂有二氧化氯、戊二醛、甲醛、过氧化氢、过氧乙酸、次氯酸钠等。

1. 二氧化氯 二氧化氯(ClO_2)是汉弗莱·戴维于 1811 年发现的。根据浓度的不同,

二氧化氯是一种黄绿色气体，具有与氯气相似的气味，760mmHg 时沸点 11℃，密度为 3.09g/L。

空气中的体积浓度超过 10% 便有爆炸性，但在水溶液中是十分稳定的。二氧化氯在水中溶解成黄绿色的溶液，它在水中不水解，也不聚合，在 pH = 2 ~ 9 范围内以一种溶解的气体存在，具有一定的挥发性。二氧化氯是一种强氧化剂，与 Cl₂ 很大的不同是与酚反应不产生异味很大的氯苯酚，与有机物、无机物反应有很强的选择性，这使二氧化氯与腐殖质及有机物反应几乎不产生发散性有机卤化物（TOX），不生成并抑制生成致癌作用的三卤甲烷（TMH）。另外，二氧化氯也不与氨及氨基化合物反应。二氧化氯作为一种强氧化剂，它能有效破坏水体中的微量有机污染物，如苯并芘、蒽醌、氯仿、四氯化碳、酚、氯酚、氰化物、硫化氢及有机硫化物等，氧化有机物时不发生氯代反应。ClO₂ 能很好地氧化水中的还原状态的金属离子，如 Fe²⁺、Mn²⁺、Ni²⁺ 等，特别是 ClO₂ 可将以有机键合形式存在的 Fe²⁺、Mn²⁺ 氧化，因此 ClO₂ 有很强的去除水体中 Fe²⁺、Mn²⁺ 的作用。二氧化氯及水溶液受紫外线照射或受热后会渐渐分解，分解产物有 Cl₂、O₂、HClO、HClO₃ 和 HCl 等。为了克服其不稳定性缺点，以便运输和贮存，一般将其制成 2% 稳定性二氧化氯溶液，使用前以柠檬酸等酸活化出二氧化氯即可。

二氧化氯是国际上公认高效消毒剂，普遍认为其对微生物的杀灭机制为：二氧化氯对细胞壁有较强的吸附穿透能力，可有效地氧化细胞内含巯基的酶，还可以快速地抑制微生物蛋白质的合成来破坏微生物。二氧化氯可以杀灭一切微生物，包括细菌繁殖体、细菌芽孢、真菌及其孢子、分枝杆菌和病毒等，此外二氧化氯还具有除藻、防腐、防霉、保鲜、除臭及漂白脱色等多方面的功能，可广泛用于食品工业、医药工业、污水处理、水产养殖、餐馆旅游业及家居消毒等。经急性口毒性试验表明，二氧化氯消毒灭菌剂属实际无毒级产品，用其消毒的水体不会对口腔黏膜、皮肤和头发产生损伤，二氧化氯不与水体中的有机物作用生成三卤甲烷等致癌物质，对高等动物细胞、精子及染色体无致癌、致畸、致突变作用，并且二氧化氯使用量很低，因此用二氧化氯消毒十分安全，无残留毒性，其安全性被世界卫生组织（WHO）定为 AI 级。二氧化氯灭菌消毒经美国食品药品监督管理局（FDA）和美国环境保护署（EPA）的长期科学实验和反复论证，考验了二氧化氯对饮用水的处理效果后，被确认为是医疗卫生、食品加工中的消毒灭菌，食品（肉类、水产品、果蔬）的防腐、保鲜，环境、饮水和工业循环水及污水处理等方面杀菌、消毒、除臭的理想药剂，是国际上公认的最理想的更新换代产品。

2. 醛类化合物 醛类消毒剂是最早使用的消毒剂，目前在消毒应用中使用最多的是甲醛和戊二醛，戊二醛用于临床比甲醛要晚半个世纪。甲醛主要被用作气雾型消毒剂，甲醛熏蒸消毒，方便简单、费用较低、对物品无损害，因此曾有比较广泛的应用，但由于熏蒸消毒时需特殊装置才能形成蒸汽，环境温度较低时甲醛穿透力差，消毒效果不可靠，消毒后残留的甲醛聚合物难以清除等，目前其应用已逐渐减少。戊二醛主要用于不耐热的医疗器械和精密仪器，尤其是内窥镜的消毒和灭菌，通常用 2% 戊二醛浸泡或擦拭进行消毒灭菌。我国《消毒技术规范》规定：对医疗器械进行灭菌处理，需 2% 戊二醛溶液浸泡 10h；一般细菌繁殖体污染物品的消毒，2% 戊二醛溶液浸泡或擦拭 10min；肝炎病毒污染表面的消毒，浸泡或擦拭 30min。

3. 过氧化物 过氧化物消毒剂的共性是杀菌物质的分子中都有“过氧键”，主要靠过氧键断裂过程中产生的新生态氧起到消毒杀菌作用，应用较广泛的过氧化物消毒剂有过氧化氢和过氧乙酸。过氧化氢作为消毒剂使用一百多年了，过氧化氢可有效杀灭各种细菌繁殖体、真菌、结核杆菌、细菌芽孢和病毒。一些不怕湿不耐热的器材，可用6%~10%的过氧化氢水溶液浸泡10min，即可达到灭菌要求；将过氧化氢进行汽化，引入真空灭菌柜内，可用于对怕热医疗器材的灭菌；过氧化氢经过超声波、微粒子（气溶胶）喷雾器雾化成气溶胶，对室内空气或物体表面都可以达到良好的消毒效果。过氧乙酸是一种酸性强氧化剂，具有使用浓度低，杀菌作用强，消毒时间短，分解物无毒等优点，在-20℃的低温下仍有很强的杀菌作用，可广泛应用于医疗、食品、畜牧、养殖等行业。过氧乙酸是一种高效消毒剂，可用于灭菌，对各种微生物均有很强的杀灭作用，其消毒效果比石炭酸强100倍，远较来苏尔、新洁尔灭、乙醇、碘伏、福尔马林等常用消毒液强，过氧乙酸在水溶液、蒸汽和气溶胶状态都有良好的杀菌效果。

4. 次氯酸钠 工业品次氯酸钠为无色或淡黄色的液体，含有效氯100~140g/L。次氯酸钠是一种高效、快速、广谱消毒剂，可有效杀灭各种微生物。其杀菌机制主要基于次氯酸，次氯酸钠在水中形成次氯酸，次氯酸是不带电荷的中性分子，分子量很小，易扩散到带电荷的菌体内部，使菌体蛋白质被氧化而致细菌死亡。此外，氯及次氯酸分解产生的新生态氧也能氧化菌体蛋白质。实验表明含一定浓度有效氯的次氯酸钠溶液作用指定的时间，可以有效杀灭大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌等细菌繁殖体；可有效杀灭白色念珠菌、热带念珠菌等真菌和结核杆菌；对口蹄疫、HIV、Polio等病毒亦能灭活；对不同细菌芽孢的杀灭效果也很好。由于次氯酸钠具备了杀菌快速、使用方便、价格低廉等优点，所以在各行各业的消毒中得到广泛的应用。

表4-2列出了制药工业常用消毒剂和以及它们的杀菌效力。

表4-2 液体消毒剂的杀菌效力等级表

类型	常用浓度	消毒效力
酚类	0.4%~0.3%	中效
季铵盐类	0.1%~0.2%	低效
醇类（乙醇、异丙醇）	75%	中效
戊二醛	2%	高效
甲醛	1%~8%	高效
次氯酸钠	20亿分之一~10亿分之一	高效
过氧化氢	3%~6%	高效
过氧乙酸	0.2%~0.5%	高效
二氧化氯	2.5亿分之一~0.1亿分之一	高效

九、消毒剂的效力确认

作为使用者，每个公司都应当为消毒剂在各种不同的使用条件下的消毒效果进行评

价, 因为消毒剂的杀菌效果会受到被消毒表面的类型、与被消毒的接触时间以及相关设施中的微生物种群的影响。消毒剂的生产供应商常用从环境中分离的常见微生物做效力评价测试, 而这些实验菌株可能与用户实际环境中的微生物有较大差别。因此, 制药企业还应当用从自己环境中分离的微生物来测定消毒剂对这些微生物的杀灭效果。

(一) 确认时需要考虑的因素

在消毒确认试验的准备过程中, 生产企业应考虑以下几个方面的问题: ①基于消毒剂本身的消毒能力进行评价。②选择合适的试验方案。③审计生产(供应)商。

对于消毒效力已被得到公认的消毒剂而言。选取适当的试验方法和验证菌株是非常重要的。例如, 某种消毒剂已被认为是低效力的并且不能杀灭芽孢, 那么, 就不能将枯草芽孢杆菌作为该消毒剂效力测试的试验菌株。

由于没有特定的测试方法要求, 不同企业可采用不同的实验方案。试验方案要与自身的消毒表面类型以及环境中的微生物种群相结合。理想的做法是将试验方案分为实验室考察现场考察两部分。

(二) 现场考察

现场考察试验用以评估消毒剂对相应设施的实际消毒效力。此类试验是通过监测清洁(消毒)前、后的环境微生物学质量进行的。经历一段时间后才能积累用以评估消毒和清洁程序的数据(建议至少3次试验)。为了获得更好的评价结果, 可以在最差条件下(如预防性维修之后)检测环境的污染状况, 因为此时环境中的微生物种类和数量有上升的潜在可能性。一般说来, 试验方法要求, 在清洁后环境中微生物数量应控制在警戒限度以内。

(三) 实验室考察

实验室对消毒剂的杀菌效力测定方法是参照美国政府农业化学师学会(AOAC)制定的消毒剂效力测定法。用于消毒剂效力测试的标准方法见 AOAC Official Method 960.09 "Germicidal and Detergent Sanitizing Action of Disinfectants"; 用于灭菌剂或杀芽孢剂效力测试的标准方法见 Method 966.04 "Sporicidal Activity of Disinfectants"。当然, 有时刻限于实验室的实际实验条件, 可以对标准方法做适当地调整和修改。

在我国, 消毒剂的效力验证还可以参照中华人民共和国国家标准 GB15981-1995《消毒与灭菌效果的评价方法与标准》以及中华人民共和国卫生部的《消毒技术规范》。通常建议使用金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538 作为细菌繁殖体中化脓性球菌的代表; 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) 8099 作为细菌繁殖体中肠道菌的代表; 白色葡萄球菌(*Staphylococcus albus*) 8032 作为空气中细菌的代表; 龟分枝杆菌脓肿亚种(*Mycobacterium chelonae* subsp. *abscessus*) ATCC 93326 作为人结核分枝杆菌的代表; 枯草杆菌黑色变种芽孢(*Bacillus subtilis* var. *niger*) ATCC 9372 作为细菌芽孢的代表; 白色念珠菌(*Candida albicans*) ATCC 10231 和黑曲霉菌(*Aspergillus niger*) ATCC 16404 作为致病性真菌的代表; 脊髓灰质炎病毒-I型疫苗株(*Poliovirus*-I)作为病毒的代表。在此基础上, 根据

消毒剂特定的用途或试验特殊需要，还可增选其他菌、毒株。

实验室对消毒剂的杀菌效力测定方法常有定量悬浮试验法、载体浸泡定量试验法、表面试验法、工作液直接接种法等多种试验方法，本书重点介绍前两种方法，其他方法可参见有关参考书。无论何种方法一定要经验证实可靠后方可用于生产实践中。

(四) 定量悬浮试验

定量悬浮试验是评价消毒剂杀菌效果常用的一种定量试验方法。

1. 试验原理 将定量的指示菌悬液加入消毒剂溶液中，作用一定时间。经中和剂去除残留的消毒剂影响后，定量接种于平皿上，倾注培养基，经培养后计算其菌落数。与未经消毒剂作用的对照菌液平皿计数相比较，计算出杀菌率。

2. 试验器材 试验菌种、培养基、中和剂、稀释液、电动混合器、秒表、刻度吸管、恒温水浴箱。

3. 试验步骤 (1) 用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液配制试验用菌悬液，浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/ml。

(2) 将消毒剂用蒸馏水稀释至待测浓度，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

(3) 吸取试验菌液 0.5ml，加入含消毒剂溶液 4.5ml 的试管中，迅速混匀并立即计时。

(4) 待试验菌液与消毒剂相互作用至预定时间，吸取 0.5ml 菌药混合液，加入 4.5ml 经灭菌的中和剂中，迅速混匀。

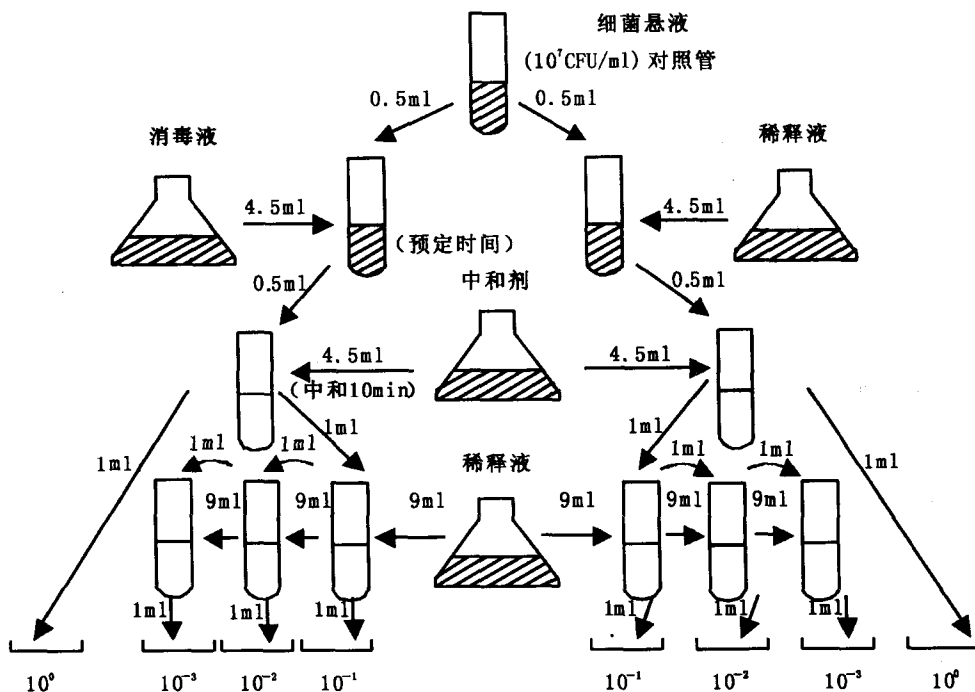


图 4-1 定量悬浮试验示意

(5) 中和 10min 后, 进行系列 10 倍稀释, 分别吸取 1.0ml 样液 (原液、稀释液), 按活菌培养计数方法测定存活菌数, 每管样液接种 2 个平皿。

(6) 同时用稀释液代替消毒液, 进行平行试验, 作为阳性对照。

(7) 细菌营养体试验样本在 37℃ 温箱培养 48h, 观察最终结果; 细菌芽孢试验样本在 37℃ 温箱培养 72h, 观察最终结果; 真菌试验样本在 30℃ 温箱培养 48 ~ 72h, 观察最终结果。

(8) 试验重复 3 次, 计算各组的活菌数, 计算杀菌率。

图 4-1 为定量悬浮试验示意图。

定量悬浮试验不仅用于常规消毒效果测定, 也可用于消毒剂的杀菌作用及其影响因素的试验。消毒剂浓度、作用时间、试验菌株以及是否加入有机物等可根据试验目的设计。

4. 消毒效力评价 一般采用杀菌率表示消毒剂杀菌能力。

杀菌率 = $[(\text{对照组平均活菌数} - \text{试验组活菌数}) / \text{对照组平均活菌数}] \times 100\%$

同时亦有用平均杀菌率及 95% 可信限表示。

例 1: 如某消毒剂进行的定量悬浮试验得出以下 (表 4-3) 试验结果, 求其杀菌率是多少?

表 4-3 定量悬浮试验结果

	对照管生长菌落数	试验管生长菌落数
原液	无法计数	无法计数
10^{-1}	无法计数	88
10^{-2}	无法计数	6
10^{-3}	110	0

$$\begin{aligned} \text{杀菌率} &= [(\text{对照组平均活菌数} - \text{试验组活菌数}) / \text{对照组平均活菌数}] \times 100\% \\ &= [(110\ 000 - 880) / 110\ 000] \times 100\% = 99.2\% \end{aligned}$$

例 2: 某消毒剂消毒前菌数为 400 000/ml, 消毒后两次试验 10^{-1} 稀释液生长菌落数分别为 38/ml 和 34/ml, 求其平均杀菌率及 95% 可信限。

$$m = [(38 + 34) / 2] \times 10 = 360$$

Poisson 分布的均数等于方差, 当均数 (m) 增加到 k 倍时, 方差 (σ^2) 增加 k^2 倍,

$$S_m = \sqrt{m/n \times k^2}。$$

$$\begin{aligned} \text{代入公式 } S_m &= \sqrt{m/n \times k^2} \\ &= \sqrt{36/2 \times 10^2} \\ &= 42.4 \end{aligned}$$

式中 S_m 为标准误, m 为均数, n 为样品数。

消毒后菌数 (m) 95% 可信区间 = $m \pm t \times S_m$

$$= 360 \pm 1.96 \times 42.4 / \text{ml} = 277 \sim 443 / \text{ml}$$

杀菌率的 95% 可信限 = 消毒前菌数 - 消毒后菌数 / 消毒前菌数

$$= [(400\ 000 - 443) / 400\ 000] - [(400\ 000 - 277) / 400\ 000]$$

$$= 0.9989 \sim 0.9993$$

答：该消毒剂的杀菌率为 42.4；杀菌率的 95% 可信限为 0.9989 ~ 0.9993。

(五) 载体浸泡定量试验

1. 试验原理 原理与定量悬浮试验相类似，本试验先将指示菌悬液定量接种到载体上，再将载体加入到消毒剂中作用至约定时间后，把载体取出加入中和剂内中和，定量接种于平皿上，倾注培养基，经培养后计算其菌落数。与未经消毒剂作用的对照菌液平皿计数相比较，计算出杀菌率。

2. 试验器材 试验菌种、载体、培养基、中和剂、稀释液、电动混合器、秒表、刻度吸管、恒温水浴箱。

3. 试验步骤 (1) 用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液配制试验用菌悬液，浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8$ CFU/ml。

(2) 用相应方法将载体染菌（滴染法、浸染法、喷染法等），每片载体回收菌数应为 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ CFU/片（按活菌培养计数所得结果），染菌载体可置 37℃ 温箱内干燥备用。

(3) 将消毒剂用蒸馏水稀释至待测浓度，置 $20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 水浴备用。

(4) 按每片 5.0ml 的量吸取消毒剂注入无菌小平皿中，用无菌镊子取 3 片预先制备的菌片放入平皿中，并使之浸透于消毒液中。

(5) 待菌药相互作用至约定时间，用无菌镊子将菌片取出分别移入含 5.0ml 中和剂试管中。用电动混合器混合 20s，使菌片上的菌体被洗脱进入中和液中，再放置 5min 以上，使中和作用充分。最终进一步混匀后，进行系列 10 倍稀释，分别吸取 1.0ml 样液（原液、稀释液）接种平皿，每管接种 2 个平皿，测定存活菌数。

(6) 另取一平皿，注入 10.0ml 稀释液代替消毒液，加入 2 片菌片，作为阳性对照组。其随后的试验步骤和活菌培养计数与上述试验组相同。

(7) 细菌营养体试验样本在 37℃ 温箱培养 48h，观察最终结果；细菌芽孢试验样本在 37℃ 温箱培养 72h，观察最终结果；真菌试验样本在 30℃ 温箱培养 48 ~ 72h，观察最终结果。

(8) 试验重复 3 次，计算各组的活菌数，计算杀菌率，计算公式同定量悬浮试验。

十、消毒剂稀释液的效期确认

很多化学消毒剂的有效成分易于分解或挥发，因此，假如企业配制了消毒剂以备将来使用，那就必须证明该稀释过的消毒液在储藏期间是稳定的并且杀菌效力不变。此类确认实验务必要考虑供应相关消毒剂的使用、配制和储藏方面的建议。一般说来，在确认消毒剂的有效期时，总是将配制目的消毒效力测定结果与预定效期日的效力检测结果作对比性评价。多采用定量悬浮试验或载体浸泡定量试验法确认消毒剂的效期。

为了确定消毒液在有效期依然有效，试验结果应证明，在有效期末的消毒剂工作液能使细菌的活细胞的下降数量不低于 3 ~ 5 个对数单位；对杀孢子剂而言，消毒剂的工作液应能使芽孢的下降数量不低于 3 ~ 4 个对数单位。

用于消毒液效期确认的试验方法须经过验证。验证方法同前述。

对于消毒效果已得到公认的消毒剂,其稀释液的效期确认亦可通过测定有效成分含量的方法进行。

综上所述,制药工业和食品工业等行业现对消毒剂的使用和确认已经越来越引起执法部门的重视,制药、食品企业也越来越意识到验证清洁或消毒程序的必要性。然而,在验证方法的选择上依然有很多灵活性,并且在多数情况下都是依照自己的实际条件来制定测试方法。最好是将实验室考察与现场考察相结合。

研究表明,Letheen 肉汤(含 0.1%大豆卵磷脂和 0.7%聚山梨酯)适用于中和酚类和季铵盐类消毒剂,硫代硫酸钠(常用浓度 0.5%)适用于中和含氯类消毒剂、含碘类消毒剂、过氧乙酸等,其他的氧化性试剂可用硫乙醇酸盐液体培养基中和。

此外,企业还应重视清洁或消毒方案的变更管理。经常评估清洁或消毒程序并将环境监测数据作趋势分析。最好每年进行一次回顾总结,以确保是否需要进行额外的培训、确认试验和清洁消毒方案的修订等。

十一、培训和安全教育

各企业必须对员工进行消毒剂的管理规程培训和安全教育,可通过定期或不定期的不断培训与进行教育,以确保操作人员了解这些知识,并能在工作中正确执行。同时确保在消毒剂的使用现场有消毒剂的管理规程(SOP),内容应包括配制、贮存、使用以及使用后的废液处理等,此外,限制性地合理使用消毒剂。不仅确保安全而且也会降低成本。

十二、消毒剂消毒效果验证实验(定量悬浮试验)实例

(一) 验证原理

将定量的指示菌悬液加入消毒剂溶液中,作用一定时间。经中和剂去除残留的消毒剂影响后,定量接种于平皿上,倾注培养基,经培养后计算其菌落数。与未经消毒剂作用的对照菌液平皿计数相比较,计算出杀菌率,以评估消毒剂的杀菌效力。

(二) 验证材料

- (1) 消毒剂:结合工厂实际自选。
- (2) 指示菌:大肠埃希菌(*Escherichia coli*) 8099;金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) ATCC 6538;枯草杆菌黑色变种芽孢(*Bacillus subtilis* var. *niger*) ATCC 9372;白色念珠菌[*Candida albicans*] ATCC 10231]。
- (3) 培养基:营养琼脂培养基、营养肉汤培养基。
- (4) 中和剂:1%的卵磷脂;1%的卵磷脂+0.1%聚山梨酸 80;硫代硫酸钠。
- (5) 稀释液:无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液(PBS)。
- (6) 电动混合器。
- (7) 恒温水浴箱。
- (8) 秒表。
- (9) 分度吸管及试管等。

(三) 验证方法 (定量悬浮试验)

1. 指示菌 (细菌繁殖体) 悬液的制备

(1) 取冻干菌种管, 在无菌操作下打开, 以毛细吸管加入适量营养肉汤, 轻柔吹吸数次, 使菌种融化分散。取含 5.0 ~ 10.0ml 营养肉汤培养基试管, 滴入少许菌种悬液, 置 37℃ 培养 18 ~ 24h。用接种环取第一代培养的菌悬液, 划线接种于营养琼脂培养基平板上, 于 37℃ 培养 18 ~ 24h。挑取上述第二代培养物中典型菌落, 接种于营养琼脂斜面, 于 37℃ 培养 18 ~ 24h, 即为第三代培养物。

(2) 取菌种第三代至第四代的营养琼脂培养基斜面新鲜培养物 (18 ~ 24h), 用 5.0ml 吸管吸取 3.0 ~ 5.0ml 稀释液加入斜面试管内, 反复吹吸, 洗下菌苔。随后, 用 5.0ml 吸管将洗液移至另一无菌试管中, 用电动混合器混合 20s, 使细菌悬液均匀。

(3) 初步制成的菌悬液, 先用细菌浓度比浊测定法粗测其含菌浓度, 然后以稀释液稀释至所需使用的浓度。

(4) 细菌繁殖体悬液应保存在 4℃ 冰箱内备用。应当天使用不得过夜。

(5) 怀疑有污染时, 应以菌落形态、革兰染色与生化试验等方法进行鉴定。

2. 中和剂鉴定试验

(1) 目的 观察所用中和剂是否对测试消毒剂有良好的中和作用, 对试验用细菌以及其恢复期培养是否有害或不良影响。

(2) 试验分组

第 1 组: 消毒剂 + 菌悬液 → 培养 观察消毒剂对试验菌有无杀灭或抑制能力。

第 2 组: (消毒剂 + 菌悬液) + 中和剂 → 培养 观察残留消毒剂被中和后受到消毒剂作用后的试验菌是否能恢复生长。

第 3 组: 中和剂 + 菌悬液 → 培养 观察中和剂是否抑菌。

第 4 组: (消毒剂 + 中和剂) + 菌悬液 → 培养 观察中和产物, 或未被完全中和的残留消毒剂对试验菌的生长繁殖是否有影响。

第 5 组: 稀释液 + 菌悬液 → 培养 作为菌数对照。

第 6 组: 稀释液 + 中和剂 + 培养基 → 培养 作为阴性对照。

(3) 评价规定 试验结果符合以下全部条件, 所测中和剂可判为合格。①第 1 组无试验菌, 或仅有少数试验菌菌落生长。②第 2 组有较第 1 组为多, 但较第 3、4、5 (组) 为少的试验菌菌落生长, 并符合表 4-4 要求者。

表 4-4

第 1 组平板平均菌落数	第 2 组平板平均菌落数
0	> 5
x	> (x + 5)
y	> (y + 0.5y)

③第 3、4、5 (组) 有相似量试验菌生长, 其组间菌落数误差率应不超过 15%。第

3.4.5 组间菌落数误差率计算公式如下:

$$\text{组间菌落数误差率} = \frac{(\text{三组间菌落平均数} - \text{各组菌落平均数}) \text{的绝对值之和}}{3 \times \text{三组间菌落平均数}} \times 100\%$$

④ 第6组无菌生长。否则,说明试剂有污染,应更换无污染的试剂重新进行试验。

⑤ 连续3次试验取得合格评价。

3. 定量悬浮试验

(1) 将消毒剂用蒸馏水稀释至试验浓度,置 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 水浴备用。

(2) 用无菌蒸馏水或磷酸盐缓冲液将试验菌配制成试验用菌悬液,浓度为 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$ 浓度的菌悬液。

(3) 将试管按需要数量分组排列于试管架上,试验组分3组并由左向右逐管标上消毒剂、中和剂、 10^{-1} 、 10^{-2} ,对照组分两组并由左向右逐管标上稀释液、中和剂、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 。

(4) 向各管中加入4.5ml相应试剂,标明 10^{-1} 、 10^{-2} 等试管加稀释液。

(5) 吸取试验菌液0.5ml,加入标明消毒剂的试管中(对照组加入标明稀释液的管中),迅速混匀并立即计时。

(6) 待试验菌液与消毒剂相互作用至预定时间,吸取0.5ml菌药混合液,加入标明中和剂的试管中,迅速混匀。

(7) 中和作用10min后,吸取0.5ml样液加入标明 10^{-1} 的试管中,混匀后吸取0.5ml样液加入标明 10^{-2} 试管中(对照组如此类推,至最后1管)。

(8) 按活菌培养计数方法测定存活菌数,试验组取中和剂管、 10^{-1} 、 10^{-2} 管测定存活菌数,对照组取 10^{-3} 、 10^{-4} 管测定存活菌数,每管样液接种2个平皿,每平皿接种样液1ml。

(9) 所有试验样本在 37°C 温箱培养48h,观察最终结果。

(10) 记录试验结果(按表4-3格式记录),计算各组的活菌数,计算杀菌率,评估消毒剂杀菌效力。(计算方法见实例。)

第五章 培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液和试剂的验证

药品的无菌检查及药品的微生物限度检查、抗生素的微生物效价测定等的微生物实验操作离不开培养基。而微生物生长、分离、鉴别、保存也要使用到培养基，此外在实验中要制备保护微生物菌种的缓冲液、稀释样品的稀释液或淋洗器具及滤膜用的淋洗液、以及在菌种鉴定中用于生化反应的各种指示剂等一系列的试剂。这些培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液、及指示剂等配制是开展微生物实验的重要基础工作。如果培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液、试剂配制有误，那么由此而得到的实验结果都是不可靠的。因此，有关培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液和试剂的配制也是 GMP 认证中检查、关注的重要领域内容。

一、培养基的概念与分类

培养基是指人们根据微生物生长繁殖所需的各类营养物质，按一定的浓度由人工方法混合配合而成的用于培育微生物生长的一类营养基质而称之。培养基是微生物生长的物质基础，是微生物检测工作的重要基础工作。按使用时的不同物理状态，培养基可分为：液体培养基、半固体培养基、固体培养基 3 种。根据不同用途（使用目的），培养基又可分为：基础培养基、富集培养基（营养或增殖培养基）、选择性培养基、鉴别培养基、厌氧培养基 5 类。另外按其营养成分和浓度是否已知可分为：合成培养基（营养成分和浓度已知）、天然培养基（营养成分和浓度未知）2 种。有关培养基的基础知识可参考有关专著和其他有关微生物学教科书。

二、培养基的制备、融化程序的确认及注意事项

（一）培养基的制备

微生物实验室所用培养基可按药典规定检查方法中所列的培养基配方配制，也可使用复合型的干燥培养基，或是使用已配制且分装好的成品培养基。干燥培养基是将新鲜配制的液体培养基用不同的方法使水分去掉；或将培养基内的各种固形成分，经过适当的处理，充分混匀，使成干燥的粉末状。用时只要按比例加入一定量的蒸馏水，经过溶解、分装、高压蒸汽灭菌，即可应用。其优点是节省培养基配制时间，携带方便，使用简易，特别使用于一般流动性及设备简单的小型实验室。目前，国内外已有多家生产，如法国生物梅里埃公司、美国密理博公司的产品、中国药品生物制品所监制的产品和广东省环凯微生物科技有限公司的产品（图 5-1），其制造方法有下列几种：喷雾法、真空法、烘干法、蒸发法、球磨法。

药品微生物限度检验、无菌检验、抗生素效价测定、药敏试验及其抗菌、防腐等项微生物检测中，培养基的质量好坏、稳定与否，对检验结果有极为重要的影响。但因培养基

的配方中各原料成分的理化性能、稳定性不同,致使检验结果有较大差异,即使同一厂家生产的同一型号的原料产品,各个批号之间质量都有较大的差异,加上各地实验室配制培养基的方法不一,同一实验生长有显著不同。为此培养基的质量标准十分重要。干燥培养基,使用方便,节约人力、物力、时间,是培养基标准化的必由之路。按说明书要求称取适量后加水溶解配制,所用培养基质量必须符合药典规定的灵敏度检查试验及无菌性检查试验才可用于检验。



图 5-1 广东省环凯微生物科技有限公司

生产的各类干燥培养基

配制培养基、缓冲液、试剂等时,称量要迅速以免吸潮而影响称量的准确性,同时为避免增加培养基等中的金属离子及其他微量化学元素而影响微生物的生长、鉴别、所用器具、容器应为洁净玻璃制品,所用溶解用水应为纯水或蒸馏水。加热溶解时不断搅拌促进培养基充分溶解,采用直火加热时易使培养基结底炭化而影响营养度和澄明度,可用沸水浴或隔套蒸锅通过蒸汽加热。然后调节 pH,按规定的要求分装,容器封口后用经验证过的灭菌程序灭菌。灭菌程序的参数应记录于高压灭菌柜的使用日志及相应的配制记录中。注意灭菌后物品应有适当措施防止再次污染。制备某些选择性培养基或淋洗液需在使用前向培养基中加入 β -内酰胺酶等试剂时,务必确保所加入剂的无菌性和质量保证。

制备好的培养基、缓冲液等应及时抽取适量用于检查 pH、无菌性、灵敏度等质量是否符合规定。微生物检验用培养基、缓冲液及试剂的配制应有原始记录供追溯检查。所有相关信息包括:名称、处方原材料、称量数、稀释溶解量、灭菌条件、灭菌程序参数,制备日期、制备人签名、质量检查结果等,都必须在原始记录或工作日志上反映出来。

(二) 培养基融化程序的确认

装于试管瓶内的成品固体培养基,在使用前需将其融化。这一融化过程也同样需要确

认,以保证培养基的营养成分不会因过度加热而受影响。

一般培养基应只能进行1次蒸汽灭菌处理,否则,重复高温加热会破坏培养基的营养成分。因此,不宜使用蒸汽灭菌柜融化琼脂培养基,宜选用沸水浴或微波炉融化培养基。因沸水浴的温度始终控制在100℃以内,相当安全,但对装量较大的培养基要使融化均匀充分,则加热的时间较长,微波炉融化培养基具有快速的优点。

至少选择3批具有代表性的不同类型培养基,对其融化前后的质量进行对比检查。确认时,应对不同融化法的运行参数(时间和温度)予以明确设定,确认合格后,将其写入相应的标准操作规程中。如果一台设备可以设定多个参数,建议在其最高和最低设定值下分别进行确认试验,以确定正常的使用范围。有关抗生素效价分析用培养基的融化过程确认方法,要参照有效期的确认试验方法进行。

(三) 培养基制备应注意事项

1. 常用玻璃仪器的准备

制备培养基所用的吸管、锥形瓶、毛细吸管、平皿等玻璃仪器用前要用肥皂水洗刷后用清水冲洗干净,晾干后备用。

(1) 平皿用纸或布包好,或装在金属盒内,于121℃高压蒸汽灭菌20min后烘干,备用。

(2) 试管管口用棉花塞或硅氟塑料试管塞塞好,再用布或报纸包扎好,121℃高压蒸汽灭菌20min后烘干,备用。

(3) 吸管及滴管先用少许棉花塞于吸口端(防止污染物吸出,或橡皮帽内的气体污染),然后用纸包后或装入金属吸管筒内,于121℃高压蒸汽灭菌20min后烘干,备用。其他玻璃器皿均应按上法处理,也应装金属筒内160℃干热灭菌2h后,备用。

2. 培养基的制备及储存

(1) 溶化 一般应放在玻璃器皿或搪瓷齐内。加入蒸馏水,隔水加热以促其溶解,加热时应经常搅拌,防止焦结,待其溶解后补足水分。

在使用干燥培养基时,先将蒸馏水按定量加入容器中,然后称取一定量培养基干粉放入水中,静置10~15min,搅拌,振荡,或延长时间以促进溶解,一般不要热,必要时加热,但时间不宜过长,温度不宜过高,避免某些营养成分被破坏。

(2) 校正酸碱度(调节pH) 培养基必须有适当的pH。因此测定pH是培养基配制过程中的重要步骤之一,测定pH的标准温度为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。调节pH可用无菌的1mol/L氢氧化钠溶液或10%碳酸钠溶液、1mol/L盐酸溶液。当调节缓冲液的pH时,宜用6mol/L磷酸或10mol/L氢氧化钾溶液。灭菌后的pH会比灭菌前的pH升高或降低,一般高压灭菌前培养基的pH会比最终pH调高0.2左右,灭菌后基本合适。因此对培养基、缓冲液、试剂在灭菌前后的pH均进行测定,并记下每次pH的测定结果,有助于积累数据考察每种培养基、缓冲液、试剂对灭菌程序的耐受性,从而指导灭菌前pH的调节。干燥培养基一般已校正过pH,用时也必须再验证。测定时,一般用指示剂滴入培养基观察其颜色的变化,或用pH计校正,如与所需pH不符,可用以上的酸或碱液加以校正。调整pH后要加热过滤,使培养基澄清。

(3) 培养基的分装 大批量配制时使用的自动分配器须经校准和确认。每次使用前

后,均要对分配器的管道系统进行冲洗,在分装无菌培养基前,则要采用无菌硅胶管。

固体培养基一般分装在 250ml、500ml 锥形瓶中,高压灭菌后根据需要分装平皿或试管。

平皿:倾注平皿,应在无菌室中放置 3~4h,如用塑料平皿须在 35℃ 培养箱中倒置 30~60min。让水蒸汽自然蒸发。

斜面:制备低层斜面分装于试管,约占容积 1/5,灭菌后趁热斜放在细玻璃棒和木杆上,使成斜度,分装使注意管口和瓶塞上勿沾有培养基,如沾有培养基应用布抹去,以避免污染。

高层斜面:制备高层斜面分装于试管,约占试管容积的 1/3,灭菌后趁热放置成高层短斜面,待其凝固后应用。

分装好的培养基或缓冲液等及时密封后必须在配制当天(2h 内最佳)进行灭菌处理。液体、半固体培养基一般在高压灭菌前分装,约装试管容积的 1/3,在灭菌后还要加其他成分的液体、半固体培养基,灭菌后再分装于灭菌试管或锥形瓶中。

(4) 培养基的灭菌 培养基的灭菌多采用高压蒸汽灭菌,各种培养基的灭菌时间和压力,按其成分不同而定。普通培养基采用 121℃、103.42kPa 灭菌 15min,但容器和装量较大时,应延长至 20min。含糖培养基 115℃、68.85kPa 灭菌 30min。含糖、血清、鸡蛋等培养基可用流动蒸汽及血清凝固器 80~100℃、30min,连续 3 d,间歇灭菌。血清或组织液,采用低热 56~58℃ 水浴 1h,连续 5~6 d 灭菌,一些遇高温即被破坏的物质如尿素、腹水等,可用细菌过滤器,过滤除菌。高压灭菌应严格按照操作规程执行,必须逐渐加热,彻底排除灭菌器内的空气,再逐渐升压保持预定的压力和时间,达到全部杀灭微生物。以上的灭菌时间和温度要经过验证确认,如不同类型培养基混合一起灭菌时宜采用 115℃、68.85kPa 灭菌 30min 为好。

三、培养基的储存

一般来说,未开封的脱水培养基应避光储存于 25℃ 以下阴凉干燥处,开过封的脱水培养基应盖紧瓶盖注意密封储存。已配制好的培养基、缓冲液一般可储存于 2~25℃ 阴凉干燥处,有条件置冰箱冷藏储存更好,否则必须在 2 d 内使用完毕。USP 中有明确规定:置 2~25℃ 阴凉干燥处如果培养基分装并储存于非密闭性容器内(如试管、三角烧瓶),则其使用期限为 1 个月,但该培养基的灵敏度试验和其他的相关质量检查务必在距使用时的前 2 周内完成;如果培养基储存于密闭性容器(如螺旋盖瓶)内,则其使用期限为 1 年,但该培养基的灵敏度试验和其他的相关质量检查须在距使用前 3 个月内完成;如果实验室购买的成品型培养基储存于密闭容器内,实验室可抽取部分代表性样品进行无菌检查试验和灵敏度试验。并根据自己的储存条件来制定合理的培养基储存期,对培养基的存储环境条件进行监控和记录,并且要对相应的储存期和储存条件进行确认。

灭菌后的培养基等物品应置适当条件下保存至规定的有效期,并对保存条件进行确证。见表 5-1 与表 5-2。

表 5-1 无菌物品的存储条件

类型	存放条件	无菌保质期 (年、月、d)
输液瓶密封装培养基	2~8℃	1 年
输液瓶密封装淋洗液、缓冲液	室温	2 年
螺旋盖瓶装培养基	2~8℃	3 个月
螺旋盖瓶装淋洗液、缓冲液	室温	3 个月
试管装无菌培养基 (固/液)	2~8℃	14d
试管装其他的无菌试剂	室温	14d
平皿琼脂培养基	25~35℃下培养 3d 后, 存于 2~8℃	14d
取样用螺旋盖瓶	室温	7d
过滤器等无菌操作作用物品	室温, 洁净室内或层流台内	7d

表 5-2 培养基 2~8℃条件保存期限

培养基种类	保存条件	保存时间
平板培养基	不袋装	2 周
	袋装	6~8 周
试管培养基 (棉塞)	不袋装	2~4 周
	袋装	8~10 周
试管培养基 (软木塞或蜡封)	不袋装	8 周
	袋装	16~18 周

有效期已过的培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液和试剂必须立即丢弃, 不得再用于检测中。实验室应建立简易的库存控制系统, 有专人保管和建立台账, 包括品名、规格、批号、数量、有效期、进货日期、使用日期和数量、以及领用人等信息, 以随时掌握有关信息。

四、培养基的质量控制

(一) 外观检查

在配制后使用前, 要认真仔细检查培养基、缓冲液、稀释液、淋洗液等的颜色和澄明度。培养基经高温灭菌后, 颜色往往会稍微加深, 但如果颜色过深, 则表明灭菌温度过高或时间过长引起营养成分炭化。有些培养基中含有琼脂、卵磷脂等难溶组分, 如果配制时搅拌不充分, 则会导致培养基浑浊, 甚至会有颗粒样物质漂浮于培养基中。用于无菌检查的硫乙醇酸盐液体, 其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层 (粉红色) 不超过培养基深度的 1/2。所以在供试品接种前, 培养基氧化层的颜色不得超过培养基深度的 1/5, 否则, 须水浴加热煮沸以赶走溶解在培养基溶液中的氧 (粉红色消失, 时间不超过 20min), 为保证培养基的营养不被重复加热破坏, 只限于加热 1 次。

(二) pH 检查

灭菌时温度过高或时间过长会使培养基中营养成分分解而使 pH 升高或降低, pH 对微生物生长非常关键。这正是我们强调要求在灭菌前、后分别测定培养基 pH 的原因。同样, 缓冲液、淋洗液及生化反应应用指示剂等试剂均需检查其 pH 是否在规定范围内。

(三) 培养基的无菌性检查

众所周知, 培养基如果本身染菌将导致实验的假阳性结果。因此《中国药典》(2005 年版) 均规定: “无菌检查用的硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基等应符合培养基的无菌性检查及灵敏度检查的要求”。虽然《中国药典》对微生物限度检查用培养基没明确规定要进行无菌性检查, 但我们知道, 培养基如果本身染菌将导致实验失败和结果不准确。因此配制好的培养基在灭菌后要进行无菌性检查, 检查合格后才进行正常的日常检验。无菌检查用的硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基的无菌性检查方法是: 抽取一定比例样品 (每批培养基随机取不少于 5 支 (瓶)), 并将其置于按既定用途所确定的条件下 (温度、厌氧、需氧环境) 培养 14d; 观察是否浑浊及有菌生长。培养基的无菌性检查亦可与供试品的无菌检查同时进行。其他检查所用的培养基也可按此要求抽样后经适温培养一定时间检查有否微生物生产便可。至于缓冲液及相关试剂, 可按照成品的无菌检查要求, 用直接接种法或薄膜过滤法进行检查。如果使用成品型培养基, 可将所有培养基置于 30~35℃ 下预培养 14d, 以发现并剔除可能由于装运或灭菌期间容器破损而产生的污染培养基。使用前, 操作人员必须认真目检培养基或缓冲液的物理状况, 以确定是否存在微生物污染等异常迹象。

(四) 培养基的灵敏度检查 (促菌生长性)

培养基灵敏度检查 (促菌生长性) 的意义是证实在规定的实验条件下, 培养基能支持微生物的生长, 那么检品中可能存在的微生物就能在该培养基内或培养基表面生长或出现浑浊或形成菌落, 从而检测结果的真实性和防止出现假阴性。为确保培养基灵敏度 (促菌生长性) 的可靠, 灵敏度试验应做双份检查, 并且要使用低菌接种量 (菌接种量一定要控制在 100 个 CFU/ml 以内) 尤其重要。下面分别具体介绍《中国药典》(2005 年版) 无菌检查用培养基的灵敏度检查方法与微生物限度检查用培养基的灵敏度检查方法。

1. 《中国药典》(2005 年版) 无菌检查用培养基的灵敏度检查方法 《中国药典》要求对所购的每个批号的脱水培养基均进行灵敏度检查。检查的菌种有: 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]; 铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC (B) 10104]; 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) [CMCC (B) 63501]; 生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) [CMCC (B) 64941]; 白色念珠菌 (*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001]; 黑曲霉 (*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003]。

(1) 菌液制备 接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中, 30~35℃ 培养 18~24h; 生孢梭菌的新鲜培养物接种到硫乙醇酸盐流体培养基中, 30~35℃ 培养 18~24h; 白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基中,

23~28℃培养 24~48h; 黑曲霉的新鲜培养物 [方法是将黑曲霉菌接种至真菌琼脂斜面培养基上, 23~28℃培养 5~7d, 使大量的孢子产生。加入 3~5ml 0.9% 无菌氯化钠溶液, 用玻棒将孢子洗脱。然后, 用管口带有能过滤菌丝装置 (如薄的无菌棉花或纱布的无菌毛细吸管) 吸出孢子菌液至无菌试管内, 用浊度法, 将菌液稀释至每毫升含 10~100 个。] 至改良马丁琼脂斜面培养基中, 20~25℃培养 5~7 d。上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每毫升含菌 10~100 菌落形成单位 (CFU) 的菌悬液。

(2) 培养基接种 取每管装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 9 支, 分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各 2 支, 每支接种量为 1ml (含菌 10~100CFU), 另 1 支不接种作为空白对照, 培养 3d; 取每管装量为 9ml 的改良马丁培养基 5 支, 分别接种白色念珠菌、黑曲霉各 2 支, 每支接种量为 1ml (含菌 10~100CFU), 另 1 支不接种作为空白对照, 培养 5d。逐日观察结果。

(3) 结果判定 空白对照管应无菌生长, 若加菌的培养基管均生长良好, 即该培养基的灵敏度检查符合规定。

2. 微生物限度检查用培养基的灵敏度检查方法 虽然微生物限度检查用培养基的灵敏度检查《中国药典》(2005 年版) 尚没有规定, 但在生产实践中常发现有培养基的质量问题。造成培养后菌落大小、数量、培养时间均有很大的差异。为保证检验的准确性与可靠性, 笔者认为还是应进行培养基的灵敏度检查, 以保证检查的准确性。培养基按使用的不同, 可分为增菌培养基、分离培养基和鉴定培养基等。这些培养基制备后能否达到要求, 必须对它进行灵敏度检查, 这是保证微生物限度检查质量的重要环节之一。

检查的方法是利用已知标准菌株 (菌种的传代次数不得超过 5 代, 接种菌数在 100CFU/ml 以下) 做灵敏度检查。

(1) 增菌培养基及选择培养基的灵敏度检查 增菌培养基 (如肉浸汤) 的性能试验主要是定量性能试验。应接种待检细菌, 接种量宜少 (在 10~100CFU/ml)。必要时可将接种菌制成不同的浓度分别接种于培养基内, 观察能生长的最小接种浓度。接种浓度小, 说明增菌培养基性能好。选择性增菌培养基主要是定性性能试验, 观察目的菌是否生长良好, 非目的菌是否被抑制或部分被抑制。应选择用已知标准菌种在培养基上能生长的菌株做性能试验。见表 5-3。

表 5-3 增菌培养基使用的灵敏度检查

培养基	灵敏度检查使用的标准菌株	培养条件	生长情况
肉浸汤 (营养肉汤)	金黄色葡萄球菌	36℃ ± 1℃, 有氧, 18~24h	良好
	大肠埃希菌		良好
胆盐乳糖	大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 有氧, 18~24h	良好
	铜绿假单胞菌		良好
	金黄色葡萄球菌		受抑制
亚硝酸盐肉汤	金黄色葡萄球菌	36℃ ± 1℃, 有氧, 18~24h	良好
1% 葡萄糖疱肉	生孢梭菌	36℃ ± 1℃, 厌氧, 24~48h	良好

(2) 分离培养基的灵敏度检查 分离培养基(如 EMB、麦康凯、SS 琼脂)性能的好坏,主要是看所培养的目的菌能否生长良好;同时能否抑制其他细菌的生长;还要看能否与其他细菌相鉴别。如大肠埃希菌在麦康凯琼脂中呈桃红色或中心桃红、圆形扁平,光滑湿润的菌落。含某些生长因子的培养基做性能试验时,应选用该因子存在时才能生长的细菌做质控菌种。分离培养基的灵敏度检查见表 5-4。

(3) 鉴定培养基及生化鉴定用试验培养基的灵敏度检查 用已知阳性及阴性的质控菌株,经鉴定能出现预期的生化反应结果,此鉴定培养基和生化反应试验方可使用。各类生化鉴定用培养基灵敏度检查的生化特征见表 5-5,有关的实验结果分别见图 5-2、5-3、5-4、5-5、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、5-11、5-12。

表 5-4 分离培养基的灵敏度检查

培养基	菌种名称	培养条件	培养特征
曙红亚甲蓝琼脂 (图 5-2)	大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	紫黑色或中心紫黑色,表面光滑并具有金属光泽的菌落(图 5-2)
	鼠伤寒沙门菌		半透明,无色至琥珀色菌落
	金黄色葡萄球菌		受抑制
卵黄氯化钠琼脂 (图 5-3)	金黄色葡萄球菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	金黄色,圆形突起,边缘整齐,外周有乳油圈,菌落直径约 1~2mm(图 5-3)
	大肠埃希菌		受抑制
甘露醇氯化钠琼脂 (图 5-4)	金黄色葡萄球菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	金黄色,圆形突起,边缘整齐,外周有黄色环,菌落直径约 1mm(图 5-4)
	表皮葡萄球菌		红色菌落
	大肠埃希菌		受抑制
麦康凯琼脂	大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	桃红色或中心桃红、圆形,扁平,光滑湿润
	鼠伤寒沙门菌		无色半透明菌落
	金黄色葡萄球菌		受抑制
SS 琼脂	鼠伤寒沙门菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	无色至淡红色,半透明,菌落中心带黑褐色
DHL 琼脂	大肠埃希菌		部分抑制,桃红色或粉红色菌落
	金黄色葡萄球菌		受抑制
十六烷三甲基溴化铵琼脂(图 5-5)	铜绿假单胞菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	表面扁平湿润、边缘不整齐的绿色或淡绿色带荧光的菌落。图 5-5
	大肠埃希菌		受抑制
	金黄色葡萄球菌		受抑制

表 5-5 生化鉴定用培养基灵敏度检查的特征

培养基及生化试验	菌种名称	培养条件	生化特征	药检用途
MUG-I 管 (图 5-6, 图 5-7)	大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	366nmUV 下显蓝白色荧光 加靛基质试剂, 培养基变红色	大肠杆菌快速 检定
蛋白胨水 (靛基质试验) (图 5-8)	大肠埃希菌 产气肠杆菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	加靛基质试剂, 培养基变红色 加靛基质试剂, 培养基不变色	大肠杆菌鉴定
缓冲葡 v-p 试验 (图 葡萄糖 5-9)	产气肠杆菌 大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	加 VP 甲乙液, 液面显红色 加 VP 甲乙液, 液面不显红色	大肠杆菌鉴定
白胨水 甲基红试验 (图 5-10)	大肠埃希菌 产气肠杆菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	加甲基红试剂后培养基变红色 加甲基红试剂后培养基为黄色	
西蒙柠檬酸盐培养基 (枸橼酸盐利用试验) (图 5-11)	肺炎克雷伯菌 宋内志贺菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	培养基变蓝色 培养基不变色	大肠杆菌, 沙 门菌鉴定
尿素琼脂 (尿素试验) (图 5-12)	普通变形杆菌 大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	培养基变玫瑰红色 培养基不变色	沙门菌鉴定
氰化钾生长试验培养基、 氰化钾对照培养基 (氰 化钾试验)	普通变形杆菌 伤寒沙门菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	在生长试验管和对照管均能生长 在生长试验管中不生长, 在对照 管中生长	沙门菌鉴定
硝酸盐还原培养基 (硝酸盐还原试验)	大肠埃希菌 硝酸盐阴性杆菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	加硝酸盐还原试剂甲乙液变红色 加硝酸盐还原试剂甲乙液不变色	铜绿假单胞菌
明胶培养基 (明胶液化试验)	铜绿假单胞菌 大肠埃希菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	4℃呈液态 4℃呈固态	铜绿假单胞菌
绿脓菌素试验 (图 5- 13)	铜绿假单胞菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	PDP 生长后用氯仿提取绿脓色素, 然后加盐酸混合后呈粉红色	铜绿假单胞菌
氧化酶试纸 (氧化酶试 验) (图 5-14)	铜绿假单胞菌 大肠埃希菌	——	出现红色至紫黑色 不变色	铜绿假单胞菌
丙二酸盐培养基 (丙二 酸盐利用试验)	肺炎克雷伯菌 福氏志贺菌	36℃ ± 1℃, 24~48h	培养基变蓝色 培养基不变色	
氨基酸脱羧酶试验培养 基 (赖氨酸、精氨酸脱 羧酶试验) (图 5-15)	鼠伤寒沙门菌 普通变形杆菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	培养基呈紫色 培养基呈黄色	沙门菌鉴定
兔血浆 (血浆凝固酶试验)	金黄色葡萄球菌 表皮葡萄球菌	36℃ ± 1℃, 1~6h	血浆凝固 血浆不凝固	金黄色葡萄球菌 鉴定
TSI 琼脂 (斜面 and 底层产 酸、产气、产硫化氢试 验) (图 5-16)	大肠埃希菌 鼠伤寒沙门菌 铜绿假单胞菌	36℃ ± 1℃, 18~24h	A/A, 产气, 不产硫化氢 K/A: 产气, 产硫化氢 K/K, 不产气, 不产硫化氢	沙门菌鉴定

