

# 中藥濃縮製劑 微生物限量檢驗法

日期: 2011.10.21~24



# 大綱

- 目的
- 檢驗規格之依據(衛生署公告)
- 檢驗方法介紹
- 檢驗流程
- 查驗登記案文件準備須知
- 查驗登記常見問題

# 微生物限量檢驗法

## ◆ 目的

各種非無菌性藥品（原料藥至最終產品）微生物總生菌數及特殊致病原菌之檢驗方法

# 中藥製劑含微生物限量之公告規格

公告日期	署授藥字第號	適用範圍	公告事項(微生物限量規格)			
			總生菌數	酵母菌及黴菌總數	大腸桿菌	沙門氏桿菌
95.10.26	0950003236	中藥碎片劑型	$\leq 10^7$ cfu/g	$\leq 10^4$ cfu/g	$\leq 10^2$ cfu/g	不得檢出
97.09.15	0970003102	10個處方中藥濃縮製劑	$\leq 10^5$ cfu/g	未規定	不得檢出	不得檢出
99.05.28	0990003141	複方製劑，2年內完成單味製劑	$\leq 10^5$ cfu/g	未規定	不得檢出	不得檢出
100.08.29	1000002752	複方製劑、100項單味製劑(100.12.01)、101.07.01單味製劑	$\leq 10^5$ cfu/g	未規定	不得檢出	不得檢出
97.09.12	0970003012	修正藥品查驗登記準則第86條-萃取濃縮製劑之審查基準	1.生物限量應準用製劑添加之輔助劑或賦形劑之規格； 2.萃取濃縮製劑之微生物限量應依主管機關公告之規定			



「藥事法第二十一條第三款所稱『藥品中一部或全部含有污穢者』，關於中藥製劑部分之解釋」令

行政院衛生署 令

發文日期：中華民國95年10月26日

發文字號：署授藥字第0950003236號

附件：中藥製劑含有害物質限量標準及其適用範圍表

藥事法第二十一條第三款所稱「藥品中一部或全部含有污穢者」，於中藥製劑，係指該製劑含有害物質超出下列限量標準者：

一、中藥製劑含有害物質限量標準及其適用範圍詳如附表。

二、中藥碎片劑型之製劑，其微生物限量標準如下：

(一) 大腸桿菌 (Escherichia coli)：每克不得超過  $10^2$  (cfu / g)。

(二) 沙門氏桿菌 (Salmonella species)：不得檢出。

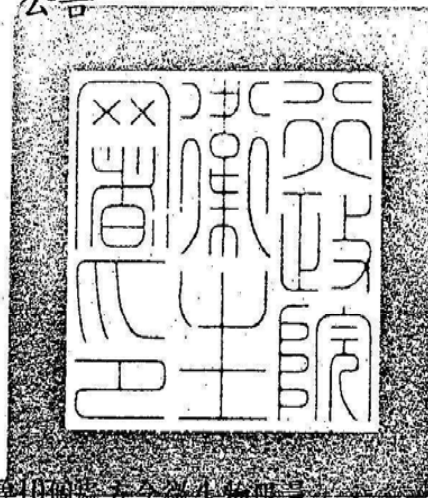
(三) 好氧性微生物總數 (Total viable aerobic count)：

每克不得超過  $10^7$  (cfu / g)。

(四) 酵母菌與黴菌總數 (Yeast & Mould)：每克不得超過  $10^4$  (cfu / g)。

# 行政院衛生署 公告

發文日期：中華民國97年9月15日  
發文字號：署授藥字第0970003102號  
附件：



主旨：公告「中藥濃縮製劑加味逍遙散等10個處方含微生物限量」。

依據：藥品查驗登記審查準則第86條。

公告事項：中藥濃縮製劑處方包括（加味逍遙散、疏經活血湯、葛根湯、辛夷清肺湯、川芎茶調散、獨活寄生湯、麻杏甘石湯、小青龍湯、六味地黃丸、龍膽瀉肝湯）等10個處方，其微生物限量為：「沙門氏菌不得檢出、大腸桿菌不得檢出、總生菌數之限量為 $10^5$ cfu/g」。

