

中图分类号: R917; R954 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)13-0081-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.13.019



药品洁净实验室物体表面微生物采集方法研究*

余凡¹, 刘刚¹, 崔亚宁², 闵红^{2△}, 张健宇¹

(1. 陕西省杨凌示范区药品检验监测评价中心, 陕西 咸阳 712100; 2. 陕西省食品药品检验研究院, 陕西 西安 710065)

摘要:目的 为药品洁净实验室物体表面微生物采集方法的选择提供参考。方法 以金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、黑曲霉为代表菌株, 对生物安全柜操作台面、集菌仪、非织布无菌服、无菌手套表面进行人工染菌制备负载样品, 分别采用擦拭法和接触碟法采集同一物体表面的微生物, 并比较回收率。分别采用接触碟法、擦拭法对实验室各洁净级别环境(A-D级)物体进行表面微生物采集, 并比较单位面积表面微生物数量。结果 负载样品接触碟法的回收率均大于80%, 显著高于擦拭法的 $(51.3 \pm 2.5)\% \sim (67.7 \pm 3.1)\%$ ($P < 0.05$)。实验室各级别环境(B-D级)物体表面微生物菌落计数中, 接触碟法检出率均显著高于擦拭法 ($P < 0.05$)。结论 药品洁净实验室平整光滑的物体表面的微生物采集适宜采用接触碟法, 可提高检出率, 能较好地反映物体表面微生物的污染状况。

关键词: 表面微生物; 药品洁净实验室; 擦拭法; 接触碟法

Collection Methods for Surface Microorganisms on Objects in Drug Cleanliness Laboratory

SHE Fan¹, LIU Gang¹, CUI Yaning², MIN Hong², ZHANG Jianyu¹

(1. Drug Testing Monitoring and Evaluation Center of Yangling Agricultural High-Tech Industrial Demonstration Zone, Xianyang, Shaanxi, China 712100; 2. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

Abstract: **Objective** To provide a reference for the selection of collection methods for surface microorganisms on objects in the drug cleanliness laboratory. **Methods** Representative strains of *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, and *Aspergillus niger* were used to artificially stain and prepare loaded samples on the laboratory operating surfaces of biosafety cabinets, bacterial collectors, non-woven sterile clothing, and sterile glove surfaces. The surface microorganisms of the same object were collected by the wiping and contact plate methods, and the recovery rates were compared. For each cleanliness level environment (A-D levels) in the laboratory, the surface microorganisms of objects were collected by contact disc method and wiping method, and the number of surface microorganisms per unit area was compared. **Results** The recovery rate of the contact disc method for loaded samples was over 80%, which was significantly higher than $(51.3 \pm 2.5)\%$ to $(67.7 \pm 3.1)\%$ of the wiping method ($P < 0.05$). The results of microbial sampling on the surface of environmental objects at different levels (B-D levels) in the laboratory showed that the detection rate of the contact disc method was significantly higher than that of the wiping method ($P < 0.05$). **Conclusion** The contact disc method is suitable for collecting microorganisms on the flat and smooth surface of objects in the drug cleanliness laboratory to improve the detection rate and truly reflect the surface microbial contamination status.

Key words: surface microorganisms; drug cleanliness laboratory; wiping method; contact disc method; collection rate

实验室洁净度质量控制是药品微生物检验结果有效、正确的保障和前提。应定期监测实验室微生物污染情况, 确保监测结果符合药品无菌检查/微生物限度检查的要求^[1]。洁净实验室受控环境按照监测项目及监测频次进行监测, 确保受控环境维持可接受的微生物污染水平, 防止外来微生物污染药品。实验室微生物监测包括关键的检测台面、人员操作服表面和操作手套的生物活性微生物、浮游菌和沉降菌。表面活性微生物测定是指对环境、设备和人员的表面微生物进行监测。设施设备、药品直接接触的人员操作手套和操作服表面

的微生物是实验室表面微生物监测的重点。单位面积表面微生物数量是评估洁净区微生物污染的重要指标。表面微生物监测结果不仅可为超标结果、阳性结果的微生物数据偏差(MDD)全面调查与分析提供依据, 还可监测消毒剂及清洁剂的使用效果^[2]。物体表面污染微生物会导致实验结果出现偏差^[3]。控制和监测洁净区表面微生物, 可保证实验数据不受外来微生物的污染, 提高检验结果的准确性和可靠性。样品收集方法是表面微生物检验过程中的关键环节。有效的采样技术手段可准确反映物体表面微生物的污染情况, 以及洁净实验室

