

附录 XIII C 微生物限度检查法

微生物限度检查法系检查非规定灭菌制剂及其原料、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环境洁净度 10000 级下的局部洁净度 100 级的单向流空气区域内进行。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。

供试品检查时，如果使用了表面活性剂、中和剂或灭活剂，应证明其有效性及对微生物无毒性。

除另有规定外，本检查法中细菌及控制菌培养温度为 $30^{\circ}\text{C}\sim 35^{\circ}\text{C}$ ；霉菌、酵母菌培养温度为 $23^{\circ}\text{C}\sim 28^{\circ}\text{C}$ 。

检验结果以 1g、1ml、10g、10ml、 10cm^2 为单位报告，特殊品种可以最小包装单位报告。

检验量

检验量即一次试验所用的供试品量（g、ml 或 cm^2 ）。

除另有规定外，一般供试品的检验量为 10g 或 10ml；膜剂为 100cm^2 ；贵重药品、微量包装药品的检验量可以酌减。要求检查沙门菌的供试品，其检验量应增加 20g 或 20ml（其中 10g 用于阳性对照试验）。

检验时，应从 2 个以上最小包装单位中抽取供试品，大蜜丸还不得少于 4 丸，膜剂还不得少于 4 片。

一般应随机抽取不少于检验用量（两个以上最小包装单位）的 3 倍量供试品。

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。供试液制备若需加温时，应均匀加热，且温度不应超过 45°C 。供试液从制备至加入检验用培养基，不得超过 1 小时。

除另有规定外，常用的供试液制备方法如下。

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 的供试液。油剂可加入适量的无菌聚山梨酯 80 使供试品分散均匀。水溶性液体制剂也可用混合的供试品原液作为供试液。

2. 固体、半固体或黏稠性供试品

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 的供试液。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 的供试液。

方法 2 取供试品 10g，加至含 20ml 无菌十四烷酸异丙酯（制法见附录 X III B 无菌检查法中供试品的无菌检查项下）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 5～10 分钟，萃取，静置使油水明显分层，取水层作为 1：10 的供试液。

(2) 膜剂供试品

取供试品 100cm²，剪碎，加 100ml 的 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液（必要时可增加稀释液），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 的供试液。

(4) 气雾剂、喷雾剂供试品

取规定量供试品，置冰冻室冷冻约 1 小时，取出，迅速消毒供试品开启部位，用无菌钢锥在该部位钻一小孔，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) 贴膏剂供试品

取规定量供试品，去掉贴膏剂的保护层，放置在无菌玻璃或塑料片上，粘贴面朝上。用适宜的无菌多孔材料（如无菌纱布）覆盖贴剂的粘贴面以避免贴剂粘贴在一起。然后将其置于适宜体积并含有表面活性剂（如聚山梨酯 80 或卵磷脂）的稀释剂中，用力振荡至少 30 分钟，制成供试液。贴膏剂也可以其他适宜的方法制备成供试液。

(6) 具抑菌活性的供试品

当供试品有抑菌活性时，采用下列方法进行处理，以消除供试液的抑菌活性后，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，至较大的培养基中，使单位体积内的供试品含量减少，至不含抑菌作用。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 离心沉淀法 取一定量的供试液，500 转/分离心 3 分钟，取全部上清液混合，用于细菌检查。

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。

细菌、霉菌及酵母菌计数

计数培养基的适用性检查

细菌、霉菌及酵母菌计数用的培养基应进行培养基的适用性检查，成品培养基、由脱水培养基或按培养基处方配制的培养基均应检查。

菌种 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代（从菌种保存中心获得的冷冻干燥菌种为第 0 代）。试验用菌种应采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试

验菌株的生物学特性。

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) (CMCC (B) 44 102)

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (CMCC (B) 26 003)

枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (CMCC (B) 63 501)

白色念珠菌 (*Candida albicans*) (CMCC (F) 98 001)

黑曲霉 (*Aspergillus niger*) (CMCC (F) 98 003)

菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基或营养琼脂培养基中，培养 18~24 小时；接种白色念珠菌的新鲜培养物至改良马丁培养基或改良马丁琼脂培养基中，培养 24~48 小时。上述培养物用 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数为 50~100cfu 的菌悬液。接种黑曲霉的新鲜培养物至改良马丁琼脂斜面培养基中，培养 5~7 天，加入 3~5ml 含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液，将孢子洗脱。然后，用适宜方法吸出孢子悬液至无菌试管内，用含 0.05% (v/v) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液制成每 1ml 含孢子数 50~100cfu 的孢子悬液。