署長 林芳郁

# 公告修訂「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」

發文日期：中華民國99年5月28日

發文字號：署授藥字第0990003141號

主旨：公告修訂「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」，並自99年7月1日起，生產之產品，均須符合本公告之規定。

依據：藥品查驗登記審查準則第86條。

公告事項：

- 一、附「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」如附表。
- 二、本署95年10月26日署授藥字第0950003236號令、97年9月15日署授藥字第0970003085、0970003101、0970003102號公告、98年7月14日署授藥字第0980001933號公告，與本公告之規定有抵觸之部分，均自99年7月1日起停止適用。
- 三、持有前述許可證者，應依本公告修正檢驗規格並留廠備查，毋須向本署報備，惟本署將加強上市後產品抽查。

# 中藥濃縮製劑含異常物質之限量 (99.05.28署授藥字第0990003141號公告)

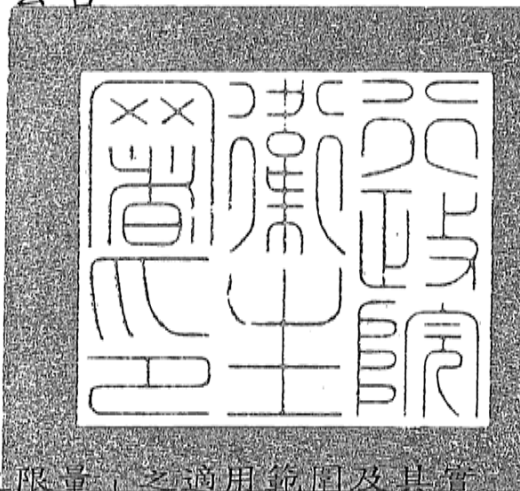
附表

異常物質	限量	適用範圍	檢驗方法	備考
總重金屬	30以下(ppm)	複方製劑，2年內完成單味製劑	台灣傳統藥典、中華藥典、日本藥局方、歐洲藥典、美國藥典、中華人民共和國藥典或藥廠自行開發檢驗方法(需提依據)等，藥典以最新版本或前一版本為限。	一、特殊情形者，另行公告。 二、本限量將於實施六個月後檢討修正。
砷	3以下(ppm)	33方 <sup>(註)</sup> 製劑，3年內完成公告200基準方其餘製劑		
鎘	0.5以下(ppm)			
汞	0.5以下(ppm)			
鉛	10以下(ppm)			
微生物 總生菌數	10 <sup>5</sup> 以下(cfu/g)	複方製劑，2年內完成單味製劑		
大腸桿菌	不得檢出			
沙門氏菌				

註：33方中藥濃縮製劑包括：葛根湯、小青龍湯、加味逍遙散、桂枝湯、甘露飲、麻杏甘石湯、補中益氣湯、六味地黃丸、黃連解毒湯、獨活寄生湯、四逆散、血府逐瘀湯、杞菊地黃丸、辛夷清肺湯、定喘湯、知柏地黃丸、柴葛解肌湯、消風散、清心蓮子飲、龍膽瀉肝湯、炙甘草湯、八味地黃丸、川芎茶調散、逍遙散、藿香正氣散、香砂六君子湯、荊防敗毒散、疏經活血湯、止嗽散、濟生腎氣丸、防風通聖散、二陳湯、六君子湯。



# 行政院衛生署 公告



發文日期：中華民國100年8月29日  
發文字號：署授藥字第1000002752號  
附件：修正「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」附表

主旨：修正「中藥濃縮製劑含異常物質之限量」之適用範圍及其實施日期，如附表。

依據：藥品查驗登記審查準則第八十六條及本署99年5月28日署授藥字第0990003141號公告。

## 公告事項：

- 一、本署99年5月28日署授藥字第0990003141號公告，與本公告規定有牴觸之部分，自發布日起停止適用。
- 二、持有前述許可證者，應依本公告修正檢驗規格並留廠備查，毋須向本署報備，惟本署將加強上市後產品抽查。