*基金项目: 陕西省重点研发计划项目[S2023-YF-YBSF-0265]。

第一作者: 余凡, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品微生物检验及实验室质量控制, (电子信箱)1844799541@qq.com。

△通信作者: 闵红, 女, 博士, 副主任药师, 研究方向为药品微生物检验及实验室质量控制, (电子信箱)hong-min518@163.com。

真实的微生物负载量^[4-5]。选择合理的采样检测方法可提高微生物的检出率,保障检验结果的真实性。为此,本研究中选取实验室关键的物体表面并制备人工负载样品,采用擦拭法和接触碟法进行采样,以期对药品洁净实验室物体表面微生物采集方法的选择提供参考。现报道如下。

1 仪器、材料与菌种

1.1 仪器

BHC-1300 II A2型生物安全柜(苏净集团苏州安泰空气技术有限公司);LMQ-C型立式灭菌器(新华器械有限公司);HTY-601型集菌仪(浙江泰林生物技术有限公司);SPX-150型生化培养箱(上海慧科电子有限公司);BS223S型电子天平(德国Sartorius公司,精度为1 mg)。

1.2 材料

FC752型薄膜过滤器;接触皿;无菌模板;非织布无菌服;一次性使用灭菌橡胶外科手套;一次性接种环;胰酪大豆胨琼脂培养基(批号为221228),pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液(稀释液、冲洗液,批号为211026),均购自北京三药科技开发公司;培养基适用性检查符合2020年版《中国药典》要求。

1.3 菌种

金黄色葡萄球菌[编号为CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌[编号为CMCC(B)10104],枯草芽孢杆菌[编号为CMCC(B)63501],大肠埃希菌[编号为CMCC(B)44102],白色念珠菌[编号为CMCC(F)98001],黑曲霉[编号为CMCC(F)98003],均来自中国菌种保藏中心。

2 方法与结果

2.1 统计学处理

采用SPSS 11.0统计学软件分析。计量资料以 $\bar{X} \pm s$ 表示,行方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2.2 菌悬液制备

按2020年版《中国药典(四部)》要求,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌均制成 $100 \sim 1\,000$ cfu/mL的菌悬液;白色念珠菌、黑曲霉均制成 $100 \sim 500$ cfu/mL的菌悬液。

2.3 生物负载样品制备与检测

2.3.1 生物负载样品制备

生物安全柜操作台表面:操作台面试验前常规消毒。取4个无菌模板(圆框内面积 25 cm^2),置操作台面上,前3个框内分别滴加0.1 mL金黄色葡萄球菌菌悬液,共用1个一次性接种环,依次将菌液在 25 cm^2 范围内均匀涂抹后自然待干。第1个涂抹制备的人工负载样品弃去不用;后2个制备的人工负载样品中,1个用擦拭法在其表面进行微生物采样及检测,另1个用接触碟法

在其表面进行微生物采样及检测。

集菌仪表面、非织布无菌服表面:样品制备同生物安全柜操作台表面。

无菌手套:取1副无菌手套,将菌液滴加在手套掌侧面的掌心部位,便于表面微生物的采集,其余同生物安全柜操作台表面。

2.3.2 检测

1) 擦拭法

菌落数检测:取2支无菌棉拭子,在含30 mL无菌pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液的大试管中沾湿,于试管口处挤压掉多余的溶液。取3支棉拭子擦拭 25 cm^2 面积。用1支棉拭子于样品表面以水平方向S型擦拭,用另1支棉拭子以垂直方向S型擦拭,再取1支未沾湿无菌干棉拭子,以取样中心为原点,以打圈的方式由里向外擦拭其表面。擦拭时,转动棉拭子,稍用力以增加摩擦力。擦拭后的棉拭子,以无菌方式剪下拭子头,弃去手接触部分,置沾湿棉拭子大试管中,用混匀仪振荡1 min。取全部溶液进行薄膜过滤,每膜用50 mL无菌pH 7.0氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗,滤完后取滤膜贴于胰酪大豆胨琼脂培养基平板(平板 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预先培养48 h,应无菌生长)上,将平板置 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养72 h,观察并计数。

本底菌落检测:取第4个未加菌液无菌模板框内样品,其余同擦拭法菌落数检测。

菌液组检测:取0.1 mL金黄色葡萄球菌的菌悬液,滴加在90 mm的平皿中,加入胰酪大豆胨琼脂培养基,混匀,培养温度和时间同擦拭法菌落数检测。

2) 接触碟法

菌落数检测:取下充满规定胰酪大豆胨琼脂培养基的接触皿(含培养基的接触皿 $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预先培养48 h,应无菌生长)的皿盖(直径为55 mm,面积为 25 cm^2),将培养基凸起面按压在台面生物负载样品表面10 s,恒定、均匀地施压,不得有环形或线性运动,按压好后将皿拿起,盖好皿盖。将采样好的接触皿进行培养并观察计数,培养温度和时间同擦拭法。

