药品微生物实验室规范指导原则

药品微生物实验室规范指导原则用于指导药品微生物检验实验室的质量控制。

药品微生物的检验结果受很多因素的影响，如样品中微生物可能分布不均匀、微生物检验方法的误差较大等。因此，在药品微生物检验中，为保证检验结果的可靠性，必须使用经验证的检测方法并严格按照药品微生物实验室规范要求进行试验。

药品微生物实验室规范包括以下几个方面：人员、培养基、菌种、实验室的布局和运行、设备、文件、实验记录、结果的判断等。

人员

从事药品微生物试验工作的人员应具备微生物学或相近专业知识的教育背景。

实验人员应依据所在岗位和职责接受相应的培训，在确认他们可以承担某一试验前，他们不能独立从事该项微生物试验。应保证所有人员在上岗前接受胜任工作所必需的设备操作、微生物检验技术和实验室生物安全等方面的培训，经考核合格后方可上岗，同时，实验室应制定所有级别实验人员的继续教育计划。

检验人员必须熟悉相关检测方法、程序、检测目的和结果评价。微生物实验室的管理者其专业技能和经验水平应与他们的职责范围相符。如：管理技能、实验室安全、试验安排、预算、实验研究、实验结果的评估和数据偏差的调查、技术报告书写等。

实验室应通过参加内部质量控制、能力验证或使用标准菌株等方法客观评估检验人员的能力，必要时对其进行再培训并重新评估。当使用一种非经常使用的方法或技术时，有必要在检测前确认微生物检测人员的操作技能。

所有人员的培训、考核内容和结果均应记录归档。

培养基

培养基是微生物试验的基础，直接影响微生物试验结果。适宜的培养基制备方法、贮藏条件和质量控制试验是提供优质培养基的保证。

1．培养基的制备

培养基可按处方配制，也可使用按处方生产的符合规定的脱水培养基。

在制备培养基时，应选择质量符合要求的脱水培养基或单独配方组分进行配制。脱水培养基应附有处方和使用说明，配制时应按使用说明上的要求操作以确保培养基的质量符合要求，不得使用结块或颜色发生改变的脱水培养基。

脱水培养基或单独配方组分应在适当的条件下储存，如低温、干燥和避光，所有的容器应密封，尤其是盛放脱水培养基的容器。商品化的成品培养基除了应附有处方和使用说明外，还应注明有效期、贮存条件、适用性检查试验的质控菌和用途。

为保证培养基质量的稳定可靠，各脱水培养基或各配方组分应准确称量，并要求有一定的精确度。配制培养基最常用的溶剂是纯化水，特殊情况下，可能需要用去离子水和蒸馏水。应记录各称量物的重量和水的使用量。

配制培养基所用容器和配套器具应洁净，可用纯化水冲洗玻璃器皿以消除清洁剂和外来物质的残留。对热敏感的培养基如糖发酵培养基其分装容器一般应预先进行灭菌，以保证培养基的无菌性。

脱水型培养基应完全溶解于水中，再行分装与灭菌。配制时若需要加热助溶，应注意不要过度加热，以避免培养基颜色变深。如需要添加其它组分时，加入后应充分混匀。

应按照生产商提供或使用者验证的参数进行培养基的灭菌。商品化的成品培养基必须附有所用灭菌方法的资料。培养基灭菌一般采用湿热灭菌技术，特殊培养基可采用薄膜过滤除菌。

培养基若采用不适当的加热和灭菌条件，有可能引起颜色变化、透明度降低、琼脂凝固力或 pH 的改变。因此，培养基应采用验证的灭菌程序灭菌，培养基灭菌方法和条件，应通过无菌性试验和促生长试验进行验证。此外，对高压灭菌器的蒸汽循环系统也要加以验证，以保证在一定装载方式下的正常热分布。温度缓慢上升的高压灭菌器可能导致培养基的过热，过度灭菌可能会破坏绝大多数的细菌和真菌培养基促生长的质量。灭菌器中培养基的容积和装载方式也将影响加热的速度。因此，应根据灭菌培养基的特性，进行全面的灭菌程序验证。