署長 邱文達 出國

副署長 江宏哲 代行

## 中藥濃縮製劑含異常物質之限量

附表一

異常物質	限量	適用範圍	檢驗方法	備考
總重金屬	30 以下 (ppm)	一、複方製劑。 二、三七等 100 項 <sup>(註 1)</sup> 單味製劑，自 100 年 12 月 1 日起實施。 三、其餘單味製劑，應於 101 年 7 月 1 日起符合本標準。	台灣傳統藥典、中華藥典、日本藥局方、歐洲藥典、美國藥典、中華人民共和國藥典或藥廠自行開發檢驗方法(需提依據)等，藥典以最新版本或前一版本為限。	特殊情形者，另行公告。
砷	3 以下 (ppm)	一、33 項 <sup>(註 2)</sup> 基準方。 二、九味羌活湯等 67 項 <sup>(註 1)</sup> 基準方，自 100 年 12 月 1 日起實施。 三、已公告 200 基準方之其餘製劑，應於 102 年 7 月 1 日起符合本標準。		
鎘	0.5 以下 (ppm)			
汞	0.5 以下 (ppm)			
鉛	10 以下 (ppm)			
微生物 總生菌數	10 <sup>5</sup> 以下 (cfu/g)	一、複方製劑。 二、三七等 100 項 <sup>(註 1)</sup> 單味製劑，自 100 年 12 月 1 日起實施。 三、其餘單味製劑，應於 101 年 7 月 1 日起符合本標準。		
大腸桿菌	不得檢出			
沙門氏菌				

註 1：100 項單味製劑與 67 項基準方如附表二。

註 2：33 項基準方包括葛根湯、小青龍湯、加味逍遙散、桂枝湯、甘露飲、麻杏甘石湯、補中益氣湯、六味地黃丸、黃連解毒湯、獨活寄生湯、四逆散、血府逐瘀湯、杞菊地黃丸、辛夷清肺湯、定喘湯、知柏地黃丸、柴葛解肌湯、消風散、清心蓮子飲、龍膽瀉肝湯、炙甘草湯、八味地黃丸、川芎茶調散、逍遙散、藿香正氣散、香砂六君子湯、荊防敗毒散、疏經活血湯、止嗽散、濟生腎氣丸、防風通聖散、二陳湯、六君子湯。