本底菌落数检测:取未加菌的操作台面,其余同接触碟法菌落数检测。

菌液组检测:同擦拭法菌液组。

3) 计算方法

分别计算金黄色葡萄球菌擦拭法和接触碟法的回收率。擦拭法回收率(%) = (擦拭法检测菌落数 - 擦拭法本底菌落数) / 菌液组菌落数 $\times 100\%$;接触碟法回收率(%) = (接触碟法检测菌落数 - 接触碟法本底菌落数) / 菌液组菌落数 $\times 100\%$ 。同法用铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉制备生物安全柜操作台面生物负载样品,每株菌株分别用擦

表1 实验室生物负载样品表面擦拭法与接触碟法的回收率($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)

Tab. 1 Recovery rates of laboratory bioburden samples by the surface wiping method and the contact disc method($\bar{X} \pm s, \%, n = 3$)								
采集面	采集方法	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	大肠埃希菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉	P
生物安全柜操作台表面	擦拭法	59.7 ± 3.1	62.7 ± 4.0	51.3 ± 2.5	56.0 ± 5.6	53.7 ± 3.1	51.3 ± 9.0	< 0.05
	接触碟法	89.0 ± 2.0	83.0 ± 3.6	88.0 ± 5.6	82.3 ± 5.9	90.7 ± 1.5	103.3 ± 5.6	
集菌仪表面	擦拭法	53.3 ± 3.2	57.0 ± 5.6	54.3 ± 6.1	51.3 ± 5.9	52.0 ± 3.0	61.3 ± 6.0	< 0.05
	接触碟法	87.7 ± 2.5	82.3 ± 3.1	91.7 ± 2.5	89.0 ± 6.2	91.0 ± 2.0	106.3 ± 3.5	
非织布无菌服表面	擦拭法	56.0 ± 1.0	61.3 ± 1.5	58.3 ± 6.0	61.3 ± 8.0	57.7 ± 3.1	61.0 ± 7.0	< 0.05
	接触碟法	84.0 ± 1.7	81.3 ± 2.1	82.0 ± 4.0	84.7 ± 6.0	86.3 ± 1.5	81.0 ± 5.0	
无菌手套表面	擦拭法	67.7 ± 3.1	63.0 ± 2.3	64.3 ± 3.1	63.0 ± 6.6	65.7 ± 9.7	63.3 ± 9.0	< 0.05
	接触碟法	82.3 ± 3.2	80.7 ± 2.5	81.7 ± 4.0	83.0 ± 7.9	83.0 ± 7.9	83.3 ± 6.0	

拭法和接触碟法采样及检测,并分别计算各菌株的擦拭法和接触碟法回收率,每株试验菌平行3次,结果见表1。采样后的物体表面应彻底消毒处理,以防污染。

集菌仪、非织布无菌服、无菌手套表面微生物采集方法、检测及回收率计算同生物安全柜操作台。各物体表面菌株擦拭法和接触碟法回收率见表1。

2.4 洁净实验室表面微生物采集与检测

选取本所药品无菌检查室、微生物限度检查室、阳性菌P2实验室A级、B级、C级、D级环境设施设备,分别对其表面进行微生物采样。随机选取30次试验操作完毕后不同环境级别污染风险较高的同一物体表面,分别采用擦拭法和接触碟法进行实际污染微生物采样,采样方法及检测同2.3.2项下。试验结束清场前采样,擦拭法用无菌模板选取25 cm²面积,在同一物体表面接触碟法采样的紧密临近部位采样,采样完毕后对接触面进行消毒处理,以防污染。结果均以cfu / 25 cm²计数,分别计算30次接触碟法和擦拭法的检测结果。结果见表2。

