

# 无菌、微生物程度检验 及措施验证

# 微生物试验室的质量管理

## 一、试验室设施与设备和管理（法规要求）

- 无菌检验、微生物程度检验与抗生素微生物检定的试验室，应严格分开。
  - 无菌检验、微生物程度检验试验室分无菌操作间和缓冲间。
  - 无菌操作间应具有相应的空调净化设施和环境，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施。
  - 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，并定时检测洁净度。
  - 无菌操作间内禁放杂物，并应制定地面、门窗、墙壁、设施等的定时清洁、灭菌规程。
- 无菌检验在洁净度100级单向流空气区域内进行，其全过程应严格遵守无菌操作，预防微生物污染。单向流空气区与工作台面，必须进行洁净度验证。微生物程度检验的全过程，均应遵守无菌操作，严防再污染。

# 微生物试验室的质量管理

为满足微生物学试验要求，微生物试验室应具有：

- 严格分开的无菌检验、微生物程度检验、无菌采样室。
- 菌种处理与微生物鉴别室有局部百级措施。
- 各自分开的抗生素微生物检定、细菌内毒素检验、抗菌作用测定半无菌室。
- 培养室（一般为100，000级）。
- 试液及培养基的配制室。
- 灭菌室。
- 试验器皿洗涤、烘干室。
- 人员办公休闲室。
- 试验用具、易耗品储备室。

# 微生物实验室的质量管理

- 设施和设备的管理
- 特殊原则品——菌种
- 培养基、缓冲液、试剂
- 消毒剂
- 文件管理
- 培训
- 内审

# 微生物实验室的质量管理

- 微生物室试验室的质量管理制定
- 洁净室（无菌室）的使用管理规程（SOP）
- 菌种处理有关的原则操作规程（SOP）
- 生物安全柜的使用原则操作规程（SOP）
- 带菌废弃物的处理原则操作规程（SOP）
- 环境消毒原则操作规程（SOP）
- 环境清洁、消毒原则操作规程（SOP）
- 试液及培养基配制的原则操作规程（SOP）
- 试验器皿洗涤原则操作规程（SOP）
  
- 建立无菌室使用登记册
  - 使用日期，时间，使用人，设备运转情况，温、湿度，洁净度情况（沉降菌数、浮游菌数、尘埃粒子数），报修原因，报修成果，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

# 微生物试验室的质量管理

## 试验室使用管理

每天工作前用消毒液消毒工作台，开紫外灯（至少半小时）进行空气消毒，每月定时做彻底清洁工作，适当初用消毒剂进行熏蒸。

非必要品禁止带入试验室，必要资料 and 统计应消毒后进入并应远离操作台。试验人员进入洁净室（无菌室）不得化妆、戴手表、戒指等首饰；不得吃东西。应严格按更衣程序更衣。

统计温湿度是否在要求的范围内，每次试验时，对操作室和层流台做微生物沉降菌落计数并统计；如发觉问题应找原因，及时报修和报告并将报修原因和成果统计归档。如遇停电，应立即停止试验，重新进入无菌室前，至少开启机房运转1小时以上。

在每次试验结束时，应用消毒剂及时按消毒规程中的要求消毒操作台和洁净室（区），并开启室内紫外灯以杀灭存留微生物。

使用后的器具如平皿、试管，全部微生物培养物，染菌/带菌物品等应用消毒液浸泡（至少二十四小时以上），经煮沸或灭菌后清洗或丢弃。

# 微生物试验室的质量管理

## ● 洁净室（无菌室）的使用管理

- 每季度定时进行清洁度再验证，以确保洁净度符合要求，保存原始统计及趋势分析资料，定时归档保存。
- 至少每年一次定时更换新的紫外灯管并统计，以确保紫外灯管灭菌连续有效，定时归档保存。
- 至少2年1次，或按洁净度验证明际情况，定时更换初效、中效、高效头。以确保净化系统的功能连续有效，并同步在使用登记本上做好更换统计。定时归档保存。
- 平时试验室内应尽量降低人员的走动或活动，通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。
- 发觉洁净度不符合要求时，应立即停止使用，寻找原因，彻底清洁、消毒，须经清洁度再验证符合要求后，才再使用，并将情况统计在无菌室使用登记册上，定时归档保存。
- 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应进行指导和监督。