菌悬液在室温下放置应在 2 小时内使用，若保存在 2~8℃ 可在 24 小时内使用。黑曲霉孢子悬液可保存在 2~8℃，在验证过的贮存期内使用。

适用性检查 取大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌各 50~100cfu，分别注入无菌平皿中，立即倾注营养琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 30~35℃ 培养 48 小时，计数；取白色念珠菌、黑曲霉各 50~100cfu，分别注入无菌平皿中，立即倾注玫瑰红钠琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 23~28℃ 培养 72 小时，计数；取白色念珠菌 50~100cfu，注入无菌平皿中，立即倾注酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂培养基，平行制备 2 个平皿，混匀，凝固，置 23~28℃ 培养 72 小时，计数。同时，用相应的对照培养基替代被检培养基进行上述试验。

结果判定 被检培养基上的菌落平均数与对照培养基上的菌落平均数的比值大于 70%，且菌落形态大小应与对照培养基上的菌落一致。判该培养基的适用性检查符合规定。

计数方法的验证

当建立产品的微生物限度检查法时，应进行细菌、霉菌及酵母菌计数方法的

验证，以确认所采用的方法适合于该产品的细菌、霉菌及酵母菌数的测定。若产品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时，计数方法应重新验证。

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。

菌种及菌液制备 同计数培养基的适用性检查

验证方法 验证试验至少应进行 3 次独立的平行试验，并分别计算各试验菌每次试验的回收率。

(1) **试验组** 平皿法计数时，取试验可能用的最低稀释级供试液 1ml 和 50~100cfu 试验菌，分别注入平皿中，立即倾注琼脂培养基，每株试验菌平行制备 2 个平皿，按平皿法测定其菌数。薄膜过滤法计数时，取规定量试验可能用的最低稀释级供试液，过滤，冲洗，在最后一次的冲洗液中加入 50~100cfu 试验菌，过滤，按薄膜过滤法测定其菌数。

(2) **菌液组** 测定所加的试验菌数。

(3) **供试品对照组** 取规定量供试液，按菌落计数方法测定供试品本底菌数。

(4) **稀释剂对照组** 若供试液制备需要分散、乳化、中和、离心或薄膜过滤等特殊处理时，应增加稀释剂对照组，以考察供试液制备过程中微生物受影响的程度。试验时，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 供试液含 50~100cfu，按试验组的供试液制备方法和菌落计数方法测定其菌数。

结果判断 在 3 次独立的平行试验中，稀释剂对照组的菌回收率（稀释剂对照组的平均菌落数占菌液组的平均菌落数的百分率）应均不低于 70%。若试验组的菌回收率（试验组的平均菌落数减去供试品对照组的平均菌落数的值占菌液组的平均菌落数的百分率）均不低于 70%，照该供试液制备方法和计数法测定供试品的细菌、霉菌及酵母菌数；若任一次试验中试验组的菌回收率低于 70%，应采用培养基稀释法、离心沉淀法、薄膜过滤法、中和法（表 1）等方法或联合使用这些方法消除供试品的抑菌活性，并重新进行方法验证。

表 1 常见干扰物的中和剂或灭活方法

干扰物	可选用的中和剂或灭活方法
戊二醛	亚硫酸氢钠

酚类、乙醇、吸附物	稀释法
醛类	稀释法、甘氨酸、硫代硫酸盐
季铵类化合物（QACs）、对羟基苯甲酸酯、	卵磷脂、聚山梨酯
汞类制剂	亚硫酸氢钠、巯基乙酸盐、硫代硫酸盐
双胍类化合物	卵磷脂
碘酒、洗必泰类	聚山梨酯
卤化物	硫代硫酸盐
乙二胺四乙酸（EDTA）	镁或钙离子
磺胺类	对氨基苯甲酸
β-内酰胺类抗生素	β-内酰胺酶

若没有适宜的方法消除供试品中的抑菌作用，那么验证试验中微生物回收的失败可看成是因供试品的抗菌活性引起的，同时表明该供试品不能被试验菌污染。但是，供试品也可能仅对试验用菌株具有抑制作用，而对其他菌株没有抑制作用。因此，根据供试品须符合的微生物限度标准和菌数报告规则，在不影响检验结果判断的前提下，应采用能使微生物生长的更高稀释级的供试液进行方法验证试验。若验证试验符合要求，应以该稀释级供试液作为最低稀释级的供试液进行供试品检验。