注: “A” 为产酸, “K” 为产碱, “/” 左边为斜面生化反应结果、右边为底层生化反应结果。

各类生化鉴定用培养基实验结果图



图 5-2 曙红亚甲蓝琼脂可见中心紫黑色



图 5-3 卵黄氯化钠琼脂外周有乳浊圈

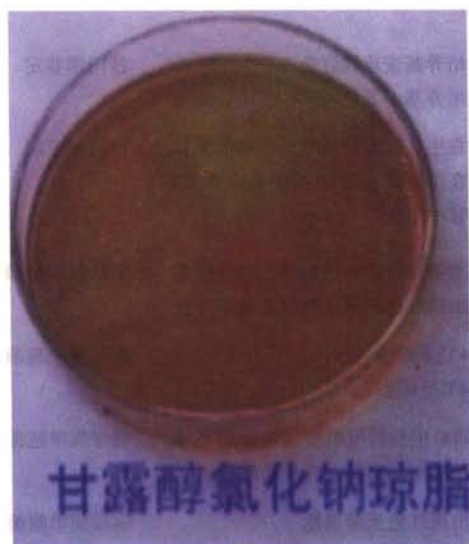


图 5-4 甘露醇氯化钠琼脂可见黄色环



图 5-5 溴化十六烷三甲胺琼脂淡绿色带荧光



图 5-6 MUG 管试验

阴性对照 检测样品 MUG 阳性



图 5-7 MUG-I 管试验

MUG 管 I 试验阳性 (红色为吲哚试验阳性)

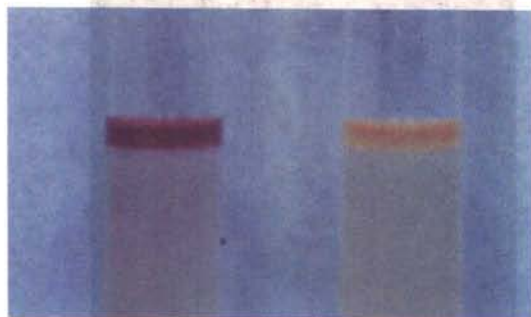


图 5-8 靛基质试验
 吲哚试验阳性（左管）；桔黄色的是
 吲哚试验阴性（右管）

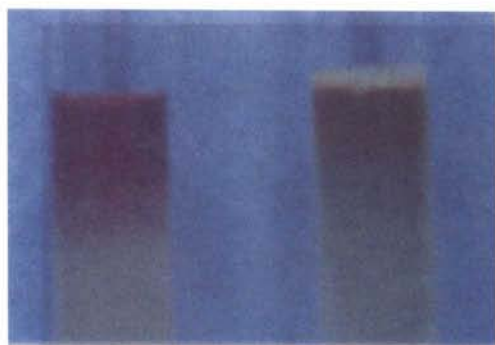


图 5-9 V-P 反应试验
 鲜红色（左管）阳性反应；
 黄色或桔黄色（右管）阴性



图 5-10 甲基红试验
 红色 +（左管） 不产生红色是黄色 -（如右管）



图 5-11 枸橼酸盐利用试验
 培养基变蓝色阳性，不变色
 （原色）阴性

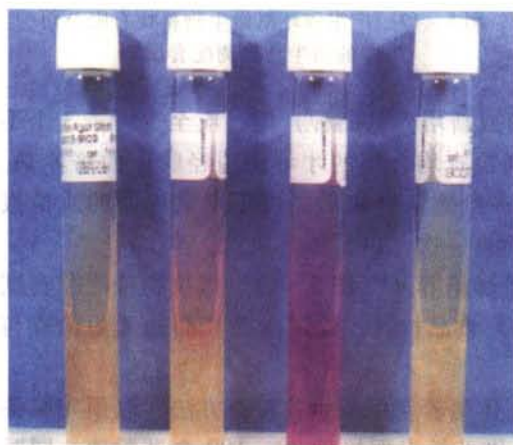


图 5-12 尿素试验
 左管对照；延迟阳性（>24h）；
 快速阳性（<4h）；阴性



图 5-13 绿脓菌素试验
 左管是 PDP 斜面生长，中管是氯仿提取绿脓色素，
 右管加盐酸后呈粉红色



图 5-14 氧化酶试验

1% 四甲基对苯二胺二氢氯化物湿润滤纸。

挑取菌落涂于滤纸上。紫色阳性，右面对照



图 5-15 赖氨酸脱羧酶试验

左管是阳性，右管是阴性对照



图 5-16 TSI 琼脂试验

左管对照，第二管无发酵，第三管产气，右管生成 H_2S



图 5-17 广东省环凯微生物科技有限公司生产的微生物检测配套试剂

通常在使用一种新的成品培养基（新供应商或新培养基品种）时，应至少考查 3 个不同批次的培养基质量，只有 3 批的培养基灵敏度检查均合格的才可使用经验证的培养基。除无菌检查用培养基外，其他实验用品培养基一旦确认合格后，可审查供应商的质检报告，而不必批批要做灵敏度检查，但至少半年检查一次，以复核其质量。

广东环凯微生物科技有限公司生产的各类干燥培养基（图 5-1）、微生物检测配套试剂（图 5-17、表 5-6），可用于药品、化妆品、食品饮料、饮用水等产品的无菌检查与微生物限度检查。

(4) 用于限度检查用细菌、霉菌与酵母菌固体培养基促菌生长检查方法 取预先制备好的琼脂培养基平皿 3~5 个，用表面涂布法每块平板表面接种 30~100 个试验菌，同时用已知质量保证的同型号琼脂培养基平皿 3~5 个做对照试验，待培养基表面的菌液被琼脂培养基吸干或风干后，将培养皿倒置于培养基的使用温度下培养 48~72h，（也可采用注碟法进行）取出培养后的平皿点计菌落数。样品培养基上的微生物数量应不得低于对照

培养基上微生物生长数量的 70%，否则，需重新检查，或该培养基被视为不符合促菌生长要求。

原则上无论是采用脱水培养基还是按《中国药典》处方配制的培养基，一旦制成成品培养基，则应对每个配制批的培养基进行促菌生长（灵敏度检查）试验，以考察培养基的质量。按脱水培养基的生产批号做灵敏度检查是基于培养基的灭菌程序已经验证。

如果实验室使用的是商购的成品型培养基，供应商应随培养基提供相应批次的培养基质量检测报告，报告包括培养基的 pH、无菌检查结果和促菌生长（灵敏度）试验结果等项目。在使用某一新的成品培养基（新供应商或新培养基品种）时，应至少考察 3 个不同批次的培养基质量，只有 3 批质量均合格方可使用该培养基。除无菌检查用培养基外，其他实验用成品培养基一旦初始确认合格后，可审查供应商的质检报告，而不必每批再做无菌检查和灵敏度检查，但每半年应至少检查一次，以复核其质量。用于无菌检查试验的每批培养基，均必须按《中国药典》规定进行灵敏度检查试验，此规定同样适用于实验室自行配制的培养基。

应在正式使用前即应完成对培养基、缓冲液、稀释剂、冲洗液和试剂的质量检查。如果在进行灵敏度试验的同时，也使用该培养基进行样品检查，那么，一旦培养基的无菌性或灵敏度不符合规定，则检验结果应无效。无论这些质量控制检查试验何时完成，实验室都必须在相关产品放行之前或检验报告发出之前，对所用培养基、缓冲液、稀释剂、冲洗液和试剂的无菌性及灵敏度试验资料的完整性和合格结论予以确认。

灵敏度（促生长性）检查试验用的菌悬液，要采用《中国药典》规定的在 5 代之内的标准菌种制得，也可向具备适当资质的供应商购买。目前市场上有此类商用产品，检查用菌种的小瓶内的每片薄膜含有 10~100CFU。产品使用简单方便，但需严格遵守供应商的使用要求。尽管所购试验菌种均附有质量证书，但正式使用前，仍必须用倾注平皿法或铺表面法等标准检测方法对菌悬液的微生物数量进行复核确认。

五、染色液与各种生化反应试液的验证

染色鉴定在微生物限度检查中十分重要，特别是对革兰染色尤其重要。除操作者的操作技术外，染色液配制后的质量与各种生化反应试液的质量是否符合规定就显得很重要。目前国内广东省环凯微生物科技有限公司已有商品生产供应（表 5-6），可以购买使用，但应验证确认。方法同新配制好的染色液一样，必须选用适当的标准菌株作阳性及阴性对照来验证染色液的性能，如革兰染色最好选用枯草杆菌和藤黄八叠球菌，亦可用葡萄球菌和大肠杆菌作为对照。对经验不足者，每次染色时均应作对照染色。验证好染色液后贴好标签，置于阴暗处保存。根据笔者过去经验，其有效期可为数月至 3 年，若分装于密闭性容器（如干燥器内等），并保存在冷藏条件下，其有效期更长。但应根据贮存条件和确认试验结果而定。

表 5-6 微生物检测配套试剂
STAINS AND ADDITIVES FOR MICROBIOLOGICAL TEST

编号 Number	品种名称 Product Name	规格 Package	产品说明及用途 Directions for use
029010	革兰染色液 Gram Stain	10 毫升 × 2 支 10ml × 2vessels	用于细菌革兰染色 For staining bacteria from cultures or specimens by differential Gram method.
029030	靛基质试剂 Kovacs Indole Reagent	10 毫升 × 1 支 10ml × 1vessel	用于靛基质 (吲哚) 试验 For performing the indole test.
029040	甲基红试剂 Methyl Red Reagent	10 毫升 × 1 支 10ml × 1vessel	用于甲基红试验 For differentiating bacteria based on the methyl red test.
029050	VP 试剂甲、乙液 Spot Test Veoges - Proskauer	10 毫升 × 2 支 10ml × 2vessels	用于 VP 试验 For differentiating bacteria based on Voges - Proskauer tests.
029060	耐酸性染色液 Ziehl - neelsen Stain	10 毫升 × 3 支 10ml × 3vessels	用于细菌耐酸性染色 For staining Anti - acid bacteria.
029070	硝酸盐还原试剂 (甲)、(乙) Nitrate Reduction Reagents (A&B)	10 毫升 × 2 支 10ml × 2vessels	用于硝酸盐还原试验 For differentiating bacteria based on nitrate reduction.
029100	40% 无菌尿素溶液 40% Urea solution	2 毫升 × 20 支 2ml × 20vessels	每 10ml 添加于 200ml 尿素琼脂培养基中 Add 10ml product to 200ml Urea Agar Base (023090) .
029110	无菌液体石蜡 sterile Liquid Paraffin	5 毫升 × 1 支 5ml × 1vessel	覆盖液体培养基用于厌氧培养 For cultivating anerobic bacteria with the product overlaid the surface of liquid medium.
029120	Lugol 碘液 Lugol Iodine	10 毫升 × 1 支 10ml × 1vessel	用于淀粉水解试验 For differentiating bacteria based on hydrolysis of starch.
029140	班试剂 (葡萄糖酸盐试剂) Benedict Reagent	10 毫升 × 1 支 10ml × 1vessel	用于葡萄糖酸盐利用试验 For differentiating bacteria based on utilization of gluconate.
029150	10% FeCl ₃ 试剂 (苯丙氨酸试剂) Phenylalanine Deaminase Reagent	10 毫升 × 1 支 10ml × 1vessel	用于苯丙氨酸脱氨酶试验 For differentiating bacteria based on deamination of phenylalanine.
029170	氧化酶试纸 Oxidase Test Paper	10 片 10pieces	用于氧化酶试验 For differentiating bacteria based on oxidase activity.
029180	冻干血浆 Freeze-dried Rabbit Plasma	0.5 毫升 × 10 支 0.5ml × 10vessels	用于金黄色葡萄球菌血浆凝固酶试验 For differentiating <i>Staphylococcus aureus</i> based on coagulase activity.

续表

编号	品种名称	规格	产品说明及用途
Number	Product Name	Package	Directions for use
	亚硝酸盐卵黄增菌剂		
029190	Freeze-dried Terullite Reagent	Potassium Egg-Yolk 5 毫升 × 10 支 5ml × 10vessels	每 5ml 添加于 95ml Baird - Parker 琼脂基础培养基中 Add 5ml product to 95ml Baird - Parker Agar Base (024040) .
029220	0.05% 无菌亚硝酸盐溶液	1 毫升 × 20 支	每 1ml 添加于 200ml 山梨醇麦康凯培养基中或添加于 100ml 庆大霉素琼脂中
	0.05% sterile Terullite solution	Potassium 1ml × 20vessels	Add 1ml product to 200ml Sorbitol MacConkey Agar (025102) or to 100ml Gentamycin Agar (025050) .
029226	0.5% 无菌 TTC 溶液	2 毫升 × 20 支	每 2ml 添加于 95ml TTC 卵磷脂 - 吐温 80 营养琼脂中
	0.5% sterile TTC solution	1ml × 20vessels	Add 2ml product to 95ml TTC Lecithin Tween - 80 Nutrient Agar (027021) .
029126	碘液	2 毫升 × 20 支	每 2ml 添加于 100ml 四硫磺酸盐增菌基础培养基中
	Iodine solution	1ml × 20vessels	Add 2ml product to 100ml Tetrathionate Broth Base (023030) .
029212	0.1% 煌绿	1 毫升 × 20 支	每 1ml 添加于 100ml 四硫磺酸盐增菌基础培养基中
	0.1% Brilliant solution	1ml × 20vessels	Add 1ml product to 100ml Tetrathionate Broth Base (023030) .
029990	吡啶黄素	0.2 克	添加于李菌增菌肉汤基础中
	Acriflavine HCl	0.2g	Added to <i>Listeria</i> Enrichment Broth Base (026040) .
029992	萘啶酮酸	0.2 克	添加于李菌增菌肉汤基础中
	Nalidixic Acid	0.2g	Added to <i>Listeria</i> Enrichment Broth Base (026040) .
029996	新生霉素	0.15 克	添加于改良 E.C. 新生霉素增菌肉汤基中
	Novobiocin	0.15g	Added to Modified E.C. Novobiocin Enrichment Broth Base (028112) .
082202	多黏菌素 B (8000 单位/mg)	800 000 单位	添加于甘露醇卵黄多黏菌素琼脂基础中
	Polymyxin B	800 000IU	Added to Mannitol Yolk Polymyxin Agar Base (MYP) (028380) .
	MUG	0.2 克	添加于基础培养基中用于大肠杆菌快速检验
		0.2g	For rapidly detecting <i>Escherichia coli</i> , with the addition of product to base media.

六、缓冲液、稀释液与淋洗液

按《中国药典》药品无菌检查、微生物限度检查要用到的缓冲液、稀释液、淋洗液有：

(一) 无菌检查用稀释液、淋洗液及其制备方法

1. 0.1% 蛋白胨水溶液 取蛋白胨 1g，加水 1000ml，微温溶解，过滤，调节 pH 至

7.1±0.2, 分装、灭菌。

2. pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液 取磷酸二氢钾 3.56g, 磷酸氢二钠 7.23g, 氯化钠 4.30g, 蛋白胨 1.0g, 加水 1000ml, 加热使溶解, 过滤, 分装、灭菌。

3. 聚山梨酯 80-0.1% 蛋白胨水溶液 取蛋白胨 1g, 聚山梨酯 80 10ml, 加水 1000ml, 微温溶解, 过滤, 调节 pH 至 7.1±0.2, 分装、灭菌。用于非水溶性供试品的无菌检查。

4. 聚山梨酯 80 氯化钠-蛋白胨缓冲液 取 10ml 聚山梨酯 80, 磷酸二氢钾 3.56g, 磷酸氢二钠 7.23g, 氯化钠 4.30g, 蛋白胨 1.0g, 加水 1000ml, 微温溶解, 过滤, 分装、灭菌。用于非水溶性供试品的无菌检查。

以上采用验证合格的灭菌程序灭菌后各种稀释液、冲洗液均要验证证实可靠后方可使用。

(二) 微生物限度检查用稀释剂及其制备方法

稀释剂配制后, 应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

1. pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 取磷酸二氢钾 3.56g, 磷酸氢二钠 7.23g, 氯化钠 4.30g, 蛋白胨 1.0g, 加水 1000ml, 微温溶解, 分装, 过滤, 灭菌。

2. 无菌聚山梨酯 80 氯化钠-蛋白胨缓冲液 取 10ml 聚山梨酯 80, 磷酸二氢钾 3.56g, 磷酸氢二钠 7.23g, 氯化钠 4.30g, 蛋白胨 1.0g, 加水 1000ml, 微温溶解, 过滤, 分装, 灭菌。

3. pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液 (0.2mol/L) 供作稀释剂或冲洗剂用。

磷酸氢二钾液 (0.2mol/L): 称取磷酸氢二钾 27.2g 加水使溶解成 1000ml。

氢氧化钠液 (0.2mol/L): 称取氢氧化钠 8.0g, 加水使溶解成 1000ml。

取磷酸氢二钾液 0.2mol/L 250ml, 加氢氧化钠液 (0.2 mol/L) 100ml, 加水稀释至 1000ml, 分装后灭菌。

4. pH7.6 无菌磷酸盐缓冲液 用于标准品的稀释 取磷酸二氢钾 27.22g 加水溶解成 1000ml, 取 50ml, 加氢氧化钠液 (0.2 mol/L) 42.4ml, 再加水稀释至 200ml, 滤过, 灭菌 30min 即得。

5. 0.9% 无菌氯化钠溶液 取氯化钠 9.0g 加水溶解使成 1000ml, 过滤, 分装, 灭菌。

以上采用验证合格的灭菌程序灭菌后的各种稀释剂均要经验证实可靠后, 方可使用。

七、文件管理与标签

所有的微生物实验记录中应包含试验用培养基、稀释液、淋洗液、缓冲液和试剂的信息, 此信息应可追溯到其原始配制记录和质量检查记录。实验室内有关培养基、稀释液、淋洗液、缓冲液和试剂的制备和质量控制记录 (包括名称) 应与《中国药典》要求相一致。

文件记录中还应提供如下信息, 各组分的生产厂家或供应商的名称、化学名称、批号、纯度 (必要时) 配制用水的类型和来源 (必要时) 有效期以及使用数量; 培养基配制后的包装方式及数量; 灭菌程序参数及记录; 质量检查结果等。表 5-7 为培养基配制记录的一种格式, 实验室可根据实际需要做相应变更。

表 5-7 培养基配制记录表

培养基名称: _____

成分	生产厂家	规格	批号	称量

加蒸馏水 _____ ml, 调 pH 至 _____, 分装 _____, 灭菌 _____ °C _____ min, 测 pH 为 _____。

已配制好的培养基、稀释液、淋洗液、缓冲液、试剂, 须分别贴以相应标签, 标明名称、批号、配制人、配制时间和有效期等。所用标签及标签上的文字应能经受住水或消毒剂浸湿而不脱落或模糊不清。要保证每一内容物的容器均贴有正确标签, 即使是配制过程中所用的容器也不例外, 这才能达到 GMP 的审计、检查要求。

八、有效期的确认

对已配制的培养基、稀释液、淋洗液、缓冲液和试剂的有效期及储存条件, 应予确认。应制定有 1 个正式方案, 并经微生物检测室和质量保证部门主管人员批准, 然后进行效期确认试验。针对每种类型 (或代表性类型) 的培养基、稀释液、淋洗液、缓冲液、试剂, 至少选择 3 个批次进行验证性试验, 第一次检测应在配制结束后立即进行。此后, 可将每次配制批次中剩余的培养基置于规定条件下储存, 并以较高的检测频率 (如数天、周、月) 对其进行再测试, 以确保适宜的有效期。如果是选用代表性的培养基进行此类确认试验时, 则应挑选配方相似且保存条件最为苛刻者作为试验的研究对象。考察的每个项目均要以文档形式保存于验证方案中。

对培养基的有效期进行初始性确认时, 需进行 pH、外观、无菌性和灵敏度的检查。对于缓冲液需要进行 pH、外观检查, 必要时检查无菌性。而对于稀释液、淋洗液、试剂, 则应检查其外观、效价或性能、以及必要时检查其无菌性。在确认抗生素效价分析用培养基的储存条件和有效期时, 要采用抗生素分析法, 将所得的 3 条标准曲线与当作样品的中剂量标准品进行对比分析, 试验时, 分析人员需要评价抑菌圈的大小、清晰度、曲线斜率及检测中剂量标准品的百分回收率的变异性。

有效期一经确认后, 应将其列入相应规程, 并在相应的培养基容器标签上标明。

如果实验室配制的培养基、稀释液、淋洗液、和缓冲液置于密闭性容器内储存, 其有效期可为 1~2 个月, 若培养基分装于非密闭性容器 (如培养皿、试管等), 保存在冷藏条

件下,其有效期为7~14d。每种培养基的具体有效时间应根据贮存条件和确认试验结果而定。

九、培养基灵敏度的验证试验实例

(一) 无菌检查培养基灵敏度的验证试验实例

1. 验证目的 在进行常规的微生物无菌检测方法之前,必须验证检测所采用的培养基应对可能存在的各类微生物具有良好的检出能力。本实验是关于硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基的验证,验证结果应显示:培养基对检品中可能存在的微生物具有良好的检出能力,符合验证要求。

2. 验证要求(合格标准) 用标准菌株对硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基的检出能力进行评价。试验结果应显示:接种量为10~100CFU时,标准菌株在培养基中均生长良好。

3. 试验原料、稀释液和标准微生物 (1) 试验和验证用培养基 见表5-8。

表5-8 验证用培养基表

名称	生产厂家	生产批号	配制日期	有效期
硫乙醇酸盐流体培养基				
改良马丁培养基				
营养肉汤培养基				
改良马丁琼脂培养基				

(2) 验证用微生物名称及其编号 见表5-9。

表5-9 验证用微生物名称及其编号

菌株名称	内控编号*	制备记录号**
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) CMCC (B) 26003		
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) CMCC (B) 10104		
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) CMCC (B) 64941		
生孢梭菌 (<i>Clostridium sporogenes</i>) CMCC (B) 64941		
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) CMCC (F) 98001		
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) CMCC (F) 98003		

注: * 编号由菌名首字母-传代数-制备日期组成; ** 年份-菌种原始记录本页码。

(3) 稀释液: pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或0.9%无菌氯化钠溶液。

(4) 器具: 试管; 三角瓶; 无菌小试管; 无菌移液管(1.0ml); 血球计数板。

4. 验证方法操作

(1) 稀释液、培养基的制备 稀释液的制备: 取氯化钠9.0g, 加蒸馏水1000ml, 加热使溶解, 分装35支试管, 每管9ml。

培养基的制备: 按用量分别称取4种培养基至三角瓶中, 加入蒸馏水, 加热煮沸搅拌

均匀，分别制成 100ml 培养基。硫乙醇酸盐流体培养基分装 8 支试管，每管为 12ml；改良马丁培养基分装 5 支试管，营养肉汤培养基分装 2 支试管，每管均为 9ml；改良马丁琼脂培养基分装 3 支试管，每管培养基高度均为试管的 1/4~1/3。

以上稀释液及培养基均高压蒸汽灭菌，改良马丁琼脂培养基斜面取出摆斜面。

(2) 菌液的制备 取金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌分别接种至 1 支营养肉汤培养基中，30~35℃ 培养 18~24h；取生孢梭菌接种至 1 支硫乙醇酸盐流体培养基中，30~35℃ 培养 18~24h；取白色念珠菌接种至 1 支改良马丁琼脂斜面培养基中，20~25℃ 培养 18~24h；取黑曲霉接种至 1 支改良马丁琼脂斜面培养基中，20~25℃ 培养 5~7h 加入 3~5ml 0.9% 无菌氯化钠溶液至琼脂斜面培养基中，用玻璃棒将孢子洗脱，吸出孢子菌液至无菌小试管内。各取 1ml 培养液或洗脱液加入装有 9ml 0.9% 无菌氯化钠溶液的试管中，振荡均匀，稀释成 10^{-1} 菌悬液，于此类推制成适宜的稀释液后用血球计数板进行计数，然后再稀释成每毫升含菌 10~100 菌落形成单位 (CFU) 的菌悬液。备用。

(3) 培养基接种 取每管装量为 12ml 的硫乙醇酸盐流体培养基 9 支，分别接种金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌各 2 支，每支接种量为 1ml (含菌 10~100 CFU)，另 1 支不接种作为空白对照，30~35℃ 培养 3d；取每管装量为 9ml 的改良马丁培养基 5 支，分别接种白色念珠菌和黑曲霉各 2 支，每支接种量为 1ml (含菌 10~100CFU)，另 1 支不接种作为空白对照，20~25℃ 培养 5d。逐日观察结果。

5. 试验结果 见表 5-10。

表 5-10 微生物的生长情况

菌种名称	浓度 (CFU/ml)	接种量 (ml)	生长情况
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) CMCC (B) 26003			
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) CMCC (B) 10104			
枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>) CMCC (B) 64941			
生孢梭菌 (<i>Clostridium sporogenes</i>) CMCC (B) 64941			
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) CMCC (F) 98001			
黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) CMCC (F) 98003			

试验日期： 年 月 日 试验操作人：

6. 结果分析 空白对照管无 (有) 菌生长，加菌的培养基管均生长良好 (无生长现象)。

7. 结论 接种量为 10~100CFU 时，标准菌株在培养基中均生长良好 (无生长现象)。因此，硫乙醇酸盐流体培养基和改良马丁培养基验证通过 (不通过)。

(二) 微生物限度检查培养基灵敏度的验证试验实例

1. 验证目的 在进行常规的微生物无菌检测方法之前，必须验证检测所采用的培养基应对可能存在的各类微生物具有良好的检出能力。本实验是关于增菌、分离和鉴定培养基的验证，验证结果应显示：增菌、分离培养基对检测目标菌具有良好的检出能力，鉴定培养基能出现预期的生化反应结果，符合验证要求。

2. 验证要求 (合格标准)

用标准菌株对胆盐乳糖培养基、曙红亚甲蓝琼脂培养基和蛋白胨水培养基的检出和鉴定能力进行评价。试验结果应显示:

(1) 增菌培养基: 目标菌接种量为 10~100CFU 时, 在培养基中生长良好, 非目标菌接种量为 100~1000CFU 时在培养基中受抑制;

(2) 分离培养基: 目标菌在培养基中生长良好, 并具有典型的菌落形态或培养特征, 非目标菌在培养基中生长受到抑制, 并不具有典型的菌落形态或培养特征;

(3) 鉴定培养基: 阳性质控菌株能出现预期的生化反应结果, 阴性质控菌株则无预期的生化反应结果。

3. 试验原料、稀释液和标准微生物

(1) 试验和验证用培养基 见表 5-11。

表 5-11 试验和验证用培养基

名称	生产厂家	生产批号	配制日期	有效期
胆盐乳糖培养基				
曙红亚甲蓝琼脂培养基				
蛋白胨水培养基				
营养琼脂培养基				

(2) 验证用微生物名称及其编号 见表 5-12。

表 5-12 验证用微生物名称及其编号

菌株名称	内控编号*	制备记录号**
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) CMCC (B) 44113		
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) CMCC (B) 10104		
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) CMCC (B) 26003		
乙型副伤寒沙门菌 (<i>Salmonella species</i>) CMCC (B) 50094		
产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>) CMCC (B) 45103		

注: * 编号由菌名首字母-传代代数-制备日期组成; ** 年份-菌种原始记录本页码。

(3) 稀释液 (pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液), 靛基质试液。

(4) 器具: 试管; 三角瓶; 无菌小试管; 无菌培养皿; 无菌移液管 (1.0ml); 无菌滴管; 血球计数板或细菌比浊管。

4. 验证方法操作 (1) 稀释液、培养基的制备 稀释液的制备: 取氯化钠 9.0g, 加蒸馏水 1000ml, 加热使溶解, 分装 25 支试管, 每管 9ml。

靛基质试液的制备: 取对二甲氨基苯甲醛 5.0g, 加入戊醇 (或丁醇) 75ml, 充分振荡, 使完全溶解后, 再取浓盐酸 25ml 徐徐滴入。

培养基的制备: 按用量分别称取四种培养基至三角瓶中, 加入蒸馏水, 加热煮沸搅拌均匀。胆盐乳糖培养基配制 100ml, 分装 7 支试管, 每管为 9ml; 蛋白胨水培养基配制

50ml, 分装 5 支小试管, 每管为 3ml; 营养琼脂培养基配制 50ml, 分装 6 支试管, 每管培养基高度均为试管的 $1/4 \sim 1/3$ 。以上稀释液及培养基均经高压蒸汽灭菌, 营养琼脂培养基斜面取出摆斜面, 曙红亚甲蓝琼脂培养基倾注灭菌平皿 7 个, 每皿约 15ml。

(2) 菌液的制备 取大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、乙型副伤寒沙门菌和产气肠杆菌分别接种至 1 支营养琼脂培养基斜面, $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养 $18 \sim 24\text{h}$ 。加入 $3 \sim 5\text{ml}$ 0.9% 无菌氯化钠溶液至琼脂斜面培养基中, 用玻璃棒将孢子洗脱, 吸出孢子菌液至无菌小试管内。大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌各取 1ml 培养液或洗脱液加入装有 9ml 0.9% 无菌氯化钠溶液的试管中振荡均匀, 稀释成均匀的 10^{-1} 菌悬液, 于此类推, 制成适宜的稀释液后, 用血球计数板进行计数或细菌比浊管比浊, 然后再稀释成每毫升含菌 $10 \sim 100$ 菌落形成单位 (CFU) 的菌悬液。备用。

(3) 培养基接种 取每管装量为 9ml 的胆盐乳糖培养基 7 支, 分别接种大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌各 2 支, 每支接种量为 1ml (含菌 $10 \sim 100$ CFU), 另 1 支不接种作为空白对照; 取曙红亚甲蓝琼脂培养基平板 7 个, 用接种环分别沾取大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌孢子洗脱液, 各划线分离 2 个平板, 另 1 个平板作为空白对照; 取蛋白胨水培养基 5 支, 分别接种大肠埃希菌、产气肠杆菌各 2 支, 每支接种量为 2 滴洗脱液, 另 1 支不接种作为空白对照, $30 \sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养 $18 \sim 24\text{h}$ 。滴加 $2 \sim 3$ 滴靛基质试剂于接种培养后的蛋白胨水培养基, 观察结果。

5. 试验结果 见表 5-13、见表 5-14、见表 5-15。

表 5-13 微生物在胆盐乳糖培养基中的生长情况

菌种名称	浓度 (CFU/ml)	接种量 (ml)	生长情况
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) CMCC (B) 44113			
铜绿假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) CMCC (B) 10104			
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) CMCC (B) 26003			

表 5-14 微生物在曙红亚甲蓝琼脂培养基中的培养特征

菌株名称	培养特征
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) CMCC (B) 44113	
乙型副伤寒沙门菌 (<i>Salmonella apecies</i>) CMCC (B) 50094	
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) CMCC (B) 26003	

表 5-15 微生物在蛋白胨水培养基中的生化特征

菌株名称	生化特征
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) CMCC (B) 44113	
产气肠杆菌 (<i>Enterobacter aerogenes</i>) CMCC (B) 45103	

试验日期: 年 月 日 操作人:

6. 结果分析 胆盐乳糖培养基空白对照管无 (有) 菌生长; 大肠埃希菌、铜绿假单胞菌均生长良好 (无生长现象); 金黄色葡萄球菌无生长现象 (生长良好)。

曙红亚甲蓝琼脂培养基空白对照平板无（有）菌生长；大肠埃希菌生长良好（无生长现象），菌落呈紫黑色或中心紫黑色，表面光滑并具有金属光泽（非此特征）；沙门菌生长良好（无生长现象），菌落呈半透明，无色至琥珀色（非此特征）；金黄色葡萄球菌受抑制（生长良好）。

蛋白胨水培养基空白对照管无（有）菌生长；大肠埃希菌生长良好（无生长现象），加靛基质试剂后培养基变红色（非此特征）；产气肠杆菌生长良好（无生长现象），加靛基质试剂后培养基不变色（非此特征）。

7. 结论 胆盐乳糖培养基：目标菌接种量为 10~100CFU 时，在培养基中生长良好，非目标菌接种量为 100~1000CFU 时在培养基中受抑制；

曙红亚甲蓝琼脂培养基：目标菌在培养基中生长良好，并具有典型的菌落形态或培养特征，非目标菌在培养基中生长受到抑制，并不具有典型的菌落形态或培养特征；

蛋白胨水培养基：阳性质控菌株能出现预期的生化反应结果，阴性质控菌株则无预期的生化反应结果。

因此，胆盐乳糖培养基、曙红亚甲蓝琼脂培养基和蛋白胨水培养基验证通过（不通过）。

附一 无菌检查用培养基及其制备方法

培养基可按以下处方制备，亦可使用按该处方生产的符合规定的脱水培养基。配制后应采用验证合格的灭菌程序灭菌。制备好的培养基应保存在 2~25℃、避光的环境。培养基若保存于非密闭容器中，应在 3 周内使用；若保存于密闭容器中，可在 1 年内使用。

1. 硫乙醇酸盐流体培养基 I（用于培养需气菌、厌气菌）

酪胨（胰酶水解）	15.0g	酵母浸出粉	5.0g
葡萄糖	5.0g	氯化钠	2.5g
L-胱氨酸	0.5g	新配制的 0.1% 刃天青溶液	1.0ml
硫乙醇酸钠	0.5g	琼脂	0.5~0.7g
（或硫乙醇酸 0.3ml）		水	1000ml

除葡萄糖和刃天青溶液外，取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 为弱碱性，煮沸，滤清，加入葡萄糖和刃天青溶液，摇匀，调节 pH 使灭菌后为 7.1 ± 0.2 。分装至适宜的容器中，其装量与容器高度的比例应符合培养结束后培养基氧化层（粉红色）不超过培养基深度的 1/2。灭菌。在供试品接种前，培养基氧化层的颜色不得超过培养基深度的 1/3，否则，须经 100℃ 水浴加热至粉红色消失（不超过 20min），迅速冷却，只限加热一次，并防止被污染。

2. 硫乙醇酸盐流体培养基 II（用于黏稠供试品的直接接种法）按硫乙醇酸盐流体培养基 I 处方，去除琼脂和刃天青，取其余成分，如法配制，即得。此培养基应在厌氧条件下培养。

3. 改良马丁培养基（用于培养真菌）

胨	5.0g	磷酸氢二钾	1.0g
酵母浸出粉	2.0g	硫酸镁	0.5g

葡萄糖	20.0g	水	1000ml
-----	-------	---	--------

除葡萄糖外，取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 约为 6.8，煮沸，加入葡萄糖溶解后，摇匀，滤清，调节 pH 使灭菌后为 6.4 ± 0.2 ，分装，灭菌。

4. 选择性培养基

(1) 对氨基苯甲酸培养基（用于磺胺类供试品）按上述硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基的处方及制法，加适量的对氨基苯甲酸（例如 0.125g），溶解后，摇匀，分装，灭菌。对氨基苯甲酸的实际用量应通过验证。

(2) 聚山梨酯 80 培养基（用于非水溶性供试品）按上述硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基的处方及制法，加适量（例如 10ml）聚山梨酯 80，摇匀，分装，灭菌。聚山梨酯 80 的实际用量应通过验证。

(3) β -内酰胺酶培养基（用于 β -内酰胺酶培养基供试品）硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基在接入供试品前分别加入 β -内酰胺酶， β -内酰胺酶培养基的实际用量应通过验证。

5. 营养肉汤培养基

胨	10.0g	氯化钠	5.0g
牛肉浸出粉	3g	水	1000ml

取上述成分混合，微温溶解，调节 pH 为弱碱性，煮沸，滤清，调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，分装，灭菌。

6. 营养琼脂培养基 按上述营养肉汤培养基的处方及制法，加入 15~20g 琼脂，调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，分装，灭菌。

7. 改良马丁琼脂培养基 按改良马丁培养基的处方及制法，加入 15~20g 琼脂，调节 pH 使灭菌后为 6.4 ± 0.2 ，分装，灭菌。

附二 微生物限度检测用培养基及其制备方法

培养基可按以下处方制备，亦可使用按该处方生产的符合要求的脱水培养基。配制后，应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

1. 营养琼脂培养基、营养肉汤培养基、硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基及改良马丁琼脂培养基。（见附一：无菌检查用培养基及其制备方法的 6、5、1 和 3、7）

2. 玫瑰红钠琼脂培养基

胨	5g	玫瑰红钠	0.0133g
葡萄糖	10g	琼脂	15~20g
磷酸二氢钾	1g	水	1000ml
硫酸镁	0.5g		

除葡萄糖、玫瑰红钠外，取上述成分，混合，微温溶解，滤过，加入葡萄糖、玫瑰红钠，分装，灭菌。

3. 酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基（YPD）

胨	10g	琼脂	15~20g
---	-----	----	--------

酵母浸出粉	5g	水	1000ml
葡萄糖	20g		

除葡萄糖外，取上述成分，混合，微温溶解，滤过，加入葡萄糖，分装，灭菌。

4. 胆盐乳糖培养基 (BL)

胨	20g	磷酸二氢钾	1.3g
乳糖	5g	牛胆盐	2g
		(或去氧胆酸钠 0.5g)	

氯化钠	5g	水	1000ml
磷酸氢二钾	4g		

除乳糖、牛胆盐外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.4 ± 0.2 ，煮沸，滤清，加入乳糖、牛胆盐，分装，灭菌。

5. 胆盐乳糖发酵培养基

胆盐乳糖培养基	1000ml	0.04% 溴甲酚紫指示液	25ml
---------	--------	---------------	------

取未灭菌的胆盐乳糖培养基，加入指示液，分装于含倒管的中试管中，每管 10ml。双料乳糖胆盐发酵培养基除蒸馏水外，其他成分加倍，分装于含倒管的大试管中，每管 10ml。灭菌。所用倒管的规格应保证产气结果的观察。

6. 曙红亚甲蓝琼脂培养基 (EMB)

营养琼脂培养基	100ml	曙红钠指示液	2ml
20% 乳糖溶液	5ml	亚甲蓝指示液	1.3 ~ 1.6ml

取营养琼脂培养基，加热溶化后，冷至 60°C ，按无菌操作加入灭菌的其他 3 种溶液，摇匀，倾注平皿。

7. 麦康凯琼脂培养基 (MacC)

胨	20g	1% 中性红指示液	3ml
乳糖	10g	琼脂	15 ~ 20g
牛胆盐	5g	水	1000ml
氯化钠	5g		

除乳糖、指示液、牛胆盐及琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，再加入其余各成分，摇匀，分装，灭菌，冷至约 60°C ，倾注平皿。

8. 4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸 (4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronide, MUG) 培养基

胨	10g	磷酸二氢钾 (无水)	0.9g
硫酸锰	0.5mg	磷酸氢二钠 (无水)	6.2g
硫酸锌	0.5mg	亚硫酸钠	40mg
硫酸镁	0.1g	去氧胆酸钠	1g
氯化钠	5g	MUG	75mg
氯化钙	50mg	水	1000ml

除 MUG 外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.3 ± 0.1 ，加入

MUG, 溶解, 每管分装 5ml, 灭菌。

9. 三糖铁琼脂培养基 (TSI)

胨	20g	硫酸亚铁	0.2g
牛肉浸出粉	5g	硫代硫酸钠	0.2g
乳糖	10g	0.2% 酚磺酞指示液	12.5ml
蔗糖	10g	琼脂	12 ~ 15g
葡萄糖	1g	水	1000ml
氯化钠	5g		

除三糖、指示液、琼脂外, 取上述成分, 混合, 微温溶解, 调节 pH 使灭菌后为 7.3 ± 0.1 , 加入琼脂, 加热溶化后, 再加入其余各成分, 摇匀, 分装, 灭菌, 制成高底层 (2 ~ 3cm) 短斜面。

10. 四硫磺酸钠亮绿培养基 (TTB)

胨	5g	硫代硫酸钠	30g
牛胆盐	1g	水	1000ml
碳酸钙	10g		

取上述成分, 混合, 微温溶解, 灭菌。

临用前, 取上述培养基, 每 10ml 加入碘试液 0.2ml 和 1% 亮绿试液 0.1ml, 混匀。

11. 沙门、志贺菌属琼脂培养基 (SS)

胨	5g	硫代硫酸钠	8.5g
牛肉浸出粉	5g	中性红指示液	2.5ml
乳糖	10g	亮绿试液	0.33ml
牛胆盐	8.5g	琼脂	20g
枸橼酸钠	8.5g	水	1000ml
枸橼酸铁铵	1g		

除乳糖、指示液、琼脂外, 取上述成分, 混合, 微温溶解, 调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.1 , 滤过, 加入琼脂, 加热溶化后, 再加入其余各成分, 摇匀, 灭菌, 冷至 60°C , 倾注平皿。

12. 胆盐硫乳琼脂培养基 (DHL)

胨	20g	枸橼酸钠	1g
牛肉浸出粉	3g	枸橼酸铁铵	1g
乳糖	10g	中性红指示液	3ml
蔗糖	10g	琼脂	18 ~ 20g
去氧胆酸钠	1g	水	1000ml
硫代硫酸钠	2.3g		

除糖、指示液及琼脂外, 取上述成分, 混合, 微温溶解, 调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.1 , 加入琼脂, 加热溶化后, 再加入其余成分, 摇匀, 冷至 60°C , 倾注平皿。

13. 溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基

胨	10g	溴化十六烷基三甲胺	0.3g
---	-----	-----------	------

牛肉浸出粉	3g	琼脂	15 ~ 20g
氯化钠	5g	水	1000ml

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.5 ± 0.1 ，加入琼脂，加热溶化后，分装，灭菌，冷至 60°C ，倾注平皿。

14. 亚硝酸盐肉汤培养基

临用前，取灭菌的营养肉汤培养基，每 100ml 中加入新配制的 1% 亚硝酸钠（钾）试液 0.2ml，混匀，即得。

15. 卵黄氯化钠琼脂培养基

胨	6g	10% 氯化钠卵黄液	100ml
牛肉浸出粉	1.8g	琼脂	23g
氯化钠	30g	水	650ml

除 10% 氯化钠卵黄液外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.6 ± 0.1 ，灭菌，待冷至约 60°C ，以无菌操作加入 10% 氯化钠卵黄液，充分振摇，倾注平皿。

10% 氯化钠卵黄液的制备取新鲜鸡蛋 1 个，以无菌操作取出卵黄，放入 10% 无菌氯化钠溶液 100ml 中，充分振摇，即得。

16. 甘露醇氯化钠琼脂培养基

胨	10g	酚磺酞指示液	2.5ml
牛肉浸出粉	1g	琼脂	15 ~ 20g
甘露醇	10g	水	1000ml
氯化钠	75g		

除甘露醇、指示液及琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.4 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，滤过，分装，灭菌，冷至 60°C ，倾注平皿。

17. 乳糖发酵培养基

胨	20g	0.04% 溴甲酚紫指示液	25ml
乳糖	10g	水	1000ml

除指示液外，取上述成分混合，微温溶解，调节 pH，使灭菌后为 7.2 ± 0.2 ，加入指示液，分装于含倒管的小试管中，每管 3ml。灭菌。

18. 绿脓菌素（pyocyanin）测定用培养基（PDP 琼脂）

胨	20g	甘油	10ml
氯化镁（无水）	1.4g	琼脂	18 ~ 20g
硫酸钾（无水）	10g	水	1000ml

取胨、氯化镁、硫酸钾和水混合，微温溶解，调节 pH 使灭菌后为 7.3 ± 0.1 ，加入甘油及琼脂，加热溶化，混匀，分装于试管，灭菌，置成斜面。

附三 微生物限度检测用试药、试液与指示液

1. 试药

十四烷酸异丙酯 Isopropyl Myristate [$\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2 = 270.46$] 本品为无色液体。溶于乙醇、

乙醚、丙酮、氯仿和甲苯，不溶于水、甘油和丙二醇。约 208℃ 分解。

二盐酸二甲基对苯二胺 *N, N* - Dimethyl - *p* - Phenylenediamine Dihydrochloride [$C_8H_{12}N_2 \cdot 2HCl = 209.12$] 本品为白色或灰白色结晶性粉末；置空气中色渐变暗；易吸潮。在水或乙醇中溶解。

溴化十六烷基三甲胺 Cetyl trimethylammonium bromide [$C_{19}H_{42}BrN = 364.46$] 本品为白色结晶。在水中溶解，在乙醇中微溶，在乙醚中不溶。

刃天青 Resazurin [$C_{12}H_7NO_4 = 229.19$] 本品为深红色结晶，有绿色光泽。在稀氢氧化钠溶液中溶解，在乙醇或冰醋酸中微溶，在水或乙醚中不溶。

中性红 Neutral Red [$C_{15}H_{17}N_4Cl = 288.78$] 本品为深绿或棕黑色粉末。在水或乙醇中溶解。

牛肉浸出粉 Beef extract powder 本品为米色粉末，在水中溶解。

牛胆盐 Ox bile salt 本品为淡黄色或黄棕色粉末，味苦而甜，具吸湿性。在水和醇中易溶。

4 - 甲基伞形酮葡萄糖苷酸 4 - Methylumbelliferyl - β - *D* - Glucuronide, MUG [$C_{18}H_{16}O_9 = 352.3$]

本品为白色针状结晶。在水、乙醇或乙醚中溶解。在稀氢氧化钠溶液中分解。

去氧胆酸钠 Sodium Deoxycholate [$C_{24}H_{39}NaO_4 = 414.56$] 本品为白色结晶性粉末，味苦。易溶于水，微溶于醇，不溶于醚。

亚碲酸钠 Sodium Tellurite [$Na_2TeO_3 = 221.58$] 本品为白色粉末。在热水中易溶，在水中微溶。

玫瑰红钠（四氯四碘荧光素钠）Rose Bengal Sodium Salt [$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5 = 1017.6$] 本品为棕红色粉末。在水中溶解，溶液呈紫色，无荧光；在硫酸中溶解，溶液为棕色。

枸橼酸铁铵 Ammonium ferric citrate [$C_{12}H_{22}FeN_3O_{14} = 488.16$] 本品为棕红色或绿色鳞片或粉末，易潮解，见光易还原成亚铁。在水中溶解，在醇和醚中不溶。

胰蛋白胨 Tryptone 本品为米黄色粉末，在水中溶解。

液状石蜡 Paraffin liquid 本品为无色油状液体。在水和醇中不溶，能与醚、苯、三氯甲烷、二硫化碳和油类相混溶。

酪蛋白胰酶消化物（胰酪胨或酪胨）Pancreatic Digest of Casein 本品为黄色或浅黄色颗粒，以干酪素为原料经胰酶水解、活性炭脱色处理、精制而成。

2. 试液

二盐酸二甲基对苯二胺试液 取二盐酸二甲基对苯二胺 0.1g，加水 10ml，即得。需新鲜少量配制，于冷处避光保存，如试液变成红褐色，不可使用。

无菌对氨基苯甲酸试液 取对氨基苯甲酸 0.1g，加入含 10ml 水的带塞试管中，灭菌。

亚碲酸钠（钾）试液 取亚碲酸钠（钾）0.1g，加新鲜煮沸后冷至 50℃ 的水 10ml 使溶解。

玫瑰红钠试液 取玫瑰红钠 0.1g，加水使溶解成 75ml。

亮绿试液 取亮绿 0.1g，加水 100ml 使溶解。

盐酸试液 取盐酸 8.4ml，加水使稀释成 100ml。

靛基质试液 取对二甲氨基苯甲醛 5.0g, 加入戊醇 (或丁醇) 75ml, 充分振摇, 使完全溶解后, 再取浓盐酸 25ml 徐徐滴入, 边加边振摇, 以免骤热导致溶液色泽变深, 或取对二甲氨基苯甲醛 1.0g, 加入 95% 乙醇 95ml, 充分振摇, 使完全溶解后, 取浓盐酸 20ml 徐徐滴入。

碘试液 取碘 6g 与碘化钾 5g, 加水 20ml 使溶解。

过氧化氢试液 取浓过氧化氢溶液 (30%), 加水稀释成 3% 的溶液。临用时配制。

3. 指示液

中性红指示液 取中性红 1.0g, 研细, 加 95% 乙醇 60ml 使溶解, 再加水至 100ml。变色范围 pH6.8 ~ 8.0 (红 → 黄)。

亚甲蓝指示液 取亚甲蓝 0.5g, 加水使溶解成 100ml。

酚磺酞指示液 取酚磺酞 1.0g, 加 1mol/L 氢氧化钠溶液 2.82ml, 使溶解, 再加水至 100ml。变色范围 pH6.8 ~ 8.4 (黄 → 红)。

溴甲酚紫指示液 取溴甲酚紫 1.6g, 加 95% 乙醇使溶解成 100ml。变色范围 pH5.2 ~ 6.8 (黄 → 紫)。

曙红钠指示液 取曙红钠 2.0g, 加水使溶解成 100ml。

附四 抗生素效价测定用培养基及灭菌缓冲液的制备方法

1. 培养基 I

胨	5g	磷酸氢二钾	3g	水	1000ml
牛肉浸出粉	3g	琼脂	15 ~ 20g		

除琼脂外, 混合上述成分, 调节 pH 使其比最终的 pH 略高 0.2 ~ 0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 调节 pH 使灭菌后为 7.8 ~ 8.0 或 6.5 ~ 6.6, 在 115℃ 灭菌 30min。

2. 培养基 II

胨	6g	酵母浸出粉	6g	琼脂	15 ~ 20g
牛肉浸出粉	1.5g	葡萄糖	1g	水	1000ml

除琼脂和葡萄糖外, 混合上述成分, 调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2 ~ 0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 调节 pH 使灭菌后为 7.8 ~ 8.0 或 6.5 ~ 6.6, 在 115℃ 灭菌 30min。

3. 培养基 III

胨	5g	氯化钠	3.5g	葡萄糖	1g
牛肉浸出粉	1.5g	磷酸氢二钾	3.68g	水	1000ml
酵母浸出粉	3g	磷酸二氢钾	1.32g		

除葡萄糖以外, 混合上述成分, 加热融化后滤过, 加葡萄糖溶解后, 摇匀, 调节 pH 使灭菌后为 7.0 ~ 7.2, 在 115℃ 灭菌 30min。

4. 培养基 IV

胨	10g	枸橼酸钠	10g	琼脂	20 ~ 30g
氯化钠	10g	葡萄糖	10g	水	1000ml

除琼脂和葡萄糖外, 混合上述成分, 调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2 ~ 0.4, 加入琼

脂, 在 109℃ 加热 15min, 于 70℃ 以上保温静置 1h 后滤过, 加葡萄糖溶解后, 摇匀, 调节 pH 使灭菌后为 6.0~6.2, 在 115℃ 灭菌 30min。

5. 培养基 V

胨	10g	麦芽糖	40g
琼脂	20~30g	水	1000ml

除琼脂和麦芽糖外, 混合上述成分, 调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2~0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 加麦芽糖溶解后, 摇匀, 调节 pH 使灭菌后为 6.0~6.2, 在 115℃ 灭菌 30min。

6. 培养基 VI

胨	8g	氯化钠	45g	葡萄糖	2.5g
牛肉浸出粉	3g	磷酸氢二钾	3.3g	琼脂	15~20g
酵母浸出粉	5g	磷酸二氢钾	1g	水	1000ml

除琼脂和葡萄糖外, 混合上述成分, 调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2~0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 调节 pH 使灭菌后为 7.2~7.4, 在 115℃ 灭菌 30min。

7. 培养基 VII

胨	5g	枸橼酸钠	10g	琼脂	15~20g
牛肉浸出粉	3g	磷酸氢二钾	7g	水	1000ml
磷酸二氢钾	3g				

除琼脂外, 混合上述成分, 调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2~0.4, 加入琼脂, 加热溶化后滤过, 调节 pH 使灭菌后为 6.5~6.6, 在 115℃ 灭菌 30min。

8. 培养基 VIII

酵母浸出粉	1g	葡萄糖	5g	琼脂	15~20g
硫酸铵	1g	磷酸盐缓冲液	1000ml		
		(pH6.0)			

混合上述成分, 加热溶化后滤过, 调节 pH 使灭菌后为 6.5~6.6, 在 115℃ 灭菌 30min。

9. 培养基 IX

蛋白胨	7.5g	牛肉浸出粉	1.0g	葡萄糖	10.0g
酵母膏	2.0g	氯化钠	5.0g	水	1000ml

除葡萄糖以外, 混合上述成分, 加热融化后滤过, 加葡萄糖溶解后, 摇匀, 调节 pH 使灭菌后为 6.5, 在 115℃ 灭菌 30min。

10. 营养肉汤培养基

胨	10g	氯化钠	5g	肉浸液*	1000ml
---	-----	-----	----	------	--------

取胨和氯化钠加入肉浸液内, 微温溶解后, 调节 pH 为弱碱性, 煮沸, 滤清, 调节 pH 使灭菌后为 7.2 ± 0.2 , 在 115℃ 灭菌 30min。

* (肉浸液也可用牛肉浸出粉 3g, 加水 1000ml, 配成溶液代替)

11. 营养琼脂培养基

胨	10g	氯化钠	5g
---	-----	-----	----

肉浸液 1000ml 琼脂 15 ~ 20g

除琼脂外,混合上述成分,调节 pH 使比最终的 pH 略高 0.2 ~ 0.4,加入琼脂,加热溶化后滤过,调节 pH 使灭菌后为 7.0 ~ 7.2,分装,在 115℃ 灭菌 30min,趁热斜放使凝固成斜面。

12. 改良马丁培养基

胨	5.0g	磷酸氢二钾	1.0g	酵母浸出粉	2.0g
硫酸镁	0.5g	葡萄糖	20.0g	琼脂	15 ~ 20g
水	1000ml				

除葡萄糖外,取上述成分加入水内混合,微温溶解,调节 pH 约为 6.8,煮沸,加入葡萄糖溶解后,摇匀,滤清,调节 pH 使灭菌后为 6.4 ± 0.2 ,分装,在 115℃ 灭菌 30min,趁热斜放使凝固成斜面。

