

· 研究报告 ·

快立洁手消毒凝胶的微生物限度检查方法学验证

檀巧婷, 严佳, 周欣, 宋洪涛 (南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025)

[摘要] 目的 建立快立洁手消毒凝胶的微生物限度检查方法。方法 采用薄膜过滤法,按照《中国药典》2010年版二部有关微生物限度检查法的相关要求进行快立洁手消毒凝胶的微生物限度检查方法验证。方法学验证试验以枯草芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、白色念珠菌、黑曲霉为试验菌,铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌为控制菌。验证试验进行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。结果 细菌、真菌和酵母菌计数方法验证试验中,试验菌的回收率、控制菌检查结果均符合要求。结论 薄膜过滤法有效可行,可用于快立洁手消毒凝胶的微生物限度检查。

[关键词] 快立洁手消毒凝胶; 微生物限度检查; 方法学验证; 薄膜过滤法

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2014)05-0366-03

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2014.05.014

Validation of method for microbial limit test of fast vertical liquid hand disinfectant gel

TAN Qiaoting, YAN Jia, ZHOU Xin, SONG Hongtao (Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] **Objective** To establish a method for microbial limit test of fast vertical liquid hand disinfectant gel. **Methods** The membrane filtration method, in accordance with the Chinese Pharmacopoeia 2010 Edition (part two) relevant requirements of microbial limit test method for validation of microbial limit test for fast vertical liquid hand disinfectant gel. *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger* were taken as test bacteria, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* were taken as control bacteria. Verification test was carried out in parallel test for 3 independent, recoveries and every trail rate were calculated. **Results** In bacteria, molds and yeasts count method validation test, recovery test strain rate, the control bacteria test results met the requirements. **Conclusion** The membrane filtration method was feasible and effective, which could be used for microbial limit test of fast vertical liquid hand disinfectant gel.

[Key words] fast vertical liquid hand disinfectant gel; microbial limit test; method validation; membrane filtration method

快立洁手消毒凝胶是本院自主研发制剂,临床上用于外科洗手消毒、手卫生消毒以及一般皮肤消毒。根据《中国药典》2010年版二部规定,凝胶剂必须做微生物限度检查。建立该制剂微生物限度检查法时,应进行细菌、真菌及酵母菌计数方法的验证,以确认所采用的方法是否适合于该制剂的细菌、真菌及酵母菌数的测定^[1]。该凝胶中含有三氯生、乙醇等抑菌成分,进行微生物限度检查时应降低或消除其抑菌作用。经查阅相关资料和文献^[2-6],对于抑菌活性强的制剂,微生物限度检查多采用薄膜过滤法,因此采用薄膜过滤法建立快立洁手消毒凝胶微生物限度检查方法。

1 试验材料

1.1 样品 快立洁手消毒凝胶(批号 20121112),由南京军区福州总医院制剂室提供。

1.2 试验菌种 试验用菌均由福建省药检所提供,分别是:金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) [CMCC(B) 26003];大肠杆菌(*Escherichia coli*) [CMCC(B) 44102];枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) [CMCC(B) 63501];白色念珠菌(*Candida albicans*) [CMCC(F) 98001];黑曲霉(*Aspergillus niger*) [CMCC(F) 98003];铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) [CMCC(F) 10104]。

1.3 培养基及稀释液 营养肉汤培养基(批号 101213)、营养琼脂培养基(批号 110325)、玫瑰红琼脂培养基(批号 110401)、改良马丁培养基(批号 1011282)、改良马丁琼脂培养基(批号 1010272)、胆盐乳糖培养基(批号 1012012)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号 101201)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培

[作者简介] 檀巧婷,药师,学士。Tel: 22859963, E-mail: tpt-010@163.com.

[通讯作者] 宋洪涛。Tel: 22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com.

培养基(批号 101124)和 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号 120329)均由北京三药科技开发公司提供。

1.4 仪器 隔水式电热恒温培养箱(型号: GHP-9160)、电热恒温鼓风干燥箱(型号: DHG-9145A)、无菌检查仪(型号: WJ-6)、净化工作台(型号: SW-CJ-1B)、真菌培养箱(型号: MJPS-150)、立式压力蒸汽灭菌器(型号: LDZX-40KBS)。

2 验证方法

按照《中国药典》2010年版二部附录 XI J 微生物限度检查法,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。