计数方法验证时，采用上述方法若还存在一株或多株试验菌的回收率达不到要求，那么选择回收情况最接近要求的方法和试验条件进行供试品的检验。

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。

供试品检查

计数方法包括平皿法和薄膜过滤法。检查时，按已验证的计数方法进行供试品的细菌、霉菌及酵母菌菌数的测定。

按计数方法的验证试验确认的程序进行供试液制备。用稀释液稀释成 1：10、1：10²、1：10³等稀释级的供试液。

1. 平皿法

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 个平板。

阴性对照试验 取试验用的稀释液 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。

培养和计数 除另有规定外，细菌培养 3 天，霉菌、酵母菌培养 5 天。逐日观察菌落生长情况；点计菌落数。必要时，可适当延长培养时间至 7 天进行菌落计数并报告。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。若同稀释级两个平板的菌落平均数不小于 15，则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 细菌、酵母菌宜选取平均菌落数小于 300cfu、霉菌宜选取平均菌落数小于 100cfu 的稀释级，作为菌数报告（取两位有效数字）的依据。以最高的平均菌落数乘以稀释倍数的值报告 1g、1mL 或 10cm² 供试品中所含的菌数。

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 <1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

2. 薄膜过滤法

采用薄膜过滤法，滤膜孔径应不大于 0.45 μm，直径一般为 50mm，若采用其它直径的滤膜，冲洗量应进行相应的调整。选择滤膜材质时应保证供试品及其溶剂不影响微生物的充分被截留。滤器及滤膜使用前应采用适宜的方法灭菌。使用时，应保证滤膜在过滤前后的完整性。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。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。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不超过 100ml，总冲洗量不得超过 1000ml，以避免滤膜上的微生物受损伤。

取相当于每张滤膜含 1g、1ml 或 10cm² 供试品的供试液，加至适量的稀释剂中，混匀，过滤；若供试品每 1g、1ml 或 10cm² 所含的菌数较多时，可取适宜稀释级的供试液 1ml 进行试验。用 pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液或其他适宜的冲洗液冲洗滤膜，冲洗方法和冲洗量同“计数方法的验证”。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。每种培养基至少制备一张滤膜。

阴性对照试验 取试验用的稀释液 1ml 照上述薄膜过滤法操作，作为阴性对照。阴性对照不得有菌生长。

培养和计数 培养条件和计数方法同平皿法，每片滤膜上的菌落数应不超过 100 个。

菌数报告规则 以相当于 1g、1ml 或 10cm² 供试品的菌落数报告菌数；若滤膜上无菌落生长，以 <1 报告菌数（每张滤膜过滤 1g、1ml 或 10cm² 供试品），或 <1 乘以最低稀释倍数的值报告菌数。

控制菌检查

控制菌检查用培养基的适用性检查

控制菌检查用的培养基应进行培养基的适用性检查，成品培养基、由脱水培养基或按培养基处方配制的培养基均应检查。检查项目包括培养基的促生长、指示和抑制特性能力。

菌种 对试验菌种的要求同计数培养基的适用性检查。

大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) (CMCC (B) 44 102)

金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) (CMCC (B) 26 003)

乙型副伤寒沙门菌 (*Salmonella paratyphi* B) (CMCC (B) 50 094)

铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) (CMCC (B) 10 104)

生孢梭菌 (*Clostridium sporogenes*) (CMCC (B) 64 941)

白色念珠菌 (*Candida albicans*) (CMCC (F) 98 001)

菌液制备 接种大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、乙型副伤寒沙门菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物至营养肉汤培养基或营养琼脂培养基中，生孢梭菌的新鲜培养物至硫乙醇酸盐流体培养基中，培养 18~24 小时；接种白色念珠菌的新鲜培

养物至改良马丁培养基或改良马丁琼脂培养基中，培养 24~48 小时。用 0.9%无
菌氯化钠溶液制成每 1ml 含菌数为 10~100cfu 的菌悬液。

菌悬液在室温下放置应在 2 小时内使用，若保存在 2~8℃可在 24 小时内使
用。

适用性检查 控制菌检查用培养基的适用性检查所用的菌株及检测项目见
表 2 。

控制菌检 查	培养基	特性	试验菌株
大肠埃希菌	胆盐乳糖培养基	促生长能力	大肠埃希菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	MUG 培养基	促生长能力+指示 能力	大肠埃希菌
	曙红亚甲蓝琼脂或麦康凯琼 脂	促生长能力+指示 能力	大肠埃希菌
大肠菌群	乳糖胆盐发酵培养基	促生长能力	大肠埃希菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	乳糖发酵培养基	促生长能力+指示 能力	大肠埃希菌
	曙红亚甲蓝琼脂或麦康凯琼 脂	促生长能力+指示 能力	大肠埃希菌
沙门菌	营养肉汤	促生长能力	乙型副伤寒沙门 菌
	四硫磺酸钠亮绿培养基	促生长能力	乙型副伤寒沙门 菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	胆盐硫乳琼脂或沙门、志贺 氏属琼脂	促生长能力+指示 能力	乙型副伤寒沙门 菌
	曙红亚甲蓝琼脂或麦康凯琼	促生长能力+指示	乙型副伤寒沙门