培养基可以采用相同成分的干燥培养基代替,临用时,照使用说明配制和灭菌,备用。

13. 灭菌缓冲液

磷酸盐缓冲液 (pH6.0) 取磷酸氢二钾 2g 与磷酸二氢钾 8g,加水使成 1000ml,滤过,在 115℃ 灭菌 30min。

磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 取磷酸氢二钾 9.39g 与磷酸二氢钾 3.5g,加水使成 1000ml,滤过,在 115℃ 灭菌 30min。

磷酸盐缓冲液 (pH7.8) 取磷酸氢二钾 5.59g 与磷酸二氢钾 0.41g,加水使成 1000ml,滤过,在 115℃ 灭菌 30min。

磷酸盐缓冲液 (pH10.5) 取磷酸氢二钾 35g,加 10mol/L 氢氧化钠溶液 2ml,加水使成 1000ml,滤过,在 115℃ 灭菌 30min。

附五 微生物检测用生化试验培养基及试剂的制备方法

培养基可按以下处方制备,亦可使用按该处方生产的符合要求的脱水培养基。配制后,应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

1. 蛋白胨水

胰蛋白胨	20g	氯化钠	5g
蒸馏水	1000ml	pH 7.4	

按上述成分配制,分装小试管,121℃ 高压灭菌 15min。

靛基质试剂 (柯凡克试剂) 将 5g 对二甲氨基苯甲醛溶解于 75ml 戊醇中,然后缓慢加入浓盐酸 25ml。

2. 缓冲葡萄糖蛋白胨水 (MR 和 V-P 试验用)

磷酸氢二钾	5g	多胨	7g
葡萄糖	5g	蒸馏水	1000ml

pH 7.0

溶化后校正 pH,分装试管,每管 1ml,121℃ 高压灭菌 15min。

甲基红试剂 10mg 甲基红溶于 30ml 95% 乙醇中, 然后加入 20ml 蒸馏水。

V-P 试剂 甲液: 6% α -萘酚-乙醇溶液; 乙液: 40% 氢氧化钾溶液。

3. 西蒙柠檬酸盐培养基

氯化钠	5g	硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2g
磷酸二氢铵	1g	磷酸氢二钾	1g
柠檬酸钠	5g	琼脂	20g
蒸馏水	1000ml	0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	0.08g

pH 6.8

先将盐类溶解于水内, 校正 pH, 再加琼脂, 加热溶化。然后加入指示剂, 混合均匀后分装试管, 121℃ 高压灭菌 15min。放成斜面。

4. 糖发酵管

牛肉膏	5g	蛋白胨	10g
氯化钠	3g	磷酸氢二钠 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)	2g
0.2% 溴麝香草酚兰溶液	12ml	蒸馏水	1000ml

pH 7.4

葡萄糖发酵管按上述成分配好后, 按 0.5% 加入葡萄糖, 分装于有一个倒置小管的小试管内, 121℃ 高压灭菌 15min。

其他各种糖发酵管可按上述成分配好后, 分装每瓶 100ml, 121℃ 高压灭菌 15min。另将各种糖类分别配好 10% 溶液, 同时高压灭菌。将 5ml 糖溶液加入于 100ml 培养基内, 以无菌操作分装小试管。注: 蔗糖不纯, 加热后会自行水解者, 应采用过滤法除菌。

5. 尿素琼脂

蛋白胨	1g	氯化钠	5g
葡萄糖	1g	磷酸二氢钾	2g
0.4% 酚红溶液	3ml	琼脂	20g
蒸馏水	1000ml	20% 尿素溶液	100ml

pH 7.2 ± 0.1

将除尿素和琼脂以外的成分配好, 并校正 pH, 加入琼脂, 加热溶化并分装烧瓶。121℃ 高压灭菌 15min。冷至 50 ~ 55℃, 加入经除菌过滤的尿素溶液。尿素的最终浓度为 2%, 最终 pH 应为 7.2 ± 0.1 。分装于灭菌试管内, 放成斜面备用。

6. 氰化钾 (KCN) 培养基

蛋白胨	10g	氯化钠	5g
磷酸二氢钾	0.225g	磷酸氢二钠	5.64g
蒸馏水	1000ml	0.5% 氰化钾溶液	20ml

pH 7.6

将除氰化钾以外的成分配好后分装烧瓶, 121℃ 高压灭菌 15min。放在冰箱内使其充分冷却。每 100ml 培养基加入 0.5% 氰化钾溶液 2.0ml (最后浓度为 1:10000), 分装于 12 mm × 100 mm 灭菌试管, 每管约 4ml, 立即用灭菌橡皮塞塞紧, 放在 4℃ 冰箱内, 至少可保存 2 个月。同时, 将不加氰化钾的培养基作为对照培养基, 分装试管备用。

7. 氨基酸脱羧酶试验培养基

蛋白胨	5g	酵母浸膏	3g
葡萄糖	1g	蒸馏水	1000ml
1.6%溴甲酚紫-乙醇溶液	1ml	L-氨基酸或 DL-氨基酸	0.5 或 1g/100ml

pH 6.8

除氨基酸以外的成分加热溶解后，分装每瓶 100ml，分别加入各种氨基酸：赖氨酸、精氨酸和鸟氨酸。L-氨基酸按 0.5% 加入，DL-氨基酸按 1% 加入。再行校正 pH 至 6.8。对照培养基不加氨基酸。分装于灭菌的小试管内，每管 0.5ml，上面滴加一层液体石蜡，115℃ 高压灭菌 10min。

8. 明胶培养基

牛肉膏	3g	蛋白胨	5g
明胶	120g	蒸馏水	1000ml

pH 7.4

取各成分加在蒸馏水中浸泡 20min，随时搅拌加温使溶解，调 pH 至 7.4，装于试管内，经 115℃ 20min 灭菌后，直立制成高层备用。

9. 硝酸盐蛋白胨水培养基

蛋白胨	10g	酵母浸膏	3g
硝酸钾	2g	亚硝酸钠	0.5g
蒸馏水	1000ml	pH 7.2	

将蛋白胨和酵母浸膏加到蒸馏水中，加温使溶解，调 pH 为 7.2，煮沸过滤补足流量，加入硝酸钾和亚硝酸钠，溶解混匀，分装到加有小倒管的试管中，115℃ 20min 灭菌后备用。

10. 丙二酸钠培养基

酵母浸膏	1g	硫酸铵	2g
磷酸氢二钾	0.6g	磷酸二氢钾	0.4g
氯化钠	2g	丙二酸钠	3g
0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	12ml	蒸馏水	1000ml

pH 6.8

先将酵母浸膏和盐类溶解于水，校正 pH 后再加入指示剂，分装试管，121℃ 高压灭菌 15min。

11. 葡萄糖铵培养基

氯化钠	5g	硫酸镁 ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0.2g
磷酸二氢铵	1g	磷酸氢二钾	1g
葡萄糖	2g	琼脂	20g
蒸馏水	1000ml	0.2% 溴麝香草酚蓝溶液	40ml

pH 6.8

先将盐类和糖溶解于水内，校正 pH，再加琼脂，加热溶化，然后加入指示剂，混合均匀后分装试管，121℃ 高压灭菌 15min，放成斜面。

12. 苯丙氨酸培养基

酵母浸膏	3g	DL-苯丙氨酸 (或 L-苯丙氨酸 1g)	2g
磷酸氢二钠	1g	氯化钠	5g
琼脂	12g	蒸馏水	1000ml

加热溶解后分装试管, 121℃高压灭菌 15min, 使成斜面。

13. 硫酸亚铁琼脂 (硫化氢试验用)

牛肉膏	3g	酵母浸膏	3g
蛋白胨	10g	硫化亚铁	0.2g
硫代硫酸钠	0.3g	氯化钠	5g
琼脂	12g	蒸馏水	1000ml

pH7.4

加热溶解, 校正 pH, 分装试管, 115℃高压灭菌 15min, 取出直立俟其凝固。

14. 硝酸盐培养基

硝酸钾	0.2g	蛋白胨	5g
蒸馏水	1000ml	pH7.4	

溶解, 校正 pH, 分装试管, 每管约 5ml, 121℃高压灭菌 15min。

硝酸盐还原试剂 甲液: 将对氨基苯磺酸 0.8g 溶解于 2.5mol/L 乙酸溶液 100ml 中。

乙液: 将甲萘胺 0.5g 溶解于 2.5mol/L 乙酸溶液 100ml 中。

附六 微生物检测用试液、指示液、染色液的配制及染色法

1. 革兰染色法

(1) 结晶紫染色液

结晶紫	1g	95%乙醇	20ml
1%草酸铵水溶液	80ml		

将结晶紫溶解于乙醇中, 然后与草酸铵溶液混合。

(2) 革兰碘液

碘	1g	碘化钾	2g
蒸馏水	300ml		

将碘与碘化钾先进行混合, 加入蒸馏水少许, 充分振摇, 待完全溶解后, 再加蒸馏水至 300ml。

(3) 沙黄复染液

沙黄	0.25g	95%乙醇	10ml
蒸馏水	90ml		

将沙黄溶解于乙醇中, 然后用蒸馏水稀释。

(4) 染色法 将涂片在火焰上固定, 滴加结晶紫染色液, 染 1min, 水洗。滴加革兰碘液, 作用 1min, 水洗。滴加 95%乙醇脱色, 约 30s; 或将乙醇滴满整个涂片, 立即倾去, 再用乙醇滴满整个涂片, 脱色 10s。水洗, 滴加复染液, 复染 1min。水洗, 待干, 镜检。

(5) 结果 革兰阳性菌呈紫色。革兰阴性菌呈红色。注：亦可用 1:10 稀释石炭酸复红染色液作复染液，复染时间仅需 10s。

2. 美蓝染色法

(1) 吕氏碱性美蓝染色液

美蓝	0.3g	95%乙醇	30ml
0.01%氢氧化钾溶液	100ml		

将美蓝溶解于乙醇中，然后与氢氧化钾溶液混合。

(2) 染色法 将涂片在火焰上固定，待冷。滴加染液，染 1~3min，水洗，待干，镜检。

(3) 结果 菌体呈蓝色。

3. 耐酸性染色法

(1) 石炭酸品红染色液

碱性品红	0.3g	95%乙醇	10ml
5%酚水溶液	90ml		

将品红溶解于乙醇中，然后与酚溶液混合。

(2) 3%盐酸-乙醇

浓盐酸	3ml	95%乙醇	97ml
-----	-----	-------	------

(3) 复染液 吕氏碱性美蓝染色液。

(4) 染色法 将涂片在火焰上加热固定，滴加石炭酸品红染色液，徐徐加热至有蒸气出现，但切不可使沸腾。染液如因蒸发减少时，应随时添加。染 5min，倾去染液，水洗。滴加盐酸-乙醇脱色，直至无红色脱落为止（所需时间视涂片厚薄而定，一般为 1~3min），水洗。滴加吕氏碱性美蓝染色液。复染 30s~1min，水洗，待干，镜检。

(5) 结果 耐酸性细菌呈红色，其他细菌、细胞等物质呈蓝色。

4. 奥尔特荚膜染色法

(1) 染色液 沙黄	3g	蒸馏水	100ml
------------	----	-----	-------

用乳钵研磨溶解。

(2) 染色法 将涂片在火焰上固定，滴加染色液，并加热至产生蒸气后，继续染 3min。水洗，待干，镜检。

(3) 结果 炭疽芽孢杆菌菌体呈赤褐色，荚膜呈黄色。

5. 鞭毛染色法

(1) 甲液 称单宁酸 5g、氯化高铁 (FeCl_3) 1.5g，溶于 100ml 蒸馏水中，待溶解后加入 1% 氢氧化钠溶液 1ml 和 15% 甲醛 2ml。

(2) 乙液 称 2g 硝酸银溶于 100ml 蒸馏水中。在 90ml 乙液中滴加浓氢氧化铵溶液，到出现沉淀后，再滴加使其变为澄清，然后用其余 10ml 乙液小心滴加至澄清液中，至出现轻微雾状为止（此为关键性操作，应特别小心）。滴加氢氧化铵和用剩余乙液回滴时，要边滴边充分摇荡，染液当天配，当天使用，2~3d 基本无效。

(3) 染色法 在风干的载玻片上滴加甲液，4~6min 后，用蒸馏水轻轻冲净。再加乙液，缓缓加热至冒汽，维持约半分钟（加热时注意勿使出现干燥面）。在菌体多的部位可呈深褐色到黑色，停止加热，用水冲净，干后镜检，菌体及鞭毛为深褐色到黑色。

第六章 灭 菌 法

灭菌法系指用适当的物理或化学手段将物品中活的微生物杀灭或除去的方法。本法适用于无菌制剂、原料、辅料及医疗器械等物品的灭菌。

无菌物品是指物品中不含任何活的微生物。对于任何一批灭菌产品来说，绝对无菌无法保证，也无法用试验来证实。实际生产过程中，灭菌是指将物品中污染的微生物残存概率下降至一定水平，以无菌保证水平 SAL (sterility assurance level) 表示。最终灭菌产品微生物存活概率不得高于 10^{-6} 。已灭菌产品达到的无菌保证水平可通过验证确定。

灭菌产品的无菌保证并不能依赖于最终产品的无菌检验，而是取决于生产过程中采用合格的灭菌工艺、严格的 GMP 管理和良好的无菌保证体系。灭菌工艺的确定应综合考虑被灭菌物品的性质、灭菌方法的有效性和经济性、灭菌后物品的完整性等因素。

灭菌程序的验证是无菌保证的必要条件。灭菌程序经验证后，方可交付正式使用。验证内容包括：

- (1) 撰写验证方案及制定评估标准。
- (2) 确认灭菌设备技术资料齐全、安装正确，并能处于正常运行（安装确认）。
- (3) 确认关键控制设备和仪表能在规定的参数范围内正常运行（运行确认）。
- (4) 采用灭菌物品或模拟物品进行重复试验，确认灭菌效果符合规定（性能确认）。
- (5) 汇总并完善各种文件和记录，撰写验证报告。

日常生产中，应对灭菌程序的运行情况进行监控，确认关键参数（如温度、压力、时间、湿度、灭菌气体浓度及吸收的辐照吸收剂量等）均在验证确定的范围内。灭菌程序应定期进行再验证。当灭菌程序发生变更（包括灭菌物品装载方式和数量的改变）时，应进行再验证。

产品的无菌保证与灭菌前产品被污染的程度及污染菌的特性相关。因此，应严格监控被灭菌品灭菌前的微生物污染水平及污染菌的耐受性，并在生产的各个环节采取各种措施降低污染，确保微生物污染控制在规定的限度内。

灭菌冷却阶段，应采取措施防止已灭菌物品被再次污染。任何情况下，都应要求容器及其密封系统确保产品在有效期内符合无菌要求。

一、灭菌方法

常用的灭菌方法有湿热灭菌法、干热灭菌法、气体灭菌法、辐射灭菌法和过滤除菌法。可根据被灭菌物品的特性采用一种或多种方法组合灭菌。只要产品允许，应尽可能选用最终灭菌法（即产品分装至包装容器后再灭菌）灭菌。若产品不适合采用最终灭菌法，可选用过滤除菌法或无菌生产工艺达到无菌保证要求，只要可能，应对非最终灭菌的产品作补充性灭菌处理（如流通蒸汽灭菌）。

(一) 湿热灭菌法

本法系指将物品置于灭菌柜内利用高压饱和蒸汽、过热水喷淋等手段使微生物菌体中的蛋白质、核酸发生变性而杀灭微生物的方法。该法灭菌能力强,为热力灭菌中最有效、应用最广泛的灭菌方法。药品、容器、培养基、无菌衣、胶塞以及其他遇高温和潮湿不发生变化或损坏的物品,均可用本法灭菌。流通蒸汽不能完全杀灭细菌孢子,一般可作为不耐热无菌产品的辅助灭菌手段。

湿热灭菌条件通常采用 $121^{\circ}\text{C} \times 15\text{min}$ 、 $121^{\circ}\text{C} \times 15\text{min}$ 或 $116^{\circ}\text{C} \times 40\text{min}$ 的程序,也可采用其他温度和时间参数。总之,必须保证物品灭菌后的 $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ 。对热稳定的物品,可采用过度杀灭法,其 SAL 应 $\leq 10^{-12}$ 。热稳定性较差产品的标准灭菌时间 F_0 [指当灭菌温度为 121°C ,生物指示菌的耐热参数 D 值为 1min ,灭菌温度系数 Z 值为 10.0°C 时的标准灭菌时间 (121°C 下计算的微生物等效灭活率)] 一般不低于 8min ,如产品的热稳定性很差时,可允许湿热灭菌的 F_0 低于 8min ,此情况下,应在生产全过程中,对产品中污染的微生物严加监控,并采取各种措施降低微生物污染水平,确保被灭菌产品达到无菌保证要求。

采用湿热灭菌时,被灭菌物品应有适当的包装和装载方式,不能排列过密,以保证灭菌的有效性和均一性。

湿热灭菌工艺验证时,应进行热分布试验、热穿透试验和生物指示剂验证试验。以确定灭菌柜空载及不同装载时腔室中的热分布状况及可能存在的冷点;在空载条件下,确认 121°C 时腔室各点的温度差值应 $\leq \pm 1^{\circ}\text{C}$;使用插入实际物品或模拟物品内的温度探头,确认灭菌柜在不同装载时,最冷点物品的标准灭菌时间 (F_0) 达到设定的标准;用生物指示剂进一步确认在不同装载时冷点处的灭菌物品达到无菌保证水平。本法常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子 (spores of *Bacillus stearothermophilus*)。

1. 热分布试验的操作 空载状态下的热分布试验:①整个灭菌腔室内的温度探头应均匀分布,将水平和垂直区均覆盖在内;②说明温度探头在腔室内的数量及位置,并有图示;③在排水口处,在靠近设备本身的温度传感/控制器的位置,应再放置一支探头;④在灭菌温度稳定期,各处温度应基本保持一致(如各点之间的温度差在 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 范围内);⑤重复试验至少 3 次,以证明在该工艺条件下的温度均一性、重现性、并且与规定标准相符;⑥每种装载方式下的热分布试验;⑦在产品容器内以及腔室均匀放置测温探头以确定在装载状态下升温缓慢的位置。此试验应在最大和最小装载方式下分别进行。

测定不同装载方式对产品的热力学效果的影响,通过实验应得到以下参数:

①保温阶段的最高和最低温度(温度范围)及平均温度;②最小和最大 F_0 值;③保温时间。复试验装载 3 次,以证明在该工艺条件下的温度均一性、重现性、并且与规定标准相符。

2. 热穿透试验 通过在产品容器内均匀分布测温探头以确定在灭菌时相应装载方式下的冷点。应分别在最大和最小装载方式下进行此试验,以确定不同装载方式对被灭菌物品的热力学效果的影响,通过实验应能获得如下数据:各点间的最大和最低温度(温度范围)保温阶段各点的平均温度、各点的最小及最大 F_0 值、以及各点的保温时间。

通过热穿透试验应达到以下目的：①测试数据应证明，在灭菌保温阶段整个腔室内各容器内的温度应不超过 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，各容器内温度之间的最大温差应不超过 2°C ；②根据灭菌参数确定合适的产品灭菌程序；③至少连续运行3次，以确保设定灭菌程序的稳定性和可靠性。

对于肠外用大输液产品及高黏性的液体产品，必须对容器内的冷点进行测试。可在容器内布置2~3个温度探头（插在不同的深度位置）来获得此方面的数据，对旋转灭菌器可以不用考虑容器内的冷点。

用相同的方法对于干热灭菌设备进行验证试验，但在保温期间各点间的温度差较湿热的要大，如在强制对流式或隧道式干热灭菌条件下，各点间温差会达到 $\pm 15^{\circ}\text{C}$ 。另外，与湿热灭菌相比，干热灭菌设备内不同类别的装载物及其装载方式，对热穿透效果的影响要大得多。

（二）干热灭菌法

本法系指物品于干热灭菌柜、隧道灭菌器等设备中、利用干热空气达到杀灭微生物或消除热原物质的方法。适用于耐高温但不宜用湿热灭菌法灭菌的物品的灭菌，如玻璃器具、金属制容器、纤维制品、固体试药、液状石蜡等均可采用本法灭菌。

干热灭菌条件一般为 $160 \sim 170^{\circ}\text{C} \times 120\text{min}$ 以上、 $170 \sim 180^{\circ}\text{C} \times 60\text{min}$ 以上或 $250^{\circ}\text{C} \times 45\text{min}$ 以上，也可采用其他温度和时间参数。总之，应保证灭菌后的产品其 $\text{SAL} \leq 10^{-6}$ 。干热过度杀灭后产品的 SAL 应 $\leq 10^{-12}$ ，此时物品一般无需进行灭菌前污染微生物的测定。 $250^{\circ}\text{C} \times 45\text{min}$ 的干热灭菌也可除去无菌产品包装容器及有关生产灌装用具中的热原物质。

采用干热灭菌时，被灭菌物品应有适当的包装和装载方式，保证灭菌的有效性和均一性。

干热灭菌法验证与湿热灭菌法相同，应进行热分布试验、热穿透试验、生物指示剂验证试验或细菌内毒素（endotoxin）灭活验证试验。以确认灭菌柜中的温度分布符合设定的标准、确定最冷点位置、确认最冷点标准灭菌时间（ F_H ）能达到设定标准并达到 SAL 要求。常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus subtilis*）。细菌内毒素灭活验证试验是证明除热原过程有效性的试验。一般将不小于1000U的细菌内毒素加入待去热原的物品中，证明该去热原工艺能使内毒素至少下降3个对数单位。细菌内毒素灭活验证试验所用的细菌内毒素一般为大肠杆菌内毒素。验证时，一般采用最大装载方式。

（三）辐射灭菌法

本法系指将灭菌产品置于适宜放射源辐射的 γ 射线或适宜的电子加速器发生的电子束中进行电离辐射而达到杀灭微生物的方法。本法最常用的为 ^{60}Co - γ 射线辐射灭菌。医疗器械、容器、生产辅助用品、不受辐射破坏的原料药及成品等均可用本法灭菌。

采用辐射灭菌法灭菌的无菌产品其 SAL 应 $\leq 10^{-6}$ 。 γ 射线辐射灭菌所控的参数主要是辐射剂量（指灭菌物品的吸收剂量）。该剂量的制定应考虑灭菌物品的适应性及可能污染的微生物最大数量及最强抗辐射力，所使用的剂量事先应验证其有效性及安全性。常用的辐射灭菌吸收剂量为 25kGy 。对最终产品、原料药、某些医疗器材应尽可能采用低辐射剂

量灭菌。灭菌前,应对被灭菌物品微生物污染的数量和抗辐射强度进行测定,以评价灭菌过程赋予该灭菌物品的无菌保证水平。

灭菌时,应采用适当的化学或物理方法对灭菌物品吸收的辐射剂量进行监控,以充分证实灭菌物品吸收的剂量是在规定的限度内。如采用与灭菌物品一起被辐射的放射性剂量计,剂量计要置于规定的部位。在初安装时剂量计应用标准源进行校正,并定期进行再校正。

^{60}Co - γ 射线辐射灭菌法验证时,除进行生物指示剂验证试验外,还应确认空载和装载时灭菌腔内的辐射剂量的分布图、灭菌物品的吸收剂量及最大和最小吸收剂量的分布、灭菌物品的均一性、灭菌腔内物品的装载方式等。常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子(spores of *Bacillus pumilus*)。

(四) 气体灭菌法

本法系指用化学消毒剂形成的气体杀灭微生物的方法。常用的化学消毒剂有环氧乙烷、气态过氧化氢、甲醛、臭氧(O_3)等,本法适用于在气体中稳定的物品灭菌。采用气体灭菌法时,应注意灭菌气体的可燃可爆性、致畸性和残留毒性。

本法中最常用的气体是环氧乙烷,一般与80%~90%的惰性气体混合使用。在充有灭菌气体的高压腔室内进行。该法可用于医疗器械,塑料制品等不能采用高温灭菌的物品灭菌。含氯的物品及能吸附环氧乙烷的物品则不宜使用。

采用环氧乙烷灭菌时,灭菌柜内的温度、湿度、灭菌气体浓度、灭菌时间是影响灭菌效果的重要因数。可采用下列灭菌条件:

温度	$54^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$
相对湿度	$60\% \pm 10\%$
灭菌压力	$8 \times 10^5 \text{ Pa}$
灭菌时间	90min

灭菌条件应予验证。灭菌时,先将灭菌腔室先抽成真空,然后通入蒸汽使腔室内达到设定的温湿度平衡的额定值,再通入经过滤和预热的环氧乙烷气体。灭菌过程中,应严密监控腔室的温度、湿度、压力、环氧乙烷浓度及灭菌时间。必要时使用生物指示剂监控灭菌效果。本法灭菌程序的控制具有一定难度,整个灭菌过程应在技术熟练人员的监督下进行。灭菌后,应采取新鲜空气置换,使残留环氧乙烷和其他易挥发性残渣消散。并对环氧乙烷残留物和反应产物进行监控,以证明其不超过规定浓度,避免产生毒性。

采用环氧乙烷灭菌时,应进行泄漏试验,以确认灭菌腔室的密闭性;生物指示剂的验证试验,指示剂一般采用枯草芽孢杆菌孢子(spores of *Bacillus subtilis*);灭菌后换气次数的验证试验,确认环氧乙烷及相应的反应产物含量在限定的范围内。验证设计时,还应考虑物品包装材料和灭菌腔室中物品的排列方式对灭菌气体的扩散和渗透的影响。

(五) 过滤除菌法

本法系利用细菌不能通过致密具孔滤材的原理以除去气体或液体中微生物的方法。常用于热不稳定的药品溶液或原料的除菌。

除菌过滤器采用孔径分布均匀的微孔滤膜作过滤材料,微孔滤膜分亲水性和疏水性两种。滤膜材质依过滤物品的性质及过滤目的而定。药品生产中采用的除菌滤膜孔径一般不超过 $0.22\mu\text{m}$ 。过滤器不得对被滤过成分有吸附作用,也不能释放物质,不得有纤维脱落,禁用含石棉的过滤器。滤器和滤膜在使用前应进行洁净处理,并用高压蒸汽进行灭菌或作在线灭菌。更换品种和批次应先清洗滤器,再更换滤膜。

过滤过程中无菌保证与过滤液体的初始生物负荷及过滤器的对数下降值 LRV (log reduction value) 有关。LRV 系指规定条件下,被过滤液体过滤前的微生物数量与过滤后的微生物数量比的常用对数值。

$$\text{即:} \quad \text{LRV} = \lg N_0 - \lg N$$

式中 N_0 为产品除菌前的微生物数量;

N 为产品除菌后的微生物数量。

LRV 用于表示过滤器的过滤除菌效率,对孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的过滤器而言,要求每 1cm^2 有效过滤面积的 LRV 应不小于 7。因此过滤除菌时,被过滤产品总的污染量应控制在规定的限度内。为保证过滤除菌效果,可使用两个过滤器串连过滤,或在灌装前用过滤器进行再次过滤。

在过滤除菌中,一般无法对全过程中过滤器的关键参数(滤膜孔径的大小及分布,滤膜的完整性及 LRV)进行监控。因此,在每一次过滤除菌前后均应作滤器的完整性试验,即气泡点试验或压力维持试验或气体扩散流量试验。确认滤膜在除菌过滤过程中的有效性和完整性。除菌过滤器的使用时间不应超过一个工作日,否则应进行验证。

过滤除菌法常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌 (*Pseudomonas diminuta*)。

通过过滤除菌法达到无菌的产品应严密监控其生产环境的洁净度,建议在无菌环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其他物品应采用适当的方法进行灭菌,并防止再污染。

(六) 无菌生产工艺

无菌生产工艺系指必须在无菌控制条件下生产无菌制剂的方法,无菌分装及无菌冻干是最常见的无菌生产工艺。后者在工艺过程中须采用过滤除菌法。

无菌生产工艺应严密监控其生产环境的洁净度,并应在无菌控制的环境下进行过滤操作。相关的设备、包装容器、塞子及其他物品应采用适当的方法进行灭菌,并防止被再次污染。

无菌生产工艺过程的无菌保证应通过培养基无菌灌装模拟试验验证。在生产过程中,应严密监控生产环境的无菌空气质量、操作人员的素质、各物品的无菌性。

无菌生产工艺应定期进行验证,包括对环境空气过滤系统有效性验证及培养基模拟灌装试验。

二、生物指示剂

生物指示剂系一类特殊的活微生物制品。可用于确认灭菌设备的性能、灭菌程序的验证、生产过程灭菌效果的监控等。用于灭菌验证中的生物指示剂一般是细菌的孢子。

（一）制备生物指示剂用微生物的基本要求

不同的灭菌方法使用不同的生物指示剂，制备生物指示剂所选用的微生物必须具备以下特性：①菌种的耐受性应大于需灭菌产品中所有可能污染微生物的耐受性；②菌种应无致病性；③菌株应稳定。存活期长，易于保存；④易于培养。若使用休眠孢子，生物指示剂中休眠孢子含量要在 90% 以上。

（二）生物指示剂的制备

生物指示剂的制备应按一定的程序进行，制备前，需先确定所用微生物的特性，如 D 值（微生物的耐热参数，系指一定温度下，将微生物杀灭 90% 所需的时间，以分表示）等。菌株应用适宜的培养基进行培养。培养物应制成悬浮液，其中孢子的数量应占优势，孢子应悬浮于无营养的液体中保存。

生物指示剂中包含一定数量的一种或多种孢子，可制成多种形式，通常是将一定数量的孢子附着在惰性的载体上，如滤纸条、玻片、不锈钢、塑料制品等；孢子悬浮液也可密封于安瓶中；有的生物指示剂还配有培养基系统。生物指示剂应选用合适的材料包装，并设定有效期。载体和包装材料在保护生物指示剂不被污染和损耗的同时，还应保证灭菌剂穿透并能与生物指示剂充分接触。载体和包装应设计原则是便于贮存、运输、取样、转移接种。

有些生物指示剂可直接将孢子接种至液体灭菌物或具有与其相似的物理和化学特性的替代品中。使用替代品时，应用数据证明二者的等效性。

（三）生物指示剂的应用

在灭菌程序的验证中，尽管可通过灭菌过程某些参数的监控来评估灭菌效果，但生物指示剂的被杀灭程度，则是评价一个灭菌程序有效性最直观的指标。可使用市售的标准生物指示剂，也可使用由日常生产污染菌监控中分离的最耐受微生物制备的孢子。在生物指示剂验证试验中，需确定孢子在实际灭菌条件下的耐受性，并测定孢子的纯度和数量。验证时，生物指示剂的微生物用量应比日常检出的微生物污染量大，耐受性强，以保证灭菌程序有更大的安全性。在最终灭菌法中，生物指示剂应放在灭菌柜的不同部位。并避免指示剂直接接触到被灭菌物品。生物指示剂按设定的条件灭菌后取出，分别置培养基中培养，确定生物指示剂中的孢子是否被完全杀灭。

过度杀灭产品灭菌验证一般不考虑微生物污染水平，可采用市售的生物指示剂。对灭菌手段耐受性差的产品，设计灭菌程序时，根据经验预计在该生产工艺中产品微生物污染的水平，选择生物指示剂的菌种和孢子数量。这类产品的无菌保证应通过监控每批灭菌前的微生物污染的数量、耐受性和灭菌程序验证所获得的数据进行评估。

（四）常用生物指示剂

1. 湿热灭菌法 湿热灭菌法最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus stearothermophilus*，如 NCTC 10007、NCIMB 8157、ATCC 7953）。 D 值为 1.5 ~ 3.0min，

每片（或每瓶）活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个，在 121°C 、19min 下应被完全杀灭。此外，还可使用生孢梭菌孢子（spores of *Clostridium sporogenes* 如 NCTC 8594、NCIMB 8053、ATCC 7955）， D 值为 $0.4 \sim 0.8\text{min}$ 。

2. 干热灭菌法 干热灭菌法最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus subtilis*，如 NCIMB 8058、ATCC 9372）。 D 值大于 1.5min，每片活孢子数 $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^6$ 个。去热原验证时使用大肠杆菌内毒素，加量不小于 1000 细菌内毒素单位。

3. 辐射灭菌法 辐射灭菌法最常用的生物指示剂为短小芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus pumilus*，如 NCTC 10327、NCIMB 10 692、ATCC 27142）。每片活孢子数 $10^7 \sim 10^8$ ，置于放射剂量 25kGy 条件下， D 值约 3kGy 。但应注意灭菌产品中所负载的微生物可能比短小芽孢杆菌孢子显示更强的抗辐射力。因此短小芽孢杆菌孢子可用于监控灭菌过程，但不能用于灭菌辐射剂量的建立。

4. 气体灭菌法 环氧乙烷灭菌最常用的生物指示剂为枯草芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus subtilis*，如 NCTC 10073、ATCC 9372）。气态过氧化氢灭菌最常用的生物指示剂为嗜热脂肪芽孢杆菌孢子（spores of *Bacillus stearothermophilus*，如 NCTC 10007、NCIMB 8157、ATCC 7953）。每片活孢子数 $1 \times 10^6 \sim 5 \times 10^6$ 个。环氧乙烷灭菌中，枯草芽孢杆菌孢子 D 值大于 2.5min，在环氧乙烷浓度为 600mg/L ，相对湿度为 60%，温度为 54°C 下灭菌，60min 应被杀灭。

5. 过滤除菌法 过滤除菌法最常用的生物指示剂为缺陷假单胞菌（*Pseudomonas diminuta*，如 ATCC19146），用于滤膜孔径为 $0.22\mu\text{m}$ 的滤器；黏质沙雷菌（*Serratia marcescens*）（ATCC 14756），用于滤膜孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的滤器。

三、湿热灭菌法验证试验实例

（一）产芽孢梭菌芽孢 - 生物指示剂验证乳剂类产品的灭菌工艺实例

1. 验证原理 USP 对过热灭菌工艺的定义是指能使 D 值不小于 1min 的微生物至少下降 12 个对数单位的灭菌工艺。对一般的液体产品而言，在 121°C 灭菌 15min 即被认为过热灭菌工艺。但对管路、胶塞、织物以及过滤器等热穿透性较差的物品则需要更长的灭菌时间或更高的灭菌温度，方能达到过热灭菌要求。用作生物指示剂的微生物芽孢应具有良好的耐热性并且耐热性也相对比较稳定。

根据灭菌工艺对微生物的强热致死效应，通常选用 D 值不低于 $1.5 \sim 3.0\text{min}$ 的嗜热脂肪芽孢杆菌芽孢（每个指示剂的芽孢含量通常在 $10^5 \sim 10^7$ 之间）作为生物指示剂对过热灭菌工艺进行验证。该类指示剂在 F_0 值低于其存活时间（ D 值 $\times$ 芽孢的对数值 - 2）时，应当能全部呈阳性结果；当 F_0 值高于其杀灭时间（ D 值 $\times$ 芽孢的对数值 + 4）时，所有的生物指示剂均应呈阴性结果。

对 F_0 值为 15min 的灭菌工艺（药典推荐的常用灭菌工艺），可选用 D 值为 1.5min、芽孢含量为 10^6 个的微生物指示剂，或其他耐热性相当的微生物指示剂，对其进行验证。

根据被灭菌物品的性质来确定所选用不同包装方式的微生物指示剂。灭菌溶液时，多选用自含型安瓿微生物指示剂；灭菌织物时，多选用芽孢条；灭菌管路时，则可能要选用

特殊生物指示剂（如用接有芽孢的钢丝、线等）以测试死角处（最冷点）的灭菌情况。

选择时，首先，要掌握灭菌前产品中污染菌状况，包括污染菌的数量及其耐热性；其次，测定生物剂在待验证产品及验证用标准溶液中耐热性（ D 值和 Z 值）；最后，根据产品的最低灭菌工艺条件、灭菌前产品中的污染菌控制要求及最终产品的无菌保证要求，用相关公式计算出验证时每个生物指示剂所需要的孢子数量。

2. 验证的方法步骤 下面以用产芽孢梭菌芽孢作为生物指示剂验证乳剂类产品灭菌工艺为实例，具体介绍生物指示剂的选择验证方法和步骤。

（1）收集与产品灭菌工艺相关的基本资料 本实例：某制药公司生产两种乳剂类产品（A 和 B），相关的产品资料。见表 6-1。

表 6-1 乳剂产品 A 及乳剂产品 B 的相关微生物控制参数

产品	灭菌前含菌量 限度控制	污染菌 耐热性限度	灭菌条件 温度 × 时间 (min)	F_0 控制范围 (min)	验证用孢子在其中的 耐热性 D_{121} (min)
A	≤100/袋	$D_{121} < 1.0\text{min}$	116℃ × 15	9 ~ 13	0.8
B	≤100/袋	$D_{121} < 1.0\text{min}$	116℃ × 15	8 ~ 12	0.9

注：产品 A 和产品 B 均为大容量注射剂（500ml/袋）。

在进行生物学验证之前，产品灭菌工艺已经过物理验证确定下来。因此，以上产品资料均可在生物学验证之前获取。灭菌前含菌量限度以及污染菌的耐热性限度均是以原材料的微生物含量和常规监控资料为基础而建立的；灭菌条件及 F_0 值控制是根据产品稳定性研究资料而建立的；验证用芽孢在每种产品中的实际耐热性资料由微生物实验室测得，并且通过热致死曲线的线性度发现产芽孢梭菌（*Clostridium sporogenes*）芽孢在上述两种产品内热稳定良好。

考虑到两种产品的规格相同、且在同一灭菌设备内灭菌并且灭菌工艺条件相似、以及生物指示剂芽孢在其中的耐热性也较为相近，只要验证其中的一个产品 D 即可，因为要采用 F_0 值控制范围的较低下限进行验证。但是，产品均是乳剂类产品，如直接将芽孢接种在产品内进行验证，势必给试验后的无菌检测带来很多麻烦。因此，可选择一透明澄清的标准溶液来替代上述二产品，只要芽孢在其中的耐热性不低于在两产品中的耐热性即可。

经测定，产芽孢梭状菌芽孢在氯化钠 - 磷酸盐缓冲液（PBS，pH7.0）中的耐热性为 1.4min，高于其在两产品中的耐热性，适合作为上述两产品灭菌工艺验证用标准溶液。

（2）确定验证条件 根据本案例，验证条件确定如下：灭菌前产品含菌量限度设定为 100/袋，灭菌温度为 116℃， F_0 值为 8min，以芽孢梭菌芽孢作为生物指示剂，验证标准溶液为氯化钠 - 磷酸盐缓冲液（PBS），验证试验瓶数量为 20 袋/次。

（3）确定芽孢的接种数量 我们知道，当灭菌条件一定时， $F_0 = D (X \lg N_0 - \lg N_t)$ 。

产品中污染菌的最大耐热性 $D_{121^\circ\text{C}} = 1.0\text{min}$ ，那么，灭菌工艺使产品达到无菌保证值所需最小 F_0 值为： $F_0 = 1.0 \times (\lg 100 - \lg 10^{-6}) = 8\text{min}$ ，与 F_0 值的下限（验证条件）相符。

按下式计算验证用产芽孢梭菌芽孢的接种量： $F_0 = D_{121} \times (\lg A - \lg B)$

根据阴性分数法, $B = 2.303 \times \log(n/q)$; 其中, n 为验证试验瓶总数; q 为试验结果呈阴性的瓶数。

假如所有的 20 只试验瓶无菌检查结果均呈阴性, 在计算时可假定只有 19 瓶呈阴性, 那么, $B = 2.303 \times \lg(20/19) = 0.0513$, 于是, $\lg B = -1.29$, $\lg A = F_0/D_{hi} + \lg B = 8/1.4 - 1.29 = 4.4$, $A = 10^{4.4}$, 因此, 每个验证瓶内的芽孢接种量可控制在 $10^4 \sim 10^5$ 之间。

(4) 操作 (略)

(5) 结果评价 在上述验证条件下, 只有连续 3 次试验的所有结果均合格 (均呈阴性) 方可证明相应灭菌工艺的可靠性。

(二) 生物指示剂验证实例

生物指示剂验证总是在灭菌设备的初始性能确认或产品的灭菌程序确认阶段进行。在随后的定期验证中, 也要与物理验证一同进行。

验证时, 腔室内的物品应按实际生产时的要求进行装载, 生物指示剂的使用数量应足以反映整个物品内、外部的灭菌状况, 生物指示剂既要遍布整个腔室, 又要尽可能地放在热效应最差的部位, 如物品中央、管路拐角以及腔室的排水口 (干热灭菌的排风口) 等。应尽可能地将生物指示剂与物理测定用温度探头放于同一位置, 以准确获取物理参数与微生物致死性之间的相关性资料, 这对偏差分析至关重要。放置在每个位置的生物指示剂均应做好标记, 并且要与验证文件中生物指示剂的验证分布图相对应。

验证时, 采用相关产品的最低灭菌条件进行灭菌处理。灭菌程序结束后, 将生物指示剂取出并清点数量并确认无误后, 送至微生物室, 在适当条件下培养检查。培养检查时, 需要考虑阳性对照以及培养基的灵敏度等关键事项。

在初始验证阶段, 分别用生物指示剂在相同的灭菌条件下至少连续运行 3 次, 以评价灭菌工艺条件的稳定性; 在以后的定期再试验中, 每次检测一批即可。

验证时的生物指示剂分布、腔室内的产品装载及指示剂的控制要求均与过热灭菌工艺验证时生物指示剂的使用原则相同。

生物指示剂验证的结果评价: 在上述验证条件下, 只有连续 3 次试验的所有结果均合格 (均呈阴性) 方可证明相应灭菌工艺的可靠性。

(三) 常用消毒灭菌效果评价实验操作实例

1. 目的要求 熟悉压力蒸汽灭菌、紫外线消毒效果试验的检测方法。

2. 器材和试剂

(1) 菌种 枯草芽孢杆菌黑色变种。

(2) 指示剂 嗜热脂肪芽孢杆菌菌片、枯草芽孢杆菌黑色变种菌片。

(3) 培养基 普通营养琼脂培养基、普通肉汤培养基、溴甲酚紫蛋白胨水。

(4) 试剂 消毒剂及其相应的中和剂、洗脱液。

(5) 其他器具 压力蒸汽灭菌器、紫外灯、无菌镊子、无菌吸管。

3. 步骤和方法

(1) 压力蒸汽灭菌效果的检测方法 ①将 5 片嗜热脂肪芽孢杆菌菌片分别装在灭菌的

试管中，管口用牛皮纸包封，然后置在通气储物盒内；②将通气储物盒放于手提压力蒸汽灭菌器内 5 个不同的位置；③103.43kPa 灭菌 20 ~ 30min 后，以无菌手续取出菌片，放入溴甲酚紫蛋白胨水培养基中，于 56℃ 培养 48h，观察培养基颜色的变化；④如所有培养基均不变色，外观澄清，说明无菌生长，则灭菌合格；如有 1 支培养基颜色变黄且外观浑浊，说明有细菌生长，则灭菌不合格。

(2) 紫外线杀菌效果的检测方法 ①取市售大肠埃希菌 ATCC25922 染菌的载片 8 个置于距紫外灯管垂直 1m 处，开启紫外灯照射，于 30、60、90、120min 4 个不同间隔时间各取出 2 个放入盛有洗脱液的试管中，振摇 80 次后进行适当稀释；②取 0.5ml 洗脱液做倾注平板，35℃ 培养 48h，做菌落记数；③试验同时做阳性对照，除不做照射外，其他操作同上；④计算杀灭率

$$\text{杀灭率} = \frac{\text{阳性对照组菌落数} - \text{试验组菌落数}}{\text{阳性对照组菌落数}} \times 100\%$$

⑤对指示菌杀灭率 $\geq 99.9\%$ ，判为消毒合格。达到物理检测标准时，作为消毒合格的参考标准。

第七章 药品微生物检测方法的验证

为保证药品的微生物检测检验的质量，必须对所有的检测方法进行验证，只有检测方法验证确认后才能确保验证结果的准确、可靠。我国的《药品生产质量管理规范》（1998年修订）第五十八条规定：“产品的生产工艺及关键设施、设备应按验证方案进行验证。当影响产品质量的主要因素，如工艺、质量控制方法、主要原辅料、主要生产设备等发生改变时，以及生产一定周期后，应进行再验证。第五十九条：应根据验证对象提出验证项目、制定验证方案，并组织实施。验证工作完成后应写出验证报告，由验证工作负责人审核、批准。第六十条：验证过程中的数据和分析内容应以文件形式归档保存。验证文件应包括验证方案、验证报告、评价和建议、批准人等”。

《中国药典》（2005年版）附录《药品质量标准分析方法验证》中明确指出：“药品质量标准分析方法验证的目的是证明采用的方法适合于相应检测要求，在建立药品质量标准时，分析方法需经验证；在药品生产工艺变更、制剂的组分变更、原分析方法进行修订时，则质量标准分析方法也需进行验证。方法验证理由、过程和结果均应记载在药品标准起草说明或修订说明中”。此外，《中国药典》（2005年版）的药品无菌检查法和微生物限度检查法中也明确规定了无菌检查法方法验证试验和微生物限度检查法方法的验证内容：“当供试品为新的产品或供试品的检验条件发生改变时，应进行方法验证试验，以确认供试品在该实验条件下无抑菌活性或其抑菌活性可以忽略不计。验证时，按“供试品的无菌检查”的规定及下列要求进行操作。供试品对每一试验菌的抑菌程度应逐一进行验证”；“当供试品为新的产品或供试品的检验条件发生改变时，应进行方法验证试验，以确认供试品的抑菌活性及测定方法的可靠性。验证时，按供试品的制备和细菌、霉菌及酵母菌计数所规定的方法及下列要求进行。对各试验菌的回收率应逐一进行验证”。为何规定要进行方法学的验证？这是由于许多药品本身具有抑菌性（如抗生素类药品、含防腐剂药品）会对检查结果带来影响，因此在进行微生物检测前，需要对样品进行适当的预处理以消除样品本身对微生物检测所带来的干扰。同样，样品的预处理方式、检验条件和培养条件也都会影响到样品的微生物检测结果。因此，在确定新产品的微生物学检验时或开发新的检测方法时或原有检验条件发生改变时必须加以验证，以确保在新产品的微生物学检验时或开发新的检测方法时或原有检验条件发生改变时的实际检验条件下，其检验方法的准确性、有效性和重现性。

目前虽然在食品、化妆品等行业的微生物检测中尚没明确规定要进行方法学的验证，但正如在绪论中指出的验证是能证明任何程序、工艺、设备、物料、活动、或系统确实能导致预期结果的文件证明的行为。因此其原理与方法同样适用这些行业，因为检测本身就是一项严谨、认真、准确、有效的科学工作。本章将以药品为例详细介绍药品微生物学检验方法的验证。

一、确保药品微生物检测方法验证准确性的关键因素

凡是对微生物学检测方法验证实验产生重大影响的因素,都是在设计验证方案时需要关注的关键因素。这些关键因素通常主要是由以下因素构成:①验证实验所用微生物的种类及其生理特性;②验证用微生物接种液的制备;③验证样品的预处理方法;以及所有验证实验的检验方法、检验条件和培养条件。因此这些因素也正是影响样品验证结果可靠性的关键要点。

(一) 验证实验用微生物的种类及其生理特性

众所周知,微生物种类类群繁多,不同种类的微生物其生理生化特性也各不相同。用于验证的微生物首先要考虑是否具有广泛代表性,至少包括 G⁻菌、G⁺菌、酵母菌和霉菌这四类微生物。这几类微生物基本涵盖了样品中可能存在的各类微生物;另一方面,它们也基本包含了在防腐抑菌效果检验试验中所要使用的试验菌株。在对控制菌或致病菌的检查方法进行验证时,则要求采用与被检微生物相同的标准菌株作为验证微生物,这样针对性与效果会更好。此外,根据验证实验的目的,可能还要增加一些在特定环境分离到的菌株用于环境监测方法或无菌检查方法的验证。

《中国药典》(2005年版)规定的验证用菌株有:大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102],金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003],乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella apecies*) [CMCC (B) 50094],白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC (F) 98001],黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC (F) 98003]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC (B) 10104],枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [AMCC (B) 26003],生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) [CMCC (B) 64941],这些验证用菌株的培养温度、培养基、培养时间见表7-1。

另外,微生物生理生化状态与制备和培养条件有密切关系,而这些生理生化状态又直接影响到微生物试验结果。因为微生物在生长不同时期(如对数期)的营养细胞和衰老细胞、或芽孢的生理生化状态是不同的,我们试验研究的是群体细胞,而不可能仅是单个的细胞,只有群体细胞均匀,生理生化特性趋于一致,实验结果才会稳定。因此,无论是用于微生物验证、防腐效力测试或消毒效果检查的验证菌株,还是用于常规试验用的阳性对照菌、培养基灵敏度检查用的试验菌,它们的培养基、储存条件要按既定的标准操作规程进行,制备均匀一致的营养细胞或芽孢,以确保各代微生物营养细胞或芽孢的生理生化状态保持稳定一致,特征趋于一致。因此选用的试验菌株应至少包含 G⁻菌、G⁺菌、酵母菌和霉菌这四大微生物,同时确定选用营养细胞还是芽孢。

(二) 验证用微生物接种液的制备

验证用微生物接种菌液的制备,必须使用5代之内的菌种。取验证(挑战)微生物菌种(大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、生孢梭菌;白色念珠菌等的新鲜培养物)至新鲜琼脂培养基中(营养肉汤、硫乙醇酸盐;改良马丁培养基中),30~35℃培养18~24h;20~25℃培养18~24h(白色念珠菌),试管培养物加入0.9%无菌氯化钠溶液约5ml或其他适宜的

稀释液，制成浓菌悬液，用上述培养物进行 1ml→9ml 的 10 倍系列稀释，按《中国药典》（2005 年版）规定的平皿菌落计数法测定菌数，制成每毫升含菌 10~100 菌落形成单位（CFU）的菌悬液。备用。

将黑曲霉菌接种至真菌琼脂斜面培养基上，20~25℃培养 5~7d，使大量的孢子产生。加入 3~5ml 0.9% 无菌氯化钠溶液，用玻璃棒将孢子洗脱。然后，用管口带有能过滤菌丝装置（如薄的无菌棉花或纱布的无菌毛细吸管）吸出孢子菌液至无菌试管内，用浊度法或《中国药典》（2005 年版）规定的平皿菌落计数法测定菌数，将菌液稀释至每毫升含 10~100 个。备用。

以上确定供试用的菌液（稀释菌液含 10~100CFU/ml）就可作为验证用接种液，接种液要保存在 2~8℃的冰箱内，可于 1 周内使用，但要求在每次接种时须重新计数，以确证稀释菌液的准确浓度。

验证微生物所用合适培养基及其制备条件见表 7-1。

表 7-1 验证微生物及其制备条件

验证微生物	合适的培养基	培养温度（℃）	培养时间（h）
大肠埃希菌（ <i>Escherichia coli</i> ）CMCC ^① （B）44102	大豆胰蛋白胨琼脂（TSA）或大豆胰蛋白胨肉汤（TSB）或营养琼脂培养基或（NA）营养肉汤培养基（NB）	32.5±2.5，有氧	18~24
铜绿假单胞菌（ <i>Ps. aeruginosa</i> ）CMCC（B）10104 或 ATCC9027		32.5±2.5，有氧	18~24
乙型副伤寒沙门菌（ <i>Salmonella species</i> ）CMCC（B）50094		32.5±2.5，有氧	18~24
金黄色葡萄菌（ <i>Staph. aureus</i> ）AMCC（B）26003 或 ATCC6538		32.5±2.5，有氧	10~24
枯草芽孢杆菌（ <i>Bacillus subtilis</i> ）AMCC（B）26003		32.5±2.5，有氧	18~24
梭状芽孢杆菌（ <i>Cl. sporogenes</i> ）CMCC（B）64941 或 ATCC11437	硫乙醇酸盐琼脂（TGA）或硫乙醇酸盐液体培养基（TGB）	32.5±2.5，厌氧	18~24
白色念珠菌（ <i>Candida albicans</i> ）CMCC（B）98001hu 或 ATCC10231	萨布罗葡萄糖琼脂（SDA）或玫瑰红钠琼脂培养或改良马丁培养基	22.5±2.5，有氧	2~3d
黑曲菌（ <i>Aspergillus niger</i> ）ATCC ^② 16404 或 CNCC（F）98003		22.5±2.5，有氧	6~10d

注：①ATCC：美国菌种保藏中心（American Type Culture Collection），菌种可在网上订购（<http://www.atcc.org>）；
②CMCC：中国医药微生物菌种保藏中心。菌种可在中国药品生物制品检定所（北京）订购。ATCC 与 CMCC 系列是法定菌种保藏机构。

（三）验证试验条件

在每个微生物检测方法验证中均应指明检测的实验条件。除要规定具体的阳性对照或抑菌效力测试试用菌种之外，还包括试验用设施、设备、器具和材料、样品的预处理方

式、稀释剂(液)、冲洗液、实验操作程序、培养条件(培养基、温度和时间)等。凡在检测方法中规定的上述关键试验条件均要与实际检测时条件相一致,并在方法验证中一一再现并准确执行。现分别详细述之。

1. 验证试验的设施、设备、器具和材料 微生物检验总是应在具有一定洁净度要求的环境下进行,《中国药典》(2005年版)有明确规定。无菌检验试验应在以至少10000级区为背景的100级层流工作台内进行;药品防腐效力测定宜在一般的相对独立的环境控制区内的生物安全柜内进行。因此验证的设施、设备、器具和材料应考虑和平时检测的条件相同,检验用设备和器具包括压力产生设备(真空压力泵)、过滤器、过滤膜、量器具等均要在验证方案中指明所用器具的规定、型号和来源,尤其是过滤器、过滤膜等与检品和培养基直接接触的器具和材料一定要注明,并且一旦确定并通过了验证,在实际检验时就得不得更改,否则须重新验证。