# 微生物试验室的质量管理

## 一、试验室设施与设备和管理

- 设施—洁净室、净化工作台、生物安全柜。
- 设备—高压蒸汽灭菌器、电热恒温干烤箱、培养箱、冰箱。
- 试验仪器—全封闭薄膜过滤装置、电动匀浆仪、电热恒温水浴箱、离心机、显微镜，及刻度吸管、试管、三角烧瓶、培养皿等。
- 建立主要设施、设备、仪器的明细统计，内容涉及名称、型号、生产厂家、购置日期。
- 质量确保档案：购置发票、安装验收或开箱验收统计、调试统计、计量检定或运营校验合格证、指定专人负责、制定原则操作规程（SOP）、建立使用登记册，维修、保养统计、改造或更新统计、直至报废统计。



# 微生物试验室的质量管理

## 一、试验室设施与设备和管理

1. 定时监测生物安全柜和（或）超净工作台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）。使用时检验压差指示表。
2. 培养箱、冰箱需在设备的每个腔室内放置经校准过的玻璃温度计，每天检验设备腔室内的温度情况而且在日志上做好相应的统计。定时回忆每个设备的温度统计数据，以考察设备的运营状态。
3. 定时用中性的清洁剂或消毒剂清洗培养箱（或室）、冷藏箱（或室）、冷冻冰箱及水浴的腔室内表面。
4. 高压灭菌柜、电热恒温干燥箱等需要验证和连续监控。
5. 仪器的校准和确认。

# 微生物试验室的质量管理

## 需要确认和验证试验和连续的质量监控的设备

涉及：高压灭菌柜、除热源电热恒温干燥箱、自动微生物鉴别系统和计数系统。

- 高压灭菌柜和电热恒温干燥去热原烘箱
- 安装确认（IQ）：要确认控制系统及其他仪器仪表的设计是否得当并经过校验。检验有关共用介质（如蒸气、水和空气等）符合灭菌工艺的要求。
- 运营确认（OQ）：要求证明空载状态下验证方案中所述腔室内全部关键位置的温度是否均处于要求范围内。建立热分布图谱。空载状态下，湿热灭菌当腔室工作温度不低于121℃时，各点温度与腔室内平均温度之差不超出±1℃，干热除热源，当运营温度不低于250℃时，腔室内的温差应不得超出±15℃。
- 性能确认（PQ）：要求在满载条件，温度探头插入待灭菌物品的内部，同步加入一定浓度的微生物或独立的生物指示剂。
- 对不同的工艺条件（物品、包装和装载方式、灭菌参数等），分别进行性能确认试验，涉及热穿透试验和生物指示剂挑战试验。

# 微生物实验室的质量管理

## ● 清洁、消毒剂的管理

- 品种：5~20倍稀释的碘伏水溶液
  - 0.10%新洁尔灭轻易
  - 1:50的84消毒液
  - 75%乙醇溶液
  - 3%碘酒溶液
  - 5%石碳酸（来苏儿）消毒溶液
  - 2%戊二醛水溶液
  - 尼泊金酒精消毒液等
- 应定时更换消毒剂品种，按原则精确配制。

# 微生物实验室的质量管理

## 一、菌种的保存与管理

### 1. 菌种—特殊的原则品

应保持其生长特征和降低污染，是微生物试验成果一致性的主要确保。

### 2. 制定菌种保藏管理制度

微生物实验室应制定菌种的保藏管理规程来规范菌种的起源、申购、保管、转种传代、存储和领用等方面的要求，确保菌种的溯源性和稳定性；预防试验用菌种因屡次传代而失去经典生物学特征发生变异或死亡，确保菌种长久正确、稳定，从而确保试验的敏捷度和重现性。

菌种名称：金黄色葡萄球菌

菌种系列号：[CMCC(B)26003]

传代次数：第 4 代

有效期：       年    月    日

制备日期：     年    月    日

传代人：王熙凤

# 微生物试验室的质量管理

- 菌种保存应有专人负责，加锁保存于冰箱中。
- 试验室的原则菌株应来自**CMCC**（中国药物生物制品检定所医学菌种保藏中心）或**ATCC**（美国菌种保藏中心）等国际法定菌种保藏机构。有接受、确认统计。
- 菌种的转种等均应在超净工作台进行，以防污染。
- 多种菌种应按要求时间接种，全部保藏的菌种均应贴有相应的标签，有菌种清单。