## (100.08.29署授藥字第1000002752號公告)

## 100 項單味濃縮製劑與 67 項基準方製劑

附表二

單味濃縮製劑						公告基準方			
編號	品名	編號	品名	編號	品名	編號	品名	編號	品名
1	三七	35	辛夷	69	茯苓	1	九味羌活湯	35	柴胡桂枝湯
2	土茯苓	36	防風	70	茯神	2	十神湯	36	柴胡清肝湯
3	大黃	37	夜交藤	71	細辛	3	上中下通用痛風丸	37	柴陷湯
4	女貞子	38	延胡索	72	連翹	4	大柴胡湯	38	桃紅四物湯
5	山梔子	39	枇杷葉	73	陳皮	5	小建中湯	39	真武湯
6	山楂	40	板藍根	74	魚腥草	6	小柴胡湯	40	荊芥連翹湯
7	山藥	41	狗脊	75	麥芽	7	五苓散	41	參苓白朮散
8	川牛膝	42	知母	76	麥門冬	8	五積散	42	參蘇飲
9	川芎	43	羌活	77	麻黃	9	半夏天麻白朮湯	43	涼膈散
10	川棟子	44	金銀花	78	菊花	10	半夏厚朴湯	44	清心利膈湯
11	丹參	45	附子	79	黃芩	11	半夏瀉心湯	45	清肺湯
12	五味子	46	前胡	80	黃柏	12	四物湯	46	清胃散
13	天麻	47	厚朴	81	黃耆	13	平胃散	47	清燥救肺湯
14	木瓜	48	威靈仙	82	黃連	14	正骨紫金丹	48	復元活血湯
15	木香	49	枸杞子	83	當歸	15	玉屏風散	49	普濟消毒飲
16	牛蒡子	50	砂仁	84	葛根	16	甘麥大棗湯	50	華蓋散
17	半夏	51	香附	85	補骨脂	17	甘露消毒丹	51	黃耆五物湯
18	玄參	52	枳殼	86	鈎藤	18	安中散	52	溫經湯
19	甘草	53	枳實	87	槐花	19	百合固金湯	53	溫膽湯
20	生地黃	54	夏枯草	88	蒲公英	20	完帶湯	54	當歸四逆湯
21	白朮	55	射干	89	蒼朮	21	抑肝散	55	當歸芍藥散
22	白芍	56	桂枝	90	蒼耳子	22	杏蘇散	56	當歸拈痛湯
23	白芷	57	桔梗	91	遠志	23	芍藥甘草湯	57	葛根黃連黃芩湯
24	白及	58	桑白皮	92	酸棗仁	24	辛夷散	58	補陽還五湯
25	石斛	59	桑枝	93	蔓荊子	25	芎歸膠艾湯	59	寧嗽丸
26	石菖蒲	60	桑寄生	94	澤瀉	26	羌活勝濕湯	60	蒼耳散
27	何首烏	61	柴胡	95	薏苡仁	27	保和丸	61	銀翹散
28	杏仁	62	桃仁	96	雞血藤	28	胃苓湯	62	潤腸丸
29	杜仲	63	益母草	97	黨參	29	苓桂朮甘湯	63	豬苓湯
30	沙參	64	秦艽	98	藿香	30	桂枝芍藥知母湯	64	薏苡仁湯
31	牡丹皮	65	荊芥	99	續斷	31	桂枝茯苓丸	65	歸脾湯
32	貝母	66	茵陳蒿	100	鬱金	32	桑菊飲	66	瀉白散
33	赤芍	67	栝樓仁			33	桑螺蛸散	67	蠲痺湯
34	車前子	68	栝樓根			34	柴胡加龍骨牡蠣湯		

# 檢驗方法依據

- 依據中華藥典第六版\_附錄第131頁~138頁
  - 微生物限量檢驗法
  - 好氧性微生物總數（總生菌數）及酵母菌與黴菌總數
  - 微生物污染檢驗法（特殊致病原菌）
    - 大腸桿菌
    - 沙門氏桿菌
    - 綠膿桿菌
    - 金黃色葡萄球菌

# 微生物限量檢測項目

## ◆ 總生菌數

- 好氧性微生物總數(Total Viable Aerobic Count)
- 酵母菌與黴菌總數(Total Yeasts and Molds Count)

## ◆ 特殊致病原菌

- 大腸桿菌(*Escherichia coli*)
- 沙門氏桿菌(*Salmonella*)
- 綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)
- 金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)



# 檢驗方法

- ◆ 檢驗前準備
  - － 培養基製備
  - － 培養基效能性測試
  - － 標準菌株及保存
- ◆ 檢驗流程
  - － 檢體預試驗
  - － 取樣
  - － 稀釋及增菌
  - － 培養
  - － 結果觀察

# 檢驗前準備事項 -1

## ◆ 設備

- ◆ 天平
- ◆ 無菌操作台( Laminer Flow)
- ◆ 高壓滅菌釜( Autoclave)
- ◆ 培養箱( Incubator)
- ◆ pH 測定儀

## ◆ 培養基配製

- ◆ 配製後應標示：
  - 培養基名稱、 批次號碼、 製備日期及有效期限
- ◆ 滅菌條件：一般為 121°C 15mins 或依藥典之規定
- ◆ 融化的培養基儲存不應超過 8 小時



# 檢驗前準備事項 -2

- ◆ 培養基效能試驗 (Growth Promotion Test)
- ◆ 稀釋液之配製
- ◆ 使用器具之滅菌



# 緩衝液與培養基

- pH 7.2磷酸鹽緩衝液(PBS)：稀釋
- 液體培養基:稀釋、增殖
  - Tryptic soy broth (TSB)
    - *E.Coli.*、*Salmonella*
  - Lactose broth (LB)
    - *Pseudomonas aeruginosa*、*Staphylococcus aureus*
- 固體培養基: 斜面、平板
  - Tryptic soy agar (TSA，好氧性微生物總數)
  - Sabouraud dextrose agar (SDA，酵母菌及黴菌總數)
- 特殊培養基：鑑別如 MacConkey Agar