	脂	能力	菌
铜绿假单胞菌	胆盐乳糖培养基	促生长能力	铜绿假单胞菌
		抑制能力	金黄色葡萄球菌
	溴化十六烷基三甲铵琼脂	促生长能力	铜绿假单胞菌
		抑制能力	大肠埃希菌
	绿脓菌素测定用培养基	促生长能力+指示能力	铜绿假单胞菌
金黄色葡萄球菌	亚碲酸盐肉汤培养基	促生长能力	金黄色葡萄球菌
		抑制能力	大肠埃希菌
	卵黄氯化钠琼脂培养基或甘露醇盐琼脂	促生长能力+指示能力	金黄色葡萄球菌
		抑制能力	大肠埃希菌
梭菌	梭菌增菌培养基	促生长能力	生孢梭菌
	哥伦比亚琼脂	促生长能力	生孢梭菌
白色念珠菌	沙氏葡萄糖肉汤	促生长能力	白色念珠菌
	沙氏葡萄糖琼脂	促生长能力+指示能力	白色念珠菌
	念珠菌显色培养基	促生长能力+指示能力	白色念珠菌
		抑制能力	大肠埃希菌
	吐温 80 玉米琼脂培养物	促生长能力+指示能力	白色念珠菌

增菌培养基促生长能力检查：分别接种不大于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基中，在相应控制菌检查规定的培养温度及最短培养时间下培养。与对照培养基管比较，被检培养基管试验菌应生长良好。

固体培养基促生长能力检查：取试验菌各 0.1ml（含菌数 50~100cfu）分别涂布于被检培养基和对照培养基平板上，在相应控制菌检查规定的培养温度及最短培养时间下培养。被检培养基与对照培养基生长的菌落大小形态特征应一致。

培养基抑制能力检查：接种不少于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基

中，在相应控制菌检查规定的培养温度及最长时间下培养，试验菌应不得生长。

固体培养基指示能力检查：取试验菌各 0.1ml（含菌数不大于 100cfu）（见表 2）分别涂布于被检培养基和对照培养基平板上，在相应控制菌检查规定的培养温度及时间下培养。被检培养基中试验菌生长的菌落形态、大小、指示剂反应情况等应与对照培养基一致。

液体培养基指示能力检查：分别接种不大于 100cfu 的试验菌（见表 2）于被检培养基和对照培养基中，在相应控制菌检查规定的培养温度及最短培养时间下培养。与对照培养基管比较，被检培养基管试验菌生长情况、指示剂反应等应与对照培养基一致。

控制菌检查方法的验证

当建立药品的微生物限度检查法时，应进行控制菌检查方法的验证，以确认所采用的方法适合于该药品的控制菌检查。若药品的组分或原检验条件发生改变可能影响检验结果时，检查方法应重新验证。

验证时，依各品种项下微生物限度标准中规定检查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。

菌种及菌液制备 同控制菌检查用培养基的适用性检查

验证方法

取规定量供试液及 10~100cfu 试验菌加入增菌培养基中，依相应控制菌检查法进行检查。当采用薄膜过滤法时，取规定量供试液，过滤，冲洗，试验菌应加在最后一次冲洗液中，过滤后，注入增菌培养基或取出滤膜接入增菌培养基中。

结果判断 若上述试验检出试验菌，按此供试液制备法和控制菌检查法进行供试品的该控制菌检查；若试验组未检出试验菌，应采用培养基稀释法、离心沉淀集菌法、薄膜过滤法、中和法等方法或联合使用这些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时进行。

供试品检查

供试品的控制菌检查应按已验证的方法进行，增菌培养基的实际用量同控制

菌检查方法的验证。

阳性对照试验 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 10~100cfu，方法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。

阴性对照试验 取稀释液 10ml 照相应控制菌检查法检查，作为阴性对照。阴性对照应无菌生长。

(1) 大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 取供试液 10ml (相当于供试品 1g、1ml、10cm²)，直接或处理后接种至适量 (不少于 100ml) 的胆盐乳糖培养基中，培养 18~24 小时，必要时可延长至 48 小时。

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 小时、24 小时在 366nm 紫外线下观察，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；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，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；如 MUG 阳性、靛基质阴性，或 MUG 阴性、靛基质阳性，则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培养基或麦康凯琼脂培养基的平板上，培养 18~24 小时。

若平板上无菌落生长、或生长的菌落与表 3 所列的菌落形态特征不符，判供试品未检出大肠埃希菌。若平板上生长的菌落与表 3 所列的菌落形态特征相符或疑似，应进行分离、纯化、染色镜检和适宜的鉴定试验，确认是否为大肠埃希菌。