# 验证明验常用菌种

- 枯草芽孢杆菌 [CMCC (B) 63501]
- 金黄色葡萄球菌 [CMCC (B) 26003]
- 生孢梭菌 [CMCC (B) 64941]
- 铜绿假单胞菌 [CMCC (B) 10104]
- 大肠埃希菌 [CMCC (B) 44102]
- 乙型副伤寒沙门菌 [CMCC (B) 50094]
- 白色念珠菌 [CMCC (B) 98001]
- 黑曲霉 [CMCC (B) 9 003]

# 菌种保藏环节

- ① 干燥菌种复苏，划平板
- ② 挑选特征经典的纯菌菌落；（制菌悬液使用）
- ③ 拟定保藏的合格菌体形态；
- ④ 选择最合适的保存措施，定时对保藏菌种进行检验，观察是否发生变化，若有变化，须变化保藏措施。保藏期满应及时进行移种。

# 菌种的接受

- ① 原则菌种一般是玻璃安平装的冻干粉剂
- ② 接受时应检验名称/数量和完整性。
- ③ 贴好标签后储存于-20℃
- ④ 一般安平冻干品可在5年之内使用
- ⑤ 使用时应按（菌种保藏中心提供的）有关资料的要求进行复溶、培养和保存。



# 菌种的复活

## ● 菌种的复活

- 用70%的酒精擦拭清洁安瓿，自然风干
- 用一小砂轮在安瓿的上部划一条线，用手轻轻将安瓿开
- 无菌操作，用一无菌吸管无菌移取1~2ml合适的液体培养基到瓶中；
- 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；
- 用无菌吸管将安瓶内菌液转移到相应的液体培养基中，
- 根据不同菌种类型而将其培养于相宜的温度下24-72小时。

## ● 菌种确实认      菌种复活后，应确认菌种的纯度与特征

- 从培养肉汤中取细菌培养物接种到平板上，上划线分离出单个菌落。
- 培养后观察其是否具有经典的菌落形态
- 然后挑取单一的纯菌落，进行革兰染色、镜检，观察其染色特征及菌形。
- 最终再做生化试验以进一步鉴定该菌种，或用API鉴定系统做鉴定工作。
- 对已经过鉴定确认的菌种就能够进行菌种的传代和保藏了。

# 菌种的传代和保藏

## ● 菌种的保藏措施

- 使菌种的代谢处于最不活跃或相对静止的状态，从而在一定时间内不发生变异并保持生命活力。
- 一般来说，低温、干燥和隔绝空气是使微生物代谢能力降低的三个主要原因
- 不论使用那种菌种保藏措施，都应进行验证，以确保在相应保存条件下的菌种不会变异而且性能稳定。
- 菌种的传代次数（自原始菌种冻干粉起）不得超出**5代**（**GMP**，药典）
- 将微生物接种至一新鲜培养基上/内，每萌发一次即称为“一代”。

# 冷冻真空干燥保藏法

主要是将待保藏菌种混于有保护作用介质内制成菌液，分装在安瓿中于冷冻条件下使其迅速冻结，因冻结可使晶型细致，不致损伤活菌细胞。然后用真空抽气减压，是安瓿内的冰晶液体升华，水气迅速被真空抽走，冰晶型的菌液不久变成疏松的干燥固体物，最终在真空状态下熔封管口，使干燥物在局部真空条件下封存，并置冷暗处，在很长时间内菌种仍可维持活力不变。

# 甘油冷冻管保藏法

- 将待保藏菌接种至平板或琼脂斜面，培养
- 用无菌接种环轻轻刮取菌台，用接种环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。
- 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佳在-30℃条件下贮存。
- 使用期至少为2年。
- 氧细菌和酵母菌可用此法保藏，霉菌和厌氧菌则不适于用此法保藏。

# 液体石蜡覆盖保藏法

- 将菌种穿刺接种于半固体高层培养基中培养，
- 无菌操作在层流台下用无菌吸管吸收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2~8℃冰箱中或室温下保存，如铜绿假单胞菌。
- 此法保藏霉菌、放线菌、芽胞杆菌可保藏两年以上，酵母菌可保藏1~2年，一般无芽胞细菌也可保藏1年左右。
- 此法制备简朴，不需要其他特殊设备，而且效果好，是传代培养的变相措施，可合适延长保藏时间。