固體培養基再融化最多1次，以免影響其效能



# pH 7.2 磷酸鹽緩衝液(PBS)

## ◆ 儲備溶液

↓ 磷酸二氫鉀(  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ) 34g / 500 mL  $\text{H}_2\text{O}$

↓ 以氫氧化鈉試液調其 pH 值為  $7.2 \pm 0.1$

↓ 加水至全量為 1000 mL 混均，儲存於  $2 \sim 8^\circ\text{C}$  冰箱備用

## ◆ 使用溶液

取儲備溶液加水稀釋 ( 1 : 800 ) 滅菌後使用

# 致病原菌之特殊培養基

## ◆ 大腸桿菌

- MacConkey agar medium
- Levine Eosine-Methylene Blue (EMB) agar medium

## ◆ 沙門氏桿菌

- Selenite Cystine broth (SCB)
- Tetrathionate broth
  - 使用前加入0.1%煌綠(Brill Green)及碘-碘化鉀試液，不可再加熱
- Brilliant Green agar (BGA)
- Xylose-Lysine Desoxycholate agar(XLD)
- Bismuth Sulfite agar (BSA)
- Triple Sugar Iron agar (TSIA) 斜面



# 培養基效能測試

## (Growth Promotion of the Media)

### ◆ 無菌性試驗 (Sterility of media)

於30~ 35°C 恆溫培養箱中培養18 ~24小時，  
觀察是否有菌落生長

### ◆ 有效性試驗 (Growth promotion test)

#### — TSA medium

選適當菌種，菌種接種量(10~100 CFU)

30~ 35°C 培養3~5日 觀察是否能長菌

#### — SDA medium

*Candida albicans* 菌種接種量(10~100 CFU)

20~ 25°C 培養 5 ~7 天 觀察是否能長菌

#### — 選擇性培養基

以相對應之菌株接種，菌種接種量(10~100 CFU)

30~ 35°C 培養18 ~24小時 觀察是否能長菌

# 微生物限量試驗標準菌株

藥典建議之品管標準菌株名稱	ATCC 編號	BCRC 編號
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 8739	BCRC 11634
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 14028	BCRC 10747
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538	BCRC 12154
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027	BCRC 11633
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6633	BCRC 10447
<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231	BCRC 21538
<i>Aspergillus niger</i>	ATCC 16404	BCRC 30506

- ATCC: American Type Culture Collection
- BCRC: Bioresource Collection and Research Center (食科所)



# 菌種之保存

## (Maintenance of Stock Culture)

- ◆ 繼代培養菌種 (4 °C)
- ◆ 冷凍保存 (一) (-20 ~ -30°C) 約半年
- ◆ 冷凍保存 (二) (-40 ~ -90°C) 數年
- ◆ 冷凍保存 (三) 液態氮 (-180°C 以下) (可長期保存)
- ◆ 冷凍乾燥法 (可長期保存)

# 冷凍保存（ $-40 \sim -90^{\circ}\text{C}$ ）

- ◆ 器具：無菌吸管、無菌菌種保存瓶及菌種盒
- ◆ 材料：菌株、細菌培養液、20%無菌甘油溶液
- ◆ 方法：取菌液與20%無菌甘油溶液以1:1比例置於菌種保存瓶內均勻混合後放入菌種盒  
置  $4^{\circ}\text{C}$  冰箱 2 小時  $\rightarrow$   $-20^{\circ}\text{C}$  2 小時  $\rightarrow$   
再置  $-40^{\circ}\text{C} \sim -90^{\circ}\text{C}$  保存