应确定每批培养基灭菌后的 pH（冷却至室温 25℃测定）。若培养基处方中未

列出 PH 的范围，除非经验证表明培养基的 pH 允许的变化范围很宽，否则，PH 的范围不能超过规定的±0.2。

制成平板或分装于试管的培养基应进行下列检查：容器和盖子不得破裂，装量应相同，尽量避免形成汽泡，固体培养基表面不得产生裂缝或涟漪，在冷藏温度下不得形成结晶，不得污染微生物等。应检查和记录批数量、有效期及培养基的无菌检查。

2.培养基的贮藏

自配的培养基应标记名称、批号、配制日期等信息，并在已验证的条件下贮藏。商品化的成品培养基标签上应标有名称、批号、生产日期、失效期及培养基的有关特性，生产商和使用者应根据培养基使用说明书上的要求进行保存，所采用的保藏和运输条件应使成品培养基最低限度的失去水分并提供机械保护。

培养基灭菌后若储藏在高压灭菌器中，质量可能会受影响，一般不提倡这种存放法。琼脂培养基不得在 0℃或 0℃以下存放，因为冷冻可能破坏凝胶特性。培养基应避光保存，若要长期保存，应置于密闭容器中以防止水分流失。琼脂平板最好现配现用，如置冰箱保存，一般不超过一周，且应密闭包装，若延长保存，保存期需经验证确定。

固体培养基灭菌后的再融化只允许一次，以避免因过度受热造成培养基质量下降或微生物污染。培养基的再融化一般采用的水浴加热或流通蒸汽。若使用微波炉，应避免培养基过度受热及水分的蒸发，更要注意安全。融化的培养基应置于 45～50℃的水浴中，不得超过 8 小时。倾注培养基时，应擦干培养基容器外表面的水分，避免容器外壁的水滴进入培养基中造成污染。

使用过的培养基（包括失效的培养基）应按照国家污染废物处理相关规定进行。

3.质量控制试验

实验室应对试验用培养基建立质量控制程序，以确保所用培养基质量符合相关检测的需要。

实验室配制或商品化的成品培养基的质量依赖于其制备过程，采用不适宜方法制备的培养基将影响微生物的生长或复苏，从而影响试验结果的可靠性。

所有配制好的培养基均应进行质量控制试验。实验室配制的培养基的常规监

控项目是 pH，适用性检查试验，定期的稳定性检查以确定有效期。培养基在有效期内应依据适用性检查试验确定培养基质量是否符合要求。有效期的长短将取决于在一定存放条件下(包括容器特性及密封性)的培养基其组成成分的稳定性。

除药典附录另有规定外，在实验室中，若采用已验证的配制和灭菌程序制备培养基且过程受控，那么同一批脱水培养基的适用性检查试验可只进行一次。如果培养基的制备过程未经验证，那么每一批培养基均要进行适用性检查试验，试验的菌种可根据培养基的用途从相关附录中进行选择，也可增加从生产环境及产品中常见的污染菌株。

培养基的质量控制试验若不符合规定，应寻找不合格的原因，以防止问题重复出现。任何不符合要求的培养基均不能使用。

用于环境监控的培养基须特别防护。用于关键区域监控的培养基最好要双层包装和终端灭菌，如果不能采用终端灭菌的培养基，那么在使用前应进行 100%的预培养以防止外来的污染物带到环境中及避免出现假阳性结果。

菌 种

试验过程中，生物样本可能是最敏感的，因为它们的活性和特性依赖于合适的试验操作和贮藏条件。实验室菌种的处理和保藏的程序应标准化，使尽可能减少菌种污染和生长特性的改变。按统一操作程序制备的菌株是微生物试验结果一致性的重要保证。

药品微生物检验用的试验菌应来自认可的国内或国外菌种收藏机构的标准菌株，或使用与标准菌株所有相关特性等效的商业派生菌株。

标准菌株的复活或培养物的制备应按供应商提供的说明或按已验证的方法进行。从国内或国外菌种收藏机构获得的标准菌株经过复活并在适宜的培养基中生长后，即为标准储备菌株。标准储备菌株应进行纯度和特性确认。标准储备菌株保存时，可将培养物等份悬浮于抗冷冻的培养基中，并分装于小瓶中，建议采用低温冷冻干燥，液氮储存，超低温冷冻（低于-30℃）等方法保存。低于-70℃或低温冷冻干燥方法可以延长菌种保存时间。标准储备菌株可用于制备每月或每周一次转种的工作菌株。冷冻菌种一旦解冻转种制备工作菌株后，不得重新冷冻和再次使用。