2.1 菌液和供试液制备

2.1.1 菌液制备 分别取经 35 °C 培养 24 h 后的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的新鲜培养物,以及 26 °C 培养 48 h 的白色念珠菌新鲜培养物,用 9 ml 0.9% 无菌氯化钠溶液依次 10 倍稀释至 10^{-7} ;取经 26 °C 培养 7 d 后的黑曲霉新鲜培养物,用 5 ml 含 0.05% (ml/ml) 聚山梨酯 80 的 0.9% 无菌氯化钠溶液将孢子洗脱,吸出孢

子悬液,再 10 倍递增稀释。以上菌悬液同时取 2 份注入琼脂培养基培养,采用平皿法计数,得到所需菌落数(50 ~ 100 CFU/ml)的菌液稀释级。

2.1.2 供试液制备 取样品 1 ml,置于 100 ml pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液中,振摇,使其均匀分散,作为 1:100 供试液,备用。

2.2 回收率测定

2.2.1 结果判断标准 试验组的菌回收率(%) = [(试验组平均菌落数 - 供试品对照组平均菌落数) / 菌液组平均菌落数] × 100%

稀释剂对照组的菌回收率(%) = (稀释剂对照组的平均菌落数 / 菌液组的平均菌数) × 100%

2.2.2 细菌、真菌计数方法验证 ①试验组:取供试液 1 ml,注入薄膜过滤器,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液过滤,冲洗 3 次,每次 100 ml,在最后一轮的冲洗液中加入试验菌菌悬液 1 ml(50 ~ 100 CFU/ml),过滤后取出滤膜,菌面朝上贴于相应琼脂培养基上,培养观察。②菌液组:操作同试验组,仅加菌液。③供试品对照组:操作同试验组,仅加供试液。④稀释剂对照组:取稀释液 1 ml 替代供试液,操作同试验组。

表 1 细菌、真菌计数方法验证试验结果(n=3)

菌株	菌落计数(CFU/ml)				试验组回收率(%)	稀释剂对照组回收率(%)
	试验组	菌液组	供试品对照组	稀释剂对照组		
大肠杆菌	49	58	0	52	84.5	89.7
	74	78.5	0	72	94.3	91.7
	68	79	0	60	86.1	75.9
金黄色葡萄球菌	84	92	0	80	91.3	87.0
	75.5	90	0	85	83.9	94.4
	70	93	0	79	75.3	84.9
枯草芽孢杆菌	76.5	88	0	65	86.9	73.9
	72	79.5	0	66	90.6	83.0
	68.5	82	0	72.5	83.5	88.4
白色念珠菌	72.5	90	0	83	80.6	92.2
	70	81	0	70.5	86.4	87.0
	61.5	79	0	64	77.8	81.0
黑曲霉	82	96	0	80	85.4	83.3
	62	77.5	0	71	80	91.6
	78	85	0	74	91.8	87.1

由表 1 可见:回收率均大于 70%,结果符合药典要求。

2.3 控制菌检查方法的验证^[7]

2.3.1 试验组 铜绿假单胞菌:取供试液 1 ml,注入过滤器中,用 pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液过滤,冲洗 3 次,在最后一次冲洗液中加入试验菌 1 ml(50 ~ 100 CFU/ml),过滤,取出滤膜,接种至 100 ml 的胆盐乳糖培养基中,培养 24 h。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 24 h,观察结果。金黄色葡萄球菌:同铜绿假单胞菌培养方法,取出滤膜,接种至 100 ml 的营养肉汤培养基中,培养 24 h,取上述培养物划线接种于甘露醇氯化钠琼脂培养基的平板上,培养 72 h,观察结果。

2.3.2 菌液组 铜绿假单胞菌:过滤器中先注入少量缓冲液,再注入菌悬液各 1 ml(50 ~ 100 CFU/ml),不加供试液,过滤(同 2.3.1 试验组操作)。金黄色葡萄球菌:同上述铜绿假单胞菌培养方法,过滤
(下转第 382 页)

3.4 自我防护意识 从急诊科和骨科门诊接诊统计情况来看,有7例为意外损伤,在救灾现场,广大指战员舍生忘死地搜救幸存者,自我保护意识已经淡漠,作为部队的指挥者应该在战士当中树立既要有勇于献身精神,又要有自我防护的意识,避免不必要的救援人员伤亡事件发生。

3.5 疫源性和人员密集 在笔者收集的处方中有7例为已经确诊或待查的肺结核患者,2010年全国第五次结核病流行病学现场调查结果显示,与2000年相比,全国肺结核患病率继续呈现下降趋势^[4]。但在抗震救灾的现场,在极其恶劣的环境下,肺结核感染可能有上升的苗头,这应该引起有关部门的关注。加强平时部队计划免疫,在条件允许时,对参加应急任务人员在出发前增加一次接种疫苗的机会。

笔者认为,切实做好救灾人员的各项防护措施,可以使我们的救援人员既在关键时刻做出快速反

应,又能胜任未来的险峻救灾任务,并且降低救灾人员的意外受伤和发病率。

【参考文献】

[1] 世界卫生组织药物统计方法整合中心(The WHO Collaborating Centre for Drug Statistics Methodology). 解剖学治疗学及化学分类系统(Anatomical Therapeutic Chemical, ATC) [S]. 美国佛罗里达州: 维基媒体基金会, 2006年版.