# 微生物限量檢驗流程圖

◆ 檢體特性及檢體預備試驗之確認

◆ 好氧性微生物總數

取樣 → 稀釋 → 培養皿製備 → 培養 → 結果計算

◆ 特殊致病原菌

取樣 → 增菌培養 → 特殊培養基篩選 → 再確認  
培養基篩選 → 結果觀察及判定





# 檢體預備試驗

- 目的

- 確認檢體是否具抑菌作用

- 檢體稀釋階之決定

- 避免誤判各項檢驗結果之正確性

# 預備試驗方法-1

- 活化微生物限量試驗4株標準菌
  - 將金黃色葡萄球菌、大腸桿菌、綠膿桿菌及沙門氏桿菌等菌種經二十四小時培養後使用
- 檢體系列稀釋
  - 分別將上述菌株接種不少於  $10^{-3}$  之菌液1 mL加入不同稀釋階之檢體中(如10g 檢品 + 90mL 7.2 PBS 或 TSB 至 100mL)
- 結果應有**增殖作用** (混濁或有菌落產生)
  - 表示檢體不具抑菌作用

# 預備試驗方法-2

- 試驗結果具抑菌作用（培養基不產生混濁）
- 處理法
  - － 增加菌種稀釋液之量
  - － 增加檢體稀釋倍數
  - － 於培養基中加入適量不活化劑  
(Fluid Casein Digest-Soy Lecithin 0.5% - Polysorbate 20 4.0% Medium)
  - － 或用微孔濾膜法(membrane filtration)

# 檢體取樣原則

- 原則

- 將檢體依其物理性質，調製成適合之溶液或懸浮液，調製後以不改變原存在於檢體內生菌之數量及種類為主。

# 取樣

- ◆ 取樣器具(無菌)
  - 容器 藥匙 吸管 培養皿
- ◆ 取樣環境及設備
  - 天平
  - 無菌操作台
- ◆ 取樣量
  - 固體粉末 10g × 2
  - 液體檢體 10mL × 2

# 稀釋及增菌

## ◆好氧性微生物總數

- 10g/10mL 檢品 + 90mL 7.2 PBS 或 TSB 至 100mL (10倍稀釋)  
(必要時以10倍稀釋方式逐步稀釋至所需倍數)  
供作檢液，使成 30~300 cfu/plate
- 黏性強或很混濁檢液將稀釋倍數放大 (10 × → 50×)
- 混合均勻後取樣
- 檢品稀釋至培養皿製備，不超過一小時

## ◆增菌

- 10g/10mL 檢品加入90mL Lactose broth 混合均勻後  
培養



# 好氧性微生物總數檢驗(培養皿法)

- ↓ 取檢品10 g/10mL 加 pH 7.2 磷酸鹽緩衝液 90mL 或TSB至 100mL (10倍稀釋液)，視情況以10倍稀釋方式逐步稀釋至所需倍數，供作檢液
- ↓ 取上述各種不同比例稀釋液各1.0mL加入培養皿(做二重複)
- ↓ 各加15 ~ 20 mL 45~ 50 °C 之Tryptic soy agar ( TSA )，水平均勻混合，靜置使凝固
- ↓ 將培養皿倒置，於 30 ~ 35 °C 恆溫培養箱中培養 48 ~ 72小時(連續觀察)
- ↓ 取同稀釋倍數之兩個培養皿之菌落數，求其平均值，再乘以其稀釋數，即為其每克/每毫升之生菌數

\* 單位：CFU/g or CFU/mL(colony forming unit )



# 酵母菌與黴菌總數檢驗(培養皿法)

- ↓ 取檢品10g/10mL 加 pH7.2 磷酸鹽緩衝液 90 mL或TSB至100mL (10倍稀釋液)，視情況以10倍稀釋方式稀釋至所需倍數)，供作檢液
- ↓ 取上述各種不同比例稀釋液各1.0mL加入培養皿 (做二重複)
- ↓ 各加15~20mL 45 ~50 °C 之 Sabouraud Dextrose Agar ( SDA )，水平均勻混合靜置使凝固
- ↓ 將培養皿倒置，於20 ~ 25 °C 恆溫培養箱中培養5 ~ 7天(連續觀察)
- ↓ 取同稀釋倍數之兩個培養皿之菌落數，求其平均值，再乘以其稀釋倍數，為其每克/每毫升之生菌數