A1级取无菌检查室的操作台面,分别采用接触碟法和擦拭法采样检测(含培养基的接触碟、胰酪大豆琼脂培养基平板,预培养48 h,无菌生长方可用于采样与检测)。

A2级选取无菌室的设备集菌仪,对机壳表面分别采用接触碟法和擦拭法采样、检测。

B1级选取微生物限度检查完毕后的操作手套,采样前双手对搓,用手套内侧面靠近指尖的部位按压在接触碟凸起的培养基上采样,另一只手套相同部位用擦拭法采样、检测。

B2级选取微生物限度检查完毕后的操作服,取前臂靠近袖口易污染的部位,采样前双前臂互相摩擦,一侧用接触碟法采样、检测,另一侧用擦拭法采样、检测。

C1级环境选取P2实验室的墙面,取靠近回风口接近地面的墙面,分别采用接触碟法和擦拭法采样、检测。

C2级选取微生物限度检查室边台表面,取使用频

率较高、易污染的区域,分别采用接触碟法和擦拭法采样、检测。

D1级选取P2实验室缓冲区的地面,取出入操作间门附近区域,分别采用接触碟法和擦拭法采样、检测。

D2级选取二更缓冲区出入洁净走廊门附近的地面,分别采用接触碟法和擦拭法采样、检测。

表2 实验室各洁净级别接触碟法与擦拭法表面微生物检测结果($\bar{X} \pm s, \text{cfu} / 25 \text{ cm}^2$)

Tab. 2 Detection results of surface microorganisms by the contact disc method and the contact disc method for each cleanliness level in the laboratory ($\bar{X} \pm s, \text{cfu} / 25 \text{ cm}^2$)			
环境级别	接触碟法	擦拭法	P值
A1级	0.2 ± 0.4	0.3 ± 0.6	0.451
A2级	0.4 ± 0.6	0.5 ± 0.7	0.706
B1级	4.8 ± 1.4	2.2 ± 1.4	< 0.05
B2级	3.7 ± 1.3	1.5 ± 1.0	< 0.05
C1级	6.5 ± 3.0	3.1 ± 2.3	< 0.05
C2级	12.2 ± 5.3	6.7 ± 2.9	< 0.05
D1级	30.3 ± 8.8	20.8 ± 5.9	< 0.05
D2级	18.7 ± 6.1	11.3 ± 4.6	< 0.05

3 讨论

表面微生物检测方法必须考虑采样的准确性和方法的适用性,即一定的信度和效度。擦拭法不同采样面使用相同棉拭子,采用统一的擦拭手法,由同一人采样、检测;接触碟法对不同采样面给予相同的压力和时间,与擦拭法同步进行采样检测,保证试验结果的可重复性和可信性。本研究中通过人工负载样品接触碟法和擦拭法的回收率验证,考察实验室物体表面2种微生物采样和检验方法的适用性。本研究结果显示,擦拭法回收率约为60%,接触碟法回收率大于80%,接触碟法回收率显著大于擦拭法($P < 0.05$)。生物安全柜操作台面、集菌仪、非织布无菌服、无菌手套均为平整、光滑的物体表面,接触碟法用于其表面微生物采集的回收率显著高于擦拭法($P < 0.05$)。

本研究中评估了2种实验室表面微生物的采集方

法,2种方法的检测结果均符合各洁净级别环境微生物监测的动态标准^[6]。B-D级环境中,2种方法检测各级别表面微生物采集的菌落总数不同,接触碟法检出率显著高于擦拭法($P < 0.05$)。药品洁净试验的推车、层流罩、传递窗、凳子、彩钢板墙面、玻璃门窗、无菌隔离器内仓、地面等设备设施表面均属平整、光滑的硬质表面,适宜选用接触碟法采集表面微生物,以获得有效的微生物污染数据。A1-A2级无菌检查室的操作台面和集菌仪表面微生物污染量极少,在染菌量极少的情況下,擦拭法会引起较大的数据误差。由表2可知,A级环境中2种方法采集的菌落数无显著差异($P > 0.05$)。

接触碟法采样是将培养基按压在待测物表面并施加一定压力,压力大小以培养基不变形为宜,采样时待测物的表面和培养基充分接触,以保证采样面上的微生物黏附于培养基表面。擦拭法采样用棉拭子擦拭待测物表面,采样过程包括样品微生物转移、制备洗脱液、过滤贴膜等,通过一定媒介将待测物表面的微生物转移至培养基表面,但转移过程中易产生较大误差。擦拭法采样有用到平皿法检测菌落数,计数结果需乘以稀释倍数,数据误差更大。文献^[7]报道了擦拭法的不足之处,微生物从表面移除的效率及回收率低,结果重复性差,与本研究结果相符。