2. 验证试验用的稀释剂(液)、冲洗液 稀释剂(液)、冲洗液是用于稀释或冲洗之用,在微生物检验中,常用的稀释液和淋洗液有无菌0.9%氯化钠溶液、各种中性的磷酸盐缓冲液、0.1%蛋白胨水溶液(pH为 7.1 ± 0.2)、pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液;含0.1%聚山梨酯(吐温-80)的0.1%蛋白胨水溶液(pH为 7.1 ± 0.2)等。验证实验方案中所用的稀释液及稀释倍数、淋洗液用量及淋洗次数等,应当与检验方法规定的相一致。如果验证结果显示,因稀释或淋洗不充分而不能有效抵消或中和样品的抑菌性,或者因淋洗液用量过多而破坏了滤膜截留微生物的效果,那么,就要根据试验结果对样品的稀释和淋洗程序做相应的调整,直至通过验证。一旦通过验证,在实际程序中就应严格执行验证实验中所用的稀释液和稀释方式以及淋洗液和淋洗的方式。

3. 无抑菌性样品的验证方法 对没有抑菌作用的产品,这类验证试验比较简单,只要根据产品的溶解特性和微生物限度要求来选择适当的中性稀释对其进行溶解和(或)稀释,然后采用直接接种法进行验证。常用的中性稀释液或淋洗液有:0.9%氯化钠溶液或0.1%蛋白胨水溶液(适用于水溶性产品);pH 7.1 ± 0.2 或pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液;含0.1%聚山梨酯(吐温-80)的pH 7.1 ± 0.2 的0.1%蛋白胨水溶液(适用于含卵磷脂或油类的药品)。

4. 具抑菌性样品的验证方法 对这类供试品,首先要通过抑细菌、抑真菌试验以验证、确定其是否具有抑菌作用,然后才选择适合的检验方法。对有抑菌作用的样品验证消除其抑菌性的方法。通常采用中和产品抑菌性的方法,一般有3种,可将这些方法的2个或3个组合在一起使用。这3种方法是:

(1) 化学钝化中和法(又称化学试剂中和法) 常用的钝化剂有对氨基苯甲酸、卵磷脂、聚山梨酯80等。表7-2列出了用于消除药品抑菌性的常见化学中和剂,及其对某些微生物的潜在毒性。尽管化学中和剂对某些微生物有毒性,但因其中和速度快,且使用方便,所以被广泛应用。在防腐剂抑菌效力试验中采用化学钝化试剂中和法,无菌检查法中的膜过滤法和直接接种法也可考虑使用化学钝化中和剂。有些对化学中和剂不敏感的抑菌性药品,可采用酶法中和(如青霉素酶)。

表 7-2 中和化学抑菌剂的常用中和剂

中和剂	化学抑菌剂的类别	中和剂的潜在抑菌性
硫酸氢盐	戊二醛	非芽孢细菌
稀释剂	酚类、乙醇、乙醛、山梨酸酯	—
甘氨酸	乙醛	生长细胞
卵磷脂	季铵盐类化合物、对羟基苯甲酸酯类	细菌
Mg ²⁺ 或Ca ²⁺ 离子	EDTA	—
聚山梨酯	季铵盐类化合物、碘、对羟基苯甲酸酯类	—
硫基醋酸盐	汞制剂	葡萄球菌类和芽孢
硫代硫酸盐	汞制剂、卤化物、乙醛	葡萄球菌类

(2) 稀释中和法 将样品稀释至最低抑菌浓度以下进行检查。

由于化学抑菌剂的抑菌效果与其浓度呈正相关，即浓度越高，抑菌作用越强。常用稀释法来中和检品的抑菌性。不同抑菌剂的浓度与其抑菌效力间的相关性不同，但对某一特定的抑菌剂来说，这种相关性是恒定不变的，二者呈指数关系，可用下式表示：

$$C^{\eta}t = k$$

式中， C 表示抑菌剂的浓度； t 表示杀灭标准试验菌株所需要的时间； k 是一个常数；浓度指数 η ，是 $\lg t$ 与 $\lg C$ 作图所得直线的斜率。抑菌剂的 η 值越高，其抑菌作用越易通过稀释而被中和掉；抑菌剂的 η 值越低，则越难通过稀释法来中和消除其抑菌力。

(3) 薄膜过滤中和法 薄膜过滤中和法使用最广泛，在药品微生物学检测中，尤其是无菌检查中常用薄膜过滤来消除药品的抑菌性。该法的原理是：当抑菌性产品通过滤膜过滤时，微生物被截留于滤膜上，然后，培养滤膜看其是否有微生物生长。残留于滤膜上的抑菌成分会抑制微生物生长，应尽可能采用对检品具有低吸附性的滤膜（如聚偏二氟乙烯），将抑菌效果降到最低。此外，对含防腐剂的产品，可通过稀释或淋洗滤膜来削弱抑菌力，所用稀释液或淋洗液应比较温和，如 0.1% 蛋白胨溶液与 pH7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液，适用于水溶性产品，含 0.1% 聚山梨酯（吐温 - 80）的 0.1% 蛋白胨溶液，适用于含卵磷脂或油类药品。淋洗液中所用的化学钝化（中和）剂应确保滤膜上的抑菌性残留物不会对微生物生长产生不良影响。

5. 青霉素类或头孢类产品无菌检查用培养基的处理 如采用直接接种法对此两类药物进行无菌检查，可按以下方法调整硫乙醇酸盐肉汤培养基及大豆胰蛋白胨液体培养基的配方，无菌操作向已灭菌的培养菌容器内加入一定量的 β -内酰胺酶，使检品中的抗生素失活。（事先测出 β -内酰胺酶对青霉素或头孢素的中和效力，再确定其用量，加有 β -内酰胺酶的培养基也可用于薄膜过滤法）。 β -内酰胺酶的加入量需通过验证。

在与细菌试验环境完全隔离的区域内进行，确定 β -内酰胺酶的用量，将数量不超过 100 个菌（CUF）的球菌 [CMCC (B) 26003 或 ATCC 29737] 接入培养基内。若能观察到接入菌种的典型生长现象，则证明 β -内酰胺酶的加入量是合适的。

6. 培养条件 微生物的生长条件也是准确测定微生物含量的重要前提条件。首先要选择能使特定样品中微生物能生长的适宜培养基（可通过细菌生长试验证实），其次是确定培养的温度和时间。可根据不同的检查项目选用各类培养基，通常营养琼脂培养基

(NA)、营养肉汤培养基(NB),以及大豆胰蛋白胨琼脂(TSA)、肉汤(TSB)等基础培养基,因其生长菌谱广,适宜大多数细菌生长,而常被用于一般的细菌检测和培养。同样,硫乙醇酸盐琼脂(TGA)或肉汤(TGB)常被用于需气、厌气菌的检测和培养,萨布罗葡萄糖琼脂(SDA)或玫瑰红钠琼脂培养基适宜霉菌生长而常被用于真菌(酵母菌、霉菌)的检测和培养。如果样品本身就有抑菌作用,可向上述培养基中添加适量的中和剂(如聚山梨酯、卵磷脂等)。使用培养基前,按规定应先检查其灵敏度和无菌性。培养的温度和时间也非常关键,表7-1中的温度和时间是各类微生物的代表性培养条件。总之,验证实验所采用的培养条件必须要与实际检验的培养条件相一致,以保证实验的真实性与重现性。

二、验证试验的原理与方法

(一) 验证的原理

验证是用微生物恢复生长的比较而确定的。因此试验方案的设计需满足两方面的要求,一方面,在检测前样品的预处理方式能有效抵消(或中和)产品的抑菌性;另一方面,样品的预处理方式和检验过程以及培养条件等均不会影响样品中的微生物生长。其方法是将试验用验证菌株等量(通常接种量为10~100 CUF之间)接种于3组(样品组、对照组、阳性对照组)不同的供试品中,经适温培养后计算各自的生长菌落数,经“检测”后,通过比较这3组供试品中验证菌株的恢复生长结果来评价整个检验方法的准确性、有效性和重现性。

1. 验证试验用供试品的制备与检查 验证试验分为3个组:A组(样品组),用适当的方法中和样品,再向其中接入少量验证微生物(接种量要少于100 CUF),按照常规检测程序和培养条件检查验证微生物的恢复生长情况;B组(蛋白胨或pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液对照组),除了用B溶液(0.1%蛋白胨或pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨溶液)替代实际样品外,中和方式、检测程序和培养条件等均与A组相同;C组(阳性对照组),不经中和处理,将实验菌株直接接种于培养基培养(接种量与A、B组相同)。

2. 结果分析 如果A组与B组的微生物生长数量相似,表明中和剂具有足够的中效力,即该中和方式有效消除了样品的抑菌性;如果B组与C组的微生物生长数量相似,则表明样品预处理用中和剂的毒性、检测程序和培养条件等均不会影响微生物的生长。

如果样品没有抑菌性,可省去B组试验,直接比较A组和C组的微生物生长结果。如果A组微生物生长数量不及C组的微生物生长数量,则表明实验用器具、材料或培养条件等方面存在对微生物生长不利的因素。

为考察检验方法的稳定性和重现性,验证时,至少需准备3个不同批次号的同类样品,分别进行3次验证实验。

(二) 验证的合格标准

分为平皿菌落计数法、液体培养基直接接种法、薄膜过滤法3种标准。

1. 平皿菌落计数法 在药品防腐剂防腐效力测试以及微生物限度检查中,通常采用

平皿菌落计数法计数每毫升（或克）样品的微生物含量。参照“验证试验用供试品的制备与检查”进行验证实验，对每种试验菌种来说，每组试验至少独立重复3次（即用3个不同批次的样品）。如果每次试验结果都表明：样品试验组（A）中验证微生物平均生长数量不低于阳性对照组（C）中验证微生物平均生长数量的70%，则认为两组试验的微生物生长数量相同，原检验方法通过验证。

2. 液体培养基直接接种法 无菌试验中的直接接种法，要求培养基既能中和抗菌剂的抑菌性，又能支持适合广谱微生物的生长，因此选用的液体培养基应能使样品中潜在的所有微生物完全能够生长。按照“验证试验用供试品的制备与检查”进行验证试验，对每种试验菌种来讲，每组试验至少独立重复3次。改变产品和培养基的比率以达到中和效果。如果3批（用3个不同批次的样品）实验结果均表明：在14 d内所有样品试验组中的液体培养基都显示有大量的微生物生长，则相应的试验方法通过验证。

3. 薄膜过滤法 薄膜过滤方法使用范围最广，除适用于无菌产品的无菌检查外，又适用于非无菌产品的限度检查。但关键是样品必须能被过滤。有些样品，如固态粉剂、软膏或乳剂等，在过滤前需要溶解样品。针对需要溶解的药品而通过验证证明该样品的溶解方式及整个试验过程、试验用具和材料以及培养条件等均不会影响产品中固有微生物的生长。其方法是：

（1）样品试验组 将样品溶液通过滤膜，再用适量的淋洗液淋洗滤膜3次，并在最后一次淋洗液中接入少量（10~100CFU）验证菌，淋洗后，将滤膜转移到适当的固体培养基上（或液体培养基中）培养。如果样品的抑菌性很强（如抗生素），过滤前需要对样品进行中和处理，那么，要在过滤前将菌种接入经中和处理过的样品溶液中，以验证中和效果。

（2）蛋白胨对照组 样品为不加产品的A溶液，其他操作及实验条件与样品试验组相同。以考察样品中和用钝化剂（针对需要预处理的样品）过滤器和过滤膜材质是否会影响微生物的生长。

（3）阳性对照组 将与样品试验组和蛋白胨对照组等量的同种验证菌悬液（10~100CFU）直接接种到固体培养基表面（或液体培养基中）。比较蛋白胨对照组和阳性对照组的微生物生长结果，可估计出过滤器和滤膜所造成的微生物损失数量。

如果3次验证（用3个不同批次的样品）试验结果均表明：上述3组试验结果间差异均在70%以上（固体培养）或在培养14 d内所有试验组的液体培养基都显示生长，那么，可认为验证微生物的回收率基本相同，相应的微生物检验方法通过验证。

（三）药品无菌检查方法的验证

1. 直接接种法

（1）验证试验方法 验证供试品对直接接种法有抑细菌或抑真菌特性时，按表7-1所列的菌种，向该种无菌检查用培养基内接入该微生物，每种培养基接2瓶，每瓶接种量要控制在10~100个菌之间，参照《中国药典》要求确定培养基用量。然后，按无菌检查要求，向含有微生物的其中1瓶培养基内接入规定量的供试品，另外1瓶作为阳性对照。对表7-1中所列的菌种及相应的培养基逐一进行验证，并将容器置于适当的温度下培养，

培养时间不超过 14 d。

(2) 验证结果的评价 如果验证供试品与阳性对照相比, 供试品容器内微生物生长现象不明显, 则说明该检品具有抑菌性。可使用吐温-80、卵磷脂、偶氮凝集素或 β -内酰胺酶等中和剂消除抑菌有效果。如果中和剂不能消除抑菌作用, 可适当增加培养基的体积, 以降低验证检品的浓度以达到消除抑菌的目的。无菌检查时的培养基用量应在含有检品的条件下不出现抑菌作用的最小体积。USP 规定, 如果培养基体积增至 2000ml 仍无法消除抑菌作用, 则在无菌检查试验中使用 2000ml 培养基; 但在检验医疗器械时, 为使检品完全浸没于培养基内, 所用培养基的体积可超过 2000ml。

2. 薄膜过滤法

(1) 验证试验方法 试验原理同前述薄膜过滤法。验证供试品对薄膜过滤法有抑细菌和抑真菌特性时, 与实际的无菌检查相同, 在同一型号的每个过滤器或过滤筒内过滤规定定量的供试品(容器数及每容器的过滤体积), 用淋洗液淋洗滤膜至少 3 次, 每次淋洗液体积为 100ml, 在最后一次淋洗液中, 接入验证用菌种(接种量为 10~100CFU); 另取一过滤器或滤筒, 不过滤供试品, 重复以上淋洗操作, 作为阳性对照。根据具体情况, 可将整张滤膜或半张滤膜转移至 100ml 的指定验证用培养基内, 或将培养基加入到装有滤膜的滤筒内。分别对表 7-1 中所列菌种及相应的培养基逐一进行验证, 并将容器置于适当的温度下培养, 培养时间不超过 14 d。如果使用新的滤膜或滤过滤器(包括不同厂家或批号、型号), 则应按上述薄膜过滤法的要求做 3 组试验, 即样品试验组、蛋白胨对照组和阳性对照组重新进行验证确认。

(2) 验证结果评价 如果供试品培养基容器内的培养基内明显可见微生物生长(混浊), 并且与阳性对照容器内的培养结果相似, 则在无菌检查试验中必须要过滤与验证试验相等量的供试品、淋洗液, 淋洗相同次数及使用同量的培养基。如果与阳性对照容器内的培养结果相比, 供试品容器内微生物生长现象不明显, 则说明该检验量在此检验条件下有抑菌作用。应增加淋洗次数, 重复以上实验。也可通过更换过滤膜并使用中和剂来消除产品的抑菌作用。USP 规定, 如果已淋洗了 5 次, 并且每次淋洗液体积达到 500ml, 仍无法中和膜上的残余抑菌性物质, 那么在无菌检查试验中就采用此淋洗次数与淋洗量作为最终淋洗方法。

(四) 药品细菌、霉菌及酵母菌计数检查方法的验证

药品细菌、霉菌及酵母菌计数检查是检测单位(体积或重量)药品中微生物数量的方法, 《中国药典》(2005 年版)采用平皿法与薄膜过滤法进行计数检查。在建立供试品的细菌、霉菌及酵母菌计数方法时或原测定法的检验条件、药品组分发生改变可能影响检验结果时, 应对计数方法的可靠性进行验证, 以确保测定结果的准确性。就其具体检测方法的验证来讲, 并没有什么特殊性, 主要是确证样品有无抑菌性(即确证检测样品中的微生物能否在此培养基中生长)。验证时, 按供试液的制备和细菌、霉菌及酵母菌计数所规定的进行。各试验菌应逐一进行验证试验。通常方法是在检测样品中加入能代表样品检测的四大代表类型的菌种(G^+ 菌、 G^- 菌、霉菌和酵母菌, 具体可见前述的验证试验用微生物, 加菌量应控制在 10~100CFU)然后按前述的平皿菌落计数法, 独立检测 3 批样品;

每次试验结果表明样品试验组的细菌(霉菌)总数不低于阳性对照组的平均生长数量的70%,则该检测方法通过验证。只要检测样品的工艺材料、方法使用的培养基、灭菌方法、操作人员不改变,则该检测方法可一直沿用;如任何条件发生改变,按规定,则要求重新予以验证证实。本节就平皿法的具体操作方法介绍如下。

1. 制备供试液 按规定制备验证用供试液。(可参见第九章四、微生物限度检查内容)

2. 制备验证用菌株(菌悬液) 见本章一、(二)。

3. 验证方法 取规定量最低稀释级的供试液,加入50~100CFU试验菌,按菌落计数方法测定其菌数(为供试品组)。平皿法计数,其试验菌液、供试液应分别注入平皿中,立即倾注琼脂培养基;薄膜过滤法计数,应在最后一次的冲洗液中加入试验菌。同时测定加入的试验菌数(为活菌组)及供试品的本底菌数(为空白组)。为考察供试液制备过程中微生物受影响的程度,可用相应的稀释液替代供试品,加入试验菌,使最终菌浓度为每1ml含50~100CFU,按供试品组的供试液制备方法和菌落计数方法测定其菌数(为对照组)。验证试验至少应进行3次独立的平行试验,并分别计算各次试验的菌回收率。

$$\text{供试品组的菌回收率}(\%) = \frac{\text{供试品组平均菌落数} - \text{空白组平均菌落数}}{\text{活菌组的平均菌落数}} \times 100\%$$

$$\text{对照组的菌回收率}(\%) = \frac{\text{对照组的平均菌落数}}{\text{活菌组的平均菌落数}} \times 100\%$$

4. 验证方法的结果判定 对照组的菌回收率均应不低于70%。若供试品组的菌回收率均不低于70%,符合验证试验,可按此方法测定供试品的细菌、霉菌及酵母菌数;若任意一次试验中供试品组的菌回收率低于70%,不符合验证试验,应建立新的方法,并重新验证。

验证试验可与供试品的细菌、霉菌及酵母菌计数同时进行。

(五) 药检控制菌检查法的验证

药检中各控制菌的检测主要有大肠埃希菌、沙门菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、梭菌的检查。在建立供试品的控制菌检查法或原检查法的检验条件发生改变可能影响检验结果时,应对检查法的可靠性进行验证,以确认所采用的方法适用于该药品的控制菌检查。验证时,依各品种项下微生物限度标准中的控制菌选择相应验证的菌株,验证大肠菌群检查法时,应采用大肠埃希菌作为验证的菌株。验证试验按供试液的制备和控制菌检查法的规定及下列要求进行。

1. 验证用菌株与制备菌悬液 大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102]、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003]、乙型副伤寒沙门菌(*Salmonella apecies*) [CMCC (B) 50094]、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC (B) 10104]、生孢梭菌(*Clostridium sporogenes*) [CMCC (B) 64941]。

接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、沙门菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基中,生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中,培养18~24h。用0.9%无菌氯化钠溶液或其他稀释液制成1ml含10~100CFU的菌悬液。

2. 验证方法 供试品制成供试液后, 分别取 50~100 CFU 试验菌在含供试品(为供试品组)和不含供试品(为活菌组)的条件下, 依相应控制菌检查法进行检查。供试品组的试验菌液和供试液应分别加入增菌培养基中。为考察在供试液制备过程中微生物受影响的程度, 可用相应的稀释液替代供品, 加入试验菌, 使最终菌浓度为每 1ml 含 10~100CFU, 按供试品组的供试液制备及控制菌检查法进行控制检查(为稀释液对照组)。

同时为了验证控制菌检查方法的专属性, 可设阴性菌对照组。方法同上, 只不过是验证大肠埃希菌、大肠菌群、沙门菌检查法时的阴性对照菌采用金黄色葡萄球菌; 验证铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、梭菌检查法时的阴性对照菌采用大肠埃希菌。阴性对照菌不得检出。

3. 结果判定 阴性菌对照组不得检出阴性对照菌。活菌组和稀释液对照组均应检出试验菌。若供试品组检出试验菌, 符合验证试验, 按此法进行供试品的该控制菌检查; 若供试品组未检出试验菌, 不符合验证试验, 应建立新的方法。如采用培养基稀释法、离心沉淀集菌法、薄膜过滤法、中和法等方法或联合使用这此方法消除供试品的抑菌活性, 并重新进行方法验证。

验证试验也可与供试品的控制菌检查同进行。

(六) 药检中各控制菌检测的注意事项

由于该项检测要求技术条件高和要求有一定丰富实践经验, 故在鉴定中, 新手们要多以标准菌株进行实践练习, 以提高自身水平。

1. 大肠埃希菌检测

(1) MUG 法不必从混合菌中分离单个菌落。除大肠埃希菌外, 尚有部分志贺菌属、沙门菌属的菌株, 以及少数革兰阳性球菌、杆菌和芽孢菌, 其 MUG 为阳性。因此, 在 MUG 培养基成分中增加了去氧胆酸钠, 可排除革兰阳性菌的干扰。至于志贺菌、沙门菌在胆盐乳糖培养基中较难生长, 即使有生长, 本法也能检出。既然药品中不得检出大肠埃希菌, 更不允许检出志贺菌、沙门菌。

(2) 配制 MUG 培养基时, 务必校正 pH, 灭菌后 pH 不得过 7.4, 否则 pH 偏高, MUG 分解, 本身则显荧光; 分装 MUG 培养基的试管应挑选, 试管、蛋白胨不得显荧光。

(3) 培养时间 供试品培养液接种于 MUG 培养基中的培养时间, 一般在 4h、24h 观察是否产生荧光, 如荧光很微弱, 不能准确判断时, 该延长培养至 48h 再观察结果。由于大肠埃希菌各菌株间的 MUG 的属性不完全相同, 对底物和底物浓度反应的差异; 培养基中选择因子的影响; 培养时间; 温度; pH 的改变; 大量竞争菌和样品本身物质成分的干扰等; 对结果的判断亦有影响。

(4) 结果观察 取供试品的 MUG 试管、阳性对照管。阳性对照管同时在 366 nm 紫外灯下观察, 阳性对照管应有较强蓝白色荧光, 阴性对照管无荧光。试品 MUG 管是否有荧光, 应仔细观察比较, 或将各管调换位置(阴性管居中), 适当倾斜试管, 阳性对照管荧光强烈, 影响供试品管与阴性对照管的观察时, 亦该移去阳性对照管。

(5) 药品中污染的大肠埃希菌, 易受生产工艺及药物的影响。在曙红亚甲蓝琼脂或麦康凯琼脂平板上的菌落形态特征有变化时, 挑取可疑菌落往往凭经验, 主观性较大, 务必

挑选 2~3 个以上菌落分别做 IMViC 试验鉴别, 挑选菌落越多, 挑选阳性菌的机率越高, 如仅挑选一个菌落 IMViC 试验的鉴别, 则易漏检。

(6) 在 IMViC 试验中, 以灭菌接种针沾取菌苔, 首先接种于枸橼酸盐琼脂斜面上, 然后接种于蛋白胨水培养基、磷酸盐葡萄糖胨水培养基中。切勿将培养基带入枸橼酸盐琼脂斜面上, 以免产生假阳性结果。枸橼酸盐利用试验培养时间, 原定为 2d, 根据试验资料, 发现培养 3d 后, 枸橼酸盐利用试验产生阳性。仅培养 2d 是不够的, 故试验培养时间改为 2~4d。

(7) 阳性对照试验是检查供试品是否有抑菌作用及培养条件是否适宜。阳性对照菌液的制备、计数及加入含供品的培养基中等操作, 不能在检测供试品的无菌室或净化台上进行, 必须在单独的隔离间或净化台操作, 以免污染供试品及操作环境。

(8) 在各类供试品中检测大肠杆菌及其他控制菌, 按一次检出结果为准, 不准抽样复检。检出的大肠埃希菌及其他控制菌培养物须保留 1 个月, 复查。

2. 沙门菌检测

(1) 氰化钾试验应十分注意密封管口, 夏天分装培养基宜在冰浴中进行, 防止氰化钾分解, 产生氢氰酸逸出, 致使培养基内氰化钾浓度降低, 不能抑制细菌生长, 造成假阳性。

氰化钾为剧毒品、操作时须谨慎, 切勿用口吸液。用后的培养基每管加数粒硫酸亚铁和 20% 氢氧化钾 0.5ml 去毒。然后再灭菌、洗涤。

(2) 试验用培养基, 需经过质量鉴定, 用已知典型反应菌株进行测验, 其灵敏度及特征性反应符合要求。培养基需在规定条件保存, 在规定时间内使用。分离平板在使用前应置 36℃ 温箱内倒置孵育 1~2h, 使其表面温暖湿润, 利于分离。

3. 铜绿假单胞菌检测

(1) 铜绿假单胞菌污染药品后, 因生产工艺和药物的影响, 在溴代十六烷基三甲胺平板上的菌落形态可产生非典型形态。为防止漏检, 在挑取疑似菌落时, 宜取 2~3 个以上菌落, 分别进行检验, 以提高铜绿假单胞菌的检出率。

(2) 绿脓菌素是铜绿假单胞菌鉴定的重要特征, 但色素的产生受许多因素的影响, 除菌株差异及变异外, 培养条件是重要因素, 温度、培养基成分等皆可影响色素产生。培养基中琼脂蛋白胨等应事先测试, 选用适宜品牌, 试验时并用阳性菌株作对照试验。

(3) 明胶液化试验 试验在试验接种前, 培养基应为固态, 否则需将培养基置冰箱内使之凝固后, 再穿刺接种。此外, 试验应同时设未接种细菌的阴性对照管, 与试验管同时培养并观察结果。

(4) 按 Bergey 系统细菌学手册第一卷 (1984), 假单胞菌属生长温度试验为 41℃。本试验实际更正“42℃生长”为“41℃生长”试验。实验宜用水浴, 培养基接种前宜预热, 以便与培养规定温度尽快一致。

4. 金黄色葡萄球菌检测

(1) 本菌在上述 3 种分离培养基上的典型菌落为金黄色。但由于受药物影响或非典型菌株存在, 亦可呈橙黄色、柠檬色或白色。培养基存放时间和培养时间影响色素产生, 故应新鲜配制。培养时间宜 48h 以上。

(2) 如果使用干燥培养基, 应按说明书配制。注意 pH 是否符合规定, 必要时应校正 pH 后灭菌使用。

(3) 血浆凝固酶试验应用新鲜培养物及新鲜血浆。如用陈旧培养物及血浆(纤维蛋白已析出)易导致假阴性反应。此外, 观察结果时不要摇动试管, 因凝固初期凝块易破坏, 引起假阴性试验。

三、验证试验结果的评价与报告

当验证实验完成后, 要对整个验证方法的试验过程和结果进行分析评价与报告, 以确定验证试验的成败或对验证结果下结论。分析评价主要包括有: ①对每个验证试验的菌株、每次验证试验的数据及其有效性和合理性进行评价; ②验证试验数据所表明的检品预处理方式、检验用器具、材料、培养条件等的合理性是否符合规定要求, 它们与药品检验的规程要求是否符合; ③验证试验数据最后要说明该药品的微生物检测方法是否准确、有效、可靠与可行, 是否有较好的重现性。最后得出总结性的结论。在此基础上, 写出验证试验的报告。

验证试验报告要遵照 GMP 要求和企业内部文档管理要求撰写。一般包含以下内容: ①验证试验药品的名称, 待验证检验方法的有效登记号; ②验证试验用菌株名称、菌号、试验室控制号、转种代数; ③验证菌株的制备和接种记录; ④验证供试品的预处理方法、检验用器具和材料、检测步骤以及培养条件等; ⑤验证试验结果的评价及结论; ⑥验证附件: 包括试验的原始记录, 包括验证菌株的制备(表 7-3)和接种量复核、验证试验结果等。

表 7-3 微生物验证菌株的制备记录

1. 菌种名称	ATCC (或 CMCC)				
菌种来源	实验室编号				
传代代数					
2. 菌种制备					
培养基	批号	接种日期	接种容器	数量	
培养条件	温度	时间			
纯化分离鉴定结果	操作人	日期			

众所周知, 检测方法验证是实验室质量保证体系的主要内容之一, 因此是 GMP 检查的重点审查对象。在对新的药品开发新的检测方法或是变更现有检测方法时, 需要对新的方法或变更后的方法进行验证, 只有验证合格后, 才能将这些方法应用于常规的样品检验。根据各自的产品特性及其检验方法来制定合理的验证方案, 确保经验证过的微生物检验方法准确、有效并且可靠。

四、验证实验实例

实例（一）氟喹诺酮类药物的无菌检查方法验证

1. 验证目的 在众多的抗生素种类中, 氟喹诺酮 (fluorquinolone, FQNS) 类抗菌药是近 20 年来发展最快, 临床应用最广的新型化学合成抗菌药。据报道, 1996 年全球销售环丙沙星约 15 万美元, 居抗感染药物销售额首位。由于该类药对头孢菌素、青霉素类耐药菌感染亦获显效, 不良反应小, 因此, 使用量大幅度上升, 品种也增加不少。目前已在临床上广泛使用已达 20 余种。实验证明, 它们对革兰阳性菌和包括铜绿假单胞菌在内的革兰阴性菌均具有广谱和高度的抗菌活性, 其主要抗菌机制为抑制细菌 DNA 旋转酶和 A 亚单位, 从而影响 DNA 的复制。我们在执行现行的中国药典标准过程选择了临床常用的氟喹诺酮类药品的 7 个品种 8 个规格为代表, 对无菌检查法进行了验证性实验, 旨在为进一步完善该类药品的质量标准, 为该类药品的无菌检查法的方法学进行验证而提供建议。

2. 验证要求 将所有各试验样品培养管与阳性对照比较, 如样品管的微生物生长良好, 则供试品的该检验量在该检验条件下已去除其抑菌作用; 如样品管的微生物生长微弱、缓慢或不生长, 则供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用, 需消除。然后采取以下措施: ①增加冲洗次数, 但每片滤膜的冲洗量一般不超过 1000ml。否则, 需验证加大冲洗量对滤膜质量无影响; ②更换滤膜品种, 选择对样品吸附作用较低的滤膜, 并再以相应的方法重复验证试验, 最后确认采用无菌检查方法的可行性。

3. 样品与仪器 乳酸环丙沙星氯化钠注射液 (浙江医药股份有限公司新昌制药厂规格 100ml: 0.2g, 250ml: 0.25g, 批号 20030717, 20030603); 乳酸左氧氟沙星注射液 (规格 100ml: 0.2g, 批号 20030617); 盐酸洛美沙星注射液 (海南康龙药业有限公司天津华津制药厂, 规格 100ml: 0.2g, 批号 02040303), 加替沙星氯化钠注射液 (上海海尼药业有限公司, 规格 100ml: 0.2g, 批号 03060601), 甲磺酸培氟沙星注射液 (白求恩医科大学制药厂, 规格 5ml: 0.4g, 批号 021002), 氟罗沙星注射液 (江苏扬子江药业集团有限公司, 规格 2ml: 0.2g, 批号 030517) 盐酸卡屈沙星葡萄糖注射液 (江苏恒瑞医药股份有限公司, 规格 100ml: 0.1g, 批号 20030918)。

HTY-2000 型集菌仪 (全封闭式, 杭州高得医疗器械有限公司); 集菌培养器 (批号 20030801, 北京牛牛基因技术有限公司); 生化培养箱 (广东医疗器械厂)。

4. 培养基与菌种 ①硫乙醇酸盐液体培养基、真菌培养基、营养肉汤培养基、营养琼脂培养基、玫瑰红钠琼脂培养基, 均由北京三环科技开发有限公司提供; ②冲洗液 0.9% 无菌氯化钠溶液; ③金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26003]、大肠埃希菌 [CMCC (B) 44102]、藤黄微球菌 [CMCC (B) 28001]、生孢梭菌 [CMCC (B) 64941] 均由中国药品生物制品检定所提供。

5. 无菌检查验证方法

(1) 对照菌液的制备 ①金黄色葡萄球菌菌悬液的制备 取金黄色葡萄球菌的营养琼脂斜面新鲜培养物 1 白金耳, 接种于营养肉汤培养基中, 35℃ 培养 18h 后, 用 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释成 $1:10^{-6}$, 再分别取 1ml 至 2 个无菌培养皿中, 每皿倾注 20ml 已溶

化并保温 45℃ 的营养琼脂培养基, 加毕后立即摇匀, 待凝固后, 倒置于生化培养箱 35℃ 培养 48h 计数; ② 大肠杆菌菌悬液的制备 同上述菌悬液制备相同; ③ 生孢梭菌菌悬液的制备 取生孢梭菌的硫乙醇酸盐液体新鲜培养物 1 白金耳, 接种于相同培养基中, 35℃ 培养 18h 后, 用 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释成 $1:10^{-6}$; 再分别取 1ml 至 2 支硫乙醇酸盐液体培养基内, 35℃ 倒置培养 24h, 轻轻取出, 点计悬浮在培养基管内的菌数; ④ 白色念珠菌菌悬液的制备 取白色念珠菌的真菌琼脂培养基斜面新鲜培养物 1 白金耳, 接种于液体真菌培养基中, 25℃ 培养 24h 后, 用 0.9% 的无菌氯化钠溶液稀释成 $1:10^{-5}$; 再分别取 1ml 至 2 个无菌培养皿中, 每皿倾注 20ml 已溶化并保温 45℃ 的真菌琼脂培养基, 加毕后立即摇匀, 待凝固后, 倒置于生化培养箱 25℃ 培养 72h 计数。以上菌悬液根据计数情况, 将菌液浓度控制在每毫升含 10~100 个菌。

(2) 培养基的灵敏度和无菌检查 取装量为 12ml 的硫乙醇酸盐液体培养基 8 管, 分别接种金黄色葡萄球菌、生孢梭菌各 3 管, 每管接种量为 1ml (含菌 10~100 个 CFU); 余下 2 管不接种作为对照 (培养基的无菌检查用)。取装量为 9ml 的液体真菌培养基 4 管, 接种白色念珠菌 3 管, 每管接种量为 1ml (含菌 10~100 个); 余下 1 管不接种作为对照 (培养基的无菌检查用)。各管置规定温度培养 5 d, 逐日记录结果。

以每株菌接种后的培养基, 应该不得少于 2 管呈现生长, 对照澄清即无菌生长, 该培养基的灵敏度和无菌检查符合要求。

(3) 薄膜过滤法的方法验证 采用薄膜过滤法。取少量冲洗液润湿滤膜, 将上述每种规格品种样品 2 瓶 (支), 全量通过一次性使用的全封闭二联集菌培养器的一个滤器, 然后用 0.9% 无菌氯化钠溶液 50ml/次, 冲洗滤膜数次, 每次均用力振摇, 使可能附着在培养器壁上的抑菌成分冲掉, 在最后一次的冲洗液中加入金黄色葡萄球菌 10~100 个/ml 抽滤, 记录所用的冲洗液总量。该集菌培养器余下的一个滤桶依上述方法操作, 在最后一次冲洗液中加入大肠杆菌 10~100 个/ml。将灭菌的硫乙醇酸盐液体培养基 100ml 抽入集菌培养器内 (该集菌培养滤桶为此次试验的样品管), 另取一套全封闭二联集菌培养器, 除样品外重复以上操作, 作为该次试验的阳性对照; 又取一套全封闭二联集菌培养器过 300ml 冲洗液 (只过一个滤桶, 另一滤桶未用), 加入灭菌的硫乙醇酸盐液体培养基 100ml, 作为此次试验的阴性管对照。将上述滤桶置 $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱培养, 观察结果。

将所有上述各培养管, 与阳性对照比较, 如样品管的微生物生长良好, 则供试品的该检验量在该检验条件下已去除其抑菌作用; 如样品管的微生物生长微弱、缓慢或不生长, 则供试品的该检验量在该检验条件下有抑菌作用, 需消除。可采取以下措施: ① 增加冲洗次数, 但每片滤膜的冲洗量一般不超过 1000ml。否则, 需验证加大冲洗量对滤膜质量有无影响; ② 更换滤膜品种, 选择对样品吸附作用较低的滤膜, 并再以相应的方法重复以验证试验, 确认采用无菌检查方法的可行性。

(4) 样品的无菌检查 取样品 6 瓶 (支), 按照验证过的无菌检验方法进行检查。

6. 验证结果 菌悬液计数均在 10~100 个。培养基灵敏度和无菌检查符合要求。金黄色葡萄球菌平均计数 90 个/ml, 大肠杆菌平均计数 88 个/ml, 阳性对照管: 大肠菌管 16h, 上 1/5 部浑浊, 呈下部条状生长; 20h, 上 1/2 部浑浊; 24h 全部浑浊。金黄色葡萄球菌管 20h, 上 1/5 部浑浊, 呈下部条状生长; 24h 上 2/3 部浑浊, 28h, 近全部浑浊。

7. 结论 各种规格品种的氟喹诺酮注射液不同的阳性对照菌冲洗量结果见表 7-4。

表 7-4 各种规格品种氟喹诺酮注射液不同阳性对照菌冲洗量结果

名 称	规 格	冲 洗 量	
		金黄色葡萄球菌	大肠杆菌
乳酸环丙沙星注射液	100ml: 0.2g	800ml	1400ml (未生长)
乳酸环丙沙星注射液	250ml: 0.25g	400ml	400ml
盐酸洛美沙星注射液	100ml: 0.2g	300ml	400ml
加替沙星氯化钠注射液	100ml: 0.2g	400ml	400ml
甲磺酸培氟沙星注射液	5ml: 0.4g	300ml	400ml
乳酸左氧氟沙星注射液	100ml: 0.2g	400ml	1000ml
氟罗沙星注射液	2ml: 0.2g	600ml	800ml
卡屈沙星注射液	100ml: 0.1g	400ml	600ml

每批样品按验证试验保证的试验条件包括冲洗量、冲洗方式、加菌顺序, 进行无菌检验。结果阳性对照菌 24h 内全部正常生长, 阴性对照及样品澄清无菌生长, 检验结果符合规定。

8. 讨论

(1) 本次试验是以氟喹诺酮类为例, 该类药由于属抗菌药, 药效学明确, 抑菌机制为抑制细菌 DNA 酶活性及细菌 DNA 的复制, 对真菌并无作用, 因此, 其无菌检验方法须采用薄膜过滤法。由于明确不能采用直接接种法, 故抑菌细菌和抑真菌试验不适合作为它的验证试验, 而以冲洗量的选择实验作为验证试验。

(2) 阳性菌的加入方式 2005 年版《中国药典》无菌检查法中没有明确指出, 目前国内各检验单位通常采用的方法是: 供试品过滤且冲洗完成后, 将金黄色葡萄球菌菌液直接加入培养基。而在国际调和修正案的无菌试验方法中特别指出在冲洗滤膜的最后阶段, 将菌液加入含有少量冲洗液的滤器中, 过滤以后再加入培养基, 这样就减少了由于薄膜质量问题而引起的漏检。

(3) 阳性菌的选择 2000 年版《中国药典》无菌检查法中, 抗菌药物选择的阳性菌为金黄色葡萄球菌。本次试验共选择 7 个品种, 分别采用金黄色葡萄球菌和大肠杆菌作阳性对照, 在同一条件下发现大肠杆菌作阳性对照比金黄色葡萄球菌作阳性对照长势快、好, 而加样品试验后, 反而有 6 个样品大肠杆菌阳性长势弱于金黄色葡萄球菌阳性, 故在实验中对用大肠杆菌作阳性的样品桶增大了冲洗量, 规格 100ml: 0.2g 乳酸环丙沙星注射液冲洗量至 1400ml/瓶后大肠杆菌阳性还未生长, 因每张膜只冲洗 1000ml, 若再冲洗下去已没多大意义。可能有相当一部分的抗菌药物当冲洗到阳性菌生长时, 并不能保证此时的药物残留量已无任何抑菌、杀菌作用。考虑是膜或滤桶壁吸附微量抗菌活性分子而造成, 从而显示出选择大肠杆菌作阳性对照优于金黄色葡萄球菌。因此, 中国药典只选择金黄色葡萄球菌作阳性对照已不再适应现在发展品种需要, 而应增添大肠杆菌作阳性。阳性菌选

择及冲洗量多少应根据品种做验证试验确定后,再进行实验。

(4) 方法学验证越来越体现其重要性,但是微生物检验的方法学验证在 2000 年版《中国药典》中仅有一项抑细菌和抑真菌试验⁽⁵⁾,这是远远不够的。如果所检的样品具有明确的抗菌活性,必须采用薄膜过滤法检验时,就没有确切的验证试验作为其无菌试验方法建立的保证,尤其在对报批的新药进行技术复核、试行标准转正时,由于申报单位提供的技术资料中没有相关的微生物检验方法学研究内容,复核工作缺乏针对性,且常常陷于被动,对此,本实验对其是有所启示的。

实例(二) ××注射液的无菌检查(薄膜过滤法)方法的验证方案示例

1. 验证目的 在进行常规的无菌检查之前,需验证在实际检验条件下,检验用物品(包括供试品、稀释液、淋洗液、培养基以及检验器具等)及操作程序不得对可能存在的微生物的生长造成不良影响。本试验是关于对××注射液的无菌检查方法[方法号××(类别)-×××(序列)-×(版本)]的验证。结果应显示,××注射液的无菌检查方法(××(类别)-×××(序列)-×(版本))符合验证要求。

2. 验证要求 严格按照无菌检验方法“××(类别)-×××(序列)-×(版本)注射液的无菌检查”准备验证试验用样品和材料,并依照检查方法(××(类别)-×××(序列)-×(版本))的操作步骤对样品进行稀释、过滤、淋洗和培养。连续3批产品的验证试验结果均应表明,所有试验菌株在样品试验组、蛋白胨对照组和阳性对照组中最初出现生长的时间均很相近,并且在14d在内都明显见微生物生长。只有这样,该产品的无菌检查方法(××(类别)-×××(序列)-×(版本))才可通过验证。

3. 验证试验用设备及材料 ① 无菌检验系统(蠕动泵)型号: ② 无菌检验用过滤器 型号: ③ 无菌稀释管 型号:

4. 验证产品、稀释、淋洗液、标准菌株及培养基 ① 产品 ××注射液 250ml 数量: 60瓶/批×3批(无菌检查采样量 20瓶/批)批号: ××××。② 稀释液 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液或 0.1% 蛋白胨水溶液(试验时可选以上的1种或2种进行,也可选其他的稀释液) 250ml/瓶(500ml)批号: ××××。③ 淋洗液同上。

5. 验证试验用菌株名称及其编号(可从表7-1中选)见表7-5。

表 7-5 验证试验用菌株名称及其编号

菌株名称	本厂内控编号*	制备记录号**
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>) ATCC 10231	Ca-2-040410	2004-104
枯草杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>) ATCC 6633	Bs-4-040410	2004-102
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC 6538	Sa-2-040414	2004-106

注: *, 菌株编号由菌名首字母-传代代数-制备日期组成; **, 年份-菌种原始记录本页码。

6. 验证用培养基 见表7-6。

表 7-6 验证用培养基

培养基名称*	生产厂**	配制批号	配制日期	有效期
大豆胰蛋白胨液体培养基 (TSB) 或改良马丁培养基			200×年×月××日	200×年×月××日
硫乙醇酸盐液体培养基 (TGB)			200×年×月××日	200×年×月××日

注：*，试验时可全做或只选 1 种进行；**，生产厂可选有批准文号的厂家。

7. 方法

(1) 产品试验 除接种试验菌株外，严格按照方法“××（类别）-×××（序列）-×（版本）注射液的无菌检查”进行样品稀释和无菌检查。

样品稀释：用无菌稀释管及蠕动泵将×××注射液 250ml 泵入到含 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或 0.9% 无菌氯化钠溶液或 0.1% 蛋白胨水溶液（试验时可选 1 种或 2 种进行，然后该溶液为 A 溶液）的输液瓶内 [每瓶（500ml）含稀释剂 250ml]，混匀，同时在稀释剂瓶外表面做好相应标记。重复操作，直至所有样品稀释完毕为止。稀释后的样品即为供试液。

无菌检查：以 20 瓶供试液为一组，用无菌检测系统和无菌检验过滤器进行过滤，过滤后用 A 溶液淋洗滤膜 3 次，每次 100ml，在最后一次淋洗液中接入 30~100 个验证微生物细胞（表 7-1）过滤后，往其中 1 只滤筒内接入 80~100ml 的 TSB 培养基（或改良马丁培养基），往另一只滤筒内接入 80~100ml 的 TGB 培养基。重复上述操作，做完另两组样品。

(2) 对照组 另取 3 套与产品检验相同型号的无菌检验过滤器，不过滤供试品，参照产品试验的淋洗方法，用 A 溶液淋洗滤膜 3 次，每次 100ml，在最后一次淋洗液中接入 30~100 个验证微生物细胞（表 7-4），滤完后，往其中 1 只滤筒内接入 80~100ml 的 TSB 培养基（或改良马丁培养基），往另一只筒内接入 80~100ml 的 TGB 培养基。重复上述操作，做完另两套过滤器。

(3) 阳性对照组 直接向与产品检验相等量的培养基内接入 30~100 个验证微生物细胞（见表 7-5）。

(4) 培养 将 TSB 培养基（或改良马丁培养基）置于 $22.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 下培养，TGB 培养基置于 $32.5^{\circ}\text{C} \pm 2.5^{\circ}\text{C}$ 下培养，分别在培养的第 1、2、3、5、7、9、11、13、14 天观察并记录结果。

重复上述步骤，直到做完 3 批样品（可不在同一天内进行，但需对接入菌的数量重新复核和计数）。

8. 结果观察和记录 将产品试验、蛋白胨对照组以及阳性对照组中长出的微生物分离并进行初步鉴别，以确证生长的菌落与接入的微生物菌株相同。

(1) 试验用微生物的稀释和计数 结果见表 7-7。

续表

TSB	验证日期	产品试验组					对照组					阳性对照组*				
		批号	培养时间 (d)													
			1	3	.	.	14	1	.	.	.	14	1	3	.	.
S. aureus ATCC 6538	××××年×月×日	××××														
	××××年×月×日	××××														
	××××年×月×日	××××														

注：*，每个试验菌株每天需做一次阳性对照试验。

9. 结论 根据上述验证试验结果，所有验证用微生物均能在产品试验组和对照组中生长良好，并且同一微生物在产品试验组、对照组和阳性对照组中出现生长的时间没有明显差异。由此说明方法“××液的无菌检查”不存在抑制微生物生长的因素，方法××××适合××注射液的无菌检查。即××注射液的无检查方法通过验证。

实例（三）微生物限度检查方法（平皿菌落计数法）的验证方案示例

中药制剂——××丸微生物限度检查方法的验证试验

1. 验证目的 在进行常规的微生物限度检测方法之前，必须验证在实际检查条件下，所检测的样品及检验程序不得对可能存在的各类微生物产生抑制作用。本实验是关于中药制剂××丸的微生物限度试验——平皿菌落计数法 [中国药典国家药品标准修订批件 2002ZFB0251] 的验证，验证结果应显示：中药制剂××丸的微生物限度试验方法对检品中可能存在的微生物没有抑制作用，符合验证要求。

2. 验证要求（合格标准） 用标准菌株评价方法《中药制剂××丸的微生物限度检查》，对检品中的微生物的抑菌性进行评价。试验结果应显示：产品试验组的微生物生长数量不低于蛋白胨对照组的 70%，产品的试验组与蛋白胨对照组间的菌落数差异不超过 30%，假定产品试验组的平均值与蛋白胨对照组的平均值之比为 Q，则 $0.7 \leq Q \leq 1.3$ 。

3. 试验原料、稀释液和标准微生物

(1) 试验样品 ××丸 3 批 批号_____，批号_____，批号_____。

(2) 稀释液 pH7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液。配法：取磷酸二氢钾 3.56g，磷酸氢二钠 7.23g，氯化钠 4.30g，蛋白胨 1.0g，加水 1000ml，加热使溶解，过滤，分装、灭菌（100ml 装 1 个三角瓶）。

(3) 器具 无菌培养皿（直径 9.0mm）10 个；无菌移液管（1.0ml）5 支；研钵 1 个；试管 2 支（内装无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液（10ml））；三角瓶 2 个（1 个为空瓶灭菌后装供试品，另一个装稀释溶液 100ml）。

(4) 验证用微生物名称及其编号（可从表 7-1 中选） 见表 7-10。

表 7-10 验证用微生物名称及其编号

菌株名称	内控编号*	制备记录号**
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) ATCC 10231		
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) ATCC44102-17		
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC 26003-20		

注：*，编号由菌名首字母-传代数-制备日期组成；**，为年份-菌种原始记录本页码。

(5) 验证用培养基见表 7-11。

表 7-11 验证用培养基

培养基名称	生产厂家	配制批号	配制日期	有效期
大豆胰蛋白胨琼脂 (TSA)				
或营养琼脂培养基				
萨布罗葡萄糖琼脂 (SDA)				
或玫瑰红钠琼脂培养基				

4. 验证方法

(1) 验证前冷冻菌种的复活 首先清洁安瓿，在安瓿的外表面喷上 70% 的乙醇并让其自然风干；然后用一小砂轮在安瓿的上部划一条线，用手轻轻掰开（开启安瓿时必须小心，因为安瓿遇热时可能会破裂）；无菌操作，再用无菌吸管无菌操作移取 1~2ml 适宜的液体培养基到安瓿中；轻轻地旋转安瓿以使冻干菌种和液体培养基充分混合并完全溶解；最后用无菌吸管将安瓿内菌液转接到相应的液体培养基中 [营养肉汤或大豆胰蛋白胨肉汤 (TSB)]，并根据安瓿上所标明的不同菌种类型而将其培养于相宜的温度下 (30~37℃ 或者是 20~25℃) 24~72h。观察肉汤是否浑浊，浑浊说明菌种复活生长；若不浑浊，在把它们当作无活菌生长的培养基丢弃以前，细菌应至少培养 1 周以上，真菌和酵母菌至少应培养 2 周以上，并且丢弃之前应灭菌处理并详细记录。

(2) 菌种确认 当菌种复活以后，还应确认菌种的纯度和特性。用无菌接种环从培养肉汤中取细菌培养物接种到 TSA（大豆胰蛋白胨琼脂培养基）平板或营养琼脂培养基平板，或相应的宜于该细菌生长的鉴别平板（如伊红亚甲蓝、麦康凯、甘露醇高盐）上划线分离出单个菌落。然后在 30~37℃ 下培养 2~3d；同样的方法取真菌和酵母菌培养物 SDA（萨布罗培养基）平板上，或玫瑰红钠培养基平板，并在 20~25℃ 下培养 7d。培养后，先观察其是否具有典型的菌落形态，然后挑取单一的纯菌落，进行革兰染色、镜检，观察其染色特性及菌型。最后再做生化实验以进一步鉴定该菌种，对已经过鉴定确认的菌种就可以进行菌种的传代和保藏了。同时可进行验证微生物菌液的制备。

(3) 验证微生物菌液的制备 取验证（挑战）微生物菌种至培养基中（营养肉汤培养基、硫乙醇酸盐培养基、改良马丁培养基中），30~35℃ 培养 18~24h；20~25℃ 培养 18~24h（白色念珠菌），试管培养物加入 0.9% 无菌氯化钠溶液，制成浓菌悬液，用上述培养物进行平板稀释法测定菌数，制成每毫升含菌 10~100 菌落形成单位 (CFU) 的菌悬液。备用。

(4) 验证方法操作 用不同类别的微生物考察供试液及检验程序的抑菌性, 将试验分为3组:

样品试验组 除接种试验菌株外, 严格按照方法“××丸微生物限度检查”进行样品稀释和检查。

准确称取××丸10g, 放入研钵中研磨混匀(可先加少量A溶液)→倒至灭菌三角瓶中, 用余下的溶液洗净研钵, 倒至灭菌三角瓶中→充分摇匀即为样品试验组供试液→移液管准确吸取1.0ml供试液至平皿中→在每个平皿中接种10~100个挑战微生物, 每种微生物接种3个平皿[分别接以上4种菌种]→分别向平皿内倒冷却到45℃的TSA培养基或营养琼脂(细菌)或SDA培养基或玫瑰红钠琼脂培养基15~20ml(白色念珠菌); 并混合均匀→凝固后, 置于适温下培养。

对照组 不加样品, 直接以稀释剂溶液(取1支装有10ml A溶液的试管)作为供试液→移液管准确吸取1.0ml供试液至平皿中→在每个平皿中接种10~100个挑战微生物, 每种微生物接种3个平皿[分别接以上4种菌种]→分别向平皿内倒冷却到45℃的TSA培养基或营养琼脂培养基(细菌)和SDA培养基(或玫瑰红钠琼脂培养基)(白色念珠菌)20ml, 并混合均匀→凝固后, 置于适温下培养。

阳性对照组 不加供试液, 直接将试验菌株接种于3个平皿, 其余操作步骤同样品组操作。

重复上述操作, 直至做完3批样品。

培养 将TSA或营养琼脂培养基平皿倒置于30~35℃下培养48h; 将SDA或玫瑰红钠琼脂培养基平皿倒置于20~25℃下培养72h。

观察和计数 对每个平皿逐日检查计数, 结果以培养终了时的计数为准, 并将每组试验中接有相同试验菌株的3个平皿计数进行平均, 取平均值。观察微生物的菌落形态并做革兰染色, 以确认生长菌与接入的微生物相同。

5. 试验结果 根据试验结果按表7-12、表7-13、表7-14填写。

表7-12 验证用微生物的稀释度和接种量

菌种名称	浓度(CFU/ml)	稀释度	接种量(ml)
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>) ATCC 10231			
大肠埃希菌(<i>Escherichia coli</i>) ATCC44102-17			
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC 26003-20			
试验日期:	年 月 日	操作人:	

表7-13 阳性对照组(接种数量)

试验菌种	阳性对照计算结果	平均值
白色念珠菌(<i>Candida albicans</i>) ATCC 10231		
大肠埃希菌(<i>Escherichia coli</i>) ATCC44102-17		
金黄色葡萄球菌(<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC 26003-20		
试验日期:	年 月 日	操作人:

表 7-14 样品试验组和对照组的最终结果

菌 名	检品： 批号：	菌落计数		比率*
		产品试验组	蛋白胨对照组	
白色念珠菌 (<i>Candida albicans</i>) ATCC 10231				
大肠埃希菌 (<i>Escherichia coli</i>) ATCC 44102-17				
金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) ATCC 26003-20				

试验日期： 年 月 日 操作人：

注：比率 = 产品试验组平均值和蛋白胨对照组平均值之比。

6. 结果分析 对同一批号的样品而言，每种试验菌在产品试验组、对照组及阳性对照组结果之间均有（或无）显著性差异，所有结果间差异均小于（或大于）30%。

不同批次间的平均结果显示，样品试验组与对照组间的结果差异也均在（或不在）30%范围内。

无论是对同一批号或不同批次的样品而言，产品试验组中的含菌量与对照组之间的比率 Q 的范围均符合（或不符合） $0.7 \leq Q \leq 1.3$ 的验证要求。

7. 结论 $\times \times$ 丸的微生物限度检查方法对微生物生长没有（或有）抑制性影响。因此该方法验证通过（不通过）。

实例（四）大肠埃希菌检查方法的验证方案示例

新型口服西药制剂—— $\times \times$ 片剂大肠埃希菌检查方法的验证试验方案

1. 验证目的 根据《中国药典》（2005 年版）微生物限度检查标准，对新型口服西药制剂—— $\times \times$ 片剂进行大肠埃希菌检查方法的验证试验，以验证西药制剂—— $\times \times$ 片剂对可能存在的微生物没有抑制作用，且检查方法准确可靠，符合验证要求。

2. 验证要求（合格标准） 用标准菌株评价对西药制剂—— $\times \times$ 片剂检品中的微生物抑菌活性进行评价。试验结果应显示：加入到产品试验组中的大肠埃希菌能生长，无抑菌作用，能检出大肠埃希菌；而阴性菌对照组不得检出阴性对照菌。胆盐乳糖培养基大肠埃希菌能生长，金黄色葡萄球菌不能检出；产品试验组 MUG 阳性，靛基质阳性；曙红亚甲蓝琼脂平板呈典型特征。

3. 验证供试品、培养基、稀释液与试液和菌株

(1) 试验供试品 口服西药制剂—— $\times \times$ 片剂 3 批，批号 _____，批号 _____，批号 _____。

(2) 稀释液与试液 pH7.0 无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液，靛基质试液。

(3) 培养基 胆盐乳糖培养基、MUG 培养基、曙红亚甲蓝琼脂。配法均按中国药典要求，并经培养基适用性检查合格。

(4) 器具 无菌培养皿（直径 9.0mm）6 个；无菌移液管（1.0ml）5 支；试管 2 支

(内装无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(10ml);三角瓶6个。

(5) 验证菌株名称及其编号 验证菌株:大肠埃希菌(*Escherichia coli*) [CMCC (B) 44102]; 阴性菌对照组验证菌株:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC (B) 26003] 依法将以上菌株制成每毫升含菌10~100菌落形成单位(CFU)的菌悬液,备用。

4. 验证方法与步骤

(1) 制备供试液与增菌 取供试品10g,加pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100ml,用匀浆仪混匀后倒入无菌三角瓶内,作为1:10供试液。然后取供试液10ml分别接至100ml的胆盐乳糖培养基3管中,其中1管加验证菌株大肠埃希菌1ml(含菌数为10~100CFU,作为供试品验证组);另1管加阴性菌对照验证菌株金黄色葡萄球菌1ml(含菌数为10~100CFU,作为阴性菌对照组);第3管加pH7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液1ml(作为本底对照组)。3管置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18~24h,必要时可延至48h。

(2) MUG与靛基质测定 取上述3管培养物0.2ml,分别接种至6管含5ml MUG培养基的试管内, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养,于5、24h在366nm紫外灯下观察。若管内培养物呈现荧光,为MUG阳性;不呈现荧光,为MUG阴性。观察后,分别沿3管培养管的管壁加入数滴靛基质试液,液面呈玫瑰红色,为靛基质阳性;呈试剂本色,为靛基质阴性。

(3) 曙红亚甲蓝琼脂平板划线鉴定 取以上无做过检验的另外3管胆盐乳糖培养基的培养物划线接种于曙红亚甲蓝琼脂平板, $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养18~24h观察。

5. 验证结果 根据试验结果实际情况填写。

(1) 胆盐乳糖培养基增菌结果 供试品验证组+,有生长;阴性菌对照组-,没生长;本底对照组-,没生长。培养时间:24h。

(2) MUG测定结果 供试品验证组+,呈现荧光;阴性菌对照组-,不呈现荧光;本底对照组-,不呈现荧光。培养时间:24h。

(3) 靛基质测定结果 供试品验证组+;阴性菌对照组-;本底对照组-。培养时间:24h。

(4) 曙红亚甲蓝琼脂平板划线鉴定结果 供试品验证组+,呈典型特征;阴性菌对照组-,无菌生长;本底对照组-,无菌生长。培养时间:24h。

6. 结果分析 3批供试品每次验证在供试品试验组、阴性对照组及本底对照组验证结果之间均无差异,所有结果一致。

7. 结论 新型口服西药制剂——××片剂对大肠埃希菌检查方法生长没有抑制性影响。该法可检出供试品中的控制菌,检查方法准确可靠,检查方法可通过验证。

第八章 微生物检测数据的趋势分析和统计处理

一、检测数据的趋势分析

对在生产工艺以及微生物检测监控过程中,无论是对实验室检测结果的管理,还是对微生物所检测进行数据的统计学评价与分析,进行趋势分析的统计处理都是一种非常重要的监控手段。因而已经成为企业工厂或实验室质量保证体系中不可缺少的组成部分。同时也是 GMP 管理的基本要求,即强调过程控制,及时发现并消除潜在偏差,以确保质量管理体系能正常安全运作。

(一) 检测数据趋势分析的目的

进行趋势分析最根本的是:为了发现相关的控制性参数是否存在有上升或下降趋势,然后分析这种趋势本身是否对整个生产过程或产品质量产生不利影响,从而导致生产的失控或质量安全带来的隐患,为领导决策提供科学依据。

趋势分析应用十分广泛,并非仅局限于常规的检测数据。它还包括测定值是否正常、异常或超标结果及实验室发生的偏差。对一段时间内累积的数据进行趋势分析,将会发现诸如人员培训不足、操作水平、仪器设备性能不佳以及系统有故障等各种问题,为我们纠偏与改正指明方向。

(二) 微生物检测进行趋势分析的常规项目

微生物检测进行趋势分析主要包括有以下方面:①生产洁净区域或微生物检验洁净区域的定期、不定期进行的环境监控数据;②按生产区域、不同要求的各个水系统、取样点划分而进行的各种水介质的微生物(含化学)分析的结果数据;③微生物检测用各批号(次)不同来源等的培养基的灵敏度试验数据;④不合格的无菌检查结果数据;⑤阴性对照或阳性对照不合格的试验结果数据;⑥按产品类型划分的各种原料、产品含菌量检查或限度检查试验数据;⑦各批号(次)的微生物检测数据;⑧按检验方法、分析人员、班次等归类所进行的无菌检查中的阳性结果记录数据;⑨可按检验方法、产品、人员等归类进行,异常及超标结果的调查数据;⑩人为性的工作偏差记录数据;⑪微生物检测用的各类仪器,设备或系统的故障记录数据;⑫其他检查试验数据等。

(三) 趋势分析的意义

对以上各类微生物检测数据进行趋势分析,有助于工厂企业以及各实验室设定合理的控制警戒限度和纠偏限度,为常规的检测结果提供评价标准依据。由于有些制药企业忽略对原料或半成品的质控如含菌量检查设定检测限度,因此检测结果仅起到了解相关信息的

作用。而不能将所获得的检测数据与相应的合格标准或内控限度相比较,起不到从生产过程中控制质量的作用。因此,工厂企业希望自己的产品真正自始至终达到既定的质量要求等级与水平,就必须对原料和半成品的微生物检测数据如含菌量检查进行长期性趋势分析和评估,以发现是否存在异常性峰值,或出现微生物质量好转的趋势等。这些都必须靠日常检测数据的积累和经验的分析才能实现。

除此之外,对检测数据进行趋势分析,还将有助于各工厂实验室发现本身系统性问题。一方面通过对实验误差、仪器设备故障和异常或超标结果的调查进行趋势分析,有助于弄清问题的真正原因,更重要的是,这能有针对性地消除偏差和加强培训,有效提高检验结果的可靠性,进而可以提早发现问题,以免给工厂企业造成更大的损失。

在进行检测数据趋势分析时,为了便于评审和直观观察,通常以统计学图形或表格的形式描述趋势分析及各类级别数据。因为趋势分析图形或表格是一种很好的培训资源和资料,将这些相关信息与实验室同行一起分析和探讨,根据趋势分析所反映出的实际问题并加以改进,将有助于提升实验室质量管理和工作效率及检测人员的水平。

综上所述,检测数据趋势分析是一种非常好而适用的质控管理手段与方法,必须要充分运用和发挥其作用,为此微生物检测工作者都应掌握适当的统计分析知识与方法及有关技巧。本章紧密结合微生物检测实际工作作简单实用的介绍。

二、微生物检测数据的统计处理

微生物检测的统计学处理是通过调查发现和评价某批或某产品微生物检测中的检测数据变化来实现质量控制的一种手段。对任何一个生产工艺、检测方法或产品检验来说,变化总是不可避免的。微生物检测与理化方法相比,其数据及检测结果具有很大的差异性。这是基于检测的生化试剂、培养基及实验用微生物等因素的批与批之间存在的差异,不同实验人员检测得出的试验结果之间的差异,尤其在常规的微生物实验检测,自动化程度较低并且包含许多的主观评价,不同试验人员得出的结果差异则更为明显所致。此外,对任何生物检测或系统而言,无论是同日的不同批次产品或不同日期的产品,彼此间总会存在一定的差异。通过统计学分析,可将这些差异控制在可接受范围之内,并且确保工艺生产、检测方法与结果的稳定性、可靠性和重现性。因此生产工艺和微生物检测数据的统计学处理主要有两个作用,一个就是将实际测得的结果与标准作对比以评价其差异程度,也即统计上所述的差异显著性检验或可靠性测定给予测试,以验证工艺、方法、检测的可靠性。另一个就是采用图形或表格等方式来发现工艺过程、检测方法或微生物检测结果的异常变化。

在企业的微生物检测实验室,可采用检测实验的统计学处理方法评价各类检验结果。众所周知差异是不可避免的,但是这些差异是否有本质区别,通过统计处理、分析,就可以对它们进行描述和评价。由此看来,微生物检测数据(结果)是可以控制的,也就是说,微生物检测数据的变化是可预测的。微生物检测试验应注重考虑取样及对结果统计。例如,在抗生素的效价和微生物检定时,究竟采用取多个样本在不同时间测量出的结果经统计综合后得出的效价值的方法,要比采用相同数量的平板或试管分析一个大样本时得出的结果更具可靠性。如果对同一样本进行多次检测分析后得到不同的曲线,则应确保检测结果的可靠性和准确性,必须要弄清楚检测方法的变异性。变异性越大,表明检测结果越

不可信。因此,检验人员和管理人员必须要分析和计算试验结果的变异性(进行可靠性测定),一旦变异性太大而不可接受,则应分析原因,调查检测数据的准确性和合理性。

(一) 统计学常用的变异指标数值

统计学用数值来表示一组数据点之间的内在变异程度,称之为变异指标。最常用的变异指标有5个:全距(范围)、方差、标准偏差、变异系数(离散系数)和标准误。

(1) 全距(range) 又名“极差”,以符号 R 表示。 $R = \text{最大值} - \text{最小值}$ 。它表示一组分析数据中最大值与最小值的范围,而没有充分利用一组数据提供的情报,因此反映实际情况的精确度较差。

(2) 方差(variance) 以符号 S^2 表示,用公式表示为: $S^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / n$ (对大样品而言) 或 $\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)$ (对小样品而言),这里 $n - 1$ 在统计学上称自由度,以 f 表示。 $\sum (x_i - \bar{x})^2$ 在统计学上称离均差平方和。

是用于反映微生物学试验数据间离散程度的一项重要指标,将每个变量与平均数相减,求出离均差,再平方后(离均差平方)逐个相加的平均数称之为方差。

方差可用来说明微生物检测样本中的数据偏离样本均数的大小,即离散程度,方差越大,样本波动越大。方差不仅可以用来检验均数间的显著性,而且能分析离散原因。该指标的不足之处在于数据过大而不便于逻辑表达。

(3) 标准偏差值(SD) 以符号 S 表示,用公式表示为: $S = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n}$ (对大样品而言) 或 $\sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / (n - 1)}$ (对小样品而言)。

实质是将方差开平方,即得到标准偏差值,可用于表示样本中个体的离散程度(即离中性),从而克服了方差的不足之处。方差和标准偏差表达的是同类信息,即离散程度。

(4) 变异系数(CV) 又名“离散系数”,以符号 $C\%$ 表示,用公式表示为: $C\% = S / \bar{x} \times 100\%$ 。

是与平均值($\bar{x}$)相关的相对偏差。变异系数只是一个数值,没有单位。当两组数据单位不同,或两均数相差较大时,不能直接用标准差比较其离散程度的大小,即可用变异系数进行比较。它也是衡量离中性程度的一个常数,它与标准差不同;标准差是一个绝对值,它只是一个相对值,表示相对波动的大小。变异系数越大,其变数的分布范围越大,反之则越小。

(5) 标准误(S_M) 标准误又称标准机误,即指样本平均数的标准差。它是指样本平均数与总体平均数之间可能误差的范围(程度), S_M 越小差异也越小。一般说来,标准差表示的是样本个体的离散程度(即离中性),而标准误则表示样本均数的离散程度,即知道样本均数($\bar{x}$)对总体均数(μ)的接近程度。当总体标准差不知道时,可用样本标准差作为总体标准差的估计值,则公式表示为: $S_M = S / \sqrt{n}$ 。由于标准误是衡量一群性质相同的平均数变动的大小,是表示性质相同的平均数变动范围大小的指标,表示着性质相同的样本之间的差异,也就是各次重复试验结果的差异,所以它的大小更好地说明了实验的精密程度。标准误越小,数据越可靠,实验重现性越高,精密程度好。标准误一般用来报告样本均数的可靠性,此外还可用来进一步对总体均数的估计,计算在一定概率下的可信

限。标准误的计算,根据不同的试验设计,采用生物检定统计的有关公式进行计算而得。

(二) 正态(常态)分布(曲线)

在生物统计中,经常要遇到用数量表现随机连续在一定范围内的现象结果,(如身高、体重、血压等)这些连续型随机变量是以许多方式而分布的,但较为重要的是正态分布,生物统计中应用广泛的就是正态分布。那么什么是正态分布呢?通俗地说它是以均数(μ)为中心,并与标准差(δ)有密切关系而呈对称的钟形分布曲线称之。见图8-1。

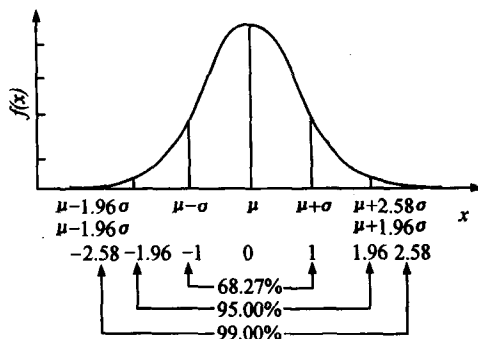


图8-1 正态分布曲线下面积分布图

在自然界中有许多频数分布近似正态分布;如:① 正常人某些生理,生化指标值测定的频数分布;② 实验室对同一样本多次重复测定的结果的频数分布;③ 从正态或近似正态总体中抽取的样本均数的频数分布。当样本含量较大时,则可将样本均数 $\bar{x}$ 作为总体均数 μ 的估计值,样本标准差 S 作为总体标准差 δ 的估计值,用正态曲线下面积分布规律估计频数分布情况。因此利用正态分布的理论,对这类事物进行研究。

正态分布具有的特点:①频数分布曲线无论向左,向右延伸,都愈来愈接近横轴,但不会和横轴相交,即以横轴为渐近线。②“随机量取值在 $-\infty$ 到 $+\infty$ 之间”是一个必然事件,其概率为1。③当 $\bar{x}$ 等于 μ 时,曲线处于最高点,以此左右两边对称。④正态分布的形态和位置随 μ 和 δ 两个参数变化而变化。 μ 决定正态分布位置, δ 决定正态分布形态。⑤ $\mu \pm$ 若干倍 δ 所包括正态分布总面积的百分率,对于每一个正态分布都是相同的。它可以看成或相当于变量值在该区间出现的概率。其面积可用积分法求出横轴上任何区间与曲线所夹的面积,常用的百分比为: μ 在 $\pm 1\delta$ 相当于正态分布总面积的68.3%; μ 在 $\pm 1.96\delta$ 相当于正态分布总面积的95%; μ 在 $\pm 2.58\delta$ 相当于正态分布总面积的99%。⑥任何正态分布都可按公式 $Z = (\bar{X} - \mu) / \delta$ 换成为 $\mu = 0$, $\delta = 1$ 的标准正态分布,均数为0,标准差为1的正态分布,记为 $N(0, 1)$ 。即使有些分布并非正态分布,但也可根据正态分布的原理所推导的公式进行计算,然后从正态分布表中查得从 $-\infty$ 到任意 Z 值区间上的面积。

如果某项微生物检测试验的数据点呈正态分布,且至少包含30个测量值(变量),约有68%的变量在距均值的1倍标准偏差范围内,95%的变量在距均值的2倍标准偏差内,99.7% (几乎100%)的变量在距均值的3倍标准偏差范围内。基于上述条件,实验室在对测试数据进行趋势分析和评价时,可将距均值的2个标准偏差和3个标准偏差范围分别设定为该试验项目的警戒限度和纠偏限度。

在微生物学检测中,提倡用相对偏差(RD)和相对标准偏差(RSD)来评价试验数据。用百分相对偏差表示2个试验数据的变异性。将这2个试验数据的差值除以均值的两倍,再乘以100,即得到百分相对偏差。当数据超过2个时,则可用百分相对标准偏差确定试验的变异性。百分相对标准偏差的计算方法如下:(标准偏差/均值) $\times 100\%$ = 相对标准偏差%。用百分相对标准偏差(或百分相对偏差)评定抗生素效价分析试验的变异性就是在微生物学检验中应用的典型事例。用管碟法分析抗生素效价时,绝大多数试验的相

对标准偏差 (RSD) 或相对偏差 (RD) 不超过 5%。但是, 对某些特定抗生素的检验方法而言, 差异性会相对较大 (有时 RSD/RD 高达 10%, 因此, 此类生物测定法的预期平均值、全距以及可接受的变异程度, 均应在方法验证试验中予以确定。

在分析微生物检验或验证性试验的数据时, 可使用学生 t 检验 (双向对比) 或 F 检验 (方差分析)、 χ^2 测验对两组或多组平行数据进行对比分析。这种检验在生物统计中称为差异显著性检验。它是通过统计方法来检验或检定处理间产生的差异 (如标准品与供试品间, 不同药物组之间, 不同因素组之间所表现出的差异) 是由于偶然因素引起的随机变异还是处理间本质上的差异, 也即是要说明哪些差别有很大可能是由生物差异性和实验误差造成, 哪些差别有很大可能性是真正差别。换言之也就是要测定由于随机变异所引起的这种差异的概率 (P) 有多大, 即实验的可靠性有多大。这种统计方法就称之为可靠性 (差异性、显著性) 检验。在以上检验中, 通过统计分析计算测出的数值分别称之为计算的 t 值、 F 值、 χ 值, 然后用计算的 t 值、 F 值、 χ 值与查相应的 t 值表 (表 8-1), F 值表 (表 8-2), χ^2 值表 (表 8-3) 进行比较, 从而得出差异是否显著或不显著。在可靠性检验时, 差别显著或不显著的标准是采用 P (概率) ≤ 0.05 或 0.01 或 $P > 0.05$ 或 0.01 作为下结论的界限, 因此: $P \leq 0.05$ 表示差别有显著意义; $P \leq 0.01$ 表示差别有非常显著意义, $P > 0.05$ 表示差别无显著意义。

表 8-1 t 值表 ($P=0.95$)

f	t	f	t	f	t	f	t
3	3.18	8	2.31	14	2.15	30	2.04
4	2.78	9	2.26	16	2.12	40	2.02
5	2.57	10	2.23	18	2.10	60	2.00
6	2.45	11	2.20	20	2.09	120	1.98
7	2.37	12	2.18	25	2.06	∞	1.96

表 8-2 F 值表

		f_1 (分子的自由度)								
		1	2	3	4	6	12	20	40	∞
f_2	1	161	200	216	225	234	244	248	251	254
		4052	4999	5403	5625	5859	6106	6208	6286	6366
	2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.33	19.41	19.44	19.47	19.50
		98.49	99.00	99.17	90.25	99.33	99.42	99.45	99.48	99.50
	3	10.13	9.55	9.28	9.12	8.94	8.74	8.66	8.60	8.53
		34.12	30.82	29.46	28.71	27.91	27.05	26.69	26.41	26.12
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.16	5.91	5.80	5.71	5.63
		21.20	18.00	16.69	15.98	15.21	14.37	14.02	13.74	13.46
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	4.95	4.68	4.56	4.46	4.36
		16.26	13.27	12.06	11.39	10.67	9.89	9.55	9.29	9.02
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.28	4.00	3.87	3.77	3.67
		13.74	10.92	9.78	9.15	8.47	7.72	7.39	7.14	6.88

续表

		f_1 (分子的自由度)								
		1	2	3	4	6	12	20	40	∞
f_2 分母的自由度	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.87	3.57	3.44	3.34	3.23
		12.25	9.55	8.45	7.85	7.19	6.47	6.15	5.90	5.65
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.58	3.28	3.15	3.05	2.93
		11.26	8.65	7.59	7.01	6.37	5.67	5.36	5.11	4.86
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.37	3.07	2.93	2.82	2.71
		10.56	8.02	6.99	6.42	5.80	5.11	4.80	4.56	4.31
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.22	2.91	2.77	2.67	2.54
		10.04	7.56	6.55	5.99	5.39	4.71	4.41	4.17	3.91
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.79	2.48	2.33	2.21	2.07
		8.68	6.36	5.42	4.89	4.32	3.67	3.36	3.12	2.87
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.60	2.28	2.12	1.99	1.84
		8.10	5.85	4.94	4.43	3.87	3.23	2.94	2.69	2.42
	30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.42	2.09	1.93	1.79	1.62
		7.56	5.39	4.51	4.02	3.47	2.84	2.55	2.29	2.01
	40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.34	2.00	1.84	1.69	1.51
		7.31	5.18	4.31	3.83	3.29	2.66	2.37	2.11	1.81
	60	4.00	3.15	2.76	2.52	2.25	1.92	1.75	1.59	1.39
		7.08	4.98	4.13	3.65	3.12	2.50	2.20	1.93	1.60
	∞	3.84	2.99	2.60	2.37	2.09	1.75	1.57	1.40	1.00
		6.64	4.60	3.78	3.32	2.80	2.18	1.87	1.59	1.00

上行, $P=0.05$; 下行, $P=0.01$ 。

但是,在实际操作中通常是将对数值的分析加以简化,仅计算对数值的差异来评价数据。对微生物进行计数时,只要平行试验结果的对数值之差不超过 0.5,都属于正常差异,也就是说数据都属于同一个数量级。在进行微生物学检验方法验证时,如果试验对照结果的对数值与样品测试结果的对数值检查一不超过 0.5,即可认为此方法验证合格。这一原则对检查抑菌性样品时的中和方法及促微生物恢复生长的方法的验证也同样适用。

(三) t 检验与 t 分布

“ t 检验”可用于检查两组呈正态分布的测量值之间的差异性。是用计算出的 t 值与查表的 t 值(表 8-1)相比较后得出结论。那么什么是 t 分布呢?当用一个样本计算出的估计标准误($S_{\bar{M}}$)来估计总体标准误($\delta_{\bar{x}}$)总是有偏差的。并且样本愈小,偏差就愈大。因此,这时 μ 有 95%的可能性在 $\bar{x} \pm 1.96 S_{\bar{M}}$ 之间的推论就偏狭,只有当样本大到使 $S_{\bar{M}}$ 接近于 $\delta_{\bar{x}}$ 时,这个推论才成立,但实际上实验所得的样本大小总是有限的,不可能使 $S_{\bar{M}}$ 接近 $\delta_{\bar{x}}$,故必须用一个统计量来纠正 1.96 这个倍数。1908 年 Willam 等用另一个参数来代替

Z , 使这个偏差能得到纠正。这个参数就称为 t 值。用公式表示如下:

$$t = (\bar{x} - \mu) / S_{\bar{M}}$$

t 值随着样本均数 $\bar{x}$ 和估计标准误 $S_{\bar{M}}$ 而变动。

设从一个总体中抽取无数个 n 相同的样本, 每个样本都计算出 $\bar{x}$ 和 $S_{\bar{M}}$ 及相当的 t 值, 则各个 t 值的频率分布就是 1 个以 0 为中心, 两边对称的类似正态分布的曲线, 但比正态分布略扁, 两尾稍翘一些称为 t 分布 (图 8-2)。

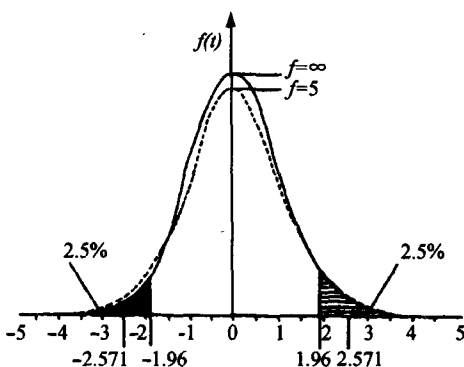


图 8-2 t 分布

当样本大小 (n) 改变时, t 分布曲线的形态也稍有改变, 每个不同大小样本所计算的 t 值有它的分布曲线, n 小时, 曲线低平, n 越大, 曲线越接近正态分布, 当 n 接近无穷大时, $S_{\bar{M}}$ 几乎接近 $\sigma_{\bar{x}}$, t 值也接近 Z 值, t 分布就与标准正态分布吻合。所以 t 分布不是一条曲线, 而是依 n 大小不同而改变的一群曲线。根据这些 t 分布可算出不同概率下的 t 值, 以 $(t)_{f0.05}$ (一定自由度 5% 临界点的 t 值) 或 $(t)_{f0.01}$ (一定自由度 1% 临界点的 t 值) 表示 (表 8-1)。

t 检验受自由度的制约 [自由度是指独立观察的个数, 因为计算标准差 (S) 时所使用的几个观察值受到 $\sum (x_i - \bar{x}) = 0$ 这一条件的限制, 等于有一个观察值不能独立取值, 只有 $n-1$ 个是自由的。如有 5 个观察值, 只有 4 个能自由变动, 这样自由度等于样本变数减少 1, 自由度为 $n-1$, 以 “ f ” 表示。应用自由度的目的在于纠正由于样本小, 而发生的取样误差影响。研究证明, 用 n 作分母算得的样本方差总是比总体方差偏小, 而用 $n-1$ 作分母算得的样本方差是总体方差更好的估计值。如为大样本因与群体较接近, 也可不用自由度而直接用 n 亦可]。 t 分布曲线和正态分布曲线一样, 呈对称的钟形, 对称轴为 $t=0$, 不同的是在小样本情况下, t 分布曲线中间比正态分布曲线中间低, 同样 t 分布曲线区间范围大于正态分布曲线的区间范围。自由度越大, t 分布曲线越接近于正态分布曲线。

t 检验的步骤:

① 建立无效假设 (H_0): 即检验的样本均数与总体均数的差异无显著性 (相同)。

则: $H_0: \mu = 0$, 或 $H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0$

② 计算 t 值

$H_0: \mu = 0 \quad t = (\bar{x} - \mu) / (S_{\bar{x}})$

$H_0: \mu_1 - \mu_2 = 0 \quad t = (|\bar{x}_1 - \bar{x}_2| - |\mu_1 - \mu_2|) / (S_{\bar{x}_1} - S_{\bar{x}_2})$

由于 $\bar{x} = \sum x / n$

则 $S_{\bar{x}} = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n(n-1)}$

③ 将计算的 t 值与 t 值表中按一定自由度查得的 $t_{f0.05}$ 或 $t_{f0.01}$ 进行比较以得出结论: 计算出的 t 值大于 $t_{f0.05}$, 则认为样本均数与总体均数的差别有显著意义, $P \leq 0.05$ 。计算出的 t 值大于 $t_{f0.01}$, 则认为样本均数与总体均数的差别有非常显著意义, $P \leq$

0.01。

计算出的 t 值小于 $t_{(f)0.05}$, 则认为样本均数与总体均数的差别无显著意义, $P > 0.05$ 。

(四) F 检验 (方差分析)

F 检验可用于评价两个或多个均值间的差异性, 其研究内容称为“试验因素”(简称因素)。此评价是通过计算两个因素的差异与每个因素内的差异之比率来完成的。 F 检验是用计算出的 F 值与查表的 F 值(表 8-2)相比较后得出结论。

1. F 值 在表示一群数值的差异程度时, 我们往往用样本的标准差(S)来估计总体的标准差(δ)但 S^2 并不是 δ 的无偏估计量, 各个 S 的平均数与 δ 之间有一定的偏差, 但用样本的方差(S^2)却可作为总体方差(δ^2)的无偏估计量, 各个 S^2 的平均数很靠近 δ^2 , 因此用样本方差(S^2)来估计总体 δ^2 要更合适些。如果我们从同一个总体随机抽取 2 个样本, 从第一个样本求得方差 S_1^2 , 从第 2 个样本求得方差 S_2^2 , 这 2 个样本即使来自同一个总体, 它们的 S_1^2 和 S_2^2 也不一定会完全相同, 将它们相比, 可以得出这 2 个方差的比值, 称为 F 值或称方差比。

$$F = S_1^2 / S_2^2$$

在同一个总体中每抽出 1 对样本, 就有 1 个 F 值, 抽出无数对样本, 就可以得到无数个 F , 由于在一般情况下两个样本的 S^2 总是比较接近的。因为 F 值的大部分都靠近 1。但如果这 2 个样本不是从同一个总体中抽出, 而从 2 个 δ^2 不等的总体中分别抽取的, 那么这个 F 值就可能会增大, 因此 F 值就可以用来估计 2 个或 2 个以上的样本是否是从同一总体中抽取的 1 个标志。

在同一总体中抽取无数对样本所得的无数个 F 值不会都等于 1, 而是在“1”左右一定范围内波动, 这是由抽样误差所造成的。如果按其 F 值的大小而将它们出现的频率排列起来即为 F 分布。 F 分布受样本大小的影响, 样本的 n 愈小, 则样本 S^2 间的差异就愈大, F 值分布的范围也愈宽, 如样本 n 愈大, 则样本 S^2 接近的机会愈多, 方差比接近于 1 的机会也愈多, F 值分布的范围也愈窄。当样本的 $n = \infty$ 时, 则 $S_1^2 = \delta_1^2$, $S_2^2 = \delta_2^2$, 由于已知是从同一总体 1 中抽样的, 故 $\delta_1^2 = \delta_2^2$, 则 S_1^2 / S_2^2 。

因此 F 分布不是一条曲线, 而是随着两个样本的 n 数大小而变动的一簇曲线(图 8-3)。

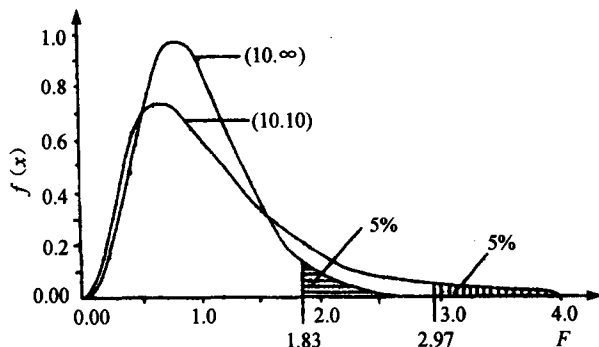


图 8-3 F 分布

按照这些 F 分布计算出来的数值就列在 F 值表中 (见表 8-2)。以 $F_{(f_1, f_2)0.05}$ 或 $F_{(f_1, f_2)0.01}$ 来表示, 在一般情况下, 其中 f_1 表示较大方差的自由度, f_2 表示较小方差的自由度。

根据 F 分布的性质, 如果我们是从小一总体中抽取的两个样本。假设它们的 F 值只受抽样误差的影响, 则有 95% 的 F 值小于 $F_{(f_1, f_2)0.05}$, 有 99% 的 F 值小于 $F_{(f_1, f_2)0.01}$ 或者说如果这二个样本的确是从小一总体中抽取出来的话, 那么它们的 F 值会超过 $F_{(f_1, f_2)0.05}$ 的概率小于 5% ($P < 0.05$), 超过 $F_{(f_1, f_2)0.01}$ 的概率小于 1% ($P < 0.01$)。这是很小的概率, 假如在一次实验中竟然出现了样本 F 值超过了 $F_{(f_1, f_2)0.05}$ 或 $F_{(f_1, f_2)0.01}$ 时, 就可以认为这两个样本不可能是从小一总体中抽取出来的。如果我们肯定这两个样本原来确实来自同一总体, 那么可以推断其中有一个样本因受到外部条件的影响 (如给以某种处理), 改变了组之间的 S^2 值, 从而使方差比变大, 使 F 值超出了抽样的变异范围, 因此我们认为这两个样本的差别是有显著意义的, 或者承认加在一个样本上的条件因素是有肯定影响的。 F 检验在具体应用时, 除了测定方差齐性外主要用于 2 个以上的均数显著性检验。

2. F 检验的步骤 ①建立检验假设 (H_0) 设各处理组间的变异属于抽样误差, 它与组内的变异是一致的, 所加的处理因素并不增加变异; ②计算各处理组间的方差以及组内的方差, 求出各对变异来源的 F 值; ③将计算的 F 值与 F 值表中按一定自由度查得的 $F_{(f_1, f_2)0.05}$ 或 $F_{(f_1, f_2)0.01}$ 进行比较以得出结论: 如处理组的 F 值大于 $F_{(f_1, f_2)0.05}$, 则认为该处理所引起的差别有显著意义。 $P \leq 0.05$; 如处理组的 F 值大于 $F_{(f_1, f_2)0.01}$, 则认为该处理引起的差别有非常显著的意义。 $P \leq 0.01$; 如处理组的 F 值小于 $F_{(f_1, f_2)0.05}$, 则认为该处理所引起的差别无显著意义。 $P > 0.05$ 。

由此可见, 当两个实验组间的可预期性差异远大于同一试验组内的不可预期性差异时, 可以认定所评估的试验组的结果是不同的。

对实验室所获得的微生物实验验证数据进行评价时, 不能简单地套用统计学公式, 而应当根据统计学检验的适用条件及被评价数据确定适当的统计学分析方法。

(五) χ^2 (读作卡方) 分析

1. χ^2 值

如从一个已知其平均数为 μ , 标准差为 δ 的正态总体中抽取随机变量 x_i , 各变量系 x_i 与均数 μ 之差对 δ 的比值, 也是一个正态分布, 即按公式

$$Z = (x_i - \mu) / \delta$$

它们的平方的总和称为 χ^2 (读作卡方)

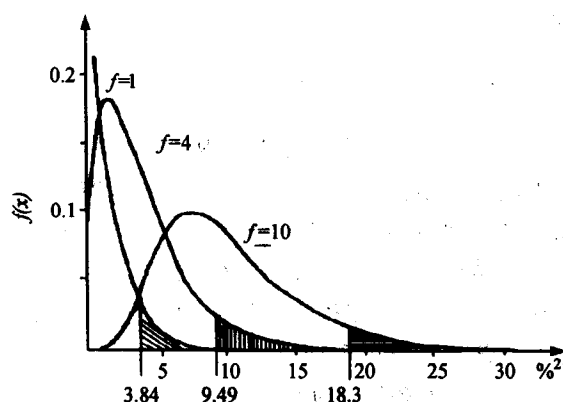
$$\chi^2 = \sum [x_i - \mu / \delta]^2$$

1899 年 Pearson 提出把 χ^2 用于计数资料离散程度的判断, 作为一个观察值和理论值之间的偏离度的指数。用公式表示

$$\chi^2 = \sum (O - T)^2 / T$$

式中 O 为观察值, T 为理论值。

虽然有了 χ^2 值来表示观察值与理论值之间的离差程度,但这个数值要大多少才能表示理论数的假设是错的呢? χ^2 分布是随着样本自由度的大小而变动的一簇曲线(图 8-4)。

图 8-4 χ^2 分布曲线图

按照这些 χ^2 分布计算出来的数值就列在 χ^2 值表中 (表 8-3)

表 8-3 χ^2 值表 ($P=0.05$)

f	χ^2	f	χ^2	f	χ^2	f	χ^2	f	χ^2
1	3.84	7	14.1	13	22.4	19	30.1	25	37.6
2	5.99	8	15.5	14	23.7	20	31.4	26	38.9
3	7.82	9	16.9	15	25.0	21	32.7	27	40.1
4	9.49	10	18.3	16	26.3	22	33.9	28	41.3
5	11.1	11	19.7	17	27.6	23	35.2	29	42.6
6	12.6	12	21.0	18	28.9	24	36.4	30	43.8

根据 χ^2 分布的性质,假如我们从总体中随机抽取样本计算得到一个 χ^2 值,就可以比较这个 χ^2 值是在 χ^2 分布的那一个范围,用概率的原理来推断所假设的理论数是否可靠。例如我们假设总体的黑子和白子数相等,即 1:1,这即为检验假设,抽取样本的 χ^2 中有 95% 在 3.84 的范围内,以 $\chi^2_{f,0.05} = 3.84$ 表示,而有 99% 在 6.64 的范围内,以 $\chi^2_{f,0.01} = 6.64$ 表示,换言之,即有 5% 的可能会超过 3.84,有 1% 的可能超过 6.64。但如果一次抽得的样本,其 χ^2 值竟然超过了这个范围 [$\chi^2_{f,0.05}$ 或 $\chi^2_{f,0.01}$],则可以认为这个样本不是从这个总体中抽取的,即该样本由不同个体组成的比例与理论假设的比例不一致,可以推翻检验假设。

2. χ^2 检验的步骤

① 建立检验假设 (H_0), 设各组的观察值和理论值是一致的。② 按公式计算 χ^2 值。③ 将计算所得的 χ^2 值与 χ^2 值表的 $\chi^2_{f,0.05}$ 或 $\chi^2_{f,0.01}$ 进行比较,如样本 χ^2 大于 $\chi^2_{f,0.05}$,则认为观察值和理论值的差别有显著意义,如样本 χ^2 大于 $\chi^2_{f,0.01}$ 则认为观察值和理论值的差别有非常显著意义,如样本 χ^2 小于 $\chi^2_{f,0.05}$,则认为观察值和理论值的差别无显著意义。

综上所述, χ^2 值是指将一个已知其平均数为 μ , 标准差为 δ 的正态分布中, 抽取随机变量 x_i , 各变量 x_i 与均数 μ 之差对 δ 的比值, 即 $Z = x_i - \mu/\delta$ 进行平方总和称为 χ^2 (读作卡方) 值。可用公式 $\chi^2 = \sum (x_i - \mu/\delta)^2$ 表示。

三、制备趋势分析图进行分析

在分析某一检测结果的数据 (某产品某工艺、某一具体检测项目等) 时, 首先可确定和对比下述参数: 控制限度——指检测结果的范围, 即确定控制的检测结果范围。合格限度——指生产或工艺以及某一项目的检测的合格范围。

通过分析这些检测参数结果, 最终可以确定该检测的项目是处于可控状态 (可预知) 还是失控状态 (不可预知)。对于处于可控状态的检测项目而言, 测得的检测项目参数总是有一恒定的平均值、方差正常并且呈正态分布。

将测得的检测参数绘制成质量控制图使数据形象化, 这些质量控制图通常由按时间顺序分布的对应数据点组成。它便于操作者和审查人员分析发现异常性差异, 而这些差异可能意味着该检测参数的控制项目即将失控。也可用其他类型的统计图表来反映一段时间内数据的变化趋势。图 8-5、8-6、8-7、8-8 即为实验室检测项目相应的图表示例, 这些图表尽管简单, 但在质量管理控制系统中用途很广, 使用方便与广泛, 它们对数据评价和改进微生物实验室的质量管理系统是非常有帮助与好处的。

当通过统计学处理发现某检测项目处于超出状态时, 实验室必须要立即向主管及有关科室反映, 并进行充分调研以找出原因并采取相应的纠偏措施。发生的偏差有可能起因于产品的原材料、生产工艺制备过程或检验程序与方法。有时, 某工艺某检测项目看似处于失控状态, 而最终却发现问题的根源在于取样的方法或检验方法的不当或操作的不当而引起。因此, 微生物检测的各个项目应当积极参与实验室检验项目有关的偏差调查。如某纯水系统微生物含量控制等项目的分析 (图 8-5、8-6、8-7)。

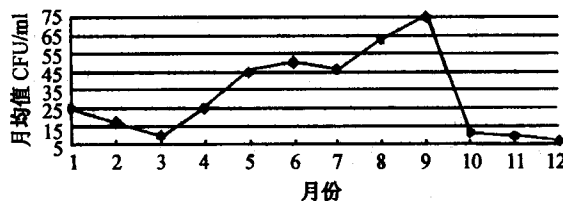


图 8-5 某纯水系统微生物含量控制分析图

从图 8-5 结果分析可得知: 在相当长的时期内, 水系统的含菌量有所增加。此含菌量的增加表明在水系统处理过程中存在失控的趋势; 而最后 3 个月显示水系统的含菌量有所下降, 此下降表明水系统已恢复到受控状态。有必要调查产生该异常趋势的原因。

从图 8-6 结果分析中可看出: 虽然 $\times \times \times \times$ 年 12 月 8 日的检验结果仍在合格限度内, 但其数据明显高出产品的正常检验范围。可认定其属于异常性结果, 发现后应立即进行相应调查。需进行复检, 以确定此差异是否属于统计学意义上的异常值。

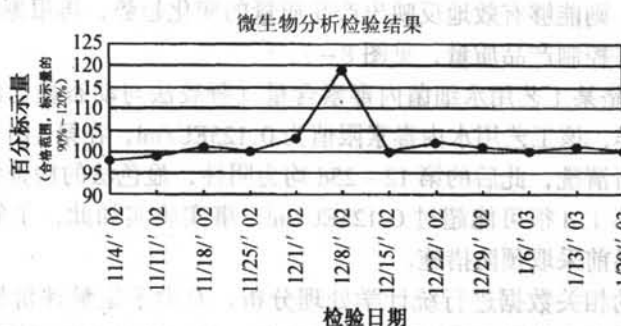


图 8-6 微生物分析检验结果控制图

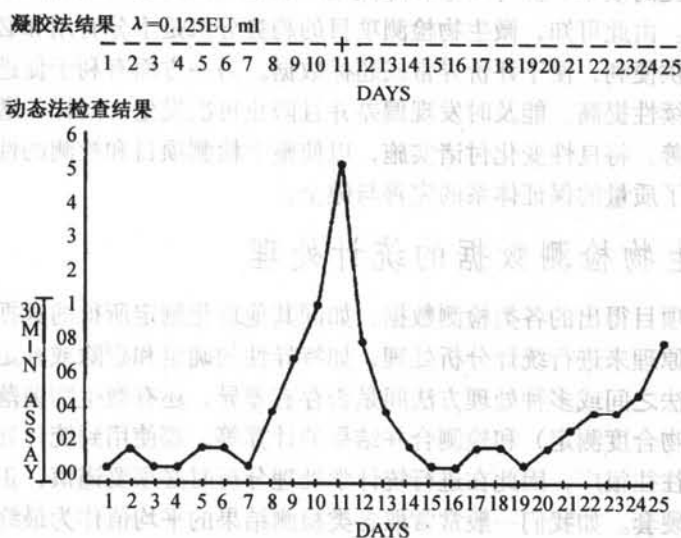


图 8-7 某工艺用水细菌内毒素含量的凝胶法与动态显色法比较趋势分析图

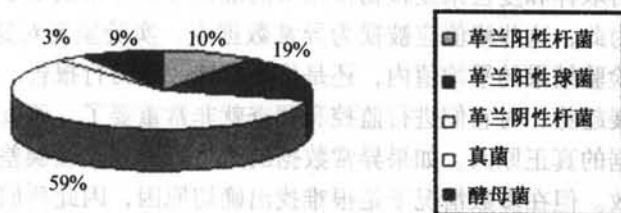


图 8-8 微生物检测数据评价示意图 (示例)

在对异常性或超标性数据进行日常评估的基础上, 为考察长期变化趋势, 可对此类数据进行汇总分析。如对实验室的偏差调查可进行年度汇总分析, 有助于改进及提升实验室工作质量和进行培训。如果环境检测数据可反映微生物的数量和类别, 那么即可从中发现和预测出环境的季节性变化。这类信息有助于管理人员制定出适于实验室用的清洁和消毒规程和方法, 其中包括消毒剂的交替使用频率等。

此外如对某一个产品的内毒素进行定量数据情况分析, 得出一个较多的连续批次产品

的内毒素定量数据,则能够有效地反映出产品质量的变化趋势,再根据这一趋势采取有效的预防措施就可更好控制产品质量,见图8-7。

图8-7显示的是某工艺用水细菌内毒素含量(凝胶法与动态显色法)比较结果,连续测定了25d的水样,该工艺用水内毒素限值为0.125EU/ml,在第11d时凝胶法阳性,此后立即对本系统进行清洗,此后的第12~25d均为阴性,显色法的检查结果则揭示了内毒素的具体变化,在第11d很可能超过0.125EU/ml,事实确实如此,了解这一信息,就可以在出现不合格产品前采取预防措施。

对某检测项目的相关数据进行统计学处理分析,有助于定量评价检测项目的检测数据。如果一个系统或相关检测项目不被监测和评价,就无法对它进行控制以及使检测项目控制得到改进和提高效率、提升质量和降低生产成本(减少返工或停产以及复检)与提早发现问题和变化。由此可知,微生物检测项目的趋势分析是十分有用和必要的。一方面它可为评审数据提供便利,便于评价异常或超标数据。另一方面有利于促进检测项目以及整个检验质量的持续性提高。能及时发现偏差并且防止再次发生。同样,通过统计学处理也能发现状况的改善,将良性变化付诸实施,以使整个检测项目和检测的性能和控制得到进一步提高,确保了质量的保证体系的完善与健全。

四、微生物检测数据的统计处理

微生物检测项目得出的各类检测数据,如同其他理化测定所得的数据一样,可运用数学统计的方法与原理来进行统计分析处理,如特异性的确定和剔除或补足,以及在验证试验中两种不同方法之间或多种处理方法间是否存有差异,还有微生物菌落计数时各皿间菌落数是否吻合(吻合度测定)和检测合并结果的计算等,都使用到统计处理。由于微生物检测的数值范围往往很广,因此在进行统计学处理分析时必须谨慎,正确运用统计的原理方法,忌生搬硬套。如我们一般常常取各类检测结果的平均值作为最终报告结果,但有时就会出现异常数据和偶然性的峰值。因微生物污染具有不均一性和检测结果的不确定性,使到我们通过再取样和复检来复核初检结果的准确性就非常困难了,也就是它的重视性就显得较难了。为此,这些峰值应被视为异常数据点。实验室要对这类结果进行评价,以确定是将其纳入检验结果的平均值内,还是作为特殊数据另行报告。为了弄清这些峰值是否会成为一种发展趋势,对它们进行监控和调查就非常重要了。调查时,要尽可能弄清楚产生这些异常数据的真正原因。如果异常数据的产生归因于实验误差或取样失误,则此数据可被认定为无效。但在多数情况下是很难找出确切原因,因此我们要借助于生物检定统计这一工具来评判异常结果是否应当被剔除。具体方法可依照《中国药典》附录部分的《生物检定统计法》中的量反应平行线测定法。此检验标准是基于组内各个样本的结果均等。随意剔除或保留异常性结果,都可能会成为偏差的根源。实验室不能仅仅因为得出的检验结果不符常规而轻易地将其剔除。以下具体结合微生物检测实例说明生检统计的 t 检验、 F 检测、 χ^2 检验的实际应用。

(一) 特异反应检测值的剔除

例1 实验室在对某批抗生素样品进行效价测定时,所得标准曲线的相关系数为

0.96。由此可知其线性关系较差（理想的相关系数值应不低于 0.98）。经查，80%标准浓度的抑菌圈结果异常。

80%参照标准浓度的抑菌圈一共有 9 个。下面用特异反应检验法来评价这些数值。

测得的抑菌圈直径 (mm): 11.5, 11.2, 11.8, 11.9, 16.3, 11.2, 12.2, 11.3。

设 y_a 表示异常值, 排列在首位, 其他数据依次递减排列, 最后一个为最小值 (y_m)。

16.3 (y_a), 12.2, 11.9, 11.8, 11.5, 11.3, 11.3, 11.2, 11.2 (y_m)

按以下公式之一进行计算

当 $m = 3 \sim 7$ 时, 相对间距 $J_1 = \frac{(y_2 - y_a)}{(y_m - y_a)}$

当 $m = 8 \sim 13$ 时, 相对间距 $J_2 = \frac{(y_3 - y_a)}{(y_{m-1} - y_a)}$

当 $m = 14 \sim 19$ 时, 相对间距 $J_3 = \frac{(y_3 - y_a)}{(y_{m-2} - y_a)}$

如果 J_1 J_2 或 J_3 超出表 8-1 中与样本数相对应的最大临界值, 则将此异常值删除是符合统计学要求的。

在上例中, 因样本总数是 9, 故可按中间的公式计算相对间距 J_2 。

$$J_2 = \frac{(11.9 - 16.3)}{(11.2 - 16.3)} = \frac{-4.4}{-5.1} = 0.86$$

计算所得相对间距值超过了对应的 J_2 临界值 0.73, 所以此异常值 16.3 在统计学意义上可予剔除。

表 8-4 特异反应检验法的 J 值表

M	3	4	5	6	7	
J	0.98	0.85	0.73	0.64	0.59	
M	8	9	10	11	12	13
J	0.78	0.73	0.68	0.64	0.61	0.58
M	14	15	16	17	18	19
J	0.60	0.58	0.56	0.54	0.53	0.51
M	20	21	22	23	24	
J	0.50	0.49	0.48	0.47	0.46	

例 2 某微生物实验室对一种原料进行含菌量检查。从一批来料中取 6 等份试样进行检测, 各试样的检测结果如下:

样 1: 21CFU/ml; 样 2: 18CFU/ml; 样 3: 36CFU/ml; 样 4: 21CFU/ml; 样 5: 12CFU/ml; 样 6: 9CFU/ml。

实验人员希望将以上 6 个检测结果进行平均并作为最终结果。但认为平行试样 3 和平行试样 6 的结果有疑问, 不能代表该批来料的实际含菌量。故用特异反应检验法对这两个数据进行评估, 看能否剔除。

针对有疑问的异常值 36CFU/ml 的计算。

36 (y_a), 21, 21, 18, 12, 9 (y_m)

计算相对间距:

$$J_1 = \frac{(21-36)}{(9-36)} = \frac{-15}{-27} = 0.55$$

因为由计算所得的相对间距值,未超出检验总数为6时的 J_1 临界值0.64,所以此疑问值36CFU不属于统计学意义上的特异值,不用剔除。

针对有疑问的异常值9CFU/ml的计算。

$$9(y_a), 12, 18, 21, 21, 36(y_m)$$

计算相对间距:

$$J_1 = \frac{(12-9)}{(36-9)} = \frac{3}{27} = 0.11$$

因为由计算所得的相对间距值,未超出检验总数为6时的 J_1 临界值0.64,所以此疑问值9CFU不属于统计学意义上的特异值。

在此例中,检验人员可以对6个平行试样的检测值进行平均,并以此平均值作为该批来料的含菌量检查结果,不用剔除。也用吻合度 χ^2 (读作卡方)检验(见例6)则检测各平板间菌数是否均一。

$$\chi^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / \bar{x}$$

已知: $n=6$ 计算: $\bar{x} = \sum x_i / n = (21 + 18 + 36 + 21 + 12 + 9) / 6 = 117 / 6 = 19.5$

离均差平方和 = $\sum (x_i - \bar{x})^2$

$$= (21 - 19.5)^2 + (18 - 19.5)^2 + (36 - 19.5)^2 + (21 - 19.5)^2 + (12 - 19.5)^2 + (9 - 19.5)^2$$

$$= 189.75$$

$$\chi^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / \bar{x} = 189.75 / 19.5 = 9.73$$

自由度 $f = n - 1 = 6 - 1 = 5$ 设 $\alpha = 0.05$ 查表得 $\chi^2_{(4)0.05} = 12.6$ 。计算的 χ^2 值 $9.73 <$ 查表的 χ^2 值 $\chi^2_{(4)0.05}$, 故 $P > 0.05$ 。结论: 菌落数间的差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

(二) t 检验实例

验证实验中,经常要对2种不同材料、2种不同方法、2种不同批号培养基等进行方法验证,以检验2种方法间是否有差异,可用 t 检验进行。

例3 国产某批号琼脂培养基与进口某批号培养基的比较验证试验测定(配对实验数据的 t 检验)

1. 试验目的 牛肉膏琼脂培养基能否代替牛心汤培养基测验乳酸菌。假设二法均值的差值 $u_1 - u_2 = u = 0$ 。

2. 方法及确定指标 按《中国药典》(2000年版)规定方法测得平均菌数,并按 t 检验法进行显著性检验

3. 材料与试剂 国产批号琼脂培养基、进口某批号培养基、其他试剂。

4. 结果及数据处理 共考察中药生粉9批次,每批2~3次,求其平均值作指标,进行两种培养基测验验证比较,结果如表8-5所示:

表 8-5 两种培养基检验验证比较测定的结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	合 计
国产培养基	97	51	83	330	62	84	94	59	60	$\sum x^2 = 4497$ $\sum x = 61$
进口琼脂培养基	71	39	83	284	42	94	85	87	74	
二者差值 x	+26	+12	0	+46	+20	-10	+9	-28	-14	

5. 计算标准差及显著性检验 计算差数的均数与标准差

均数 $\bar{x} = 61/9 = 6.78$

$$\begin{aligned}\text{标准差} &= S/\sqrt{n} = S_x = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n(n-1)} = \sqrt{(\sum x^2 - (\sum x)^2/n) / (n(n-1))} \\ &= \sqrt{(4497 - 61^2/9) / (9 \times (9-1))} \\ &= 7.53\end{aligned}$$

$$t = |(\bar{x} - \mu) / S_x| = \frac{6.78 - 0}{7.53} = 0.900$$

自由度 $f = 9 - 1 = 8$

设 $\alpha = 0.05$, 查表 $t_{(8)0.05} = 2.306$

$t < t_{(8)0.05}$, $P > 0.05$

结论: 国产与进口两种培养基差异无显著意义。

t 检验的计算机统计处理: 见五、统计例题的微机运算中的 (一) 配对试验 t 检验微机运算。

(三) F 检验实例

微生物检验验证中, 涉及到多个因素的检验验证, 如多种试剂或培养基等的比较验证试验, 可用 F 检验进行, 以确定各因素间是否有差异。

例 4: 虎红培养基中 4 种试剂的比较 (F 检验) 验证试验。

1. 试验目的 通过虎红培养基中四种试剂的比较 (F 检验) 验证试验, 检验不同生产厂家的虎红试剂配制的霉菌培养基是否对药品中霉菌数检验存在差别。

试验指标: 按《中国药典》(2000 年版) 试验, 以平板霉菌计数作指标进行统计。

2. 试验材料与试剂

(1) 各种不同的虎红试剂 见表 8-6。

表 8-6 4 种不同的虎红试剂

编 号	名 称	厂 名	批 号
I	四氧四碘荧光素二钠	上海试剂三厂	811126
II	四氧四碘荧光素 B	上海标本模型厂	800620
III	四氧四碘荧光料	北京化工厂	800608
IV	四氧四碘荧光素	上海中化学厂	650415

(2) 样品 淀粉酶。(略)

(3) 其他试剂试药 均为 AR 级 (略)。

3. 试验方法及结果

(1) 虎红培养基的制备 按《中国药典》(2000年版)规定,将虎红配制成4/3000溶液,再依法制成虎红琼脂培养基,备用。

(2) 试验及结果 取3批已知含霉菌较多的淀粉酶样品,按《中国药典》(2000年版)使用4种虎红配制的培养基倾注平皿,检验,计数,各作3次,每种培养基得9个数据,经平方根处理后,见表8-7。

表 8-7 淀粉酶样品检验结果

实验号	虎红培养基			
	I	II	III	VI
1	2 (4)	2.24 (5)	2.83 (8)	2.83 (8)
2	2.55 (6.5)	2.24 (5)	2.24 (5)	2.45 (6)
3	2.74 (7.5)	3 (9)	2.45 (6)	2.24 (5)
4	2.55 (6.5)	1.41 (2)	2.74 (7.5)	2.65 (7)
5	1.87 (3.5)	2.35 (5.5)	2.35 (5.5)	2.12 (4.5)
6	2.83 (8)	2.74 (7.5)	2.83 (8)	2.24 (5)
7	2.12 (4.5)	2.12 (4.5)	2 (4)	2.74 (7.5)
8	2.35 (5.5)	2.65 (7)	2.45 (6)	2.65 (7)
9	2.55 (6.5)	2.45 (6)	2.92 (8.5)	2.12 (4.5)

括号中数字为平方根转换前数据

4. 数据处理及结果分析

(1) 计算每列数据和 $\sum x_i$, 列均数 $\bar{x}_j$, 列平均和 $\sum \bar{x}_j^2$

$$\begin{aligned}\sum x_{\text{I}} &= 2 + 2.55 + 2.74 + 2.55 + 1.87 + 2.83 + 2.12 + 2.35 + 2.55 \\ &= 21.56\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{\text{II}} &= 2.24 + 2.24 + 3 + 1.41 + 2.35 + 2.74 + 2.12 + 2.65 + 2.45 \\ &= 21.2\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{\text{III}} &= 2.83 + 2.24 + 2.45 + 2.74 + 2.35 + 2.83 + 2 + 2.45 + 2.92 \\ &= 22.81\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{\text{IV}} &= 2.83 + 2.45 + 2.24 + 2.65 + 2.12 + 2.24 + 2.74 + 2.65 + 2.12 \\ &= 22.04\end{aligned}$$

$$\bar{x}_{\text{I}} = 21.56 \div 9 = 2.40$$

$$\bar{x}_{\text{II}} = 21.2 \div 9 = 2.36$$

$$\bar{x}_{\text{III}} = 22.81 \div 9 = 2.53$$

$$\bar{x}_{\text{IV}} = 22.04 \div 9 = 2.45$$

$$\begin{aligned}\sum \bar{x}_j^2 &= 2^2 + 2.55^2 + 2.74^2 + 2.55^2 + 1.87^2 + 2.83^2 + 2.12^2 + 2.35^2 + 2.55^2 \\ &= 52.54\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{II}^2 &= 2.24^2 + 2.24^2 + 3^2 + 1.41^2 + 2.35^2 + 2.74^2 + 2.12^2 + 2.65^2 + 2.45^2 \\ &= 51.57\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{III}^2 &= 2.83^2 + 2.24^2 + 2.45^2 + 2.74^2 + 2.35^2 + 2.83^2 + 2^2 + 2.45^2 + 2.92^2 \\ &= 58.60\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\sum x_{IV}^2 &= 2.83^2 + 2.45^2 + 2.24^2 + 2.65^2 + 2.12^2 + 2.24^2 + 2.74^2 + 2.65^2 + 2.12^2 \\ &= 54.59\end{aligned}$$

(2) 计算数据总和 $\sum x$ 和总平方和 $\sum x^2$ 总平均值 $\bar{x}$

$$\sum x = 21.56 + 21.2 + 22.81 + 22.04 = 87.61$$

$$\sum x^2 = 52.54 + 51.57 + 58.57 + 58.60 + 54.59 = 217.30$$

$$\bar{x} = (2.40 + 2.36 + 2.53 + 2.45) / 4 = 2.43$$

(3) 计算总差方和 $SS_{\text{总}}$ 、组间差方和及方差、组内差方和及方差

$$\begin{aligned}\text{总差方和 } SS_{\text{总}} &= \sum (x - \bar{x})^2 \\ &= \sum x^2 - (\sum x_i)^2 / (\text{行数} \times \text{列数}) \\ &= 217.30 - (87.01)^2 / (9 \times 4) \\ &= 4.09\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{组间差方和 } SS_{\text{组间}} &= \sum (x - \bar{x})^2 \times \text{行数} \\ &= (\sum x_j)^2 / \text{行数} - (\sum x)^2 / (\text{行数} \times \text{列数}) \\ &= [(21.56^2 + 21.1^2 + 22.81^2 + 22.09^2) / 9] - 87.61^2 / (9 \times 4) \\ &= 0.16\end{aligned}$$

组间方差 = 组间差方和 / 组间自由度

$$= 0.16 / (4 - 1)$$

$$= 0.0538$$

组内差方和 $SS_{\text{组内}} = \text{总差方和} - \text{组间差方和}$

$$= 4.09 - 0.16$$

$$= 3.93$$

组内方差 = 组内差方和 / 组内差方自由度

$$= 3.93 / [(9 - 1) \times 4]$$

$$= 0.123$$

F 值 = 组间方差 / 组内方差

$$= 0.0538 / 0.0123$$

$$= 0.439$$

设置信度 $\alpha = 0.05$

组间自由度 $f_1 = \text{列数} - 1 = 4 - 1 = 3$

组内自由度 $f_2 = (\text{行数} - 1) \times \text{列数} = (9 - 1) \times 4 = 32$

查 $\alpha = 0.05$, 双侧检验 F 值临界值表 $F(f_1, f_2)_{0.05}$

即: $F(3, 32)_{0.05} = 2.9$

$$F < F(3, 32)_{0.05} = 2.9$$

得结论: 不同虎红试剂对检验霉菌计算差异无显著意义, 见表 8-8。

表 8-8 方差分析表

变异来源	自由度	差方和	方差	F 值	结论
组间	3	0.16	0.0538	0.439	$P > 0.05$
组内	32	3.93	0.123		
总	35				

F 检验计算机统计处理: 见五、统计例题的微机运算中的 (二) 多因素 F 检验微机运算。

(四) χ^2 检验实例

例 5: 乙酰胺快速法与部颁法检验铜绿假单胞菌的比较 (配对实验 χ^2 值检验)

1. 试验目的 药品检验中铜绿假单胞菌检验按部颁《药品卫生检验方法》周期长; 乙酰胺快速法, 检验周期短, 为评价二法检出率的差异, 用配对法进行实验。

2. 指标确定及检验方法选择 本实验结果为非数学型, “检出”或“未检出”可用 χ^2 检验, 又由于是配对实验, 适用“四格表”来进行两样本频数的比较。

3. 材料与试剂 菌种: 标准铜绿假单胞菌一株 [CMCC (B) 10104], 自分离铜绿假单胞菌 5 株。样品: 9 个品种 30 个批次, 均为已检验过无铜绿假单胞菌样品, 每一批取 10ml, 加 100ml 生理盐水作不加菌供试液。其他材料与试剂均应符合有关规定 (略)。

4. 试验方法及结果 分别按《药品卫生检验方法》和协作组规定的“乙酰胺快速法”试验, 每份供试液同时按两种方法检验得到 30 对未加菌和 180 对加菌样品的检验结果, 如表 8-8 所示 (详表略, 只列统计表)。

二法均检出 (阳性) 175 对

二法均未检出 (阴性) 30 对

部颁法检出而乙酰胺法未检出 2 对

乙酰胺法检出而部颁法未检出 3 对

5. 数据处理及 χ^2 检验 将以上统计检出情况列成四格表, 见表 8-9。

表 8-9 铜绿假单胞菌检出率比较

		部颁法 (I 法)		合计
		检出	未检出	
快速法 (II 法)	检出	A = 175	B = 3	178
	未检出	C = 2	D = 30	32
合计		177	33	210

$$\begin{aligned}\chi^2 &= \sum (O - T)^2 / T \\ &= \{[b - (b + c)/2]^2 / (b + c)/2\} + \{[c - (b + c)/2]^2 / (b + c)/2\}\end{aligned}$$

$$= (b - c)^2 / (b + c)$$

$$= (3 - 2)^2 / (3 + 2)$$

$$= 1/5$$

$$= 0.2$$

(注: 由于本例属大样本 $n > 60$, 故不需平行校正, 若 $n < 60$, 则需平行校正, 按 $\chi^2 = [|b - c| - 1]^2 / (b + c)$ 计算)

$$\text{自由度 } f = (\text{行数} - 1)(\text{列数} - 1)$$

$$= (2 - 1) \times (2 - 1)$$

设 $\alpha = 0.05$ 查表得 $\chi^2_{(1)0.05} = 3.8$

$\chi^2 < \chi^2_{(1)0.05}$ 故 $P > 0.05$

结论: 部颁法与快速法差异无显著性意义。

χ^2 检验计算机统计处理: 见五、统计例题的微机运算中的 (三) 配对试验 χ^2 (卡方) 检验。

例 6: 吻合度 χ^2 检验实例

用生理盐水溶液把未知浓度的细菌悬浊液作分段稀释, 并取 1ml 涂布 5 个琼脂平板进行菌落计数, 结果如表 8-10。

表 8-10 5 个琼脂平板进行菌落计数的测定结果

平板号	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5
菌落数	115	108	136	125	145

要求对该菌落计数进行适合度检验 (检测各平板间菌数是否均一)。

如果稀释和平板培养等操作都进行得很合适, 可以设想菌落数遵循 Poisson 分布, 故可用 χ^2 检验来检查它。即 $\chi^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / \bar{x}$

已知: $n = 5$

计算: $\bar{x} = \sum x_i / n = (115 + 108 + 136 + 125 + 145) / 5 = 629 / 5 = 125.8$

离均差平方和 = $\sum (x_i - \bar{x})^2$

$$= (115 - 125.8)^2 + (108 - 125.8)^2 + (136 - 125.8)^2 + (125 - 125.8)^2 + (145 - 125.8)^2$$

$$= 906.8$$

$$\chi^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / \bar{x} = 906.8 / 125.8 = 7.21$$

自由度 $f = n - 1 = 5 - 1 = 4$

设 $\alpha = 0.05$ 查表得 $\chi^2_{(4)0.05} = 9.49$

$\chi^2 < \chi^2_{(4)0.05}$ 故 $P > 0.05$

结论: 菌落数与 Poisson 分布的差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 即其服从 Poisson 分布。

(五) 试验结果的合并计算

在微生物检验中, 为了使实验结果更加精确可靠, 对于某些样本需要重复测定多次,

或多人重复同一检测所得的检测报告数据,然后平均报告,特别是制备国家标准品或参考品时,一般需要协作标定,将样品分发至各有关实验室,多个实验室的测定结果通过可靠性、均一性检验后进行合并计算,得到各实验室标定的效价均值,然后将各实验室的结果再次进行合并计算,得出较可靠的效价值。在常规检验中,如果在必要时善于对测定结果进行合并计算,可达到增加实验的精密度的、降低可信限率的目的。

在生物检定中,由于生物差异、实验条件及操作误差的影响,各次实验结果不可能相同,在合并计算时,如果不考虑每个结果的精密度,将结果一律等同看待是不合理的。因此,不能简单地以算术平均值代表合并的结果,而要根据参加合并计算的每个结果带来可靠信息的程度,给以一定的权重(W),然后计算加权平均值($\bar{M}$)。

权重为各次实验 S_M 平方 (M 的方差) 的倒数: $M = 1/S_M^2$

$$\text{加权平均值 } \bar{M} = \sum WM / \sum W$$

参加合并计算的 n 个结果应该是: ①各个实验结果是独立的、完整的,实验条件相同,和标准品同时比较所得的结果 (P_T); ②各次检定结果,经用标示量或估计效价 (A_T) 校正后,取其对数 ($\lg P_T$) 参加合并计算

计算时,令 $\lg P_T = M$

n 次实验结果共 n 个 M 值,首先按 χ^2 检验 M 的方差均一性,看 M 是否来自同一总体。

$$\chi^2 = \sum WM^2 - \sum WM^2 / \sum W, F = n - 1$$

接上式自由度 (f) 查 χ^2 值表 (表 8-2), 得查表值, 当 χ^2 计算值小于查表时, 认为 n 个实验结果均一, 可按 $\bar{M} = \sum WM / \sum W$ 式计算 $\bar{M}$, 按 $\bar{P}_T = \lg^{-1} \bar{M}$ 、 $S_{\bar{M}} = 1 / \sum W$ 、 $\bar{P}_T$ 的 $FL = \lg^{-1} (M \pm tS_M)$ 式计算 $\bar{P}_T$ 、 $S_{\bar{M}}$ 和 $\bar{P}_T$ 的 FL 。

$$\bar{P}_T = \lg^{-1} \bar{M}$$

$$S_{\bar{M}} = 1 / \sum W$$

合并计算的自由度 (f) 是 n 个实验结果的 S^2 自由度之和 ($f = \sum f_i$), 按此 f 值查 t 值表 (表 8-1) 得 t 值。

$$\bar{P}_T \text{ 的 } FL = \lg^{-1} (\bar{M} \pm tS_M)$$

计算 $\bar{P}_T$ 的 $FL\%$

$$\bar{P}_T \text{ 的 } FL\% = [(P_T \text{ 的高限} - P_T \text{ 的低限}) / 2P_T] \times 100\%。$$

当 χ^2 计算值大于 $\chi^2_{(0.05)}$ 查表值时, 则 n 个实验结果不均一, 如为个别实验结果影响 n 次实验结果的均一性, 可以剔除个别结果, 将其余均一的结果进行合并计算。如果 n 次实验结果的不均一性并非个别实验结果的影响, 则按公式 $\bar{M} = \sum M / n$ 和公式 $S_{\bar{M}} = \sqrt{[\sum M^2 - (\sum M)^2 / n] / [n(n-1)]}$ 、 $f = n - 1$ 式计算 n 个 M 的不加权均值 $\bar{M}$ 及其 $S_{\bar{M}}$, 再按公式 $\bar{P}_T = \lg^{-1} M$ 式计算 $\bar{P}_T$, 按 $\bar{P}_T$ 的 $FL = \lg^{-1} (\bar{M} \pm tS_M)$ 式计算 $\bar{P}_T$ 的 FL 和按 $\bar{P}_T$ 的 $FL\% = [(\bar{P}_T \text{ 的高限} - \bar{P}_T \text{ 的低限}) / (2 \times \bar{P}_T)] \times 100\%$ 式计算 $\bar{P}_T$ 的 $FL\%$ 。

例 7: 标准品协作标定结果的合并计算

某省药品检验所 19 × × 年参加国家标准品土霉素的协作标定, 共测得 17 个效价值,

合并计算结果见表 8-11。

表 8-11 土霉素效价测定结果

P_T (U/mg)	M ($\lg P_T$)	S_M	W ($1/S_M^2$)	WM	WM^2
926.51	2.9669	0.010 26	9499.60	28 184.36	83 620.19
894.84	2.9517	0.008 98	12 400.73	36 603.23	108 041.77
887.07	2.9480	0.009 16	11 918.16	35 134.74	103 577.20
910.83	2.9594	0.006 16	26 353.52	77 990.61	230 805.40
924.08	2.9657	0.008 24	14 728.06	43 679.01	129 538.83
910.42	2.9592	0.005 99	27 870.60	82 474.69	244 059.09
916.18	2.9620	0.004 86	42 337.72	125 404.33	371 447.62
902.26	2.9553	0.006 27	25 436.94	75 173.79	222 161.10
897.17	2.9529	0.010 98	8 294.60	24 493.12	72 325.75
903.54	2.9559	0.008 02	15 547.17	45 955.88	135 840.99
896.70	2.9526	0.007 08	19 949.57	58 903.10	173 917.29
912.52	2.9602	0.006 46	23 962.66	70 934.26	209 979.58
903.15	2.9558	0.009 78	10 454.96	30 902.77	91 342.41
910.40	2.9592	0.009 29	11 586.94	34 288.07	101 465.27
877.16	2.9431	0.005 74	30 351.22	89 326.68	262 897.34
905.95	2.9571	0.009 25	11 687.36	34 560.69	102 199.42
891.24	2.9500	0.006 99	20 466.60	60 376.47	178 110.59
Σ			322 846.41	954 385.80	2 821 329.84

1. χ^2 检验

代入 $\chi^2 = \sum WM^2 - \sum WM^2 / \sum W$ 式得:

$$\chi^2 = 2\,821\,329.84 - (954\,385.80)^2 / 322\,846.41 = 12.25$$

$$f = 17 - 1 = 16$$

查 χ^2 值表 (表 8-2): $\chi_{(16)0.05}^2 = 26.3$

χ^2 计算值 (12.25) 小于 $\chi_{(16)0.05}^2$ 查表值 (26.3), 17 次实验结果均一。

2. 按 $\bar{M} = \sum WM / \sum W$ 计算 $\bar{M}$

$$\bar{M} = \sum WM / \sum W$$

$$= 954\,385.80 / 322\,846.41 = 2.9562$$

3. 按 $\bar{P}_T = \lg^{-1} \bar{M}$ 式计算 $\bar{P}_T$

$$= \lg^{-1} 2.9562 = 904.07 \text{ U/mg}$$

$$4. \text{ 按 } S_{\bar{M}} = \sqrt{1/\sum W} \text{ 式计算 } S_{\bar{M}} \\ = \sqrt{1/322} \sqrt{846.41} = 0.000176$$

合并计算的自由度 $f = 895$ (17 次实验的自由度之和); $t = 1.96$ (查表 8-1 所得)

$$5. \text{ 按 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL = \lg^{-1} (\bar{M} \pm t S_{\bar{M}}) \text{ 式计算 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL$$

$$\bar{P}_T \text{ 的 } FL = \lg^{-1} (\bar{M} \pm t S_{\bar{M}}) \\ = \lg^{-1} (2.9562 \pm 1.96 \times 0.000176) = 911.28 - 896.91 \text{ U/mg}$$

$$6. \text{ 按 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL\% = [(\bar{P}_T \text{ 的高限} - \bar{P}_T \text{ 的低限}) / (2 \times \bar{P}_T)] \times 100\% \text{ 式计算 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL\% \\ = [(911.28 - 896.91) / (2 \times 904.07)] \times 100\% = 0.79\%$$

7. 合并计算统计处理的微机运算 见五、统计例题的微机运算中的 (五) 常规检定中的合并计算的微机运算。

例 8: 常规检定中的合并计算

某省药品检验所 19 × × 年 7 次测定盐酸林可霉素效价值, 进行合并计算, 结果见表 8-12。

表 8-12 盐酸林可霉素效价测定结果

P_T (U/mg)	M ($\lg P_T$)	S_M	W ($1/S_M^2$)	WM	WM^2
855.54	2.9322	0.0125	6400.00	18 766.08	55 025.90
838.20	2.9233	0.0072	12 290.12	56 390.82	164 847.28
838.56	2.9235	0.0062	26 014.57	76 053.59	222 342.67
851.06	2.9300	0.0096	10 850.69	31 792.52	93 152.13
841.12	2.9249	0.0070	20 408.16	59 691.84	174 592.65
843.48	2.9261	0.0124	6503.64	19 030.31	55 684.58
838.92	2.9211	0.0044	51 652.89	150 883.26	440 745.10
		Σ	141 120.07	412 608.42	2 821 329.84

1. χ^2 检验

代入 $\chi^2 = \sum WM^2 - \sum WM^2 / \sum W$ 式得:

$$\chi^2 = 1\,206\,390.31 - (422\,608.42)^2 / 14\,112\,007.41 = 1.25$$

$$f = 7 - 1 = 6$$

查 χ^2 值表 (表 8-2): $\chi_{(6)0.05}^2 = 12.6$

χ^2 计算值 (1.25) 小于 $\chi_{(6)0.05}^2$ 查表值 (12.6), 7 次实验结果均一。

2. 按 $\bar{M} = \sum WM / \sum W$ 计算 $\bar{M}$

$$\begin{aligned}\bar{M} &= \sum WM / \sum W \\ &= 412\,608.42 / 14\,120.07 = 2.9238\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}3. \text{按 } \bar{P}_T &= \lg^{-1} \bar{M} \text{ 式计算 } \bar{P}_T \\ &= \lg^{-1} 2.9238 = 839.07 \text{ U/mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}4. \text{按 } S_{\bar{M}} &= \sqrt{1 / \sum W} \text{ 式计算 } S_{\bar{M}} \\ &= \sqrt{1 / 141\,120.07} = 0.0027\end{aligned}$$

合并计算的自由度 $f = 95$ (7次实验的自由度之和), $t = 1.96$ (查表 8-1 所得)。

$$5. \text{按 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL = \lg^{-1} (\bar{M} \pm t S_{\bar{M}}) \text{ 式计算 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL$$

$$\begin{aligned}\bar{P}_T \text{ 的 } FL &= \lg^{-1} (\bar{M} \pm t S_{\bar{M}}) \\ &= \lg^{-1} (2.9238 \pm 1.96 \times 0.0027) \\ &= 849.36 - 828.91 \text{ U/mg}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}6. \text{按 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL\% &= [(\bar{P}_T \text{ 的高限} - \bar{P}_T \text{ 的低限}) / (2 \times \bar{P}_T)] \times 100\% \text{ 式计算 } \bar{P}_T \text{ 的 } FL\% \\ &= [(849.36 - 828.91) / (2 \times 839.07)] \times 100\% \\ &= 1.22\%\end{aligned}$$

7. 合并计算统计处理的微机运算 见五、统计例题的微机运算中的(五)试验结果合并计算的微机运算。

五、统计例题的微机运算

随着计算机技术的不断发展,利用计算机来调用各种统计软件包对研究数据进行统计分析愈来愈为更多的人所使用。常用的统计软件包可分为两大类,即通用软件包和专用软件包,普遍采用的通用软件包有 SPSS (statistical package for the social Science, 社会科学统计程序)、SAS (statistical analysis system, 统计分析系统)、BMDP (biomedical computer program, 生物医学计算机程序)、SYSTAT (数理统计软件包)、STATGRAPHICS (statistical graphics system, 统计制图系统),其中前三套软为国外较著名的三大软件包件,其统计功能相差不大。专用软件包有 EPISTAT (epidemiological statistics 流行病学统计分析软件包)、Epi Info (epidemiology and disease surveillance 流行病学及疾病监测软件包)、GRANDSTAT (儿童生长发育专用统计软件包)等。但是以上的统计软件包,常受版权、价格、流行等因素制约,因此,它的使用也较局限于一些较大的机构。此外,研究者还可根据的需要对统计软件包中目前尚未收入的统计方法和数学模型编写必要的统计分析程序来处理分析数据。

目前,在家庭和部门最常用的软件是微软的 Office 办公组件,因此,若能利用 Office 办公组件中的 Excel 电子表格处理软件来进行各种微生物检测实验结果的统计处理,无论是在家庭、学校、工厂、机关,还是在科研机构都能使用,有利于统计分析的交流和普及。还能使统计分析工作从繁琐、枯燥的数据运算和查表中解脱出来,并提高了计算精度及可靠性。以下根据本书中的统计例题编写而成,以供同行使用。

(一) 配对试验 t 检验微机运算

本运算是在 Excel97 下以表 8-5 为例运行, 测定结果见表 8-5: 两种培养基检验验证比较测定的结果。

计算机运算步骤如下:

已知: 数据对数 = 9, $\mu = 0$ 。测定结果见表 8-5: 两种培养基检验验证比较测定的结果。

1. 建立统计表格 进入 Excel 窗口后, 单击单元格 F1, 输入“配对试验 t 检验”, 按 ENTER 键。然后如图 8-9 所示以此在各单元格中输入图中所示数据, 其输入方法为: 当每个单元格的数据输入完毕后, 用光标键将光标指针移动到 (或用鼠标单击) 下一个要输入数据的单元格输入数据即可 (也可按 ENTER 键结束该单元数据的输入)。当有些单元的数据不能正确显示时, 可将鼠标移动到该所在单元格的列标右边框处, 当鼠标变为左右双箭头时, 按下鼠标左键, 左、右拖动使单元格调整到合适宽度后 (能正确显示数据), 放开鼠标左键即可。

2. 输入已知项目数据

(1) 输入已知数据 将光标键分别移动到单元格 B3, B4 输入数据对数的值“9”, μ 值“0”后, 按 ENTER 键 (方法同前, 下同)。

(2) 输入各组数据及测定结果值 如图 8-10 所示分别在测定结果表中输入表 8-2 中的数据, 即在单元格 B7 至 J8 输入测定结果值。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1						配对试验 t 检验												
2																		
3	数据对数 (n) =																	
4	μ =																	
5																		
6		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	Σx^2	
7	牛心汤培养基																	
8	牛肉膏琼脂培养基																Σx	
9	二者差值																0	
10																		
11																		
12	均数 =																	
13	标准差																	
14	t =																	
15	自由度 (ν) =																	
16	P =																	
17																		
18	结论:																	
19																		

图 8-9

3. 计算

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R
1						配对试验 t 检验												
2																		
3	数据对数 (n) =	9																
4	μ =	0																
5																		
6		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	$\sum x^2$	
7	牛心汤培养基	97	51	83	330	62	85	94	59	60							4497	
8	牛肉膏琼脂培养基	71	39	83	284	42	94	85	87	74							$\sum x$	
9	二者差值	26	12	0	46	20	-10	9	-28	-14	0	0	0	0	0	0	61	
10																		
11																		
12	均数 =	6.7778																
13	标准差	7.531																
14	t =	0.9																
15	自由度 (f) =	8																
16	P =	0.3944																
17																		
18	结论:	$P > 0.05$ 差别无显著意义																
19																		

图 8-10

(1) 测定结果表中二者差值, $\sum x^2$ 及 $\sum x$ 的计算

将光标键移到单元格 B9, 输入二者差值的计算公式: “= B7 - B8”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 B9 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向右拖动到单元格 P9, 放开鼠标左键后即可将 B9 中的公式复制到单元格 C9 到 P9 中 (输入的计算公式都以 “=” 为开头, 其标点符号及字母均为英文符号。下同)。

(2) 均数、标准差、 t 值、自由度 f 、 P 的计算和结论的判断。

① 均数、标准差、 t 值、自由度 f 、 P 的计算 将光标键分别移动到单元格 B12, B13, B14, B15, B16, 依次输入: 均数计算公式 “= Q9/B3”, 标准差计算公式 “= SQRT ((Q7 - Q9^2/B3) / (B3 * (B3 - 1)))”, t 值计算公式 “= ABS ((B12 - B4) / B13)”, 自由度 f 计算公式 “= B3 - 1”, P 计算公式 “= TDIST (B14, B15, 2)”。

② 结论的判断 将光标键移动到单元格 B18, 输入 P 结论判断计算公式 “= IF (B16 > 0.05, “ $P > 0.05$ 差别无显著意义”, IF (B16 < 0.01, “ $P < 0.05$ 差别有非常显著意义”, “ P 在 0.05 ~ 0.01 之间差别有显著意义”))”。

4. 加速公式的输入方法、修饰、设置纸张及打印、文件的保存与退出

参见四、量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

(二) 多因素 F 检验微机运算

本运算是 Excel97 下以表 8-7: 样品检验结果为例运行, 测定结果见表 8-7: 样品检验结果。

计算机运算步骤如下:

已知: 数据数 = 9, 组数 = 4。测定结果见表 8-7: 样品检验结果。

1. 建立统计表格

进入 Excel 窗口后, 单击单元格 G1, 输入“多因素 F 检验”, 按 ENTER 键。然后如图 8-11 所示以此在各单元格中输入图中所示数据, 其输入方法见配对试验 t 检验微机运算中 1. 建立统计表格。

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1							多因素 F 检验			
2										
3	组数 =									
4	数据数 =									
5										
6	试验号	培养基								
7		I	II	III	IV					
8	1									
9	2									
10	3						总 $\sum x =$			
11	4						总 $\sum x^2 =$			
12	5						$\bar{x}$ 的均数 =			
13	6						组间自由度 $f_1 =$			
14	7						组内自由度 $f_2 =$			
15	8						总差方和 ($SS_{总}$) =			
16	9						组间差方和 ($SS_{组间}$) =			
17	10						组间方差 =			
18	11						组内差方和 ($SS_{组内}$) =			
19	12						组内差方 =			
20	13						F 值 =			
21	14						$P =$			
22	15									
23	$\sum x$						结论:			
24	$\sum x^2$									
25										

图 8-11

2. 输入已知项目数据

(1) 输入已知数据 将光标键分别移动到单元格 B3, B4 输入组数的值“4”、数据数的值“9”后, 按 ENTER 键 (方法同前, 下同)。

(2) 输入各组数据及测定结果值 如图 8-12 所示分别在测定结果表中输入表 8-7 中的数据, 即在单元格 B8 至 E16 输入测定结果值。

3. 计算

(1) 测定结果表中 $\sum x$ 及 $\sum x^2$ 的计算 将光标键移到单元格 B23, 输入 $\sum x$ 的计算公式: “=SUM (B8:B22)”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 B23 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向右拖动到单元格 E23, 放开鼠标左键后即可将 B23 中的公式复制到单元格 C23 到 E23 中 (输入的计算公式都以“=”为开头, 其标点符号及字母均为英文符号。下同)。

将光标键移到单元格 B24, 输入 $\sum x^2$ 的计算公式: “=SUMSQ (B8:B22)”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 B24 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左

键不放,向右拖动到单元格 E24,放开鼠标左键后即可将 B24 中的公式复制到单元格 C24 到 E24 中。

(2) 总 $\sum x$, 总 $\sum x^2$, x 的均数, 组间自由度 f_1 , 组内自由度 f_2 , 总差方和 ($SS_{\text{总}}$), 组间差方和 ($SS_{\text{组间}}$), 组间方差, 组内差方和 ($SS_{\text{组内}}$), 组内差方, F 值, P 的计算和结论的判断

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
1							多因素 F 检验			
2										
3	组数 =	4								
4	数据数 =	9								
5										
6	试验号	培养基								
7		I	II	III	IV					
8	1	2	2.24	2.83	2.83					
9	2	2.55	2.24	2.24	2.45					
10	3	2.74	3	2.45	2.24		总 $\sum x =$	87.61		
11	4	2.55	1.41	2.74	2.65		总 $\sum x^2 =$	217.2955		
12	5	1.87	2.35	2.35	2.12		x 的均数 =	2.433611		
13	6	2.83	2.74	2.83	2.24		组间自由度 $f_1 =$	3		
14	7	2.12	2.12	2	2.74		组内自由度 $f_2 =$	32		
15	8	2.35	2.65	2.45	2.65		总差方和 ($SS_{\text{总}}$) =	4.086831		
16	9	2.55	2.45	2.92	2.12		组间差方和 ($SS_{\text{组间}}$) =	0.161475		
17	10						组间方差 =	0.053825		
18	11						组内差方和 ($SS_{\text{组内}}$) =	3.925356		
19	12						组内差方 =	0.122667		
20	13						F 值 =	0.438788		
21	14						$P =$	0.726798		
22	15									
23	$\sum x$	21.56	21.2	22.81	22.04		结论:	$P > 0.05$ 差别无显著意义		
24	$\sum x^2$	52.54	51.57	58.6	54.59					
25										

图 8-12

① 总 $\sum x$, 总 $\sum x^2$, x 的均数, 组间自由度 f_1 , 组内自由度 f_2 , 总差方和 ($SS_{\text{总}}$), 组间差方和 ($SS_{\text{组间}}$), 组间方差, 组内差方和 ($SS_{\text{组内}}$), 组内差方, F 值, P 的计算

将光标键分别移动到单元格 G10, G11, G12, G13, G14, G15, G16, G17, G18, G19, G29, G21, 依次输入: 总 $\sum x$ 计算公式 “=SUM (B8:E22)”, 总 $\sum x^2$ 计算公式 “=SUMSQ (B8:E22)”, x 的均数计算公式 “=AVERAGE (B8:E22)”, 组间自由度 f_1 计算公式 “=B3-1”, 组内自由度 f_2 计算公式 “=(B4-1)*B3”, 总差方和 ($SS_{\text{总}}$) 计算公式 “=H11-(H10^2/(B3*B4))”, 组间差方和 ($SS_{\text{组间}}$) 计算公式 “=(SUMSQ (B23:E23)/B4)-(H10^2/(B3*B4))”, 组间方差计算公式 “=H16/H13”, 组内差方和 ($SS_{\text{组内}}$) 计算公式 “=H15-H16”, 组内差方计算公式 “=H18/H14”, F 值计算公式 “=H17/H19”, P 计算公式 “=FDIST (H20, H13, H14)”。

② 结论的判断 将光标键移动到单元格 H23, 输入 P 结论判断计算公式 “=IF (H21 > 0.05, “P>0.05 差别无显著意义”, IF (H21 < 0.01, “P<0.05 差别有非常显著意义”, “

P 在 0.05~0.01 之间 差别有显著意义”))”。

4. 加速公式的输入方法、修饰、设置纸张及打印、文件的保存与退出
参见四、量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

(三) 配对试验 χ^2 (卡方) 检验

本运算是在 Excel97 下以表 8-9: 铜绿假单胞菌检出率比较为例运行, 测定结果见表 8-9。

计算机运算步骤如下:

已知: 该公式的自由度 $f=1$ 。测定结果见表 8-9。

1. 建立统计表格

进入 Excel 窗口后, 单击单元格 B1, 输入“配对试验卡方检验”, 按 ENTER 键。然后如图 8-13 所示以此在各单元格中输入图中所示数据, 其输入方法见配对试验 t 检验微机运算中 1. 建立统计表格。

	A	B	C	D	E	F
1		配对试验卡方检验				
2						
3						
4			部颁法 (I)		合计	
5			检出	未检出		
6	快速法 (II)	检出				
7		未检出				
8	合计					
9						
10	自由度 (f) =	1				
11	$\chi^2 =$					
12	$P =$					
13						
14	结论:					
15						

图 8-13

2. 输入已知项目数据

(1) 输入已知数据 将光标键分别移动到单元格 B3, B4 输入组数的值“4”、数据数的值“9”后, 按 ENTER 键 (方法同前, 下同)。

(2) 输入各组数据及测定结果值 如图 8-14 所示分别在测定结果表中输入表 8-6 中的数据, 即在单元格 C6 至 D7 输入 4 个测定结果值。

3. 计算

	A	B	C	D	E	F
1		配对试验卡方检验				
2						
3						
4			部颁法 (I)		合计	
5			检出	未检出		
6	快速法 (II)	检出	175	3	178	
7		未检出	2	30	32	
8	合计		177	33	210	
9						
10	自由度 (f) =	1				
11	$\chi^2 =$	0.2				
12	$P =$	0.654721				
13						
14	结论:	$P > 0.05$ 差别无显著意义				
15						

图 8-14

(1) 测定结果表中合计的计算 将光标键移到单元格 C8, 输入合计的计算公式: “=SUM (C6:C7)”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 C8 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向右拖动到单元格 D8, 放开鼠标左键后即可将 C8 中的公式复制到单元格 D8 中 (输入的计算公式都以 “=” 为开头, 其标点符号及字母均为英文符号。下同)。

将光标键移到单元格 E6, 输入合计的计算公式: “=SUM (C6:D6)”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 E6 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向下拖动到单元格 E7, 放开鼠标左键后即可将 E6 中的公式复制到单元格 E7 中。

(2) χ^2 及 P 的计算和结论的判断

① χ^2 及 P 的计算 将光标键分别移动到单元格 B11, B12, 依次输入: χ^2 计算公式 “= (D6 - C7) ^2 / (D6 + C7)”, P 计算公式 “=CHIDIST (B11,1)”。

② 结论的判断 将光标键移动到单元格 B14, 输入 P 结论判断计算公式 “=IF (B12 > 0.05, “ $P > 0.05$ 差别无显著意义”, IF (B12 < 0.01, “ $P < 0.05$ 差别有非常显著意义”, “ P 在 0.05 ~ 0.01 之间 差别有显著意义”))”。

4. 加速公式的输入方法、修饰、设置纸张及打印、文件的保存与退出

参见四、量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

(四) 量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算

本运算是在 Excel97 下以本书第三章例 3-2 新霉素效价测定结果为例运行, 测定结果见表 3-2。

已知: 标示量 (估计效价) $A_T = 670$, 组比值 $r = 1/0.8$, 分组数 $k = 6$, 每组个数 $m = 9$,

缺项补足数 = 0, 各剂量组的剂量值: $d_{S_1} = 8.0\text{U/m}$, $d_{S_2} = 10.0\text{U/m}$, $d_{S_3} = 12.5\text{U/m}$, $d_{T_1} = 8.0\text{U/m}$, $d_{T_2} = 10.0\text{U/m}$, $d_{T_3} = 12.5\text{U/m}$ 。测定结果见表 3-2。

1. 建立统计表格

进入 Excel 窗口后, 单击单元格 A1, 输入“量反应平行线测定随机设计 (3.3) 法”, 按 ENTER 键。然后如图 8-15 所示以此在各单元格中输入图中所示数据, 输入方法及列宽的调节方法详见本节直接测定法的微机运算。

2. 输入已知项目数据

(1) 输入已知数据 将光标键分别移动到单元格 B3, D3, B4, B5, B6, 输入 A_T 的值“670”, 缺项补足数“0”, r 的值“=1/0.8”(此处用计算公式计算 1:0.8 的值), k 的值“6”, m 的值“9”。

(2) 输入各剂量组数据及测定结果值 如图 8-16 所示分别在测定结果表中输入表 3-2 中的数据, 即在单元格 B9 至 G9 输入各剂量组数据, 在单元格 B10 至 G18 输入测定结果值。

3. 计算

(1) 测定结果表中 $\sum y_m$, S_1 , S_2 , S_3 , T_1 , T_2 , T_3 及 $\sum y$ 的计算 将光标键移到单元格 H10, 输入 $\sum y_m$ 的计算公式: “=SUM (B10:G10)”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 H10 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向下拖动到单元格 H24, 放开鼠标左键后即可将 H10 中的公式复制到单元格 H11 到 H24 中。

将光标键分别移动到单元格 B25, C25, D25, E25, F25, G25, H25, 依次输入: S_1 的计算公式 “=SUM (B10:B24)”, S_2 的计算公式 “=SUM (C10:C24)”, S_3 的计算公式 “=SUM (D10:D24)”, T_1 的计算公式 “=SUM (E10:E24)”, T_2 的计算公式 “=SUM (F10:F24)”, T_3 的计算公式 “=SUM (G10:G24)”, $\sum y$ 的计算公式 “=SUM (B25:G25)”。

(2) 差方和、自由度 f 、方差、 F 、 P 的计算和结论的判断。

① 差方和的计算 将光标键分别移动到单元格 B30, B31, B32, B33, B34, B35, B36, B37, B38, 依次输入: 试品间的差方和计算公式 “=SUM (G25 + F25 + E25 - D25 - C25 - B25) ^2/ (6 * B6)”, 回归的差方和计算公式 “= (G25 - E25 + D25 - B25) ^2/ (4 * B6)”, 偏离平行的差方和计算公式 “= (G25 - E25 - D25 + B25) ^2/ (4 * B6)”, 二次曲线的差方和计算公式 “= (G25 - 2 * F25 + E25 + D25 - 2 * C25 + B25) ^2/ (12 * B6)”, 反向二次曲线的差方和计算公式 “= (G25 - 2 * F25 + E25 - D25 + 2 * C25 - B25) ^2/ (12 * B6)”, 剂间的差方和计算公式 “=SUMSQ (B25:G25) /B6 - H25^2/ (B5 * B6)”, 碟间的差方和计算公式 “=SUMSQ (H10:H24) /B5 - H25^2/ (B5 * B6)”, 误差的差方和计算公式 “=B38 - B35 - B36”, 总差方和计算公式 “=SUMSQ (B10:G24) - H25^2/ (B5 * B6)”。

② 自由度的计算 将光标键分别移动到单元格 C30, C31, C32, C33, C34, C35, C36, C37, C38, 依次输入: 试品间的自由度“1”, 回归的自由度“1”, 偏离平行的自由度“1”, 二次曲线的自由度“1”, 二次曲线的自由度“1”, 剂间的自由度计算公式 “=B5 - 1”, 碟间的自由度计算公式 “=B6 - 1”, 误差的自由度计算公式 “= (B5 - 1) * (B6 - 1) - D3”, 总自由度计算公式 “=B5 * B6 - 1”。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	量反应平行线测定随机区组测定 (3.3) 法							
2								
3	标示量 $A_T =$		缺项补足数 =					
4	组比值 $r =$							
5	分组数 $k =$							
6	各组个数 $m =$							
7			测定结果表					
8		d_{S_1}	d_{S_2}	d_{S_3}	d_{T_1}	d_{T_2}	d_{T_3}	Σy_m
9	剂量							
10								
11								
12								
13								
14								
15								
16								
17	y							
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25	$\Sigma y (k)$							
26		S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	Σy
27								
28			可靠性测验结果表					
29	变异来源	差方和	f	方差	F	P	结论	
30	试品间							
31	回归							
32	偏离平行							
33	二次曲线							
34	反向二次曲线							
35	剂间							
36	碟间							
37	误差							
38	总							
39								
40	$t (0.05)$	V	W	D	G	R	P_T	S_M
41								
42								
43	R 的 $FL =$							
44	P_T 的 $FL =$							
45	P_T 的 $FL\% =$							
46								

图 8-15

③ 方差的计算 将光标键分别移动到单元格 D30, D31, D32, D33, D34, D35, D36, D37, 依次输入: 试品间的方差计算公式 “= B30/C30”, 回归的方差计算公式 “= B31/

C31¹⁷，偏离平行的方差计算公式“= B32/C32”，二次曲线的方差计算公式“= B33/C33”，反向二次曲线的方差计算公式“= B34/C34”，剂间的方差计算公式“= B35/C35”，碟间的方差计算公式“= B36/C36”，误差的方差 (s^2) 计算公式“= B37/C37”。

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	量反应平行线测定随机区组测定 (3.3) 法							
2								
3	标示量 $A_T =$	670	缺项补足数 =	0				
4	组比值 $r =$	1.25						
5	分组数 $k =$	6						
6	各组个数 $m =$	9						
7			测定结果表					
8		d_{s_1}	d_{s_2}	d_{s_3}	d_{T_1}	d_{T_2}	d_{T_3}	Σy_m
9	剂量	8	10	12.5	8	10	12.5	
10		16.05	16.2	16.5	15.8	16.35	16.6	97.5
11		16.2	16.45	16.65	16.2	16.45	16.7	98.65
12		16	16.45	16.7	16.05	16.35	16.7	98.25
13		15.95	16.35	16.6	16	16.25	16.6	97.75
14		15.7	16.25	16.6	15.85	16.25	16.6	97.25
15		15.55	16.2	16.55	15.7	16.2	16.6	96.8
16		15.65	16.2	16.4	15.8	16.15	16.4	96.6
17	y	15.9	16.1	16.45	15.8	16.1	16.5	96.85
18		15.6	16	16.3	15.7	15.95	16.3	95.85
19								0
20								0
21								0
22								0
23								0
24								0
25	$\Sigma y (k)$	142.6	146.2	148.75	142.9	146.05	149	875.5
26		S_1	S_2	S_3	T_1	T_2	T_3	Σy
27								
28			可靠性测验结果表					
29	变异来源	差方和	f	方差	F	P	结论	
30	试品间	0.002963	1	0.002963	0.428524	0.516461	无显著差异	
31	回归	4.1684028	1	4.1684028	602.8624	9.78E-26	极显著差异	
32	偏离平行	6.944E-05	1	6.944E-05	0.010044	0.920672	无显著差异	
33	二次曲线	0.0144676	1	0.0144676	2.0924	0.155825	无显著差异	
34	反向二次曲线	0.0066898	1	0.0066898	0.967526	0.33121	无显著差异	
35	剂间	4.1925926	5	0.8385185	121.2722	4.57E-23	极显著差异	
36	碟间	1.0017593	8	0.1252199	18.11014	4.48E-11	极显著差异	
37	误差	0.2765741	40	0.0069144				
38	总	5.4709259	53					
39								
40	$t (0.05)$	V	W	D	C	R	P_T	S_M
41	2.021074579	0.1333333	3.0625	1	0.006776	1.009762	676.540834	0.0065
42								
43	R 的 $FL =$	0.979879125476722 ~ 1.04069503407778						
44	P_T 的 $FL =$	656.519014069404 ~ 697.265672832114						
45	P_T 的 $FL\% =$	3.0113969						
46								

图 8-16

④ F 的计算 将光标键分别移动到单元格 E30, E31, E32, E33, E34, E35, E36, 依次输入: 试品间的 F 计算公式 “=D30/D37”, 回归的 F 计算公式 “=D31/D37”, 偏离平行的 F 计算公式 “=D32/D37”, 二次曲线的 F 计算公式 “=D33/D37”, 反向二次曲线的 F 计算公式 “=D34/D37”, 剂间的 F 计算公式 “=D35/D37”, 碟间的 F 计算公式 “=D36/D37”。

⑤ P 的计算 将光标键分别移动到单元格 F30, F31, F32, F33, F34, F35, F36, 依次输入: 试品间的 P 计算公式 “=FDIST (E30, C30, C37)”, 回归的 P 计算公式 “=FDIST (E31, C31, C37)”, 偏离平行的 P 计算公式 “=FDIST (E32, C32, C37)”, 二次曲线的 P 计算公式 “=FDIST (E33, C33, C37)”, 反向二次曲线的 P 计算公式 “=FDIST (E34, C34, C37)”, 剂间的 P 计算公式 “=FDIST (E35, C35, C37)”, 碟间的 P 计算公式 “=FDIST (E36, C36, C37)”。

⑥ 结论的判断 将光标键分别移动到单元格 G30, G31, G32, G33, G34, G35, G36, 依次输入: 试品间的 P 结论判断计算公式 “=IF (F30>0.05, “无显著差异”, IF (F30>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 回归的 P 结论判断计算公式 “=IF (F31>0.05, “无显著差异”, IF (F31>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 偏离平行的 P 结论判断计算公式 “=IF (F32>0.05, “无显著差异”, IF (F32>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 二次曲线的 P 结论判断计算公式 “=IF (F33>0.05, “无显著差异”, IF (F33>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 反向二次曲线的 P 结论判断计算公式 “=IF (F34>0.05, “无显著差异”, IF (F34>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 剂间的 P 结论判断计算公式 “=IF (F35>0.05, “无显著差异”, IF (F35>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”, 碟间的 P 结论判断计算公式 “=IF (F36>0.05, “无显著差异”, IF (F36>0.01, “显著差异”, “极显著差异”))”。

(3) 供试品 T 中 $t_{(0.05)}$, V , W , D , G , R , P_T , S_M 的计算 将光标键分别移动到单元格 A41, B41, C41, D41, E41, F41, G41, H41, 依次输入: t 分布的逆函数公式 “=TINV (0.05, C37)”, V 的计算公式 “=(E25 + F25 + G25 - B25 - C25 - D25) / 3”, W 的计算公式 “=(G25 - E25 + D25 - B25) / 4”, D 的计算公式 “=D9/G9”, G 的计算公式 “=(D37 * A41^2 * B6) / (4 * C41^2)”, R 的计算公式 “=D41 * 10^ (LOG (B4) * B41/C41)”, P_T 的计算公式 “=B3 * F41”, S_M 的计算公式 “=LOG (B4) * SQRT (B6 * D37 * ((1 - E41) * (2/3) * C41^2 + (1/4) * B41^2)) / (C41^2 * (1 - E41))”。

(4) 可信限及可信限率的计算

将光标键分别移动到单元格 B43, B44, B45, 依次输入: R_T 的 FL 计算公式 “=10^ (LOG (F41) / (1 - E41) - A41 * H41) & “~” & 10^ (LOG (F41) / (1 - E41) + A41 * H41)”, P_T 的 FL 计算公式 “=B3 * 10^ (LOG (F41) / (1 - E41) - A41 * H41) & “~” & B3 * 10^ (LOG (F41) / (1 - E41) + A41 * H41)”, P_T 的 $FL\%$ 计算公式 “=(10^ (LOG (F41) / (1 - E41) + A41 * H41) - 10^ (LOG (F41) / (1 - E41) - A41 * H41)) / (2 * F41) * 100”, 观察各单元格内计算结果。

4. 加速公式的输入方法

(1) 粘贴函数: 在函数公式的输入中, 可单击编辑栏上的“粘贴函数”按钮 () 来选择所需函数, 以加快输入速度。

(2) 公式的复制: 可以避免大量反复输入公式的工作, 如 3 计算公 $\sum y_m$ 计算公式的

输入方法,其中 H11 到 H24 中的公式就是由 H10 的公式复制而来(请注意从 H10 到 24 中其公式完全相同,但其公式内的单元格地址各不相同,但有规律性,望灵活掌握应用)。

5. 修饰

通过加边框线、单元格的内容居中等方法,可使编制的统计模块更加美观和完善,方法是:

(1) 加边框线

① 选定区域:把鼠标移到单元格 A8 上,按下鼠标左键不放拖动至单元格 H26 后,释放鼠标左键,整个区域即被选中,并呈反白框。

② 加边框:将单击“格式”菜单后,再单击“单元格”,在单元格的格式对话框中选取“边框”选项卡。先在“线形样式”中选取所需的线形(粗细、虚实等线),再在“预置”栏中选取“外边框”和选取“内部”后,单击“确定”按钮。则所选定区域的单元格即出现边框,形成了一个“测定结果表”。

用同样方法,再将单元格 A29 至单元格 G38 的区域,加上边框。

用同样方法,再将单元格 A40 至单元格 G41 的区域,加上边框。

用同样方法,再分别将单元格 D3,单元格 B3 至单元格 B6,单元格 B9 至单元格 G24 的区域,加上粗黑边框。

(2) 居中 将光标键移动到需居中的单元格或选定需居中的区域(方法同选择加边框区域),然后单击“格式”菜单,再单击“单元格”,在单元格的格式对话框中选取“对齐”选项卡。在“水平对齐”下拉编辑框中,选取“居中”后,再单击“确定”按钮。则所选中单元格或区域中的内容则变为居中排列方式(或选定需居中的单元格或选定需居中的区域后单击格式工具栏上的居中按钮即可)。

本例的统计结果见图 8-16。若将粗黑方框内的数据删除后,即可得到该测定法的统计模块,以后只要在粗黑方框内输入相应数据后,即可统计出结果。

6. 设置纸张及打印

(1) 设置纸张的大小 单击“文件”菜单中的“页面设置”命令,然后单击其中的“页面”选项卡。在“纸张大小”下拉编辑框中,单击所需的纸张大小选项。在“缩放”中选取调整为 1 页宽 1 页高项。

(2) 打印 单击“文件”菜单中的“打印”命令,然后单击其中的“确定”按钮。即可将图 8-16 除行标及列标外的内容完全打印在 1 张纸上。

7. 文件的保存与退出

(1) 保存尚未命名的文件 单击“文件”菜单中的“保存”命令。在“保存位置”框中,选择希望保存工作簿的驱动器和文件夹。在“文件名”框中,键入“随机区组设计(3:3)法”。然后单击“保存”按钮(即保存 1 个文件名为“随机区组设计(3.3)法”的文件)。