# 總生菌數與酵母菌及黴菌數比較

	稀釋液	培養基	培養溫度	培養時間
總生菌數	7.2 PBS	TSA SCDA	30~35 °C	2~3天
酵母菌及 黴菌總數	7.2 PBS	SDA PDA	20~25 °C	5~7天

總生菌數：Tryptic Soy Agar (TSA)

Soybean-Casein Digest Agar (SCDA)

酵母菌及黴菌：Sabouraud Dextrose agar (SDA)

Potato Dextrose Agar (PDA)



# 特殊致病原菌 — 大腸桿菌 (*E. Coli.*)

- ↓ 取檢品10g/10mL，加入Lactose Broth至100mL，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中做增菌培養24~48小時
- ↓ 以接種環直接接種於MacConkey Agar培養基之表面上，加蓋並倒置。於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24~48小時，觀察其菌落生長情形
- ↓ 取可疑菌落分別接種於EMB Agar培養基之表面上，加蓋並倒置。於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24~48小時，觀察其菌落生長情形

# 特殊病原菌－大腸桿菌(*E. Coli.*)

特殊培養基	MacConkey Agar	EMB Agar
菌落特徵	磚紅色 外圍有膽汁 沉澱環	於反射光下 有特殊光 澤，於透射 光下為藍黑 色
革蘭氏染色	陰性桿菌	陰性桿菌



*Escherichia coli* colonies on MacConkey Agar



EMB Agar w/ *E. coli*

\* 必要時可用其他適當選擇性培養基及生化試驗方法予以確認(如Vitek等)

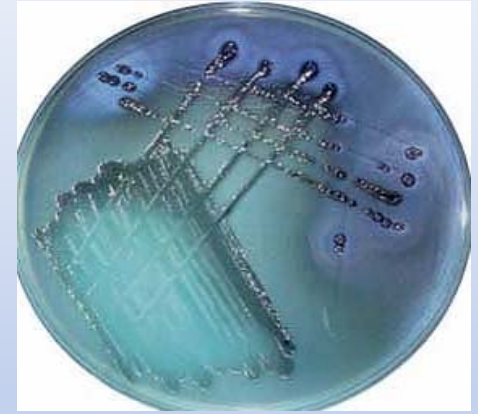


# 特殊病原菌－沙門氏菌(*Salmonella*)

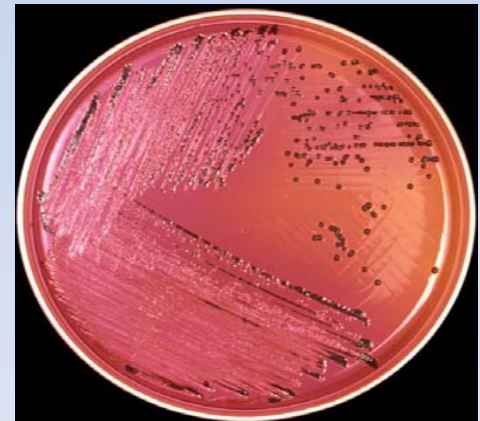
- ↓ 取檢品10g/10mL，加入Lactose Broth至100mL，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中作增菌培養24 ~ 48小時
- ↓ 若有菌產生，則取該菌液1.0mL各加入內含10mL Selenite Cystine Broth之試管及內含10mL Tetrathionate Broth之試管，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中作再次增菌培養12 ~ 24小時
- ↓ 以接種環畫線接種於 BGA medium、XLD agar medium、(BSA) medium培養基之表面上，加蓋並倒置於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24 ~ 48小時，觀察其菌落生長情形
- ↓ 上述可疑菌落進行分別先接種於TSIA斜面培養基，再做深層穿刺，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24 ~ 48小時，觀察菌落生長情形