# 琼脂斜面低温保藏法保藏法（厂家常用）

- 将菌种接种在合适的固体斜面培养基上，生长充分后，移至2~8℃冰箱中保藏。
- 保藏时间：
  - 霉菌、放线菌及芽胞的菌保存2~4个月，移种一次；
  - 酵母菌2个月移种一次；
  - 细菌最佳每1月移种一次。
- 优点：操作简朴，使用以便，不需特殊设备，对大多数微生物都适用。
- 缺陷：保藏期太短；传代次数多，易发生变异及污染。
- 此法为试验室工作用菌种的最常用的保藏措施，仅能用于工作用菌种的短期保藏。

# 保藏芽胞液对

- 产芽胞的微生物宜制成芽胞菌悬液后再保藏，
- 无菌操作，取1ml孢子液接入茄形瓶或培养皿内，轻轻转动使菌液均匀分布于培养基表面。
- 将培养皿在合适的温度下培养。一般需要7天或更长时间
- 在层流台下，取3~5ml氯化钠磷酸盐缓冲液（pH7.0）加入培养皿内
- 用无菌玻璃L棒轻轻刮下菌苔，注意不要划破培养基。
- 用无菌注射器或无菌吸管吸收菌悬液，搜集于试管中。
- 将搜集的芽胞液放在80~90℃水浴中加热15分钟，冷却。
- 做好标识，放至2~8℃冰箱中保藏。原始芽胞液可保存1年。
- 每次使用前用平皿法重新标定其浓度。

# 微生物菌种的传代保藏过程

按菌种说明书要求复溶菌粉菌（原则菌株），转种于适当的增菌培养基内（此为第一代**G1**），复壮后转接至平板上，并于适当温度下培养适当初间，分离出单个纯种菌落（此为第二代**G2**）

菌种鉴定完毕后，挑取纯菌落制成浓菌悬液用于制备甘油冷冻管，冷冻或低温保存（原则贮备菌株**G2**）；同时挑取纯菌落转接斜面菌种作为工作用菌种（工作菌株**W3**），于适当温度下培养适当初间后可用于试验，直至转为**W5**为止，需重新开启安瓶，再重复上述操作程序。

- 菌种被分为两类，传代用菌种和工作用菌种，
- 传代用菌种（原则贮备菌株）用甘油冷冻管法保藏
- 工作用菌种（工作菌株）用斜面低温保藏法保藏



# 试验用菌液的制备

传代：取菌液0.1ml接种至10ml液体培养基，按规定培养、稀释  
对照用菌种在使用过程中，亦应检验其生物学特征。如菌落形态（在可能情况下，用选择性培养基进行生长检验）、革兰染色、镜检菌体形态、主要生化特征（必要时应作菌种鉴定实验）。如发现染菌或变异，衰退等现象时，应及时处理。

为保证试验的可靠性和准确性，实验室还应严格按摄影关规程制备和使用菌种，并对每种微生物的存贮条件（需/厌氧状态、温度和时间）进行确认。

室温下菌悬液应在制备后的2小时内使用

低温保存（2-8℃）时

细菌和酵母菌的菌悬液应在制备后的二十四小时内使用

霉菌孢子液则应在制备后的7天内使用（黑曲霉孢子悬液可保存在2~8℃，在验证过的贮存期内使用）

在使用时（在二十四小时之内）均应同步进行菌数复核检验。

- 试验时可采用分光光度法或麦氏比浊法估计菌液浓度。

## 菌种的制备、保藏和使用统计

1、菌种名称\_\_\_\_\_菌种系列号\_\_\_\_\_菌种起源\_\_\_\_\_  
 试验室编号\_\_\_\_\_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\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 纯化分离鉴定成果\_\_\_\_\_操作人\_\_\_\_\_日期\_\_\_\_\_

3、菌种保藏措施\_\_\_\_\_保藏数量\_\_\_\_\_保藏用培养基\_\_\_\_\_批号\_\_\_\_\_  
 培养条件 温度\_\_\_\_\_时间\_\_\_\_\_使用期\_\_\_\_\_操作人\_\_\_\_\_日期\_\_\_\_\_