表 3 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
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

(2) 大肠菌群 (*Coliform*) 取含适量 (不少于 10ml) 的乳糖胆盐发酵培

培养基管 3 支，分别加入 1：10 的供试液 1ml（含供试品 0.1g 或 0.1ml）、1：100 的供试液 1ml（含供试品 0.01g 或 0.01ml）、1：1000 的供试液 1ml（含供试品 0.001g 或 0.001ml），另取 1 支乳糖胆盐发酵培养基管加入稀释液 1ml 作为阴性对照管。培养 18～24 小时。

乳糖胆盐发酵管若无菌生长、或有菌生长但不产酸产气，判该管未检出大肠菌群；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 18～24 小时。

若平板上无菌落生长，或生长的菌落与表 4 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 4 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。

表 4 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、紫红色、红色或粉红色，圆形，扁平或稍凸起，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，扁平或稍凸起，边缘整齐，表面光滑，湿润

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 24～48 小时。若产酸产气，判该乳糖胆盐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 5 报告 1g 或 1ml 供试品中的大肠菌群数。

表 5 可能的大肠菌群数表

各供试品量的检出结果			可能的大肠菌群数 N (个/g 或 ml)
0.1g 或 0.1ml	0.01g 或 0.01ml	0.001g 或 0.001ml	
+	+	+	$>10^3$
+	+	—	$10^2 < N < 10^3$
+	—	—	$10 < N < 10^2$
—	—	—	< 10

注：+代表检出大肠菌群；—代表未检出大肠菌群。

(3) **沙门菌 (*Salmonella*)** 取供试品 10g 或 10ml，直接或处理后接种至适量（不少于 200ml）的营养肉汤培养基中，用匀浆仪或其他适宜方法混匀，培养 18~24 小时。

取上述培养物 1ml，接种于 10ml 四硫磺酸钠亮绿培养基中，培养 18~24 小时后，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 18~24 小时（必要时延长至 40~48 小时）。若平板上无菌落生长，或生长的菌落不同于表 6 所列的特征，判供试品未检出沙门菌。

若平板上生长的菌落与表 6 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 and 高层穿刺接种，培养 18~24 小时，如斜面未见红色、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鉴定试验，确认是否为沙门菌。

表 6 沙门菌菌落形态特征

培养基	菌落形态
胆盐硫乳琼脂	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) **铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)** 取供试液 10ml（相当于供试品 1g、1ml、10cm²），直接或处理后接种至适量（不少于 100ml）的胆盐乳糖培养基中，培养 18~24 小时。取上述培养物，划线接种于溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基的平板上，培养 18~24 小时。

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。如平板上无菌落生长或生长的菌落与上述菌落形态特征不符，判供试品未检出铜绿假单胞菌。如平板生长的菌落与上述菌落形态特征相符或疑似，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 18~24 小时。取斜面培养物进行革兰染色、镜检及氧化酶试验。

氧化酶试验 取洁净滤纸片置于平皿内，用无菌玻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 30 秒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。

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。

绿脓菌素 (Pyocyanin) 试验 取斜面培养物接种于 PDP 琼脂培养基斜面上，培养 24 小时，加三氯甲烷 3~5ml 至培养管中，搅碎培养基并充分振摇。静置片刻，将三氯甲烷相移至另一试管中，加入 1mol/L 盐酸试液约 1ml，振摇后，静置片刻，观察。若盐酸溶液呈粉红色，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作阴性对照，阴性对照试验应呈阴性。

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，应继续进行适宜的鉴定试验，确认是否为铜绿假单胞菌。

(5) 金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 取供试液 10ml (相当于供试品 1g、1ml、10cm²)，直接或处理后接种至适量 (不少于 100ml) 的亚碲酸钠 (钾) 肉汤 (或营养肉汤) 培养基中，培养 18~24 小时，必要时可延长至 48 小时。取上述培养物，划线接种于卵黄氯化钠琼脂培养基或甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上，培养 24~72 小时。若平板上无菌落生长或生长的菌落不同于表 7 所列特征，判供试品未检出金黄色葡萄球菌。

表 7 金黄色葡萄球菌菌落形态特征

培养基	菌落形态
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
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

若平板上生长的菌落与表 7 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 18~24 小时。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 18~24 小时，作血浆凝固酶试验。