# 特殊病原菌－沙門氏菌(*Salmonella*)

特殊培養基	BGA	XLD	BSA	TSIA
菌落外觀	形小、透明、無色或粉紅色(常有粉紅色至紅色圈)	紅色、有或無黑色中心	黑色或綠色	斜面培養紅色
革蘭氏染色	陰性桿菌	陰性桿菌	陰性桿菌	陰性桿菌



salmonella\_BSA



Salmonella\_XLD

# 特殊病原菌－綠膿桿菌

## (*Pseudomonas aeruginosa*)

- ↓ 取檢品10g/10mL，加入TSB medium 至100mL，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中增菌培養24 ~ 48小時
- ↓ 以接種環直接接種於Cetrimide Agar培養基之表面上，加蓋並倒置，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24 ~ 48小時，觀察其菌落生長情形
- ↓ 若培養基上之菌落為綠色，於紫外光下成綠色螢光，對革蘭氏染色呈陰性桿菌反應的話，則取上述可疑菌落以接種環分別接種於Pseudomonas-Agar Medium培養基之表面上，加蓋並倒置，於33°C ~ 37°C 下，培養三天，檢測Fluorescin及Pyocyanin
- ↓ 上述可疑菌落在進行Oxidase and Pigment Test



# 特殊病原菌－綠膿桿菌

## (*Pseudomonas aeruginosa*)

特殊培養基	Cetrimide Agar Medium	<i>Pseudomonas</i> -Agar Medium for detection of <b>Fluorescin</b>	<i>Pseudomonas</i> -Agar Medium for detection of <b>Pyocyanin</b>
菌落特徵	一般為綠色	一般為無色至黃色	一般為綠色
紫外光之螢光	綠色	黃色	藍色
氧化 試驗	陽性	陽性	陽性
革蘭式染色	陰性桿菌	陰性桿菌	陰性桿菌



*Pseudomonas* / Cetrimide

# 特殊病原菌－金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)

- ↓ 取檢品10g/10mL，加入TSB至100mL，於30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中增菌培養24 ~ 48小時
- ↓ 以接種環直接接種於Mannitol-Salt Agar 或Baird-Parker Agar或Vogel-Johnson Agar培養基之表面上，加蓋並倒置於，30°C ~ 35°C 恆溫培養箱中培養24 ~ 48小時，觀察其菌落生長情形
- ↓ 上述可疑菌落再進行Coagulase Test (凝血酶試驗)



# 特殊病原菌－金黃色葡萄球菌

## (*Staphylococcus aureus*)

特殊培養基	Vogel-Johnson Agar	Mannitol-Salt Agar	Baird-Parker Agar
菌落特徵	黑色，周圍有黃色圈汁沉澱環	一般為無色至黃色	一般為綠色
凝血試驗	陽性	陽性	陽性
革蘭式染色	陽性球菌(成串狀)	陽性球菌(成串狀)	陽性球菌(成串狀)



*Staphylococcus* /  
Mannitol

# 查驗登記案文件準備須知

- 檢驗依據
- 檢驗規格
- 詳細檢驗標準作業程序(SOP)
  - － 培養基配製方法、檢體前處理
  - － 取樣量、稀釋方法
- 原始檢驗紀錄(表格化)
- 成績書

# 查驗登記案常見問題(一)

- 檢驗依據非藥典等公定書
- 檢送規格
  - 不符合所依據之公定書
  - 勿影印藥典附錄之內文代替SOP
  - SOP內容不完整
- 缺與送驗檢體同批號
  - 原始檢驗紀錄(含培養基配製等資料)
  - 成績書

# 查驗登記案常見問題(二)

- 總生菌數結果表示
  - 0 cfu/g (10倍稀釋) 應為 < 10 cfu/g
  - 直接寫 <  $10^5$  cfu/g 非寫實際檢驗結果
- 未逐步稀釋僅作  $10^4$  (單階)稀釋溶液二重複
  - 無法反應實際污染情形
  - 趨勢分析評估
- 檢體特性&稀釋階
- 檢驗結果與SOP無法比對
- 總生菌數規格訂為  $1.0 \times 10^3$  cfu/g ?
- 無法提供原始檢驗紀錄或不完整

# The End

## 謝謝!