### 4、菌种使用统计

序号	支取日期	数量	操作人	用途	处理

当菌种超出使用期或被污染后来应灭菌后丢弃。

是

否

阐明：试验室菌种编号原则：名称+传代代数+制备日期

# 培养基管理

- 一般采用购自中国药物生物制品检定所合格的商品脱水培养基。同步按照使用说明书进行配制，需注意培养基的pH值应符合要求，不然必须校正后，按说明书要求灭菌。
- 商品脱水培养基应在使用期内使用，使用前应注意核对名称，检验外观，遇有结块、吸潮现象，应废弃。
- 新鲜培养基的配制，应按质量原则要求的配方进行，对培养基的原材料要进行挑选，试剂应为化学纯试剂规格。制成的培养基要求无沉淀。必要时以合适措施过滤，调整pH值，分装灭菌备用。
- 灭菌：应经验证合格的灭菌程序（一定装载方式下灭菌措施和条件）。
- 验证：无菌性试验，促生长试验，灭菌器蒸汽循环系统。

# 培养基的质量控制

- 建立质量控制程序
- 全部配好的培养基均需进行质量控制（pH、合用性检验试验）
- 培养基使用期确实定：定时的稳定性检验以拟定使用期（2~25℃，避光，非密闭容器3周内使用，密闭容器1年内使用）。
- 质量控制的频率：用同1批脱水培养基，采用经验证的配制和灭菌措施制备的培养基，可只做1次敏捷度检验。
- 质量控制菌株的选择（营养、敏捷、代表性）
- 对无菌培养基的无菌性、敏捷度检验
- 与对照培养基进行比较
- 无菌检验用需气厌气培养基的指示剂氧化层不得超出培养基深度的1/5，不然须经水浴煮沸10分钟，但只限加热一次。无菌检验结束时，指示剂氧化层应不超出培养基深度的1/2。
- 大肠埃希菌检验用MUG培养基配制前应挑选无荧光的试管进行配制，观察成果时应应用同批培养基配制的空白管和阳性菌管同步观察。

# 培养基的敏捷度检验： 已知菌生长试验

①细菌组：  
取每管装量为12ml硫乙醇酸盐液体培养基9支，分别接种不大于100cfu试验菌各2支；

菌种：  
金黄色葡萄球菌  
铜绿假单胞菌  
枯草芽孢杆菌  
生孢梭菌

空白对照：另一支不接种，培养24~72小时逐日观察成果

②霉菌组：  
取每管装量为9ml的改良马丁液体培养基5支，分别接种不大于100cfu试验菌各2支；

菌种：  
白色念珠菌  
黑曲霉

空白对照：另一支不接种，培养5天逐日观察成果

## ● 成果鉴定

空白管培养基无菌生长

加菌的培养基管均生长良好

判敏捷度检验合格。

# 培养基管理

- 配制好的培养基，按无菌要求进行灭菌。
- 培养基的配制须有统计，统计内容具有：
  - a) 配制日期和配制人员的标识；
  - b) 培养基/溶液的类型、体积；
  - c) 成份、每个成份物质的含量、制造商、批号；
  - d) pH（最初和最终）值
  - e) 无菌措施，涉及实施的方式、时间和温度。
- 按日期编制灭菌后的培养基编号
- 将制备完毕的培养基按品种放置在阴凉的指定位置，备用。注意保存期

# 灭菌法

- a. 湿热高压蒸汽灭菌法：依115℃、121℃或132℃，应用于培养基灭菌、试验器械、工作服、橡胶物品和试验室废弃物，也可用于玻璃器皿的灭菌。  
一般121℃30min
- b. 干热法：利用物理学，171℃-1小时，160℃-2小时、121℃-3小时：玻璃器皿

湿热：蛋白质轻易凝固

干热：氧化

# 检验措施学验证：

- 在化学测试中，药物的测定措施需要验证，与此相应，当建立药物的无菌、微生物程度检验法时，也应进行分析措施的验证，以证明所采用的措施适合于该产品的无菌、微生物程度检验。
- 证明采用药典的某种措施和检验条件，在该供试品的检验量、检验条件下，无抑菌活性或活性已消失，确保检验成果的精确性。



# 检验措施学验证：

- 验证时机；
- 建立检验措施时；
- 修订检验措施时；
- 组分和检验条件发生变更时；
- 定时再验证。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/715103023004011324>