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物（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，3 小时后开始观察直至 24 小时。阴性对照管的血浆应流动自如，阳性对照管血浆应凝固，若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规定时，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（*Clostridium*） 取供试液 10ml（相当于供试品 1g、1ml）2 份，其中 1 份置 80℃ 保温 10 分钟后迅速冷却。上述 2 份供试液直接或处理后分别接种至 100ml 的梭菌增菌培养基中，置厌氧条件下培养 48 小时。取上述每一培养物 0.2ml，分别涂抹接种于含庆大霉素的哥伦比亚琼脂培养基平板上，置厌氧条件下培养 48～72 小时。若平板上无菌落生长，判供试品未检出梭菌；若平板上有菌落生长，应挑选 2～3 个菌落分别进行革兰染色和过氧化氢酶试验。

过氧化氢酶试验 取上述平板上的菌落，置洁净玻片上，滴加 3% 过氧化氢试液，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。

若上述可疑菌落为革兰阳性梭菌，有或无卵圆形或球形的芽孢，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。

（7）白色念珠菌（*Candida albicans*） 取供试液 10ml（相当于供试品 1g、1ml、10cm²）直接或处理后接种至适量（不少于 100ml）的沙氏葡萄糖肉汤培养基中，培养 48～72 小时。取上述培养物划线接种于沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上，培养 24～48 小时（必要时延长至 72 小时）。

白色念珠菌在沙氏葡萄糖琼脂培养基上生长的菌落呈乳白色偶见淡黄色，表面光滑有浓酵母气味，培养时间稍久则菌落增大，颜色变深、质地变硬或有皱褶。若平板上无菌落生长或生长的菌落与上述菌落形态特征不符，判供试品未检出白色念珠菌。如平板上生长的菌落与上述菌落形态特征相符或疑似，应挑选 2～3 个菌落分别接种至念珠菌显色培养基平板上，培养 24～48 小时（必要时延长至

72 小时)。若平板上无绿色或翠绿色的菌落生长,判供试品未检出白色念珠菌。

若平板上生长的菌落为绿色或翠绿色,挑取相符或疑似的菌落接种于 1%吐温 80-玉米琼脂培养基上,培养 24~48 小时。取培养物进行染色,镜检及芽管试验。

芽管试验 挑取 1%吐温 80-玉米琼脂培养基上的培养物,接种于加有一滴血清的载玻片上,盖上盖玻片,置湿润的平皿内,置 35~37℃、1~3 小时,置显微镜下观察,可见到由孢子长出短小芽管。

若上述疑似菌为非革兰阳性菌,显微镜未见厚膜孢子、假菌丝、芽管,判供试品未检出白色念珠菌。

结果判断

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。

供试品的细菌数、霉菌和酵母菌数其中任何一项不符合该品种项下的规定,应从同一批样品中随机抽样,独立复试两次,以 3 次结果的平均值报告菌数。

眼用制剂检出霉菌和酵母菌数时,须以两次复试结果均不得长菌,方可判供试品的霉菌和酵母菌数符合该品种项下的规定。

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项下的规定,判供试品符合规定;若其中任何一项不符合该品种项下的规定,判供试品不符合规定。

稀释液

稀释液配制后,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 照无菌检查法(附录 XIII B)制备。

2. pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液、pH7.6 无菌磷酸盐缓冲液 按缓冲液(附录 XV D)配制后,过滤,分装,灭菌。

如需要,可在上述稀释液灭菌前或灭菌后加入表面活性剂或中和剂等。

3. 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。

培养基及其制备方法

培养基可按以下处方制备,也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

照无菌检查法（附录XIII B）制备。

2. 玫瑰红钠琼脂培养基

胨	5.0g	玫瑰红钠	0.0133g
葡萄糖	10.0g	琼脂	14.0g
磷酸二氢钾	1.0g	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	10.0g	琼脂	14.0g
酵母浸出粉	5.0g	水	1000ml
葡萄糖	20.0g		

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	20.0g	磷酸二氢钾	1.3g
乳糖	5.0g	牛胆盐	2.0g
氯化钠	5.0g	（或去氧胆酸钠）	（0.5g）
磷酸氢二钾	4.0g	水	1000ml

除乳糖、牛胆盐（或去氧胆酸钠）外，取上述成分，混合，微温溶解，调节pH值使灭菌后为 7.4 ± 0.2 ，煮沸，滤清，加入乳糖、牛胆盐（或去氧胆酸钠），分装，灭菌。

5. 乳糖胆盐发酵培养基

蛋白胨	20.0g	0.04%溴甲酚紫水溶液	25ml
乳糖	10.0g	水	1000ml
牛胆盐	5.0g		

除0.04%溴甲酚紫水溶液外，取上述成分，混合，微温溶解，调节pH值使

灭菌后为 7.4 ± 0.2 ，加入 0.04% 溴甲酚紫指示液，根据要求的用量分装于含倒管的试管中。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	20.0g	1% 中性红指示液	3ml
乳糖	10.0g	琼脂	14.0g
牛胆盐	5.0g	水	1000ml
氯化钠	5.0g		