接触碟法影响因素少,减少了试验结果的不确定性,使试验数据更真实、有效。擦拭法的影响因素较多,如棉拭子的吸附和释放能力^[8]、提取溶剂量、振荡的方式与时间都会影响微生物的回收率^[9]。擦拭法采集效果受拭方式与方法、棉拭子头材质、脱脂棉缠绕的松紧度^[10]、棉拭子头个数与面积、擦拭摩擦力等因素有关^[11]。不同取样人员、取样棉拭子及同一棉拭子不同取样人员的采集率都会有所不同,造成试验结果差异较大。接触碟法节省人力物力,对使用条件要求较低,取样面积精准,取样步骤少,过程不易污染^[12],确保了取样的准确性和安全性,检测数据能真实反映表面微生物污染情况。擦拭法操作过程烦琐,影响试验效率,取样面积不精准,采样和检验过程易污染,造成检验结果的真实性降低。相比于擦拭法,接触碟法采样结果更便于实验室环境菌的溯源分析^[13-14]。

由于污染物分布不均匀,实际微生物采样结果不具有可重复性。通过本研究中采用实验室物体表面微生物的不同采集方法,以及取样结果的回收率和重复性试验,评估了不同物体表面2种采样方法的回收率。擦拭法是较早用于表面微生物检测的传统方法,适用于不规则的设备及弯曲、不平整的物体表面微生物的采集,如实验室门把手等,是接触碟法的有益补充;擦拭法更适宜于凹凸不平、粗糙的物体表面,凹处的微生

物不易被接触碟采集到,湿润的棉拭子更易带出凹处微生物,从而提高此类物体表面微生物的检出率。

擦拭法和接触碟法作为表面微生物采样方法,均属定量检测,广泛用于制药企业车间、食品企业车间、卫生防疫、医院和实验室设施设备、操作人员着装等环境的监测评价和风险评估^[15]。表面微生物检测数据是实验室风险管理的重要参考依据。接触碟法是国外文献报道中最多见的环境表面微生物采样法,具有方便快捷、经济实用、采样效果好等优点,适合染菌量较低的清洁物体表面微生物的采集^[16],是药品洁净室实验室表面微生物采样的理想选择。

参考文献

- [1] 董 勇. 药品微生物检验实验室质量控制策略分析[J]. 中国处方药, 2018, 16(7): 37-38.
- [2] 颜若曦, 曹 轶, 翟铁伟. 药品生产企业质量控制实验室要点与缺陷分析[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(9): 1253-1258.
- [3] 黄慧思, 崔碧玲, 洪嘉敏. 药品洁净区环境微生物监测分析报告[J]. 广东化工, 2021, 48(23): 154-156.
- [4] 陈伟盛, 朱荣峰, 关倩明. 药品洁净实验室生物负载信息的采集与分析[J]. 中国药师, 2015, 18(6): 1046-1048.
- [5] 韩 杰, 任 哲, 金 虹, 等. 两种手术室空气微生物采样方法比较[J]. 中国消毒学杂志, 2017, 34(11): 1024-1026.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 508.
- [7] 林嗣豪, 陈赞奎, 唐文娟. 表面擦拭采样方法及其在环境与职业卫生领域应用[J]. 中国职业医学, 2018, 45(5): 649-653.
- [8] 金 慧, 王慧敏, 孔庆鑫, 等. 医院感染调查环境表面微生物采样技术应用现状与研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(16): 2555-2560.
- [9] 康 莉, 李 挥, 刁立琴, 等. 一种医用脱脂棉生物负载测定方法的研究[J]. 医疗装备, 2021, 34(13): 41-42.
- [10] 郭艳飞. 不同采样拭子材质和洗脱方式对表面微生物收集的影响[J]. 中国医药指南, 2021, 19(4): 24-26.
- [11] 韩 杰, 金 虹, 任 哲, 等. 两种采样方法对环境中微生物采样效果的比较研究[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(1): 10-12.
- [12] 李 南, 孙丽媛, 关奕泽, 等. 药物生产车间污染微生物的快速鉴定和污染微生物资源及信息库的建立[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(3): 474-483.
- [13] 郑小玲, 王征南, 王知坚, 等. 药品微生物检测实验室环境菌库的建立[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(7): 847-850.
- [14] 阎雅宁, 曹晓云. 无菌药品生产企业微生物洁净室微生物污染的鉴定与结果分析[J]. 中国药品标准, 2023, 24(1): 45-51.
- [15] 王似锦, 余 萌, 王杠杠, 等. 环境分离菌在药品微生物检验中的应用[J]. 中国药事, 2022, 36(12): 1424-1429.
- [16] 江 宁, 钱子煜, 任 慧, 等. 载体压印法对医院物体表面及手表面细菌采样应用评价[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 37(5): 335-338.

(收稿日期: 2023-06-13; 修回日期: 2023-11-04)