[2] 张鹏, 易贤楚. 抗震救灾医学救援的应急准备与组织实施[J]. 解放军医院管理杂志, 2009, 16(7): 654-655.

[3] 中国新闻周刊. 地震救援 13.7万军队如何调配[EB/OL]. (2008-06-05) [2013-3-11]. <http://news.163.com/08/0605/11/4DM24JU600012MS9.html>.

[4] 郑灵巧. 我国传染性肺结核患病率10年下降61%[EB/OL]. 健康报, 2011-03-22 [2013-3-11]. <http://www.jkb.com.cn/htmlpage/19/198389.htm?docid=198389&cat=09C&sKeyword=null>.

[收稿日期] 2013-08-30 [修回日期] 2014-01-07

[本文编辑] 李睿旻

(上接第367页)

后取出滤膜置于营养肉汤培养基中,培养、划线(同2.3.1 试验组)。

2.3.3 供试品对照组 同试验组,加供试液,不加菌液。

2.3.4 稀释剂对照组 取与供试液等量的稀释剂与供试品组同法操作,作为阴性对照。

表2 控制菌检查方法验证试验结果

菌种	试验组	菌液组	供试品对照组	稀释剂对照组
金黄色葡萄球菌	+	+	-	-
铜绿假单胞菌	+	+	-	-

注:表中“+”呈阳性,“-”呈阴性,符合《中华人民共和国药典》要求

3 讨论

3.1 样品具有抑菌作用,根据凝胶微生物限度检查方法的文献报道^[2-6],采用薄膜过滤法,能有效降低或消除抑菌作用,检查结果符合要求。在验证试验过程中,供试品分别制成1:10,1:20,1:50的供试液时,薄膜过滤缓慢,滤膜易堵,试验菌生长不规则,甚至不生长,菌回收率低于70%,不符合药典要求。试验最终选取1:100供试液,菌落生长良好,薄膜过滤较为顺畅,菌回收率均高于70%,验证结果符合要求。

3.2 微生物限度检查的整个步骤相当复杂,相关程序特别多,在检测的过程中,任何的检测程序中的操作不当和硬件条件不够,都会对药品微生物限度检查结果造成不同程度的影响,从而导致误差的出现^[8]。

4 结论

经验证试验,采用薄膜过滤法对样品进行细菌、真菌、酵母菌检查及控制菌检查,将样品制成1:100供试液,用pH7.0的无菌氯化钠-蛋白胍缓冲液冲洗3次,每次100ml,试验菌回收率及控制菌检查结果均符合《中华人民共和国药典》规定。因此,在此试验条件下,采用薄膜过滤法建立快立洁手消毒凝胶微生物限度检查有效可行。

【参考文献】

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典2010年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录XI J108.

[2] 江燕, 张春瑛, 钱文忠. 红花油凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药师, 2010, 13(4): 591-592.

[3] 李近磊, 王嘉怡, 迟丹怡, 等. 复方克林霉素凝胶微生物限度检查法的方法验证研究[J]. 中国药房, 2010, 21(25): 2380-2382.

[4] 杨淑先, 赵新霞, 牛坡. 林可霉素利多卡因凝胶微生物限度检查方法研究[J]. 中国药房, 2011, 22(33): 3143-3145.

[5] 钱文静, 张玫, 袁耀佐. 盐酸特比萘芬凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 药物分析杂志, 2008, 28(12): 2135-2139.

[6] 刘宁, 张文婷. 克林霉素磷酸酯凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(12): 1991-1993.

[7] 周国华, 傅小英. 医疗机构制剂检验基本操作指南[M]. 北京: 人民军医出版社, 2012: 112-121.

[8] 李佩蓉, 范秋汝. 药品微生物限度检验的误差影响因素[J]. 北方药学, 2011, 8(3): 81-819.

[收稿日期] 2013-06-06 [修回日期] 2013-10-29

[本文编辑] 陈静