工作菌株的传代次数应严格控制，不得超过5代（从菌种收藏机构获得的标准菌株为第0代），以防止过度的传代增加表型变化的风险。1代是指将活的培养物接种到微生物生长的新鲜培养基中培养，任何亚培养的形式均被认为是转种或传代一次。必要时，实验室应对工作菌株的特性和纯度进行确认。

工作菌株不可代替标准菌株，标准菌株的商业衍生物仅可用作工作菌株。

实验室必须建立和保存其所有菌种的进出、收集、贮藏、保存、确认试验以及销毁的记录，应有文件化的程序管理菌种（从标准菌株到工作菌株），该程序包括：标准菌种的申购记录；从标准菌株到工作菌株操作及记录；菌种必须定期转种传代，并做纯度、特性等实验室所需关键诊断指标的确认，并记录；每支菌种都应适当标注，注明其名称、标准号、接种日期、所传代数；菌种生长的培养基和培养条件；菌种保存的位置和条件；其它需要的程序。

实验室的布局和运行

实验室应具有进行微生物检测所需的适宜、充分的设施条件。实验室的布局与设计应充分考虑到良好微生物实验室操作规范和实验室安全的要求。实验室布局设计的基本原则是既要最大可能防止微生物的污染，又要防止检验过程对环境和人员造成危害。合适的规划及活动区域的合理区分将提高微生物实验室操作的可靠性。

通常，实验室应划分成洁净或无菌区域和活菌操作区域，同时应根据试验目的，在时间或空间上有效分隔不相容的试验活动，将交叉污染的风险降低到最低。

一般情况下，药品微生物检验的实验室应有符合无菌检查法（附录ⅩⅢB）和微生物限度检查法（附录ⅩⅢC）要求的、用于具有开展无菌检查、微生物限度检查、无菌采样等检测活动的、独立设置的洁净室（区）或隔离系统，并为上述检验配备相应的细菌（真菌）等实验室、培养室、培养基及实验用具准备（包括灭菌）区、样品接收和储藏区、标准菌株储藏区、污染物处理区和文档处理区等辅助区域，同时，应对上述区域明确标识。

实验室应对进出洁净区域的人和物建立控制程序和标准操作规程（如更衣程序等），应按相关国家标准建立洁净室（区）和隔离系统的验证、使用和清洁维护标准操作规程，对可能影响检测结果的工作（如洁净度验证及监测、消毒、清

洁维护等）能够有效地控制、监测并记录。

实验室对所用的消毒剂种类应定期更换，使用的消毒剂应无菌。

一些样品需要证明微生物的生长，并需要在实验室进一步分析污染物的特性，如再培养、染色、微生物鉴定或其它确定试验均应在实验室的活菌操作区进行。任何出现微生物生长的培养物不得在实验室无菌区域内打开。对染菌样品的有效隔离可以减少假阳性结果的出现。

实验人员不能在实验室的活菌操作区域或邻近区域进行抽样。应采用无菌操作技术进行取样，防止在取样过程中使样品受到微生物的污染而导致假阳性的结果。因此，实验设施应设计成保证样品在控制条件下抽样，包括能有效防止微生物污染的无菌设施及环境、适宜的无菌服、无菌抽样器具和合格的操作人员，并记录抽样环境的监测结果。如果可能，所有的样品应在具有无菌条件的特定抽样间进行无菌抽样。