除乳糖、1% 中性指示液、牛胆盐及琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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	10.0g	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	1.0g
氯化钠	5.0g	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 值使灭菌后为 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	20.0g	硫酸亚铁	0.2g
牛肉浸出粉	5.0g	硫代硫酸钠	0.2g
乳糖	10.0g	0.2% 酚磺酞指示液	12.5ml

蔗糖	10.0g	琼脂	12.0g
葡萄糖	1.0g	水	1000ml
氯化钠	5.0g		

除三种糖、0.2%酚磺酞指示液、琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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	5.0g	硫代硫酸钠	30.0g
牛胆盐	1.0g	水	1000ml
碳酸钙	10.0g		

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 和亮绿试液 0.1ml，混匀。

11. 沙门、志贺菌属琼脂培养基（SS）

胨	5.0g	硫代硫酸钠	8.5g
牛肉浸出粉	5.0g	中性红指示液	2.5ml
乳糖	10.0g	亮绿试液	0.33ml
牛胆盐	8.5g	琼脂	16.0g
枸橼酸钠	8.5g	水	1000ml
枸橼酸铁铵	1.0g		

除乳糖、中性红指示液、琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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	20.0g	枸橼酸钠	1.0g
牛肉浸出粉	3.0g	枸橼酸铁铵	1.0g
乳糖	10.0g	中性红指示液	3ml
蔗糖	10.0g	琼脂	16.0g
去氧胆酸钠	1.0g	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 值使灭菌后为 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. 溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基

胨	10.0g	溴化十六烷基三甲铵	0.3g
牛肉浸出粉	3.0g	琼脂	14.0g
氯化钠	5.0g	水	1000ml

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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. 亚碲酸盐肉汤培养基

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

15. 卵黄氯化钠琼脂培养基

胨	6.0g	10%氯化钠卵黄液	100ml
牛肉浸出粉	1.8g	琼脂	14.0g
氯化钠	30.0g	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 值使灭菌后为 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	10.0g	酚磺酞指示液	2.5ml
牛肉浸出粉	1.0g	琼脂	14.0g
甘露醇	10.0g	水	1000ml
氯化钠	75.0g		

除甘露醇、酚磺酞指示液及琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 7.4 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化后，滤过，分装，灭菌，冷至

60℃，倾注平皿。

17. 乳糖发酵培养基

胨	20.0g	0.04%溴甲酚紫指示液	25ml
乳糖	10.0g	水	1000ml

除 0.04%溴甲酚紫指示液外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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 琼脂培养基)

胨	20.0g	甘油	10ml
氯化镁 (无水)	1.4g	琼脂	14.0g
硫酸钾 (无水)	10.0g	水	1000ml

取胨、氯化镁、硫酸钾和水混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 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。

19. 梭菌增菌培养基

牛肉浸出粉	10.0g	盐酸半胱氨酸	0.5g
胨	10.0g	氯化钠	5.0g
酵母浸出粉	3.0g	醋酸钠	3.0g
可溶淀粉	1.0g	琼脂	0.5g
葡萄糖	5.0g	水	1000mL

取上述成分，混合，加热煮沸使溶解，调节 pH 值使灭菌后为 6.8 ± 0.2 ，加热溶化，滤过，分装，灭菌。

20. 哥伦比亚琼脂培养基

酪蛋白胰酶消化物	10.0g	肉胃酶消化物	5.0g
心胰酶消化物	3.0g	氯化钠	5.0g
玉米淀粉	1.0g	琼脂	15.0g
酵母浸出粉	5.0g	水	1000ml

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值使灭菌后为 7.3 ± 0.2 ，加入琼脂，加热溶化，滤过，分装，灭菌，冷至 $45 \sim 50^\circ\text{C}$ ，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。

21. 沙氏葡萄糖液体培养基

葡萄糖	40g	水	1000ml
蛋白胨	10g		

除葡萄糖外。取上述成分，混合，微温溶解，滤过。加入葡萄糖，溶解，分装，灭菌。

22. 沙氏葡萄糖琼脂培养基

葡萄糖	40g	琼脂	15~18g
蛋白胨	10g	水	1000ml

除琼脂和葡萄糖外。混合，微温溶解，滤过。加入琼脂和葡萄糖，溶解，分装，灭菌。

23. 念珠菌显色培养基(CHROMagar)