(2) 保存已经命名的文件 单击“文件”菜单中的“保存”命令(即按原有的文件名保存文件)。

(3) 退出 单击“文件”菜单中的“退出”命令。

(五) 常规检定中的合并计算微机运算

实验结果合并计算的微机运算

以例 8 盐酸林可霉素效价测定结果的合并计算 (表 8-12) 为例运行。

已知: 参加合并计算的实验 $n=7$ 次, 合并计算的自由度 $f=195$ 。测定结果见表 8-12: 盐酸林可霉素效价测定结果。

	A	B	C	D	E	F	G
1	实验结果的合并计算						
2							
3	测定次数 $n =$						
4	合并计算的自由度 $\sum f_i =$						
5							
6			测定结果				
7	P_T	S_M	$M (\lg P_T)$	M^2	$W (1/S_M^2)$	WM	WM^2
8							
9							
10							
11							
12							
13							
14							
15							
16							
17							
18							
19							
20							
21							
22							
23							
24							
25							
26							
27							
28	Σ						
29							
30	$\chi^2 =$		$f =$				
31							
32	实验结果均一时结果为:						
33	M	P_T	S_M	f	$t_{(0.05)}$		
34							
35							
36	P_T 的 $FL =$						
37	P_T 的 $FL\% =$						
38							
39	实验结果不均一时结果为:						
40	M	P_T	S_M	f	$t_{(0.05)}$		
41							
42							
43	P_T 的 $FL =$						
44	P_T 的 $FL\% =$						
45							

图 8-17

1. 建立统计表格 进入 Excel 窗口后, 单击单元格 A1, 输入“实验结果的合并计算”, 按 ENTER 键。然后如图 8-17 所示以此在各单元格中输入图中所示数据, 输入方法及列宽的调节方法详见 (四) 量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

2. 输入已知项目数据

(1) 输入已知数据 将光标键分别移动到单元格 B3, B4, 依次输入测定次数 n 的值“7”, 合并计算的自由度值“195”。

(2) 输入各次实验的检定结果 P_T 及 M 的标准误 S_M 如图 8-18 所示分别在测定结果表中输入表 8-12: 盐酸林可霉素效价测定结果中的数据, 即在单元格 A8 至 B14 输入各次实验的 P_T 及 S_M 值。

3. 计算

(1) 测定结果表中 M , M^2 , W , WM , WM^2 的计算 将光标键移到单元格 C8, 输入 M 的计算公式: “= IF (ISERROR (LOG (A8)), ””, LOG (A8))”, 按 ENTER 键后, 将鼠标移到单元格 C8 的右下角处, 当鼠标变成一个黑“十”时, 按下鼠标左键不放, 向下拖动到单元格 C27, 放开鼠标左键后即可将 C8 中的公式复制到单元格 C9 到 C27 中。

将光标键移到单元格 D8, 输入 M^2 的计算公式: “= IF (ISERROR (C8^2), ””, C8^2)”, 按 ENTER 键后, 用同前的方法将 D8 中的公式复制到单元格 D9 到 D27 中。

将光标键移到单元格 E8, 输入 W 的计算公式: “= IF (ISERROR (1/B8^2), ””, 1/B8^2)”, 按 ENTER 键后, 用同前的方法将 E8 中的公式复制到单元格 E9 到 E27 中。

将光标键移到单元格 F8, 输入 WM 的计算公式: “= IF (ISERROR (E8 * C8), ””, E8 * C8)”, 按 ENTER 键后, 用同前的方法将 F8 中的公式复制到单元格 F9 到 F27 中。

将光标键移到单元格 G8, 输入 WM^2 的计算公式: “= IF (ISERROR (E8 * C8^2), ””, E8 * C8^2)”, 按 ENTER 键后, 用同前的方法将 G8 中的公式复制到单元格 G9 到 G27 中。

(2) 测定结果表中 $\sum M$, $\sum M^2$, $\sum W$, $\sum WM$, $\sum WM^2$ 的计算 将光标键分别移动到单元格 C28, D28, E28, F28, G28, 依次输入: $\sum M$, 的计算公式 “= SUM (C8: C27)”, $\sum M^2$ 的计算公式 “= SUM (D8: D27)”, $\sum W$ 的计算公式 “= SUM (E8: E27)”, $\sum WM$ 的计算公式 “= SUM (F8: F27)”, WM^2 的计算公式 “= SUM (G8: G27)”。

(3) χ^2 、 f 的计算和实验结果的判断

将光标键分别移动到单元格 B30, D30, E30, 依次输入: χ^2 的计算公式 “= G28 - F28^2/E28”, f 的计算公式 “= B3 - 1”, 实验结果的判断公式 “= IF (B30 > CHIINV (0.05, D30), “实验结果不均一”, “实验结果均一”)”。

函数 CHIINV (0.05, D30) 表示, 当概率水平为 95% ($1 - 0.05 = 0.95$), 自由度为 D30 单元格中值时的 χ^2 值。若将 0.05 改为 0.01, 则为 99% 的概率水平。

(4) 实验结果均一时 M , P_T , S_M , f , $t_{(0.05)}$ 及 P_T 的 FL 、 P_T 的 $FL\%$ 的计算 将光标键分别移动到单元格 A34, B34, C34, D34, E34, 依次输入: M 的计算公式 “= F28/E28”, P_T 的计算公式 “= 10^A34”, S_M 的计算公式 “= SQRT (1/E28)”, f 的计算公式 “= B4”, $t_{(0.05)}$ 的计算公式 “= TINV (0.05, D34)”。

将光标键分别移动到单元格 B36, B37, 依次输入: P_T 的 FL 的计算公式 “= 10^(A34

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	实验结果的合并计算							
2								
3	测定次数 $n =$	7						
4	合并计算的自由度 $\sum f_i =$	195						
5								
6			测定结果					
7	P_T	S_M	$M (\lg P_T)$	M^2	$W (1/S_M^2)$	WM	WM^2	
8	855.54	0.0125	2.9322403	8.598033	6400	18766.34	55027.41	
9	838.2	0.0072	2.9233477	8.545962	19290.1235	56391.74	164852.7	
10	838.56	0.0062	2.9235341	8.547052	26014.5682	76054.48	222347.9	
11	851.06	0.0096	2.9299602	8.584667	10850.6944	31792.1	93149.59	
12	841.12	0.007	2.924858	8.554794	20408.1633	59690.98	174587.6	
13	843.48	0.0124	2.9260748	8.561914	6503.64204	19030.14	55683.62	
14	833.92	0.0044	2.9211244	8.532968	51652.8926	150884.5	440752.5	
15								
16								
17								
18								
19								
20								
21								
22								
23								
24								
25								
26								
27								
28	Σ		20.481139	59.92539	141120.084	412610.3	1206401	
29								
30	$\chi^2 =$	1.299667	$f =$	6	实验结果均一			
31								
32	实验结果均一时结果为:							
33	M	P_T	S_M	f	$t_{(0.05)}$			
34	2.923824098	839.12	0.002662	195	1.97220401			
35								
36	P_T 的 $FL =$	829.037395913678 ~ 849.325328058171						
37	P_T 的 $FL\% =$	1.208881						
38								
39	实验结果不均一时结果为:							
40	M	P_T	S_M	f	$t_{(0.05)}$			
41	2.925877062	843.0961	0.0014858	6	2.44691185			
42								
43	P_T 的 $FL =$	836.067828552845 ~ 850.183382823309						
44	P_T 的 $FL\% =$	0.837126						
45								

图 8-18

- $E34 * C34$) & " ~ $10^{\circ} (A34 + E34 * C34)$ ", P_T 的 $FL\%$ 的计算公式 " $= (10^{\circ} (A34 + E34 * C34) - 10^{\circ} (A34 - E34 * C34)) / (2 * B34) * 100$ "。

(5) 实验结果不均一时 M , P_T , S_M , f , $t_{(0.05)}$ 及 P_T 的 FL 、 P_T 的 $FL\%$ 的计算 将光

标键分别移动到单元格 A41, B41, C41, D41, E41, 依次输入: M 的计算公式 “= C28/B3”, P_T 的计算公式 “= 10^A41”, S_M 的计算公式 “= SQRT ((D28 - C28^2/B3) / (B3 * (B3 - 1)))”, f 的计算公式 “= B3 - 1”, $t_{(0.05)}$ 的计算公式 “= TINV (0.05, D41)”。将光标键分别移动到单元格 B43, B44, 依次输入: P_T 的 FL 的计算公式 “= 10^ (A41 - E41 * C41) & “~” & 10^ (A41 + E41 * C41)”, P_T 的 $FL\%$ 的计算公式 “= (10^ (A41 + E41 * C41) - 10^ (A41 - E41 * C41)) / (2 * B41) * 100”。

4. 修饰 通过加边框线、单元格的内容居中等方法, 可使编制的统计模块更加美观和完善, 方法详见 (四) 量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

本例的统计结果见图 8-18。若将粗黑方框内的数据删除后, 即可得到该测定法的统计模块, 以后只要在粗黑方框内输入相应数据后, 即可统计出结果。

5. 设置纸张及打印 方法详见 (四) 量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

6. 文件的保存与退出 将文件保存为 “实验结果的合并计算” 后, 退出。

方法详见 (四) 量反应平行线测定随机区组设计 (3.3) 法的微机运算。

六、微生物检测数据分析应注意的问题

在多数情况下对微生物检测数据进行分析时, 一般都很难做出恰当的评判。这是由于微生物检测的特殊性所致, 在对医药微生物检测质量控制数据的分析和评价时应注意以下有关问题, 以得到正确的评价。①如有异常值或超标数据, 要尽可能找到具体的缘由和原因; ②避免用于化学或物理分析数据的评价方法或指导性原则来套用于微生物检测结果的评价; ③尽管采用原数据的对数值有利于微生物学数据的评价, 但对计数值较小的微生物学检测结果并不适用; ④某些定性数据不能用算术关系式计算 (如致病微生物的筛查、无菌检查、控制菌的检出等)。此类定性数据标志着检验结果合格与否, 它们属于质反应。定性数据难于进行趋势分析, 因为该类检验常以 “检出” / “阳性” 或 “未检出” / “阴性” 等作为报告结果; ⑤由来微生物污染具有不均一性, 故难于对异常值进行调查; ⑥微生物检测过程中存在着不可预测的变化。只有通过长期结累的数据进行趋势分析才有可能发现其中的变化, 若仅对短期数据进行评估则很难发现。

综合以上问题, 医药、食品企业的微生物实验室应建立一套对微生物检测试验数据进行趋势分析和统计分析评价的方案。与化学或物理检测方法相比, 尽管微生物学检测方法具有更大的可变更性, 但使用数据统计学分析将更加有助于对检测数据进行相对应的分析和评价, 能尽早发现不利的变化趋势。因为一方面微生物检测结果总是需要一定的时间才能得到, 另一方面如果不及时收集数据和证据则难于开展偏差调查。无论是 QA 或 QC 管理层还是实验分析人员, 都要掌握生物检定统计学的有关原理和使用方法, 并能熟练运用和坚持执行, 这样才能确保质量, 使企业质量管理体系不断的升级和完善。

第九章 有关微生物检测（查）的操作方法

一、抗生素微生物检定

抗生素微生物检定系在适宜条件下，根据量反应平行线原理设计，通过检测抗生素对微生物的抑制作用，计算抗生素活性（效价）的方法。它包括两种方法，管碟法和浊度法。

测定结果经计算所得的效价，如低于估计效价的 90% 或高于估计效价的 110% 时，应调整其估计效价，重新试验。除另有规定外，本法的可信限率不得大于 5%。

（一）管碟法

系利用抗生素在琼脂培养基内的扩散作用，比较标准品与供试品两者对接种的试验菌产生抑菌圈的大小，测定供试品效价的一种方法。

1. 菌悬液的制备

（1）枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）悬液 取枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501] 的营养琼脂斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中，在 35 ~ 37℃ 培养 7d，用革兰染色法涂片镜检，应有芽孢 85% 以上。用灭菌水将芽孢洗下，在 65℃ 加热 30min，备用。

（2）短小芽孢杆菌（*Bacillus pumilus*）悬液 取短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202] 的营养琼脂斜面培养物，照上述方法制备。

（3）金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）悬液 取金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003] 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35 ~ 37℃ 培养 20 ~ 22h。临用时，用灭菌水或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

（4）藤黄微球菌（*Micrococcus luteus*）悬液 取藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001] 的营养琼脂斜面培养物，接种于盛有营养琼脂培养基的培养瓶中，在 26 ~ 27℃ 培养 24h，或采用适当方法制备的菌斜面，用培养基Ⅲ或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下，备用。

（5）大肠埃希菌（*Escherichia coli*）悬液 取大肠埃希菌 [CMCC (B) 44 103] 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35 ~ 37℃ 培养 20 ~ 22h。临用时，用灭菌水将菌苔洗下，备用。

（6）啤酒酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）悬液 取啤酒酵母菌 [ATCC 9763] 的 V 号培养基琼脂斜面培养物，接种于Ⅳ号培养基琼脂斜面上。在 32 ~ 35℃ 培养 24h，用灭菌水将菌苔洗下置含有灭菌玻璃珠的试管中，振摇均匀，备用。

（7）肺炎克雷伯菌（*Klebsiella Pneumoniae*）悬液 取肺炎克雷伯菌 [CMCC (B) 46 117] 的营养琼脂斜面培养物，接种于营养琼脂斜面上，在 35 ~ 37℃ 培养 20 ~ 22h。临用时，用灭菌水将菌苔洗下，备用。

(8) 支气管炎博特菌 (*Bordetella Bronchiseptica*) 悬液 取支气管炎博特菌 [CMCC (B) 58 403] 的营养琼脂斜面培养物, 接种于营养琼脂斜面上, 在 32~35℃ 培养 24h。临用时, 用灭菌水将菌苔洗下, 备用。

2. 标准品溶液的制备 标准品的使用和保存, 应照标准品说明书的规定。临用时照表 9-1 的规定进行稀释。标准品的品种、分子式及理论计算值见表 9-2。

供试品溶液的制备 精密称 (或量) 取供试品适量, 用各药品项下规定的溶剂溶解后, 再按估计效价或标示量照表 9-1 的规定稀释至与标准品相当的浓度。

表 9-1 抗生素微生物检定试验设计表

抗生素类别	试验菌	培养基		灭菌缓冲液 pH 值	抗生素浓度范围 单位 /ml	培养条件	
		编号	pH 值			温度℃	时间 h
链霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	0.6~1.6	35~37	14~16
卡那霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	0.9~4.5	35~37	14~16
阿米卡星	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	0.9~4.5	35~37	14~16
巴龙霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	0.9~4.5	35~37	14~16
核糖霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	2.0~12.0	35~37	14~16
卷曲霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	10.0~40.0	35~37	14~16
磺苄西林	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	6.5~6.6	6.0	5.0~10.0	35~37	14~16
去甲万古霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	VIII	6.0	6.0	9.0~43.7	35~37	14~16
头孢噻肟钠	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	VII	6.5~6.6	6.0	0.5~2.2	35~37	14~16
庆大霉素	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	2.0~12.0	35~37	14~16
红霉素	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	5.0~20.0	35~37	14~16
新霉素	金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003]	II	7.8~8.0	7.8 ^③	4.0~25.0	35~37	14~16
四环素	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	6.5~6.6	6.0	10.0~40.0	35~37	14~16
土霉素	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	6.5~6.6	6.0	10.0~40.0	35~37	16~18
金霉素	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	6.5~6.6	6.0	4.0~25.0	35~37	16~18
氯霉素	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	6.5~6.6	6.0	30.0~80.0	35~37	16~18
杆菌肽	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	6.5~6.6	6.0	2.0~12.0	35~37	16~18
黏菌素	大肠杆菌 [CMCC (B) 44 103]	VI	7.2~7.4	6.0	614~2344	35~37	16~18
两性霉素 B ^①	啤酒酵母菌 (ATCC 9763)	IV	6.0~6.2	10.5	0.5~2.0	35~37	24~36
奈替米星	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	5~20	35~37	14~16
西索米星	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	5~20	35~37	14~16
阿奇霉素	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	0.5~20	35~37	16~18
磷霉素	藤黄微球菌 [CMCC (B) 28 001]	II	7.8~8.0	7.8	5~20	35~37	18~24
乙酰螺旋霉素 ^②	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	II	8.0~8.2	7.8	5~403	35~37	14~16
妥布霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	1~4	35~37	14~16
罗红霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	II	7.8~8.0	7.8	5~10	35~37	16~18
克拉霉素	短小芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 202]	I	7.8~8.0	7.8	2.0~8.0	35~37	14~16

续表

抗生素类别	试验菌	培养基		灭菌缓 冲液 pH 值	抗生素浓 度范围 单位 /ml	培养条件	
		编号	pH 值			温度℃	时间 h
大观霉素	克雷伯肺炎杆菌 [CMCC (B) 46 117]	II	7.8~8.0	7.0	50~200	35~37	16~18
吉他霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	II ^④	8.0~8.2	7.8	20~40	35~37	16~18
麦白霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	营养琼脂 培养基	8.0~8.2	7.8	20~40	35~37	16~18
小诺霉素	枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63 501]	I	7.8~8.0	7.8	0.5~2.0	35~37	14~16
多粘菌素 B	支气管炎博特菌 [CMCC (B) 58 403]	多粘菌 素 B 用培 养基	6.5~6.7	6.0	4.0~25.0	35~37	16~18

注: ① 两性霉素 B 双碟的制备, 用菌层 15ml 代替两层; ② 乙酰螺旋霉素。抗 II 检定培养基, 调节 pH 使灭菌后为 8.0~8.2; ③ 含 3% 氯化钠; ④ 加 0.3% 葡萄糖。

表 9-2 抗生素标准品品种与理论值

标准品品种	标准品分子式或品名	理论计算值 U/mg	标准品品种	标准品分子式或品名	理论计算值 U/mg
链霉素	(C ₂₁ H ₃₉ N ₇ O ₁₂)·2·3H ₂ SO ₄	798.3	金霉素	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₈ ·HCl	1000
卡那霉素	C ₁₈ H ₃₆ N ₄ O ₁₁ ·H ₂ SO ₄	831.6	红霉素	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	1000
阿米卡星	C ₂₂ H ₄₃ N ₅ O ₁₃		氯霉素	C ₁₁ H ₁₂ Cl ₂ N ₂ O ₅	1000
核糖霉素	C ₇₇ H ₉₄ N ₄ O ₁₀ ·nH ₂ SO ₄ (n<2)		杆菌肽	杆菌肽	
新霉素	硫酸新霉素		粘菌素	硫酸粘菌素	
庆大霉素	硫酸庆大霉素		去甲万古霉素	C ₆₅ H ₇₃ Cl ₂ N ₉ O ₂₄ ·HCl	975.23
磺苄西林	C ₁₆ H ₁₆ N ₂ Na ₂ O ₇ S ₂	904.0	卷曲霉素	硫酸卷曲霉素	
四环素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₈ ·HCl	1000	两性霉素 B	C ₄₇ H ₇₃ NO ₁₇	1000
土霉素	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₇ ·5H ₂ O	927	奈替米星	(C ₂₁ H ₄₁ N ₅ O ₇) ₂ ·5H ₂ SO ₄	660.1
西索米星	(C ₁₉ H ₃₇ N ₅ O ₇) ₂ ·5H ₂ O	646.3	阿奇霉素	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	1000
磷霉素	C ₅ H ₅ CaO ₄ P·H ₂ O	711.5	妥布霉素	C ₁₆ H ₃₇ N ₅ O ₉	1000
乙酰螺旋霉素	乙酰螺旋霉素		罗红霉素	C ₄₁ H ₃₆ N ₂ O ₁₅	1000
克拉霉素	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	1000	吉他霉素	吉他霉素	
大观霉素	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₇ ·2HCl·5H ₂ O	670.9	麦白霉素	麦白霉素	
小诺霉素	C ₂₀ H ₄₁ N ₅ O ₇ ·5/2H ₂ SO ₄	654.4	巴龙霉素	C ₂₃ H ₄₅ N ₅ O ₁₄ ·nH ₂ SO ₄	
多粘菌素 B	硫酸多粘菌素 B				

3. 双碟的制备 取直径约 90mm, 高 16~17mm 的平底双碟, 分别注入加热融化的培养基(照表 9-1) 20ml, 使在碟底内均匀摊布, 放置水平面上使凝固, 作为底层。另取培养基适量加热融化后, 放冷至 48~50℃ (芽孢可至 60℃), 加入规定的试验菌悬液适量(能得清晰的抑菌圈为度。二剂量法标准品溶液的高浓度所致的抑菌圈直径在 18~22mm,

三剂量法标准品溶液的中心浓度所致的抑菌圈直径在 15~18mm), 摇匀, 在每一双碟中分别加入 5ml, 使在底层上均匀摊布, 作为菌层。放置在水平台上冷却后, 在每一双碟中以等距离均匀安置不锈钢小管 (内径 $6.0\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$, 高 $10.0\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$, 外径 $7.8\text{mm} \pm 0.1\text{mm}$) 4 个 (二剂量法) 或 6 个 (三剂量法), 用陶瓦圆盖覆盖备用。

4. 检定法

(1) 二剂量法 取照上述方法制备的双碟不得少于 4 个, 在每一双碟中对角的 2 个不锈钢小管中分别滴装高浓度及低浓度的标准品溶液, 其余 2 个小管中分别滴装相应的高低两种浓度的供试品溶液; 高、低浓度的剂距为 2:1 或 4:1。在规定条件下培养后, 测量各个抑菌圈直径 (或面积), 照生物检定统计法中的 (2.2) 法进行可靠性测验及效价计算。

(2) 三剂量法 取照上述方法制备的双碟不得少于 6 个, 在每一双碟中间隔的 3 个不锈钢小管中分别滴装高浓度 (S_3)、中浓度 (S_2) 及低浓度 (S_1) 的标准品溶液, 其余 3 个小管中分别滴装相应的高、中、低 3 种浓度的供试品溶液; 高、低浓度的剂距为 1:0.8。在规定条件下培养后, 测量各个抑菌圈直径 (或面积), 照生物检定统计法中的 (3.3) 法进行可靠性测验及效价计算。

(二) 浊度法

利用抗生素在液体培养基中对试验菌生长的抑制作用, 通过测定培养后细菌浊度值的大小, 比较标准品与供试品对试验菌生长抑制的程度, 测定供试品效价的一种方法。美国、英国、日本等国药典中均有收载, 《中国药典》(2005 年版) 也已收载。国内北京海淀潮声技术开发公司已开发了抗生素比浊法测量仪 (图 9-1), 可用于浊度法测定抗生素效价。



浊度法测定原理是分别加入抗生素标准品和供试品的已接种有试验菌的培养液中, 因不同浓度的抗生素对试验菌的抑制作用不同, 在一定时间内, 通过测量培养基内试验菌浓度 (浊度) 变化就可确定供试品的效价。浊度法因在液体中进行, 所以不受扩散因素的影响, 因此不会像管碟法那样易受如钢圈的放置、向钢圈内滴液的速度、液面的高低、菌层厚薄等种种因素影响抗生素在琼脂表面扩散, 而造成结果的差异或试验的失败, 也就是说不受一切扩散因素的影响。同时, 该法测定时间短, 培养 3~4h 则可有结果, 杯碟法需要 16~24h (如磷霉素含量测定需培养 24h)。再者, 误差小, 管碟法可信限率为 5%, 最大可达 7% (如中国药典 2000 年版的红霉素含量测定项下, 规定的可信率为不大于 7%), 而本法约在 1%~3%, 同时可进行自动化测定, 易实行规范化操作。

1. 浊度法菌悬液的制备

(1) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 悬液 取金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003] 的营养琼脂斜面培养物, 接种于营养琼脂斜面上, 在 35~37℃ 培养 20~22h。临用时, 用灭菌水或 0.9% 灭菌氯化钠溶液将菌苔洗下, 备用。

(2) 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 悬液 取大肠埃希菌 [CMCC (B) 44 103] 的营养琼脂斜面培养物, 接种于营养琼脂斜面上, 在 35~37℃ 培养 20~22h。临用时, 用灭菌水

将菌苔洗下,备用。

(3) 白色念珠菌 (*Candida albicans*) 悬液 取白色念珠菌 [CMCC (F) 98001] 的改良马丁琼脂斜面的新鲜培养物,接种于 10ml 培养基 IX 中,置 35~37℃ 培养 8h,再用培养基 IX 稀释至适宜浓度,备用。

2. 标准品溶液的制备 标准品的使用和保存,应照标准品说明书的规定。临用时照表 9-3 的规定进行稀释。

表 9-3 抗生素微生物检定浊度法试验设计表

抗生素类别	试验菌	培养基		灭菌缓冲液 pH	抗生素浓度范围 U/ml	培养条件温度℃
		编号	pH			
庆大霉素	金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26 003]	I	7.8~8.0	7.8	5.0~20.0	35~37

标准品的品种、分子式及理论计算值见表 9-2。具体操作如下:

(1) 称量 要求同管碟测定法。

(2) 稀释 标准品与供试品溶液的稀释应采用容量瓶,每步稀释,取样量不得少于 2ml 为宜,稀释步骤一般不超过 3 步。

(3) 标准品溶液 按《中国药典》各品种含量测定项下要求,制成一定浓度的标准品贮备液。在各品种项下规定的剂量反应线性范围内,以线性浓度范围的中间值作为中间浓度,标准品溶液选择 5 个剂量,剂量间的比例应适宜(通常为 1:1.25 或更小)。

3. 供试品溶液的制备 供试品根据估计效价或标示量,按标准品溶液制备方法,选择中间浓度,选择至少 2 个剂量,每一剂量不少于 3 个试管。

4. 含试验菌液体培养基的制备 临用前,取规定试验菌悬液适量 (35~37℃ 培养 3~4h 后测定的吸收值在 0.3~0.7 之间,且剂距为 2 的相邻剂量间的吸光度差值不小于 0.1),加入到各规定的液体培养基中,混合,使在试验条件下能得到满意的剂量-反应关系和适宜的测定浊度。已接种试验菌的液体培养基应立即使用。

5. 检定操作方法 采用标准曲线法进行检定。

(1) 线性试验 取适宜的大小厚度均匀的已灭菌试管,在各试验管内精密加入含试验菌的液体培养基 9.0ml,再分别精密加入各浓度的标准品溶液各 1.0ml,立即混匀,按拉丁方或随机区组分配,将各管在规定条件下培养至适宜测量的浊度值(通常约为 4h)。

(2) 样品规定 取适宜的大小厚度均匀的已灭菌试管,在各试验管内精密加入含试验菌的液体培养基 9.0ml,再分别精密加入 2 个浓度标准品和供试品溶液各 1.0ml,立即混匀,按随机区组分配将各管在规定条件下培养至适宜测量的浊度值(通常约为 4h)。

(3) 空白试验 另取 2 支试管各加入药品稀释剂 1.0ml,再分别加入含试验菌的液体培养基 9.0ml,其中一支试管立即加入甲醛溶液 0.5ml,混匀,作为空白对照,另一支试管同法培养作为细菌生长对照。

(4) 吸光度的测量 在线测定各管的吸光度,或取出立即加入 12% 甲醛溶液 0.5ml 以终止微生物生长,在 530nm 或 580nm 波长处测定各管的吸光度。

6. 记录与计算

(1) 试验记录要求 应包括抗生素的品种、剂型、标示量、生产厂、批号、检查目

的、检验依据、检验日期、温度、湿度，标准品与供试品的称量、稀释步骤与核对人，抑菌圈测量结果。

(2) 标准曲线的计算 标准品的各浓度 $\lg$ 值及相对应的吸光度列成表 9-4。

表 9-4 抗生素标准品浓度 $\lg$ 值与吸光度

组数	抗生素标准品浓度 $\lg$ 值	吸光度
1	X_1	Y_1
2	X_2	Y_2
3	X_3	Y_3
4	X_4	Y_4
...	...	...
N	X_n	Y_n
平均值	$\bar{X}$	$\bar{Y}$

按公式 (9-1) 和公式 (9-2) 分别计算标准曲线的直线回归系数 (即斜率) b 和截距 a ，从而得到相应的标准曲线的直线回归方程 (9-3)。

$$\begin{aligned} \text{回归系数: } b &= [\sum (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})] / \sum (X_i - \bar{X})^2 \\ &= (\sum X_i Y_i - \bar{X} \sum Y_i) / (\sum X_i^2 - \bar{X} \sum X_i) \end{aligned} \quad (9-1)$$

$$\text{截距: } a = \bar{Y} - b \bar{X} \quad (9-2)$$

$$\text{直线回归方程: } Y = bX + a \quad (9-3)$$

(3) 回归系数的显著性测验 判断回归得到的方程是否成立，即 X 、 Y 是否有直线关系，可采用 t 检验。要求 X 、 Y 应具有直线关系。

假设 $H_0: b = 0$ ，在假设 H_0 成立的条件下，按公式 (9-4) 至 (9-6) 计算 t 值。

$$\text{估计标准差: } S_y X = \sqrt{\sum (Y_i - Y)^2 / (n - 2)} \quad (9-4)$$

$$\text{回归系数标准误: } S_b = S_y X / \sqrt{\sum (X_i - \bar{X})^2} \quad (9-5)$$

$$t = b - 0 / S_b \quad (9-6)$$

式中 Y_i 为标准品实际吸收度； Y 为估计的吸光度 [由标准曲线直线回归方程 (9-3) 计算得到]； $\bar{Y}$ 为标准品浓度的吸光度的平均值； X_i 为抗生素实际浓度 $\lg$ 值； $\bar{X}$ 为抗生素标准品实际浓度 $\lg$ 值的均值。

对于相应自由度 ($2n - 4$) 给定的显著性水平 α (通常 $\alpha = 0.05$)，查表得 $t_{\alpha/2n-4}$ ，若 $|t| > t_{\alpha/2n-4}$ ，则拒绝 H_0 ，认为回归效果显著，即 X 、 Y 具有直线回归关系；若 $|t| \leq t_{\alpha/2n-4}$ ，则接受 H_0 ，认为回归效果不显著，即 X 、 Y 不具有直线回归关系。

(4) 测定结果的计算及可信限率估计。

① 抗生素浓度 $\lg$ 值的计算 当回归系数具有显著意义时，测得供试品吸光度的均值后，根据标准曲线直线回归方程 (9-3)，按方程 (9-7) 计算抗生素浓度 $\lg$ 值。

$$\text{抗生素浓度 } \lg \text{ 值: } X_0 = (Y_0 - a) / b \quad (9-7)$$

② 抗生素浓度 (数学转换值) 可信限率 按公式 (9-4) 和 (9-8) 计算得到的抗

生素浓度 $\lg$ 值在 95% 置信水平 ($\alpha = 0.05$) 的可信限率。

X_0 的可信限率:

$$FL\% = X_0 \pm ta(n-2) [S_Y X / |b|] \sqrt{1/m + 1/n + (X_0 - \bar{X})^2 / (\sum X_i^2 - \bar{X} \sum X_i)} \quad (9-8)$$

式中 n 为标准品的平行测定数; m 为供试品的平行测定数; X_0 为根据线性方程计算得到的抗生素的浓度 $\lg$ 值; Y_0 为抗生素供试品吸收度的均值。

③可信限率的计算 按公式 (9-9) 计算得到的抗生素浓度 (或数学转换值) 的可信限率。

$$\text{可信限率 } FL\% = [(X_0 \text{ 高限} - X_0 \text{ 低限}) / 2X_0] \times 100\% \quad (9-9)$$

式中, X_0 应以浓度为单位。

其可信限率除另有规定外, 应不大于 5%。

④供试品含量的计价 将计算得到的抗生素浓度 (将 $\lg$ 值转换为浓度) 再乘以供试品的稀释度, 即得样品中抗生素的量。

(5) 实验计算所得效价低于估计效价的 90% 或高于估计效价的 110%, 则检验结果仅作为初试, 应调整供试品估计效价, 予以重试。

(6) 原料药效价测定一般需双份样品, 平行实验以便核对。对不符合规定的样品应至少有 2 次符合规定的结果, 才能发出报告。

(7) 效价结果的有效数字按中国药典规定取舍小数位。

7. 二剂量法或三剂量法操作步骤 除另有规定外, 取大小一致的已灭菌的试管, 在各品种项下规定的剂量反应线性范围内, 选择适宜的高、(中)、低浓度, 分别精密加入各浓度的标准品和供试品溶液各 1.0ml, 二剂量的剂距为 2:1 或 4:1, 三剂量的剂距为 1:0.8。同标准曲线法操作, 每一浓度组不少于 4 个试管, 按随机区组分配将各试管在规定条件下培养。照生物检定统计法中的 (2.2) 和 (3.3) 法进行可靠性测验及效价计算。

二剂量法或三剂量法同 (2.2) 和 (3.3) 法要求直线回归、剂间 $P < 0.01$, 偏离平行 $P > 0.05$ 。

有关培养基及其制备方法: 见本书第五章附录四: 抗生素效价测定用培养基及灭菌缓冲液的制备方法。

二、细菌内毒素检查

系利用从鲎的变形细胞中提取的试剂来检测或量化由革兰阴性菌产生的细菌内毒素, 以判断供试品中细菌内毒素的含量是否符合规定的一种方法。包括凝胶法和光度测定法两种方法, 后者包括浊度法和显色基质法。供试品检测时, 可使用其中任何一种方法进行试验。当测定结果有争议时, 除另有规定外, 以凝胶法结果为准。

细菌内毒素的量用内毒素单位 (EU) 表示。

细菌内毒素国家标准品系自大肠埃希菌提取精制而成, 用于核定、复核、仲裁鲎试剂灵敏度和标定细菌内毒素工作标准品的效价。

细菌内毒素工作标准品系以细菌内毒素国家标准品为基准标定其效价, 用于试验中试

剂灵敏度复核、干扰试验及设置的各种阳性对照。

细菌内毒素检查用水系指与灵敏度为 0.03EU/ml 或更高灵敏度的鲎试剂在 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 条件下 24h 不产生凝集反应的灭菌注射用水。细菌内毒素定量测定用的检查用水, 其内毒素的含量应小于 0.005EU/ml。

试验所用的器皿需经处理, 以去除可能存在的外源性内毒素。常用的方法是在 250°C 干烤至少 1h, 也可用其他确证不干扰细菌内毒素检查的适宜方法。若使用塑料器械, 如微孔板和与微量加样器配套的吸头等, 应选用标明无内毒素并且对试验无干扰的器械。试验操作过程应防止微生物的污染。

1. 供试品溶液的制备 某些供试品需进行复溶、稀释或在水性溶液中浸提制成供试品溶液。一般要求供试品溶液的 pH 在 6.0~8.0 的范围内。对于过酸、过碱或本身有缓冲能力的供试品, 需调节被测溶液 (或其稀释液) 的 pH, 可使用酸、碱溶液或鲎试剂生产厂家推荐的适宜的缓冲剂调节 pH。酸或碱溶液需用检查用水在已去除内毒素的容器中进行配制。缓冲剂必须经过验证不含内毒素和干扰因子。

2. 内毒素限值的建立 药品、生物制品的细菌内毒素限值 (L) 一般按式 9-10 确定:

$$L = K/M \quad (9-10)$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值, 以 EU/ml, EU/mg 或 EU/U 活性单位表示; K 为按规定的给药途径, 人用每千克体重每小时最大可接受的内毒素剂量, 以 EU/(kg·h) 表示, 注射剂 $K = 5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 放射性药品注射剂 $K = 2.5\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 鞘内用注射剂 $K = 0.2\text{EU}/(\text{kg}\cdot\text{h})$; M 为人用每千克体重每小时最大剂量, 以 ml/(kg·h)、mg/(kg·h) 或 U 活性单位/(kg·h) 表示, 人均体重按 60kg 计算, 注射时间若不足 1h, 按 1h 计算。

3. 确定最大有效稀释倍数 最大有效稀释倍数 (MVD) 是指供试品溶液被允许稀释的最大倍数, 在此稀释倍数下可进行内毒素限值的检测。用式 9-11 确定 MVD:

$$\text{MVD} = cL/\lambda \quad (9-11)$$

式中 L 为供试品的细菌内毒素限值; c 为供试品溶液的浓度。当 L 以 EU/ml 表示时, 则 c 等于 1.0ml/ml; 当 L 以 EU/mg 或 EU/U 表示时, c 的单位需为 mg/ml 或 U/ml。λ 为在凝胶技术中鲎试剂的标示灵敏度 (EU/ml), 或是在吸光度检测中所使用的标准曲线上最低的内毒素浓度。

(一) 凝胶法操作

凝胶法是通过在有内毒素存在的情况下利用鲎试剂产生凝集反应来检测或定量内毒素的方法。在标准环境中, 能够使鲎试剂产生凝集的内毒素的最低浓度即为鲎试剂的标示灵敏度, 用 EU/ml 表示。

1. 试验前的准备工作与材料

试验所用器皿需经处理除去可能存在的外源性内毒素 (常用的方法是 250°C 干烤至少 1h, 也可用其他适宜的方法)。同时试验所用器皿应确保不干扰细菌内毒素的检查; 试验操作过程应防止微生物的污染。材料与器具: ①细菌内毒素工作标准品; ②鲎试剂; ③细菌内毒素检查用水; ④旋涡混合器 (图 2-1) 和 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 试管恒温仪 (图 2-8); ⑤ 10mm × 75 mm 试管或复溶后的 0.1 ml/支规格的鲎试剂原安瓿; ⑥稀释容器 (大口径试管、

小三角瓶、小磨口瓶、抗生素瓶或安瓿); ⑦移液器材(1、2、5、0.5ml 移液管或移液枪); ⑧试管架或试管浮板; ⑨其他用具: 酒精灯、消毒酒精棉球、剪刀、砂轮、镊子、封口胶布、油性笔、标记纸。

2. 鲎试剂灵敏度复核 当使用新一批鲎试剂或试验环境中发生了可能会影响检验结果的改变时, 须进行鲎试剂灵敏度复核试验。

根据鲎试剂灵敏度的标示值(λ_b), 将细菌内毒素国家标准品或细菌内毒素工作标准品用细菌内毒素检查用水溶解, 在旋涡混合器上混合 15min, 然后制成 2.0 λ 、 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 等 4 个浓度的内毒素标准溶液, 每稀释一步均应在旋涡混合器上混匀 30 s, 取装有 0.1ml 鲎试剂溶液的 10mm×75mm 试管或复溶后的 0.1ml/支规格的鲎试剂原安瓿, 等体积加入内毒素标准溶液。每一个浓度平行做 4 管, 同时在 2 管中加入 0.1ml 细菌内毒素检查用水作为阴性对照。将试管中溶液轻轻混匀后, 封闭管口, 垂直放入 37℃±1℃ 适宜恒温器中, 保温 60min±2min。

将试管从恒温器中轻轻取出, 缓缓倒转 180°时, 管内凝胶不变形, 不从管壁滑脱者为阳性, 记录为 (+); 凝胶不能保持完整并从管壁滑脱者为阴性, 记录为 (-)。保温和拿取试管过程应避免受到振动造成假阴性结果。

若最大浓度 2.0 λ 管均为阳性, 最低浓度 0.25 λ 管均为阴性, 阴性对照管为阴性时, 试验方为有效。按式 (9-12) 计算反应中点浓度的几何平均值, 即为鲎试剂灵敏度的测定值(λ_c)

$$\lambda_c = \lg^{-1} \left[\sum X/4 \right] \quad (9-12)$$

式中 X 为反应终点浓度的对数值 ($\lg$)。反应终点浓度是系列浓度递减的内毒素溶液中最后一个呈阳性结果的浓度。

当 λ_c 在 0.5 λ ~ 2.0 λ (包括 0.5 λ 和 2.0 λ) 时, 方可用于细菌内毒素检查, 并以 λ 为该批鲎试剂的灵敏度。

以上具体的操作参见第三章四、细菌内毒素标准品与鲎试剂。

3. 干扰试验 按表 9-5 制备溶液 A、B、C 和 D, 使用的供试品溶液应为未检验出的内毒素且不超过最大有效稀释倍数 (MVD) 的溶液, 按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

只有当 A 和 D 的所有平行管都为阴性, 并且 C 的结果在鲎试剂灵敏度复核范围内时, 试验方为有效。按式 (9-13、9-14) 计算 C 和 B 的反映终点浓度的几何平均值 (E_s 和 E_t)

$$E_s = \lg^{-1} \left(\sum X_s/4 \right) \quad (9-13)$$

$$E_t = \lg^{-1} \left(\sum X_t/4 \right) \quad (9-14)$$

式中 X_s 、 X_t 分别为溶液 C 和溶液 B 的反应终点浓度的对数值 ($\lg$)。

当 E_s 在 0.5 λ ~ 2.0 λ (包括 0.5 λ 和 2.0 λ) 时, 且当 E_t 在 0.5 E_s 和 2.0 E_s (包括 0.5 E_s 和 2.0 E_s) 时, 则认为供试品在该浓度下无干扰作用。否则如果供试品溶液在小于 MVD 的稀释倍数下对试验有干扰, 将供试品溶液进行不超过 MVD 的进一步稀释, 再重复干扰试验。

使用更高灵敏度的鲎试剂并对供试品进行更大倍数的稀释或通过其他适宜的方法 (如

过滤、中和、透析或加热处理等) 排除干扰。为确保所选择的处理方法可以有效地排除干扰且不会使内毒素失去活性, 要使用预先添加了标准内毒素再经过处理的供试品溶液进行干扰试验。

在进行新药的内毒素检查试验前, 或对无内毒素检查项的品种建立内毒素检查法时, 须进行干扰试验。

当鲎试剂、供试品的来源、配方、生产工艺改变或当试验环境中发生了任何有可能影响试验结果的变化时, 须重新进行干扰试验。

表 9-5 凝胶法干扰试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液				4
B	2λ/供试品溶液	供试品 溶液	1	2λ	4
			2	1λ	4
			4	0.5λ	4
			8	0.25λ	4
C	2λ/检查用水	检查 用水	1	2λ	2
			2	1λ	2
			4	0.5λ	2
			8	0.25λ	2
D	无/检查用水				2

注: 溶液 A, 供试品溶液; 溶液 B, 干扰试验系列; 溶液 C, 鲎试剂标示灵敏度的对照系列; 溶液 D, 阴性对照。

4. 检查法 按表 9-6 制备溶液 A、B、C、D。使用稀释倍数为 MVD 并且已经排除干扰的供试品溶液来制备溶液 A 和 B。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 9-6 凝胶限量试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/添加了内毒素的溶液	平行管数
A	无/供试品溶液	2
B	2λ/供试品溶液	2
C	2λ/检查用水	2
D	无/检查用水	2

使用稀释倍数为 MVD 并且已经排除干扰的供试品稀释液来制备溶液 A 和 B (样品阳性对照)。溶液 B 和 C (阳性对照) 含有相当于 2λ 浓度的标准内毒素。溶液 D (阴性对照) 为检查用水。

结果判断 保温 60min ± 2min 后观察结果。只有当样品阳性对照溶液 B 和阳性对照溶液 C 的平行管都为阳性, 阴性对照溶液 D 的平行管为阴性时, 试验方为有效。

当溶液 A 的两个平行管都为阴性时, 供试品溶液符合规定。当溶液 A 的两个平行管都为阳性时, 供试品不符合规定。当溶液 A 的两个平行管中的一个为阳性另一个为阴性时需进行复试。在复试中, 溶液 A 需做 4 支平行管, 当所有平行管都为阴性时, 供试品溶液符合规定。

(二) 凝胶半定量试验

本方法是通过确定终点浓度来量化供试品溶液中的内毒素。按表 9-7 制备溶液 A、B、C 和 D。按鲎试剂灵敏度复核试验项下操作。

表 9-7 凝胶半定量试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度/加入内毒素的溶液	稀释用液	稀释倍数	所含内毒素的浓度	平行管数
A	无/供试品溶液	检查	1		2
		用水	2		2
			4		2
			8		2
B	2 λ /供试品溶液		1	2 λ	2
C	2 λ /检查用水	检查	1	2 λ	2
		用水	2	1 λ	2
			4	0.5 λ	2
			8	0.25 λ	2
D	无/检查用水				2

注：A，没有超过 MVD 并且通过干扰试验的供试品溶液。其随后的稀释也不得超过 MVD。用检查用水进行 2 倍系列稀释，从通过干扰试验的稀释倍数开始再稀释至 1、2、4 和 8 倍；B，含 2 λ 浓度标准内毒素的溶液 A（样品阳性对照）；C，含 2 λ 、 λ 、0.5 λ 和 0.25 λ 浓度标准内毒素的两个检查用水系列；D，阴性对照。

结果判断 当试验符合以下 3 点时方为有效：①阴性对照溶液 D 的所有平行管为阴性；②样品阳性对照 B 的所有平行管为阳性；③溶液 C 的终点浓度的几何平均值在 0.5 λ ~ 2 λ 之间。

用溶液 A 中每一系列平行管的终点稀释倍数乘以 λ ，计算出每个系列的终点浓度，所有平行管的终点浓度的几何平均值即为供试品溶液的内毒素浓度（按“灵敏度的复核”中的公式）。如果试验检验的是供试品的稀释液，则记录内毒素浓度为小于 λ （如果检验的是稀释过的样品，则记录为小于 $\lambda \times$ 该样品的最低稀释倍数）。如果都为阳性，记录内毒素的浓度为大于或等于最大的稀释倍数乘以 λ 。

当内毒素浓度小于规定的限值时，样品符合要求。

(三) 光度测定法操作

光度测定法分为浊度法和显色基质法。浊度法系利用检测鲎试剂与内毒素反应过程中浊度变化而测定内毒素含量的方法。

所有的光度测定试验都要求在特定的仪器（图 2-10、图 2-11、图 2-12）与专用鲎试剂（图 9-2）中进行，温度一般为 $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 。

为保证浊度和显色实验的精确性和有效性,要预先进行标准曲线的校验试验以及试验溶液的干扰试验。当试验环境中发生了任何可能会影响检验结果的改变时,试验的有效性就要求重新检验。

1. 标准曲线的可靠性试验操作 用标准内毒素配成溶液并制成至少 3 个浓度的稀释液(稀释度不得大于 10),最低浓度不得低于所用鲎试剂的标示检测限。每一稀释步骤的混匀时间同细菌内毒素检查法中凝胶法的要求,每一浓度至少做 3 支平行管。同时要求做 2 支阴性对照。当阴性对照在反应时间内不发生反应,将全部数据进行线性回归分析。

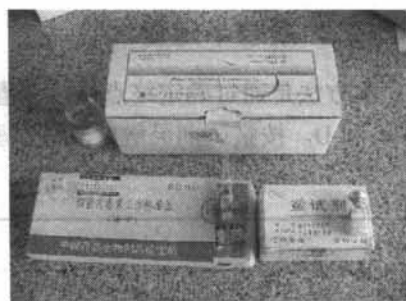


图 9-2 细菌内毒素工作标准品、细菌内毒素检查用水、专用鲎试剂

根据线性回归分析,标准曲线的相关系数 $|r|$ 的绝对值应大于或等于 0.980,试验方为有效。否则须重新试验。试验的具体操作步骤如下:

(1) 稀释内毒素工作标准品 ①取试剂盒内效价为 100EU 的内毒素工作标准品 1 支,开启,加入 1ml 内毒素检查用水溶解,然后用封口膜封闭瓶口,在混旋器混合 15min,混旋后得到 100EU/ml 的内毒素工作标准品溶液;②按 10 倍稀释法制备内毒素工作标准品浓度梯度,每稀释一步前要充分振荡 30s 后,再吸取液体加到下一梯度试管中(工作标准品为中国药品生物制品检定所生产的,单位为 100EU/ml)。

例:把浓度为 100EU/ml 的工作标准品稀释为 10, 1.0, 0.1 和 0.01EU/ml 4 个浓度,可按如下顺序稀释;

$$100\text{EU/ml} \xrightarrow[1.8\text{ml}]{0.2\text{ml}} 10\text{EU/ml} \xrightarrow[1.8\text{ml}]{0.2\text{ml}} 1\text{EU/ml} \xrightarrow[1.8\text{ml}]{0.2\text{ml}} 0.1\text{EU/ml} \xrightarrow[1.8\text{ml}]{0.2\text{ml}} 0.01\text{EU/ml}$$

(2) 制备溶解鲎试剂 取定量测定鲎试剂(装量为 0.5ml) 3 瓶,分别加入 0.5ml 细菌内毒素检查用水(此水应重新开瓶),静置少时,待其充分溶解后,将它们混合在一瓶内轻轻摇匀,待用。

(3) 加鲎试剂至专用小试管内 取仪器专用试管 10 支定量专用小试管,分别加入 0.1ml 鲎试剂(注意不要产生气泡)。

(4) 加内毒素至专用小试管内 用移液枪取稀释好的内毒素 4 个浓度点(10, 1.0, 0.1 和 0.01EU/ml)分别加入到有鲎试剂的小试管中(每管加 0.1ml,每个浓度点做 2 个平行管),注意:加样前应混旋内毒素溶液 30s,且每个浓度点加样时要更换加样头。

(5) 做阴性对照 取 0.1ml 细菌内毒素检查用水加入小试管中(做 2 个平行管)做阴性对照。

(6) 保温检测 将小试管分别插入反应器中(注意一插就要插到底部)开始保温检测(检测仪可采用图 2-10 至图 2-12 的细菌内毒素测定仪检测),并进行数据采集。有关仪器开机操作详见厂家说明书。反应过程中仪器可随时检查反应动态曲线。

(7) 生成标准曲线 反应时间(1h)到后,用鼠标点击“STOP”按钮,停止数据采集(ATI 细菌内毒素检查测定仪可自动完成),则屏幕上出现对话框询问是否结束,回答是;又询问是否保存数据,回答是,则将文件保存并进入数据处理界面;点击“生成标准

曲线”键,则自动对数据进行回归计算,并询问是否存储该标准曲线,回答是;计算机将自动以鲎试剂批号为文件名存储。

(8) 结果判断 标准曲线: $|r| \geq 0.980$,有效,NC 的反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,有效;否则应检查原因,重试。

2. 干扰试验 通常在干扰试验进行之前先做药品与鲎试剂相容性的初筛试验[目的:确定供试品无干扰的稀释倍数范围(或浓度范围)]。其初筛试验程序是:

(1) 记录: ①供试品名称、浓度 C (或干粉重量及溶解后浓度 C); ②最大人体剂量 M (查阅中国药典、USP、EP 或有关研究药品鲎试验的文献)。

(2) 计算供试品的内毒素限值 $L = K/M$ 。

(3) 选择试剂 ①TAL 或 LAL (抗干扰能力、缓冲能力、灵敏度、阴性控制、溶解性等); ②BET 水 (内毒素含量小于 0.005EU/ml); ③RSE 或 CSE (经 RSE 标化);

(4) 计算 供试品的最大有效稀释倍数 $\text{MVD} = L/\lambda$ 或最低有效浓度 $\text{MVC} = \lambda/L = C/\text{MVD}$ 。

(5) 选择标准曲线的内毒素浓度范围 (2 ~ 10 倍等比稀释系列,如: 4λ 、 2λ 、 λ ; 100λ 、 10λ 、 λ)。

(6) 确定 PPC 的内毒素浓度 λ_m (标准曲线的中点浓度)。

(7) 确定初步筛选的供试品的稀释倍数范围或浓度范围。

(8) 制备 ①标准内毒素系列 (用 BET 水稀释的内毒素标准溶液); ②NPC 稀释系列 (不含内毒素的供试品稀释系列); ③PPC 稀释系列 (含标准曲线中点浓度内毒素 λ_m 的供试品稀释系列)。

(9) 反应 在 ATi 系统或 BET-72 型测定仪的反应器内进行。①标准曲线: TAL + ES 系列 (至少 3 个内毒素浓度,平行二管); ②PPC: TAL + 含中点内毒素 λ_m 的供试品稀释液 (平行二管); ③NPC: TAL + 供试品稀释液 (平行二管); ④NC: TAL + BET 水 (平行二管)。

(10) 数据处理 回收率 $= E_s - E_t/\lambda_m \times 100\%$ 。在测定仪中数据处理的回收率计算机自动计出。

(11) 结果判断 标准曲线: $|r| \geq 0.980$,有效;PPC: 回收率 50% ~ 200%,无干扰;NC: 阴性对照,其反应时间大于标准曲线最低浓度的反应时间,有效;PPC: 测定值在标准曲线范围内,有效。

当以上初筛试验得出回收率在 50% ~ 200% 的浓度后,就以该浓度进行正式的干扰试验操作。

其步骤是:选择标准曲线中点或一个靠近中间的内毒素浓度 (以初筛试验得出回收率在 50% ~ 200% 的浓度)。按表 9-8 制备溶液 A (NPC)、B (PPC)、C (3 个浓度的标准曲线) 和 D (NC)。供试品和鲎试剂的比例以及保温时间等,参照所用仪器和试剂的有关说明进行。每种溶液至少做 2 个平行管。

选择标准曲线中点或一个靠近中间的内毒素浓度。按表 9-8 制备溶液 A、B、C 和 D。供试品和鲎试剂的比例以及保温时间等,参照所用仪器和试剂的有关说明进行。每种溶液至少做 2 个平行管。

表 9-8 光度法干扰试验溶液的制备

溶液	内毒素浓度	加入内毒素的溶液	平行管数
A	无	供试品溶液	不少于 2 个
B	标准曲线的中点浓度 (或附近的点)	供试品溶液	不少于 2 个
C	至少 3 个浓度 (最低一点设定为 λ)	检查用水	每一浓度不少于 2 个
D	无	检查用水	不少于 2 个

注：溶液 A，稀释倍数未超过 MVD 的供试品溶液；溶液 B，加入了标准曲线中点的一个内毒素浓度的，和溶液 A 有相同稀释倍数的供试品溶液；溶液 C，如“校验标准曲线的标准性”项下描述的，用于制备标准曲线的标准内毒素溶液；溶液 D，检查用水（阴性对照）。