被检样品应有传递、储存、处置和识别管理程序。待验样品应在合适的条件下储存并能够保证其完整性而不改变其性状，应明确规定和记录储存条件。

实验室还应针对类似于带菌培养物溢出的意外事件制定处理规程。如：活的培养物洒出必须就地处理，不得使培养物污染扩散。

实验室应有妥善处理废弃样品和有害废弃物的设施和制度。

设　备

实验室应配备与检验能力和工作量相适应的仪器设备，其类型、测量范围和准确度等级应满足检验所采用标准的要求，设备的安装和布局应便于操作，易于维护、清洁和校准。

实验室在仪器设备完成相应的检定、校准、验证、确认其性能，并形成相应的操作、维护和保养的标准操作规程后方可正式使用，使用要有记录。为保证设备处于良好工作状态，应定期维护和期间核查，并保存相关记录。

微生物实验室所用的仪器应根据日常使用的情况进行定期的校准，并记录。校准的周期和校验的内容将根据仪器的类型和设备在实验室产生的数据的重要性的不同而不同。重要的仪器设备，如培养箱、冰箱等，应由专人负责，保证其运行状态正常和受控，同时应有相应的备用设备以保证试验菌株和微生物培养的连续性；对于培养箱、冰箱、高压灭菌锅等影响实验准确性的关键设备应在其运

行过程中对关键参数（如温度、压力）进行连续观测和记录，有条件的情况下尽量使用自动记录装置。如果发生偏差，应评估对以前的检测结果造成的影响并采取必要的纠正措施。

对于一些容易污染微生物的仪器设备如水浴锅、培养箱、冰箱和生物安全柜等应定期进行清洁和消毒。

对试验需用的无菌器具应实施正确的清洗、灭菌措施，并形成相应的标准操作规程，无菌器具应有明确标识并与非无菌器具加以区别。

文件

文件应当充分表明试验是在实验室里按可控的检查法进行的，一般包括以下方面：人员培训与资格确认；设备验收、检定（或校准期间核查）和维修；设备的关键参数和使用记录（如 24 小时或 7 天记录图）；培养基制备、贮藏、和质量控制；检验规程中的关键步骤；数据记录与结果计算的确认 ；质量责任人对试验报告的评估；数据偏离的调查。

实验记录

实验结果可靠性的依赖于试验严格按照标准操作规程进行，而标准操作规程应指出如何进行正确的试验操作。实验记录应包含所有关键的实验细节，以便确认数据的完整性。

实验室原始记录至少应包括以下内容：实验日期、检品名称、实验人员姓名、标准操作规程编号或方法、实验结果 、偏差（存在时）、实验参数（所使用的设备、菌种、培养基和批号以及培养温度等）、主管/复核人签名。

每一个关键的实验设备均应记录在案，所有按要求进行的校准过程及设备维护均需记录。任何恰当的日常记录都是有用的。设备温度（水浴，培养箱，灭菌器）必须记录和监测。

实验记录写错时，用单线划掉并签字。原来的数据不能抹去或被覆盖。

所有实验室记录应以文件形式保存并防止意外遗失，正规的记录应存放在特定的地方并有登记。

结果的判断

由于微生物试验的特殊性，在实验结果分析时，应从各个可能的方面去考虑，不但要假设被污染，而且要考虑微生物在原料、辅料或试验环境中存活的可能性。此外，还应考虑微生物生长特性。

对实验结果应进行充分和全面的评价。所有影响结果观察的微生物条件和因素应完全考虑，包括与规定的限度或标准有很大的偏差结果。关键是应知道实验结果与标准的差别是否有统计学意义。

若发现实验结果不符合药典各论要求或另外建立的质量标准，应进行原因调查。引起微生物污染结果不符合标准的原因主要有两个：试验操作错误或产生无效结果的试验环境条件；产品的微生物污染总数超过规定的限度或检出控制菌。

异常结果分析时，应充分考虑实验室环境、抽样区的防护条件、样品在该检验条件下以往检验的情况，样品本身具有使微生物存活或繁殖的特性等情况。此外，回顾试验过程，也可评价该实验结果的可靠性及实验过程是否恰当。如果试验操作被确认是引起实验结果不符合的原因，那么应制定改错方案以解决问题，按照正确的操作方案进行实验，在这种情况下，对试验过程及试验操作应特别认真地进行监控。

如果依据分析调查结果发现试验有错误而判实验结果无效，那么这种情况必须记录。实验室也必须认可复试程序，如果需要，可按相关规定重新抽样，但抽样方法不能影响不符合规定结果的分析调查。