蛋白胨	10.2g	琼脂	15g
氢醌素	0.5g,	灭菌水	1000ml
色素	22.0g		

除琼脂外，取上述成分，混合，微温溶解，调节 pH 值至 6.3 ± 0.2 。滤过，加入琼脂，加热煮沸，不断搅拌至琼脂完全溶解，倾注平皿。

24. 1%吐温 80-玉米琼脂培养基

黄色玉米粉	40g	琼脂	10~15g
聚山梨酯 80	10ml	水	1000ml

取玉米粉、吐温 80 及蒸馏水 500ml，混合，65℃加热 30 分钟，混匀，用纱布滤过，补足原水量。取琼脂，水 500ml，混合，加热溶解。将以上两种溶液混合，摇匀，分装，灭菌。

试药

十四烷酸异丙酯 Isopropyl Myristate (C₁₇H₃₄O₂=270.46)

本品为无色液体。溶于乙醇、乙醚、丙酮、三氯甲烷或甲苯，不溶于水、甘油或丙二醇。约 208℃分解。

二 盐 酸 二 甲 基 对 苯 二 胺 N， N-dimethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride (C₈H₁₂N₂ • 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。

溴化十六烷基三甲铵 Cetyl Trimethylammonium Bromide

(C₁₉H₄₂BrN=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。

中性红 Neutral Red (C₁₅H₁₇N₄Cl=288.78)

本品为深绿色或棕黑色粉末。在水或乙醇中溶解。

牛肉浸出粉 Beef Extract Powder

本品为米黄色粉末，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。在水或醇中易溶。

甘露醇 Mannitol (C₆H₁₄O₆=182.17)

本品为白色结晶；无臭，味甜。在水中溶解，在乙醇中微溶。

4-甲基伞形酮葡萄糖苷酸 4-Methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, MUG

(C₁₈H₁₆O₉=376.3)

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 (C₂₄H₃₉NaO₄=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 (Na₂TeO₃=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

(C₂₀H₂Cl₄I₄Na₂O₅=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。

单硬脂酸甘油酯 Glycerol Monostearate (C₂₁H₄₂O₄=358.56)

本品为白色或黄色蜡状。在热有机溶剂或矿物油中溶解，在水中不溶，但与水能乳化。

枸橼酸钠 Sodium Citrate (C₆H₅Na₃O₇·2H₂O=294.10)

本品为白色结晶或粉末。在水中易溶，在乙醇中不溶。

枸橼酸铁铵 Ammonium Ferric Citrate (C₁₂H₂₂FeN₃O₁₄=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，在醇或醚中不溶。

胰蛋白胨 Tryptone

本品为米黄色粉末。在水中溶解。

硫酸锌 Zinc Sulfate ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ =287.56)

本品为白色结晶、颗粒或粉末。在水中易溶，在甘油中溶解，在乙醇中微溶。

硫酸锰 Manganese Sulfate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ =169.02)

本品为粉红色结晶。在水中溶解，在乙醇中不溶。

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。

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。

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。

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。

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和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、销售过程中的检验，中药提取物及辅料的检验，新药标准制订，进口药品标准复核，考察药品质量及仲裁等，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、品种项下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 1000cfu。每 1ml 不得过 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g 或 1ml 不得过 100cfu。

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 10 000cfu (丸剂每 1g 不得过 30 000cfu)。每 1ml 不得过 500cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g 或 1ml 不得过 100cfu。

大肠埃希菌 每 1g 或 1ml 不得检出。

大肠菌群 每 1g 应小于 100 个。每 1ml 应小于 10 个。

2.3 含豆豉、神曲等发酵原粉的制剂

细菌数 每 1g 不得过 100000cfu。每 1ml 不得过 1000cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g 不得过 500cfu。每 1ml 不得过 100cfu。

大肠埃希菌 每 1g 或 1ml 不得检出。

大肠菌群 每 1g 应小于 100 个。每 1ml 应小于 10 个。

3. 局部给药制剂

3.1 用于手术、烧伤或严重创伤的局部给药制剂 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 1000cfu。每 1ml 不得过 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g、1ml 或 10cm²不得过 100cfu。

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 10 000cfu。每 1ml 不得过 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g、1ml 或 10cm²不得过 100cfu。

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 10cfu。

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 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g、1ml 或 10cm²不得过 10cfu。

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、1ml 或 10cm²不得过 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g、1ml 或 10cm²应小于 10cfu。

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、梭菌、白色念珠菌 每 1g、1ml 或 10cm²不得检出。

3.7 直肠给药制剂

细菌数 每 1g 不得过 1000 个。每 1ml 不得过 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g 或 1ml 不得过 100cfu。

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 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 100cfu。

霉菌和酵母菌数 每 1g、1ml 或 10cm² 不得过 100cfu。

金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌 每 1g、1ml 或 10cm² 不得检出。

4. 含动物脏器（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。