

# 中藥濃縮製劑 微生物限量檢驗法

主講人：許鳳麟 葉美伶

日期：2010.11



# 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

# 中藥規格(行政院衛生署公告)

公告	總生菌數	酵母菌及黴菌總數	大腸桿菌	沙門氏桿菌
99.5.28 署授藥字第 0990003141號 中藥濃縮製劑	$\leq 10^5$ cfu/g	未規定	不得檢出	不得檢出
95.10.26 署授藥字第 0950003236號 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

# 微生物限量檢測項目

## ◆ 總生菌數

- 好氧性總生菌數(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*)



# 檢測方法

## ◆ 檢測前準備

- － 培養基製備
- － 培養基效能性測試
- － 標準菌株及保存

## ◆ 檢測流程

- － 取樣
- － 稀釋及增菌
- － 培養
- － 結果觀察



# 檢測前準備事項 -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



# 檢測前準備事項 -2

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

# 培養基

## ◆ 固體培養基- 斜面、平板

Tryptic soy agar ( **TSA** 好氧性總生菌數)

Sabouraud dextrose agar ( **SDA** 酵母菌及黴菌數)

## ◆ 液體培養基 - 增殖

Lactose Broth ( **LB** ) – *E.Coli.*、*Salmonella*

Tryptic soy broth ( **TSB** ) – *Pseudomonas aeruginosa*  
*Staphylococcus aureus*

★固體培養基再融化不超過1次，以免影響其效能

★融化的培養基儲存不應超過8小時





# 致病原性之特殊培養基

## ◆ 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

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

#### — TSA medium

致病原性四株菌任選1~2株 接種量 < 100 cfu

30~ 35°C 培養18 ~24小時 觀察是否能長菌

#### — SDA medium

*Candida albicans* 接種量 < 100 cfu

20~ 25°C 培養 2 ~3 天 觀察是否能長菌

#### — 選擇性培養基

以相對應之菌株接種，接種量 < 100 cfu

30~ 35°C 培養18 ~24小時 觀察是否能長菌

★ *Candida albicans* (ATCC10231 ; BCRC21538)



# 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

ATCC: American Type Culture Collection

BCRC: Bioresource Collection and Research Center



# 菌種活化製備

- 選擇正確菌種，並確認菌種身份
- 依據生產廠商說明書活化菌種
- 不要重覆從菌種包裝瓶中移取菌種或重新冷凍菌種
- 繼代次數(每接種一次即為一代)
- 所有接觸菌種(液)之器具皆須經高溫高壓滅菌處理

# 菌種之保存

## (Maintenance of Stock Culture)

- ◆ 繼代培養 (適當培養基於 $4^{\circ}\text{C}$ )
- ◆ 冷凍保存 (一) ( $-20 \sim -30^{\circ}\text{C}$ ) 約半年
- ◆ 冷凍保存 (二) ( $-40 \sim -90^{\circ}\text{C}$ ) 數年
- ◆ 冷凍保存 (三) 液態氮 ( $-180^{\circ}\text{C}$  以下) (可長期保存)
- ◆ 冷凍乾燥法 (可長期保存)

# 冷凍保存（-40 ~ -90°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°C 冰箱 2 小時 → -20°C 2 小時 →  
再置 -40°C ~ -90 °C 保存

# pH 7.2 磷酸鹽緩衝液

## ◆ 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



# 微生物限量檢測流程圖

## ◆ 好氧性總生菌數

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





# 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

# 稀釋及增菌

## ◆ 總生菌數

- 10g 檢品 + 90mL 7.2 PBS 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 檢品加入 Lactose broth 混合均勻後培養



# 好氧性總生菌數測試(培養皿法)

- ↓ 取檢品10 g 加 pH 7.2 磷酸鹽緩衝液 90mL 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，即為其每克之生菌數

\* 單位: CFU/g (colony forming unit)



# 酵母菌與黴菌總數測試(培養皿法)

- ↓ 取檢品10g 加 pH7.2 磷酸鹽緩衝液 90 mL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)



# 總生菌數之結果計算

## ◆ 案例

10X 培養皿 0 , 0 結果  $< 10$  cfu/g

## ◆ 案例

10X 培養皿 15 , 25 結果  $< 200$  cfu/g ( $2.0 \times 10^2$  cfu/g)

## ◆ 案例

100X 培養皿 130 , 120 平均 125

1000X 培養皿 38 , 54 平均 46

結果  $(125 \times 100 + 46 \times 1000) \div 2 = 29250$

$2.9 \times 10^4$  cfu/g

\* 中藥濃縮製劑之總生菌數規格為 $10^5$  cfu/g 以下



# 特殊致病原菌－大腸桿菌(*E. Coli.*)

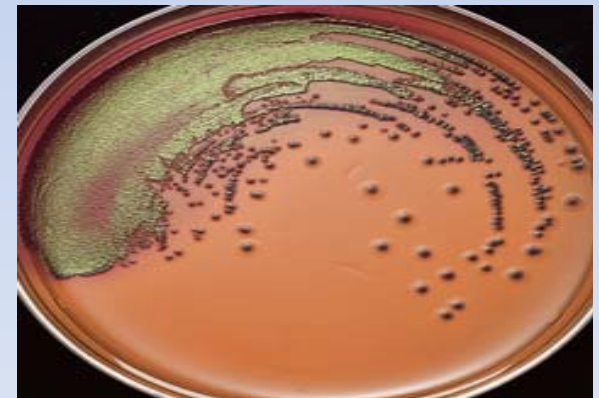
- ↓ 取檢品10g，加入Lactose Broth至100mL，於30°C～35°C恆溫培養箱中做**增菌**培養24～48小時
- ↓ 以接種環直接接種於MacConkey Agar培養基之表面上，加蓋並倒置。於30°C～35°C恆溫培養箱中培養24～48小時，觀察其菌落生長情形
- ↓ 取**可疑菌落**分別接種於EMB Agar培養基之表面上，加蓋並倒置。於30°C～35°C恆溫培養箱中培養24～48小時，觀察其菌落生長情形

# 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之培養及生化試驗方法予以確認(如Vitek等)



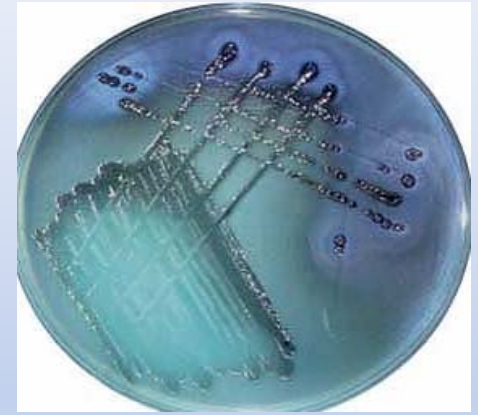
# 特殊病原菌－沙門氏菌 (*Salmonella*)

- ↓ 取檢品10g，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，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，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 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

# 實驗報告內容應包括：

- 實驗日期
- 微生物檢驗人員名字
- 受測材料名稱、批號、數量
- 標準作業程序編號
- 檢測方法
- 檢測結果
- 審核員簽名

# 查驗登記案文件準備

- 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、檢驗、結果計算方法
- 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
  - SOP不能以影印藥典附錄之內文替代
  - 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
- 只作  $10^4$  稀釋溶液二重複
  - 無法反應實際污染情形
  - 趨勢分析評估
- 增加取樣量欲達到 30~300 cfu/plate
- 非以10倍系列稀釋方式
- 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



# The End

## 謝謝!