按所得线性回归方程分计算机出供试品溶液和含标准内毒素的供试品溶液的内毒素含量 c_t 和 c_s ，再按式 (9-15) 计算该试验条件下的回收率 (R)。

$$R = \frac{E_s - E_t}{\lambda_m} \times 100\% \quad (9-15)$$

从包含添加内毒素的供试品溶液中减去溶液本身的平均的内毒素浓度，可计算出添加内毒素的平均回收率。当内毒素的回收率在 50% ~ 200% 之间，则认为在此试验条件下供试品溶液干扰试验成立。

当内毒素的回收率不在指定的范围内，须按“凝胶法干扰试验”中的方法去除干扰因素，并要利用凝胶法干扰试验来验证处理的有效性。

3. 检查法 按照“光度法的干扰试验”中的操作步骤进行检测。使用溶液 C 生成的标准曲线来计算溶液 A 的每一个平行管的内毒素浓度。试验必须符合以下 3 个条件方为有效：①系列溶液 C 的结果要符合“光度技术预试验”下的“校验标准曲线的标准性”中的要求；②用溶液 B 中的内毒素浓度减去溶液 A 中的内毒素浓度后，计算出的内毒素的回收率要在 50% ~ 200% 的范围内。③溶液 D（阴性对照）的反应时间应大于标准曲线最低浓度的反应时间。

结果判断 若溶液供试品所有平行管的平均内毒素浓度乘以稀释倍数和浓度后，小于产品的内毒素限值时，判供试品溶液符合规定。若大于规定的内毒素限值时，判供试品溶液符合规定。（注：本检查法中“管”的意思包括其他任何反应容器，如微孔板中的孔。）

三、无菌检查

无菌检查系用于确定要求无菌的药品、医疗器具、原料、辅料及其他品种是否无菌的一种方法。若供试品符合无菌检查法的规定，仅表明了供试品在该检验条件下未发现微生物污染。无菌检查应在环境洁净度 10000 级和局部洁净度 100 级的单向流空气区域内或隔离系统中进行，其全过程必须严格遵守无菌操作，防止微生物污染。单向流空气区、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室（区）悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证。隔离系统按相关的要求进行验证，其内部环境的洁净度须符合无菌检查的要求。硫乙醇酸盐流体培养基置 30 ~ 35℃ 培养；改良马丁培养基置 23 ~ 28℃ 培养。

无菌检查法包括薄膜过滤法和直接接种法两种方法。只要供试品性状允许，应采用薄

膜过滤法。操作时,用适当的消毒液对供试品容器表面进行彻底消毒。如果容器内有一定的真空度,可用适当的无菌器材(如一头带有除菌过滤器的针头),向供试品容器内导入无菌空气,再按无菌操作启开容器,取出内容物。

供试品处理时所用的溶剂、乳化剂、分散剂、中和剂及其用量须证明有效,并对微生物无毒性。除另有规定外,供试品处理及接种,按下列方法进行。

检验数量 检验数量是指一次实验所供试品最小包装的数量。除另有规定外,出厂产品按表9-9规定,上市产品监督检验按表9-10、表9-11规定。表9-9、表9-10、表9-11中最少检验数量不包括阳性对照试验的供试品用量。一般情况下,供试品无菌检查若采用薄膜过滤,应增加1/2的最小检验数量作阳性对照用;若采用直接接种法,应增加供试品1支(或瓶)作阳性对照用。无菌检查法建立在批产品受微生物污染是均一的假设上,但是即使整批产品非常均匀,检出低水平污染的几率也是很低的。因此,应尽量抽取批生产开始和结束或生产过程出现异常情况下的产品进行检验。

表9-9 批产品出厂最少检验数量

产品类型	批产量 N (个)	每种培养基最少检验数量
注射剂	≤ 100	10%或4个(取较多者)
	$100 < N \leq 500$	10个
	> 500	2%或20个(取较少者)
大体积注射剂(> 100 ml)		2%或10个(取较少者)
眼用及其他非注射产品	≤ 200	5%或2个(取较多者)
	> 200	10个
桶装固体原料	≤ 4	每个容器
	$4 < N \leq 50$	20%或4个容器(取较大者)
	> 50	2%或10个容器(取较大者)
抗生素固体原料药(≥ 5 g)		6个容器
医疗器械	≤ 100	20%或4件(取较多者)
	$100 < N \leq 500$	10件
	> 500	2%或20个(取较少者)

表9-10 上市抽验样品(液体制剂)的最少检验量

供试品装量 V (ml)	每支样品接入每管培养基的最少量(ml)	最少检验数量(瓶或支)
≤ 1	全量	20 ^①
$1 < V < 5$	半量	10
$5 \leq V < 20$	2	10
$20 \leq V < 50$	5	10
$50 \leq V < 100$	10	10
$50 \leq V < 100$ (静脉给药)	半量	10
$100 \leq V < 500$	半量	6
$V \geq 500$	500	6

注:①每种培养基各接种10支供试品。

表 9-11 上市抽验样品（固体制剂）的最少检验量

供试品装量 M (mg/支或瓶)	每支样品接入每管培养基的最小量 (mg)	最少检验数量 (瓶或支)
$M < 50$	全量	20 ^①
$50 \leq M < 300$	半量	10
$300 \leq M < 5g$	150	10
$M \geq 5g$	500	10 ^②
外科用敷料棉花及纱布	100mg 或 1cm × 3cm	10
缝合线、一次性医用材料	整个材料 ^③	20 ^①
带导管的一次性医疗器具（如输液袋）	整个器具体切碎或拆开	10
其他医疗器具		20 ^①

注：①每种培养基各接种 10 支供试品；②抗生素粉针剂（ $\geq 5g$ ）、抗生素原料药（ $\geq 5g$ ）的最少检验量为 6 瓶（支），桶装固体原料的最少检验数量为 4 个包装；③如果医用器械体积过大，培养基用量可在 2000ml 以上，将其完全沉没。

检验量 是指一次试验所用的供试品总量（g 或 ml）。除另有规定外，按表 9-9、表 9-10、表 9-11 规定。采用直接接种法时，若每支（瓶）供试品的装量足够接种两份培养基，则应分别接种硫乙醇酸盐流体培养基。采用薄膜过滤时，检验量应不少于直接接种的总接种量，只要供试品特性允许，应尽可能将所有容器内的全部内容物过滤。

培养基用量 除另有规定外，培养基用的量应不少于表 9-10、表 9-11 规定的量。供试品无菌检查时，每支培养基的实际装量及所占容器高度的比例应与“无菌检查验证试验”所用的培养基相同。

供试品溶剂 供试品处理时所用的溶剂、乳化剂、分散剂、中和剂及其用量应验证在该检验条件下不具抗菌作用。

阳性对照 供试品无菌检查应进行阳性对照试验。阳性对照试验应根据供试品特性选择阳性对照菌：无抑菌作用及抗细菌的供试品，以金黄色葡萄球菌为对照菌；抗革兰阴性菌为主的供试品以大肠埃希菌为对照菌；抗厌氧菌的供试品，以生孢梭菌为对照菌；抗真菌的供试品，以白色念珠菌为对照菌。阳性对照试验用菌液制备同培养基灵敏度检查。阳性对照管的加菌量应小于 100CFU。阳性对照的供试品用量同供试品无菌检查每份培养基接种的样品量（见表 9-10、表 9-11）。阳性对照管培养 48~72h 应生长良好。

阴性对照 凡无菌检查，均应取相应溶剂和稀释剂同法操作，作为阴性对照。

（一）薄膜过滤法

采用封闭式薄膜过滤器或一般薄膜过滤器，可优先选用封闭式薄膜过滤器。无菌检查用的滤膜孔径不大于 $0.45\mu m$ ，直径为 47mm。选择滤膜材质时应考虑供试品及其溶剂的特性，如抑菌性供试品采用具有疏水性边缘及低吸附性的滤膜。水溶性供试液过滤前先将少量的冲洗液过滤以润湿滤膜。油类供试品，其滤膜和过滤器在使用前应充分干燥。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。同时每片滤膜的总过滤量不宜太大，以避免滤膜上的微生物受损伤。

供试液经薄膜过滤后，若需要用冲洗液冲洗滤膜，每张滤膜每次冲洗量为 100ml，冲

洗量及冲洗方法同方法验证试验。为发挥滤膜的最大过滤效率,应注意保持供试品溶液及冲洗液覆盖整个滤膜表面。如用封闭式过滤器,分别将硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基加入相应的滤筒内。如果仅用1只过滤器,取出滤膜,将其剪成3等份;如使用2只以上过滤器,取出滤膜,按过滤的供试品量将其滤膜分成3等份。将上述滤膜分别置于含硫乙醇酸盐流体培养基、改良马丁培养基容器中,其中一份做阳性对照用。

1. 水溶液供试品 取规定量,直接过滤,或混合至含稀释液不少于100ml的无菌容器内,混匀,过滤。如供试品具有抑菌作用或含防腐剂,须用适量的冲洗液冲洗滤膜,冲洗次数不得少于3次。

2. 固体制剂供试品 取规定量,加适宜的溶剂溶解或按标签说明复溶,根据其溶解性按水溶液或非水溶性供试品项下的方法操作。

(1) β -内酰胺类供试品 取规定量,按水溶液或固体制剂供试品的处理方法处理,过滤,用适宜的冲洗液冲洗滤膜。再用含适量 β -内酰胺酶的冲洗液清除残留在滤筒、滤膜上的抗生素后接种培养基,必要时培养基中可加入少量的 β -内酰胺酶;或将滤膜直接接入含适量 β -内酰胺酶的培养基。 β -内酰胺酶的用量同方法验证试验。

(2) 非水溶性制剂供试品 取规定量,直接过滤;或混合溶于不少于100ml的含适量的聚山梨酯80或其他适宜乳化剂的稀释液中,充分混合,过滤。用含1%聚山梨酯80的冲洗液冲洗滤膜至少3次。滤膜于含或不含聚山梨酯80的培养基中培养。聚山梨酯80或其他适宜乳化剂的用量同方法验证试验。

(3) 可溶于十四烷酸异丙酯的膏剂和黏性油剂供试品 取规定量,混合至适量的无菌十四烷酸异丙酯^①(可适当加热,温度不得超过44℃)中,剧烈振摇,使供试品充分溶解,趁热迅速过滤。若无法过滤,应加入不少于100ml的稀释液,充分振摇萃取,静置,取下层水相作为供试液过滤。过滤后用含1%聚山梨酯80的冲洗液冲洗滤膜至少3次,滤膜于聚山梨酯80培养基中培养。无菌十四烷酸异丙酯的用量同方法验证试验。

(4) 无菌气(喷)雾剂供试品 取规定量,将各容器置冰室冷冻约1h。以无菌操作迅速在阀上钻一小孔,释放抛射剂后再无菌开启容器,按水溶性制剂或非水溶性制剂项下的方法操作。

(5) 装有药物的注射器供试品 取规定量,装上无菌针头(非包装中所配带的),吸入稀释液或标签所示的溶剂溶解,按水溶性制剂或非水溶性供试品项下方法操作。同时应做包装中所配带的无菌针头的无菌检查。

(6) 装有导管的医疗器具(输血、输液袋等)供试品 取规定量,用冲洗量50~100ml/袋分别冲洗内壁,收集冲洗液于适宜的无带菌容器中,薄膜过滤。同时应做包装中所配带的无菌针头的无菌检查。

(二) 直接接种法

直接接种法即每支(或瓶)供试品按规定量分别接入含硫乙醇酸盐流体培养基和改良

注:①无菌十四烷酸异丙酯的制备采用薄膜过滤法过滤除菌。选用孔径为0.22 μ m的脂溶性滤膜,并经140℃干热灭菌2h。

马丁培养基容器中,除另有规定外,培养基用量要大于供试品体积的90%,两种培养基装量分别为15ml和10ml以上,并经验证,接种的各培养基管数同供试品的检验数量。依不同供试品分别操作如下:

1. 接种至培养基中

(1) 混悬液及浑浊供试品 取规定量接种至培养基中。

(2) 固体制剂供试品 取规定量直接接种,或加入适宜的溶剂溶解,或按标签说明复溶后,取规定量接种至培养基中。

(3) β -内酰胺类或磺胺类供试品 取规定量,混合,加入适量的无菌 β -内酰胺酶溶液或对氨基苯甲酸溶液使中和,接种至培养基中,或直接使用选择性培养基。 β -内酰胺酶或对氨基苯甲酸的用量同方法验证试验。

(4) 非水溶性供试品 取规定量,混合,加入适量的聚山梨酯80或其他适宜的乳化剂及稀释剂使其乳化,接种至培养基中。或直接接种至含聚山梨酯80或其他适宜乳化剂的培养基中。聚山梨酯80或乳化剂的用量同方法验证试验。

(5) 外科敷料、肠线、缝合线等供试品 外科敷料取规定数量,以无菌操作拆开包装,于不同部位分别剪取约100 mg或1cm×3cm的供试品;肠线、缝合线及其他一次性的医用材料按规定量取最小包装,无菌拆开包装,接种于足以浸没供试品的适量培养基中。

(6) 灭菌医用器具供试品 取规定量,必要时应将其拆散或切成小碎块,接种于足以浸没供试品的适量培养基中。

(7) 放射性药品 取供试品1瓶(支),接种于装量为7.5ml的培养基中,管接种量为0.2ml。

2. 培养及观察 上述含培养基的容器按规定的温度培养14d。培养期间应逐日观察并记录是否有菌生长。如在加入供试品后、或在培养过程中,培养基出现浑浊,培养14d后,不能从外观上判断有无微生物生长,可取该培养液适量转种至同种新鲜培养基中或斜面培养基上,细菌培养2d、真菌培养3d,观察是否再出现浑浊或斜面有无菌生长;或用接种环取培养液涂片,染色,镜检,判断是否有菌。

(三) 无菌检查结果判断

若硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基管均澄清,或虽显浑浊但经确证无菌生长,判供试品符合规定;若硫乙醇酸盐流体培养基及改良马丁培养基管中任何1管显浑浊并确证有菌生长,判供试品不符合规定,除非能充分证明生长的微生物非供试品所含。当满足下列至少一个条件时,判试验结果无效:①对无菌检查试验相关设施的微生物监控数据证明其不符合规定;②对无菌试验过程的回顾,揭示了本操作程序是错误的;③阴性对照管有菌生长;④供试品管中生长的微生物经鉴定后,确证微生物生长是因无菌试验中所使用的物品和(或)无菌操作技术不当引起的。

试验若经确认无效,应重试。重试时,重新取同量供试品,依法重试,若无菌生长,判供试品符合规定;若有菌生长,判供试品不符合规定。

有关培养基及其制备方法:见本书第五章附一:无菌检查用培养基及其制备方法。

四、微生物限度检查

微生物限度检查法系检查非规定灭菌制剂及其原、辅料受微生物污染程度的方法。检查项目包括细菌数、霉菌数、酵母菌数及控制菌检查。微生物限度检查应在洁净度 100 级的单向流空气区域内进行,其环境的洁净度为 10000 级。检验全过程必须严格遵守无菌操作,防止再污染。单向流空气区域、工作台面及环境应定期按《医药工业洁净室(区)悬浮粒子、浮游菌和沉降菌的测试方法》的现行国家标准进行洁净度验证。

除另有规定外,本检查法中细菌培养温度为 30~35℃;霉菌、酵母菌培养温度为 23~28℃;控制菌培养温度为 35~37℃。检验结果以 1g、1ml、10g、10ml 或 10cm² 为单位报告。

检验量 即一次试验所用的供试品量(g、ml 或 cm²)。

除另有规定外,供试品的检验量为 10g 或 10ml;化学膜剂为 100cm²;贵重药品、微量包装药品的检验量可以酌减(但不得少于最小用量)。要求检查沙门菌的供试品其检验量应增加 10g 或 10ml。检验时,应从 2 个以上最小包装单位中抽取供试品,膜剂还不得少于 4 片。一般应随机抽取不少于检验量(两个以上最小包装单位)的 3 倍量供试品。

(一) 供试液的制备

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供试液。所用乳化剂、分散剂、中和剂及其用量应证明是有效的,并对微生物无毒性。供试液制备若需用水浴加温时,温度不应超过 45℃,时间一般不超过 30min。供试液从制备至加入检验用培养基,不得超过 1h。除另有规定外,常用的供试品制备方法如下:

1. 液体供试品 取供试品 10ml,加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml,混匀,作为 1:10 供试液。油剂可加入适量的无菌聚山梨酯 80 使供试品分散均匀。水溶性液体制剂可用混合的供试品原液作为供试液。

2. 固体、半固体或黏稠液供试品 取供试品 10g,加 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml,用匀浆仪或其他适宜的方法,混匀,作为 1:10 供试液。必要时加适量的无菌聚山梨酯 80,并置水浴中适当加温使供试品分散均匀。

3. 需用特殊供试液制备方法的供试品

(1) 非水溶性供试品 方法① 取供试品 5g(或 5ml),加至含溶化的(温度不超过 45℃) 5g 司盘 80、3g 单硬脂酸甘油酯、10g 聚山梨酯 80 无菌混合物的烧杯中,用无菌玻璃棒搅拌成团后,慢慢加入 45℃ 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至 100ml,边加边搅拌,使供试品充分乳化,作为 1:20 供试液。方法② 取供试品 10g,加至含 20ml 无菌十四烷酸异丙酯(制法见无菌检查附注)和无菌玻璃珠的适宜容器中,必要时可增加十四烷酸异丙酯的用量,充分振摇,使供试品溶解。然后加入 45℃ 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100ml,振摇 5~10min,萃取,待油水明显分层,取其水层作为 1:10 供试液。

(2) 膜剂供试品 取供试品 100 cm²,剪碎,加适量的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 100ml(必要时可增加稀释剂),浸泡,振摇,作为 1:10 的供试液。

(3) 肠溶及结肠溶制剂供试品 取供试品 10g,加 pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液(用于肠

溶制剂)或 pH7.6 无菌磷酸盐缓冲液(用于结肠溶制剂)至 100ml,置 45℃ 水浴中,振摇,使溶解,作为 1:10 供试液。

(4) 气雾剂、喷雾剂供试品 取规定量供试品,置冷冻室冷冻约 1h。取出,迅速消毒供试品开启部位周围,用无菌钢锥在容器上钻一小孔,放至室温,并轻轻转动容器,使抛射剂缓缓全部释出。用无菌注射器吸出全部药液,加至适量的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(若含非水溶性成分,加适量的无菌聚山梨酯 80)中,混匀,取相当于 10g 或 10ml 的供试品,再稀释成 1:10 的供试液。

(5) 具抑菌活性的供试品 当供试品有抑菌活性时,应消除供试液应消除其抑菌活性后,再依法检查。常用的方法如下:① 培养基稀释法 取规定量的供试液,至较大量的培养基中,使单位体积内的供试品含量减少,至不具抑菌作用。测定细菌、霉菌及酵母菌的菌数时,取同稀释级的供试液 2ml,每 1ml 供试液可等量分注多个平皿,倾注于琼脂培养基,混匀,凝固,培养计数。每 1ml 供试液所注的平皿中生长的菌数之和即为 1ml 的菌落数,计算每 1ml 供试液的平均菌落数,按平皿法计数规则报告菌数;控制菌检查时,可加大增菌培养基的用量;② 离心沉淀集菌法 取一定量的供试液,3000r/min 离心 20min(供试液如有沉淀,先以 500r/min 离心 5min,取全部上清液再离心),弃去上清液,留底部集菌液约 2ml,加稀释剂至原量;③ 薄膜过滤法 见细菌、霉菌及酵母菌计数项下的“薄膜过滤法”;④ 中和法 凡含汞、砷或防腐剂等具有抑菌作用的供试品,可用适宜的中和剂或灭活剂消除其抑菌成分。中和剂或灭活剂可加在所用的稀释液或培养基中。

(二) 细菌、霉菌及酵母菌计数

当供试品为新的产品或供试品的检验条件发生改变时,应进行方法验证试验,以确认供试品的抑菌活性及测定方法的可靠性。验证时,按供试液的制备和细菌、霉菌及酵母菌计数所规定的方法及下列要求进行。对各试验菌的回收率应逐一进行验证。验证方法见第八章。

验证试验也可与供试品的细菌、霉菌及酵母菌计数同时进行。

1. 平皿法 取均匀供试液,用 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液稀释成 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 等稀释级,取适宜的连续 2~3 个稀释级的供试液进行菌数测定。

取供试液 1ml,置直径 90mm 的无菌平皿中,注入 15~20ml 温度不超过 45℃ 的溶化的营养琼脂培养基或玫瑰红钠琼脂培养基或酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基,混匀,凝固,倒置培养。每稀释级每种培养基至少制备 2 个平皿。同时取试验用的稀释剂 1ml,置无菌平皿中,注入培养基,凝固,倒置培养。每种计数用的培养基各制备 2 个平板,均不得有菌生长。另有规定外,细菌培养 48h,分别在 24h 及 48h 点计菌落数,一般以 48h 的菌落数报告;霉菌、酵母菌培养 72h,分别在 48h 及 72h 点计菌落数,一般以 72h 的菌落数报告;必要时,可适当延长培养时间至 5~7d 进行菌落计数。菌落蔓延生长成片的平板不宜计数。点计菌落数后,计算各稀释级供试液的平均菌落数,按菌数报告规则报告菌数。若稀释级两个平板的菌落平均数不小于 15 时,两个平板的菌落数不能相差 1 倍或以上。

一般营养琼脂培养基用于细菌计数;玫瑰红钠琼脂培养基用于霉菌及酵母菌计数;酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基用于酵母菌计数。在特殊情况下,若营养琼脂培养基上长有

霉菌和酵母菌、玫瑰红钠琼脂培养基上长有细菌,则应分别点计霉菌和酵母菌、细菌菌落数。然后将营养琼脂培养基上的霉菌和酵母菌数或玫瑰红钠琼脂培养基上的细菌数,与玫瑰红钠琼脂培养基中的霉菌和酵母菌数或营养琼脂培养基中的细菌数进行比较,以菌落数高的培养基中的菌数为计数结果。

含蜂蜜、王浆的液体制剂,用玫瑰红钠琼脂培养基测定霉菌数,用酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基测定酵母菌数,合并计数。

菌数报告规则 宜选取细菌、酵母菌平均菌落数在 30~300 之间、霉菌平均菌落数在 30~100 之间的稀释级,作为菌数报告(取两位有效数字)的依据。① 当仅有 1 个稀释级的菌落数符合上述规定,以该级的平均菌落数乘以稀释倍数报告菌数;② 当同时有 2 个稀释级的菌落数符合上述规定时,视两者比值(比值为高稀释级的菌落数乘以稀释倍数的值除以低稀释级的菌落数乘以稀释倍数的值)而定。若比值不大于 2,以两稀释级的菌落数乘以稀释倍数的均值报告菌数;若比值大于 2 但不超过 3 时,以低稀释级的菌落数乘以稀释倍数报告菌数;③ 当出现比值大于 3,或高稀释级的菌落数大于或等于低稀释级的菌落数等异常情况时,应查明原因再行检查,必要时,应进行方法的重新验证;④ 当各稀释级的平均菌落数均小于 30,以最低稀释级的平均菌落数乘以稀释倍数报告菌数;⑤ 如各稀释级的平板均无菌落生长,或仅最低稀释级的平板有菌落生长,但平均菌落数小于 1 时,以小于 1 乘以最低稀释倍数报告菌数。

2. 薄膜过滤法 应采用开放式薄膜过滤法,滤膜的孔径不大于 $0.45\mu\text{m}$ 。选择滤膜材质时应考虑供试品及其溶剂的特性。

取规定量的供试液直接或处理后,用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液按 10 倍比稀释成 $1:10^2$ 、 $1:10^3$ 等稀释级,取适宜稀释级的供试液进行菌数测定。

取供试液 2ml 直接过滤,或加至 100ml 稀释剂中,混匀,过滤。用无菌 pH7.0 氯化钠-蛋白胨缓冲液(或无菌聚山梨酯氯化钠-蛋白胨缓冲液)冲洗滤膜,每次冲洗量为 100ml,冲洗次数同“方法的验证”。冲洗后取出滤膜,菌面朝上贴于营养琼脂培养基或玫瑰红钠琼脂培养基或酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基平板上培养。同时取试验用的稀释剂 2ml 同法操作,作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。按平皿法方法培养和计数,每片滤膜上的菌落数应不多于 100 个。点计的菌落数除以 2 为该稀释级每毫升的菌落数。

菌数报告规则 以该级的菌落数乘以稀释倍数报告菌数;若最低稀释级的滤膜上无菌落生长,以小于 1 乘以最低稀释倍数报告菌数。

(三) 控制菌检查

控制菌的检查也要进行方法的验证。当供试品为新的产品或供试品的检验条件发生改变时,应进行方法验证试验,以确认供试品的抑菌活性及检查法的可靠性。验证时,依各供试品微生物限度项下的规定选择应验证的菌株,按供试液的制备和控制菌检查法所规定的及下列要求进行。具体可见第八章。供试品进行控制菌检查时,应做阳性对照试验。阳性对照试验的加菌量为 $10\sim 100\text{CFU}$,供试品和增菌培养基用量及检查同供试品的控制菌检查。阳性对照试验应检出相应的控制菌。同时取稀释剂 10 ml 加入 100 ml (或 200 ml) 相应控制菌检查用的增菌培养基中,培养,应无菌生长。

1. 大肠埃希菌检查

(1) 增菌 取供试液 10ml (相当于供试品 1g、1ml、10cm²) 直接或处理后接至 100ml 的胆盐乳糖培养基中, 培养 18~24h, 必要时可延至 48h。

(2) MUG 快速检查 这是《中国药典》(2000 年版) 后新增项目, 并是我国首创的方法。取上述培养物 0.2ml, 接种至含 5ml MUG 培养基的试管内培养, 于 5、24h 在 366nm 紫外光下观察, 同时用未接种的 MUG 培养基作本底对照。若管内培养物呈现荧光, 为 MUG 阳性 (图 5-6); 不呈现荧光, 为 MUG 阴性。观察后, 沿培养管的管壁加入数滴靛基质试液, 液面呈玫瑰红色, 为靛基质阳性; 呈试剂本色, 为靛基质阴性。本底对照应为 MUG 阴性和靛基质阴性。如 MUG 阳性、靛基质阳性 (图 5-6、图 5-7), 判供试品检出大肠埃希菌; 如 MUG 阴性、靛基质阴性, 判供试品未检出大肠埃希菌。

(3) 曙红亚甲蓝琼脂 (伊红美蓝) 或麦康凯琼脂平板划线分离 如 MUG 阳性、靛基质阴性, 或 MUG 阴性、靛基质阳性, 应取胆盐乳糖培养基的培养物划线接种于曙红亚甲蓝琼脂平板或麦康凯琼脂平板, 培养 18~24h。若平板上无菌落生长、或生长的菌落与表 9-12 所列的菌落形态特征不符, 判供试品未检出大肠埃希菌。

表 9-12 大肠埃希菌菌落形态特征

培养基	菌落形态
曙红亚甲蓝琼脂	呈紫黑色、浅紫色、蓝紫色或粉红色, 菌落中心呈深紫色或无明显暗色中心, 圆形, 稍凸起, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润, 常有金属光泽 (图 5-2)
麦康凯琼脂	鲜桃红色或微红色, 菌落中心呈深桃红色, 圆形, 扁平, 边缘整齐, 表面光滑, 湿润

(4) 疑似大肠杆菌的生化反应试验确认 若平板上生长的菌落与表 9-12 所列的菌落形态特征相符或疑似, 应对可疑菌落进行分离、纯化、染色镜检和适宜的生化试验, 确认是否为大肠埃希菌。

(5) 适宜的生化试验 选择平板菌落典型特征相符或疑似菌的 2~3 个菌落, 分别接种于营养琼脂培养基斜面上, 培养 18~24h, 然后取营养琼脂培养基斜面的培养物进行检查。

① 靛基质试验 将纯培养物接种于蛋白胨水中, 37℃ 培养 24~48h。沿管壁加入对-氨基苯甲醛试液 0.3~0.6 ml, 观察液面是否有红色环。大肠埃希菌为有红色环, 为阳性 (图 5-8)。

② 甲基红试验 将纯培养物接种于磷酸盐葡萄糖蛋白胨水培养基中, 37℃ 培养 24~48h。加甲基红指示剂数滴, 观察结果, 红色为阳性, 黄色为阴性。大肠埃希菌应是阳性 (图 5-10)。

③ V-P 试验 将纯培养物接种于磷酸盐葡萄糖蛋白胨水培养基中, 37℃ 培养 24~48h。加入 V-P 试剂甲液 1 ml, 混匀, 再加入 V-P 试剂乙液 0.4 ml。充分振摇, 观察结果, 数分钟后出现红色为阳性; 黄色为阴性, 4h 出现红色为阳性反应。大肠埃希菌应是阴性 (图 5-9)。

④ 枸橼酸盐利用试验 将纯培养物接种于枸橼酸盐琼脂培养基中, 37℃ 培养 24~48h。观察结果, 培养基由绿色变成蓝色为阳性, 黄色为阴性。大肠埃希菌应是阴性 (图

5-11)。

最后根据靛基质试验(I)、甲基红试验(M)、乙酰甲基甲醇生成试验(V-P)、枸橼酸盐利用试验(C)和革兰染色镜检结果进行确认。

2. 大肠菌群检查

(1) 增菌 取双料胆盐乳糖发酵管1支,加入1:10供试液10ml(含供试品1.0g或1.0ml);取胆盐乳糖发酵管2支,分别加入1:10供试液1ml(含供试品0.1g或0.1ml)和1:100稀释的供试液1ml(含供试品0.01g或0.01ml)。阴性对照取1支双料胆盐乳糖发酵管,加入稀释剂10ml。培养18~24h。若胆盐乳糖发酵管无菌生长、或有菌生长但不产酸产气判该管未检出大肠菌群。

(2) 平板划线分离 若产酸产气,应将发酵管中的培养物分别划线接种于曙红亚甲蓝琼脂培养基或麦康凯琼脂培养基的平板上,培养18~24h。

表 9-13 大肠菌群菌落形态特征

培养基	菌落形态
曙红亚甲蓝琼脂	呈紫黑色或紫红色,圆形,稍凸起,边缘整齐,表面光滑,湿润
麦康凯琼脂	鲜桃红色或粉红色,圆形,扁平,边缘整齐,表面光滑,湿润

若平板上无菌落生长,或生长的菌落与表9-13所列的菌落形态特征不符或为非革兰阴性无芽孢杆菌,判该管未检出大肠菌群;若平板上生长的菌落与表9-13所列的菌落形态特征相符或疑似,且为革兰阴性无芽孢杆菌,应进行确证试验。

(3) 确证试验 从上述分离平板上挑选4~5个疑似菌落,分别接种于乳糖发酵管中,培养24~48h。若产酸产气,判该胆盐乳糖发酵管检出大肠菌群,否则判未检出大肠菌群。

根据大肠菌群的检出管数,按表9-14报告1g或1ml供试品中的大肠菌群数。

表 9-14 大肠菌群 MPN (Most Probable Number)

各供试品量的检出结果			最可能的大肠菌群数 N (个/g或ml)
1.0g或1.0ml	0.1g或0.1ml	0.01g或0.01ml	
+	+	+	$> 10^2$
+	+	-	$10 < N < 10^2$
+	-	-	$1 < N < 10$
-	-	-	< 1

注: +, 检出大肠菌群; -, 未检出大肠菌群。

3. 沙门菌检查

(1) 增菌培养 取供试品10g或10ml,加至200ml的营养肉汤培养基中,用相应的供试液制备方法制成供试液,培养18~24h。取上述培养物1ml,接种于10ml四硫磺酸钠亮绿培养基中,培养18~24h后。

(2) 平板划线分离 分别划线接种于胆盐硫乳琼脂(或沙门、志贺菌属琼脂)培养基和麦康凯琼脂(或曙红亚甲蓝琼脂)培养基的平板上,培养18~24h(必要时延长至40~

48h)。若平板上无菌落生长,或有菌落但不同于表 9-15 所列特征,判供试品未检出沙门菌。

(3) 三糖铁琼脂培养基穿刺接种 若平板生长的菌落特征与表 9-15 所列的菌落形态特征相符或疑似,用接种针挑选 2~3 个菌落分别于三糖铁琼脂培养基高层斜面上进行斜面和高层穿刺接种,培养 18~24h 后,斜面未见红色,底层未见黄色;或斜面黄色、底层无黑色,判供试品未检出沙门菌。否则,应取三糖铁琼脂培养基斜面的培养物进行适宜的生化试验和血清凝集试验,确认是否为沙门菌。

表 9-15 沙门菌菌落形态特征

培养基	菌落形态
胆盐硫琼脂	无色至浅橙色,半透明,菌落中心带黑色或全部黑色或无黑色
沙门、志贺菌属琼脂	无色至淡红色,半透明或不透明,菌落中心有时带黑褐色
曙红亚甲蓝琼脂	无色至浅橙色,透明或半透明,光滑湿润的圆形菌落
麦康凯琼脂	无色至浅橙色,透明或半透明,菌落中心有时为暗色

(4) 沙门菌适宜的生化试验和血清凝集试验 取沙门菌疑似菌株的 TSI 斜面培养物,做以下试验:

① 靛基质试验 按大肠杆菌检查方法项下操作、判断结果。沙门菌应为阴性反应(图 5-8)。

② 尿素试验 用接种环沾取培养物,划线接种于尿素琼脂培养基上。置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24h,观察结果。如斜面变为红色为阳性反应;阴性反应为变色。沙门菌应为阴性反应(图 5-12)。

③ 氰化钾试验 取 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 20~24h 的疑似菌株肉汤培养液,用接种环沾取 1 环,接种至氰化钾培养基内,另取一环接种于对照培养基内。接种后即以橡胶塞塞紧,置于 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48h,观看结果。对照管内有菌生长(浑浊),而试验管也有菌生长者为阳性(不受抑制)。经 48h 培养后,对照管有菌生长,而试验管无细菌生长时为阴性(受抑制)。沙门菌应为阴性反应。(注:本检查法《中国药典》2005 年版取消)

本试验应十分注意密封管口,夏天分装培养基宜在水浴中进行,以防氰化钾分解,产生氢氰酸逸出,致使氰化钾浓度下降,细菌生长,造成假阳性。

④ 赖氨酸脱羧酶试验 用接种环沾取少量培养物,接种在赖氨酸脱羧酶培养基,同时接种对照培养基。置 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 培养 24~48h,观察结果。对照管黄色,试验管呈紫色时为阳性反应;黄色为阴性反应,沙门菌应为阳性反应(图 5-15)。

⑤ 动力检查 用接种针沾取培养物,穿刺接种半固体肉汤琼脂培养基培养 24h 后呈现浑浊蔓延现象;无动力的细菌仅沿穿刺线生长,周围培养基清晰。无动力表现的培养物,应在室温保留 2~3 d 后,再观察,沙门菌除少数例外,均具有周身鞭毛,能运动。

⑥ 血清学试验 在洁净载玻片近中心区的一端,以接种环沾取沙门菌属 A~F “O” 多价血清 2~3 环,再挑取疑似菌株的 TSI 斜面上部的培养物少许,与血清混合(要小心操作,以防外溅,污染四周),将玻片前后侧动,在暗背景下观察结果,如为阳性反应,通常在 3min 内出现凝集现象。有时反应迟缓,需将玻片置培养皿内,并在皿内放湿棉球

一个,以防干涸,约过 20min,再观察结果。

凡与血清出现凝集者,应以 0.9%氯化钠与同一菌株培养物做对照试验,对照应无凝集现象方可确定为阳性反应。

当与血清未出现凝集时,应以接种环取上述斜面培养物,置于含少量 0.9%氯化钠的试管中,制成浓菌悬液,在 100℃水浴中保温 30min(目的是破坏菌体外的 H 抗原)待冷,再以此处理后的菌悬液与沙门菌属 A~F“O”多价血清做凝集试验,如出现凝集,应判为阳性反应;如不出现凝集,则为阴性反应。

4. 铜绿假单胞菌检查

(1) 增菌培养 取供试液 10ml(相当于供试品 1g、1ml、10cm²)直接或处理后接至 100ml 的胆盐乳糖培养基中,培养 18~24h。

(2) 平板划线分离 取上述培养物,划线接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基的平板上,培养 18~24h。铜绿假单胞菌典型菌落呈扁平、无定形、周边扩散、表面湿润,灰白色,周围时有蓝绿色素扩散(图 5-5)。如平板上无菌落生长或生长的菌落与上述菌落特征不符,判供试品未检出铜绿假单胞菌。

(3) 纯培养 如平板生长的菌落特征与上述菌落特征相符或疑似,应挑选 2~3 个菌落,分别接种于营养琼脂培养基斜面上,培养 18~24h。取培养物进行革兰染色、镜检及氧化酶试验。

(4) 氧化酶试验 取洁净滤纸片置于平皿内,用无菌玻璃棒取斜面培养物涂于滤纸片上,滴加新配制的 1%二盐酸二甲基对苯二胺试液,在 30s 内若培养物呈粉红色并逐渐变为紫红色为氧化酶试验阳性,否则为阴性(图 5-14)。若斜面培养物为非革兰阴性无芽孢杆菌或氧化酶试验阴性,均判供试品未检出铜绿假单胞菌。否则,应进行绿脓菌素试验。

(5) 绿脓菌素(Pyocyanin)试验 取上述培养物,接种于 PDP 琼脂培养基斜面上,培养 24h 后,在试管内加氯仿 3~5ml,搅碎培养基并充分振摇。静置片刻,将氯仿相移至另一试管中,加入 1mol/L 盐酸试液约 1ml,振摇后,静置片刻,观察;如在盐酸溶液层内出现粉红色,为绿脓菌素试验阳性,否则为阴性。同时用未接种的 PDP 琼脂培养基斜面同法做阴性对照试验,阴性对照试验应呈阴性(图 5-13)。

若上述疑似菌为革兰阴性杆菌、氧化酶试验阳性及绿脓菌素试验阳性,判供试品检出铜绿假单胞菌。若上述疑似菌为革兰阴性杆菌、氧化酶试验阳性及绿脓菌素试验阴性,应继续进行适宜的生化试验,确认是否为铜绿假单胞菌。

(6) 适宜的生化试验 ①硝酸盐还原产气试验 挑取纯培养物接入硝酸盐胨水培养基内,37℃培养 24h 观察。凡倒置小管中有气体产生者即为阳性反应。② 41℃生长试验 挑取纯培养物分别接种肉汤琼脂斜面上,40℃±1℃温箱接着 24~48h 后观察有无菌落生长。有菌苔生长为阳性,否则为阴性。③ 液化明胶试验 以接种针沾取营养琼脂斜面培养物,穿刺接种入明胶培养基内,37℃培养 24h 后,取出放置冰箱(4℃)内 10~30min 呈溶液状即为阳性反应,呈凝固状为阴性反应。

5. 金黄色葡萄球菌检查

(1) 增菌培养 取供试液 10ml(相当于供试品 1g、1ml、10cm²)直接或处理后接至

100ml 的亚硝酸钠肉汤（或营养肉汤）培养基中，培养 18~24h，必要时可延至 48h。

(2) 平板划线分离 取上述培养物，划线接种于卵黄氯化钠琼脂培养基（图 5-3）或甘露醇氯化钠琼脂培养基（图 5-4）的平板上，培养 24~72h。若平板上无菌落生长或生长的菌落不同于表 9-16 所列特征，判供试品未检出金黄色葡萄球菌。

表 9-16 金黄色葡萄球菌菌落形态特征

培养基	菌落形态
卵黄氯化钠琼脂	金黄色，圆形凸起，边缘整齐，外围有卵磷脂分解的乳浊圈，菌落直径 1~2mm
甘露醇氯化钠琼脂	金黄色，圆形凸起，边缘整齐，外围有黄色环，菌落直径 0.7~1mm

若平板上生长的菌落与表 9-16 所列的菌落特征相符或疑似，应挑选 2~3 个菌落，分别接种于营养琼脂培养基斜面上，培养 18~24h。取营养琼脂培养基的培养物进行革兰染色，并接种于营养肉汤培养基中，培养 18~24h，做血浆凝固酶试验。

(3) 血浆凝固酶试验 取灭菌小试管 3 支，各加入血浆和无菌水混合液（1:1）0.5ml，再分别加入可疑菌株的营养肉汤培养物（或由营养琼脂培养基斜面培养物制备的浓菌悬液）0.5ml、金黄色葡萄球菌营养肉汤培养液（或由营养琼脂培养基斜面培养物制备的浓菌悬液）0.5ml、营养肉汤或 0.9% 无菌氯化钠溶液 0.5ml，即为试验管、阳性对照管和阴性对照管。将 3 管同时培养，3h 后开始观察直至 24h。当阴性对照管的血浆流动自如，阳性对照管血浆凝固时，试验管血浆凝固者为血浆凝固酶试验阳性，否则为阴性；如阳性对照管或阴性对照管不符合要求时，应另制备血浆，重新试验。

若上述疑似菌为非革兰阳性球菌、血浆凝固酶试验阴性，判供试品未检出金黄色葡萄球菌。

6. 梭菌检查 检查梭菌的方法主要是增菌产毒培养和镜检形态观察，必要时做分离培养过氧化氢酶试验再行鉴定。

(1) 样品的前处理 散剂除去包装，直接称取规定量的样品即可；胶囊除去包装，连壳一起称取规定量样品；软膏剂或栓剂，称取样品 10g，按规定适宜方法乳化，乳化后慢慢加入预热至 45℃ 的 0.9% 无菌氯化钠-蛋白胨溶液，制成 1:20 供试液。量取各 10ml 于 3 支灭菌离心管内，以 3000r/min 离心 30min，弃上层液，保留底部约 2ml 残液。

(2) 增菌培养 取 40ml 新鲜葡萄糖肉培养基 3 管，其中 2 管各加入供试品 0.5g（软膏剂或栓剂加离心底部约 2ml 残液），为试验组，其中 1 管加 0.05ml 新鲜的对照菌液（可采用产气荚膜梭菌、破伤风梭菌或脓毒梭菌的菌液）作为阳性对照组；另 1 管加入稀释液 1ml，为阴性对照组。将 3 管置 80℃ 保温 20min 后迅速冷却，在厌氧条件下培养 72~96h。阴性对照应无菌生长，阳性对照组应为浑浊、碎肉有消化变色并有恶臭等现象。如试验管不出现混浊、产气、消化碎肉、臭气等现象，判供试品未检出梭菌；否则，应进行以下试验。

(3) 分离培养 取试验组培养物 0.2ml，涂抹接种于含庆大霉素的哥伦比亚琼脂培养基平板上，在厌氧条件下培养 48~72h。若无菌落生长，判供试品未检出梭菌；若有菌落生长，取平板上的 2~3 个菌落进行革兰染色、过氧化氢酶试验。

(4) 过氧化氢酶试验 取哥伦比亚琼脂培养基平板上的菌落，置洁净玻片上，滴加

3%过氧化氢溶液,若菌落表面有气泡产生,为过氧化氢酶试验阳性,否则为阴性。梭菌应为过氧化氢酶阴性;同时用枯草杆菌作为过氧化氢酶试验的阳性对照菌。

(5) 结果判断 若试验组的葡萄糖庖肉培养基管出现浑浊、产气、消化碎肉、臭气等现象;哥伦比亚琼脂培养基平板上的菌落为革兰阳性梭菌,有或无卵圆形至球形的芽孢,大于菌体,着生于菌体中央、次端或顶端;过氧化氢酶阴性,判供试品检出梭菌。否则判供试品未检出梭菌。

(6) 注意事项 ① 检验人员应在半个月前注射破伤风类毒素进行免疫,以后每隔6~12个月重复注射1次,加强免疫力。操作时勿损伤皮肤,若有损伤,应立即注射破伤风抗毒素;② 带有活菌和毒素的器具,应彻底灭菌后方可洗涤。

附:梭菌检查用培养基

1. 庖肉培养基

(1) 牛肉碎块的制备 取新鲜牛肉,除去脂肪和筋腱,加水煮沸约10min,切成约 5mm^3 的小块,称重,按1:3(肉:水)加蒸馏水,置4~10℃浸18~20h后,煮沸1h,用白布过滤(滤液即为1:3牛肉浸液),肉渣用自来水漂洗2次,然后加入适量氢氧化钠液,搅拌,使pH在8.4左右,浸泡过夜,次日倾去上层水,用蒸馏水冲洗2~3次,放在纱布上,自动沥干(不要挤压)。将肉渣铺在搪瓷盘上,灭菌,于80~100℃烘干,筛去碎屑,装瓶,保持干燥,备用。

(2) 庖肉培养基的制备 将上述碎肉块装入合适的容器中,再加入营养肉汤培养基,碎肉的量为1.5%,调节pH使灭菌后为 7.3 ± 0.1 。灭菌。

2. 哥伦比亚琼脂培养基

酪蛋白酶消化物	10.0g	肉胃酶消化物	5.0g
胰酶消化物	3.0g	酵母浸出粉	5.0g
玉米淀粉	1.0g	氯化钠	5.0g
琼脂	15.0g	水	1000ml

除琼脂外,取上述成分,混合,微温溶解,调节pH,使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ,加入琼脂,加热溶化后,滤过,分装,灭菌,冷至45~50℃,加入相当于20mg庆大霉素的无菌硫酸庆大霉素,混匀,倾注平皿。

(四) 微生物限度检查结果判断

若供试品的细菌数、霉菌和酵母菌数、控制菌三项检验结果均符合该品种的规定,判供试品符合规定。若供试品检出控制菌或其他致病菌时,按一次检出结果为准,不再复试。判供试品不符合规定。当供试品未检出控制菌或其他致病菌时,若细菌数、霉菌和酵母菌数其中任何一项不符合该品种的规定,应从同一批样品中随机抽样,独立复试两次,若3次结果的平均值符合该品种的规定,判供试品符合规定;否则判不符合规定。

附录:微生物限度标准 《中国药典》(2005年版)(一部)与(二部)均按给药途径制定微生物限度标准。但有所不同,现按全文列出(一部)、(二部)标准。

附（一）《中国药典》（2005年版）（一部）微生物限度标准

非无菌药品的微生物限度标准是基于药品的给药途径、对患者健康潜在的危害以及中药的特殊性而制订的。药品的生产、贮存、销售及新药标准制订、进口药品标准复核、考察药品质量、仲裁及辅料等检验中，除另有规定外，其微生物限度均以本标准为依据。

1. 制剂通则、品种各论中要求无菌的制剂及标示无菌的制剂 应符合无菌检查法规定。

2. 口服给药制剂

2.1 不含药材原粉的制剂 细菌数 每1g不得过1000个。每1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得过100个。大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。

2.2 含药材原粉的制剂 细菌数 每1g不得过10000个（丸剂每1g不得过30000个）。每1ml不得过500个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得过100个。大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。大肠菌群 每1g不得过100个。每1ml不得过10个。

2.3 含豆豉、神曲等发酵成分的制剂 细菌数 每1g不得过100000个。每1ml不得过1000个。霉菌和酵母菌数 每1g不得过500个。每1ml不得过100个。大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。大肠菌群 每1g应少于100个。每1ml应少于10个。

3. 局部给药制剂

3.1 用于手术、烧伤及严重损伤的局部给药制剂 应符合无菌检查法规定。

3.2 用于表皮或黏膜不完整的含药材原粉的局部给药制剂 细菌数 每1g或10cm²不得过1000个。每1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。

3.3 用于表皮或黏膜完整的含药材原粉的局部给药制剂 细菌数 每1g或10cm²不得过10000个。每1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。

3.4 眼部给药制剂 细菌数 每1g或1ml不得过10个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得检出。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。

3.5 耳、鼻及呼吸道吸入给药制剂 细菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过10个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。大肠埃希菌 鼻及呼吸道给药的制剂，每1g、1ml或10cm²不得检出。

3.6 阴道、尿道给药制剂 细菌数 每1g或1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml应小于10个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、梭菌 每1g或1ml不得检出。

3.7 直肠给药制剂 细菌数 每1g或1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。

3.8 其他局部给药制剂 细菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。

4. 含动物组织(包括提取物)及动物类原药材粉(蜂蜜、王浆、动物角、阿胶除外)的口服给药制剂 每10g或10ml还不得检出沙门菌。

5. 有兼用途径的制剂,应符合各给药途径的标准。

6. 霉变、长螨者 以不合格论。

7. 中药提取物及辅料 参照相应制剂的微生物限度标准执行。

附(二)《中国药典》(2005年版)(二部)微生物限度标准

非无菌药品的微生物限度标准是基于药品的给药途径、对患者健康潜在的危害以及中药的特殊性而制订的。药品的生产、贮存、销售及新药标准制订、进口药品标准复核、考察药品质量、仲裁及辅料等检验中,除另有规定外,其微生物限度均以本标准为依据。

1. 制剂通则、品种各论中要求无菌的制剂及标示无菌的制剂 应符合无菌检查法规定。

2. 口服给药制剂

细菌数每1g不得过1000个,每1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数每1g或1ml不得过100个。大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。

3. 局部给药制剂

3.1 用于手术、烧伤及严重损伤的局部给药制剂 应符合无菌检查法规定。

3.2 眼部给药制剂 细菌数 每1g或1ml不得过10个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得检出。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌 每1g或1ml不得检出。

3.3 耳、鼻及呼吸道吸入给药制剂 细菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过10个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。大肠埃希菌 鼻及呼吸道给药的制剂,每1g、1ml或10cm²不得检出。

3.4 阴道、尿道给药制剂 细菌数 每1g或1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml应小于10个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g或1ml不得检出。

3.5 直肠给药制剂 细菌数 每1g不得过1000个,每1ml不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g或1ml不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g或1ml不得检出。

3.6 其他局部给药制剂 细菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。霉菌和酵母菌数 每1g、1ml或10cm²不得过100个。金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每1g、1ml或10cm²不得检出。

4. 含动物组织(包括提取物)及动物类原药材粉(蜂蜜、王浆、动物角、阿胶除外)的口服给药制剂 每10g或10ml不得检出沙门菌。

5. 有兼用途径的制剂,应符合各给药途径的标准。

6. 霉变、长螨者 以不合格论。

7. 中药提取物及辅料 参照相应制剂的微生物限度标准执行。

五、鲜乳中抗生素残留量检验

1. 菌液制备 将嗜热乳酸链球菌移种至脱脂乳(须经113℃灭菌20min)中,经

36.5℃ ± 1.0℃培养 15h 后, 以灭菌脱脂乳 1:1 稀释待用。

2. 样品检验 取鲜乳检样 9ml, 置 16mm × 160cm 试管内, 80℃水浴加热 5min, 冷却至 37℃以下, 加菌液 1ml, 36.5℃ ± 1.0℃水浴加热 2h, 加 4% 2, 3, 5, - 氯化三苯四氮唑 (TTC) 0.3ml, 在 36.5℃ ± 1.0℃水浴中培养 30min 后观察结果。如为阳性, 再于水浴中培养 30min 做第二次观察。每份检样必须做两份。

3. 做阴性和阳性对照 在做检品的同时, 另再做阴性和阳性对照各一份。阳性对照管用无抗生素的乳 8ml 加抗生素及菌液 1ml 和 TTC 0.3ml; 阴性对照管用无抗生素乳 9ml 加菌液 1ml 和 TTC 0.3ml。然后和检样一同培养观察。阳性管应不显色, 阴性管应显色, 否则结果有误应重试。

4. 结果判断 准确培养 30min 观察结果, 如为阳性, 再继续培养 30min 做第二次观察。观察要迅速, 避免光照过久发生干扰。乳中有抗生素存在, 则检样中虽加菌液培养物, 但因细菌的繁殖受到抑制, 因此指示剂 TTC 不还原, 不显色。与此相反, 如果没有抗生素存在, 则加入菌液即行增殖, TTC 被还原而显红色, 也就是说检样呈乳的原色为阳性, 呈红色为阴性。具体显色状态判断标准与检测各种抗生素的灵敏度的内容见表 9-17 和表 9-18。

表 9-17 显色状态判断标准

检品管显色状态	阳性管显色状态	阴性管显色状态	结果判断
未显色者	不显色者	显色者	阳性
微红显色者	不显色者	显色者	可疑
桃红色-红色	不显色者	显色者	阴性

表 9-18 检测各种抗生素的灵敏度

抗生素名称	最低检出量
青霉素	0.004U
链霉素	0.5U
庆大霉素	0.4U
卡那霉素	5U

参考文献

1. 潘友文主编. 现代医药工业微生物实验室质量管理与验证技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004
2. 国家食品药品监督管理局药品安全监督司、药品认证管理中心组织编写. 药品验证指南 (2003). 北京: 化学工业出版社, 2004
3. 中国药品生物检定所编. 中国药品检验标准操作规范. 北京: 中国医药科技出版社, 2001
4. 汪穗福主编. 药品生物检定技术. 北京: 中国医药科技出版社, 1999
5. 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典 (一部) (二部) (2005 年版). 北京: 化学工业出版社, 2005
6. 马绪荣主编. 药品微生物. 北京: 中国医药科技出版社, 1999
7. 崔春英, 安华民编著. 实用抗生素微生物检定技术. 郑州: 中原农民出版社, 1994
8. 中国实验室国家认可委编著. 国家实验室质量体系内部审核员培训教程. 北京: 经济科学出版社, 2000
9. 汪穗福, 何慧贞. 教学用细菌保存方法改良. 广州医药, 1994, (1): 46
10. 汪穗福, 张丽芳, 等. 介绍一种简便实用的菌种保藏方法. 微生物学研究与应用. 1993, (4:) 封 3
11. 沈 萍, 彭珍荣主译. 微生物学 (第 5 版) 中文版. 北京: 高等教育出版社, 2003
12. [日] 微生物研究法讨论会编. 微生物学实验法. 北京: 科学出版社, 1981
13. 洪秀华主编. 临床微生物学和微生物检验实验指导. 人民卫生出版社, 2002
14. 中华人民共和国国家标准 (GB/T 4789. 27 - 2003). 食品卫生微生物学检验鲜乳中抗生素残留量检验. 中华人民共和国卫生部; 中国国家标准化管理委员会发布



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCCP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE