

液体敷料微生物限度检查方法的研究

袁晓玲¹, 黄葆华², 张静静², 胡锦涛², 梁净^{2*}

(1. 安徽医科大学临床医学院基础医学部病原生物学教研室, 合肥 230061; 2. 安徽省食品药品检验研究院, 合肥 230051)

摘要: **目的** 建立和验证液体敷料的微生物限度检查方法, 确认适用于该产品的微生物限度检查方法。**方法** 参照《中华人民共和国药典》2020年版四部(通则1105、1106)对液体敷料进行需氧菌数、霉菌和酵母菌总数的计数验证及控制菌微生物检查的验证试验。**结果** 用无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(含2%吐温80)制备供试液(浓度为1:10)后采用平皿计数法, 需氧菌数、霉菌和酵母菌总数的计数的回收值均在0.5~2的范围内, 控制菌(金黄色葡萄球菌和铜绿假单胞菌)通过常规法, 也可检出阳性菌。**结论** 对于本次试验所用的液体敷料, 可以用平皿法和常规法进行微生物限度检查。

关键词: 液体敷料; 平皿法; 微生物限度检查; 方法学验证

0 引言

随着皮肤护理产品制造工业的革新和消费者对高品质产品的需求增加, 医用敷料凭借其适用性广、安全性高及功效性强等优势备受消费者青睐。特别是在皮肤修复及护肤概念盛行的背景下, 医用敷料的市场需求持续增长, 推动了我国医用敷料行业市场规模的快速增长。当皮肤因创伤、疾病或手术而受到损伤时, 皮肤的迅速修复尤为关键, 液体敷料通过在皮肤或黏膜表面形成保护层, 隔离阻断微生物定植, 起物理屏障作用, 用于皮肤或黏膜浅表性创面护理。本试验参照2020年版《中华人民共和国药典》四部非无菌产品微生物限度检查(通则1105、1106)的方法^[1]要求, 对于以非无菌提供的液体敷料进行微生物限度检查, 确认适用于该类产品的微生物限度检查方法。为各医疗器械检验机构或各企业微生物检验提供一个有关液体敷料的微生物限度检查的方法, 为有关管理部门监管该类产品的卫生质量状况提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器

HTY-601型集菌仪(杭州泰林生物技术设备有限公司)、薄膜过滤器(浙江泰林生物技术股份有限公司)、电热恒温培养箱(BD115型, Binder)、霉菌培养箱(PYX-250M-C, 广东韶关科力实验仪器有限公司)

1.2 试剂

液体敷料, 非无菌型(批号: 20220901, 规格: 涂抹型,

10), 由安徽省食品药品检验研究院提供。

pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(含2%吐温80)、无菌氯化钠溶液(0.9%)、胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基、甘露醇氯化钠培养基、沙氏葡萄糖液体培养基(SDB)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)。

金黄色葡萄球菌 [*Staphylococcus aureus*, CMCC(B)26003]、铜绿假单胞菌 [*Pseudomonas aeruginosa*, CMCC(B)10104]、枯草芽孢杆菌 [*Bacillus subtilis*, CMCC(B)63501]、白色念珠菌 [*Candida albicans*, CMCC(F)98001]、黑曲霉菌 [*Aspergillus niger*, CMCC(F)98003], 均由微穹微生物技术有限公司提供。

1.3 方法

1.3.1 试验菌液的制备

取上述菌种金黄色葡萄球菌(浓度为 5.2×10^4 CFU/mL)、铜绿假单胞菌(浓度为 3.7×10^4 CFU/mL)、枯草芽孢杆菌(浓度为 4.2×10^4 CFU/mL)、白色念珠菌(浓度为 4.1×10^4 CFU/mL)、黑曲霉(浓度为 3.6×10^4 CFU/mL)的菌悬液, 用0.9%的无菌氯化钠溶液进行倍比稀释, 使每种菌悬液稀释后的稀释液含菌数均不大于10000 CFU/mL, 备用。

1.3.2 供试液的制备

分别取试验样品10 mL, 加含2%吐温80的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液至100 mL, 制成浓度为1:10的供试液。

1.3.3 试验操作

(1)需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的验证试验-平皿法需氧菌总数的验证。取1.3.2制备好的的供试液进行分装, 每份

第一作者: 袁晓玲, 硕士, 助教, 主管药师, 教师, 研究方向为医疗器械产品微生物无菌方法学建立、呼吸道合胞病毒的致病机制。

* 通信作者: 梁净, 副主任药师, 副主任, 研究方向为医疗器械产品微生物无菌方法学建立、阻微生物穿透领域、微生物医用材料的生物相容性评价研究等。E-mail: 591452506@qq.com

10 mL。取其中的 3 份供试液, 分别加入上述 1.3.1 中的浓度为不大于 10000 CFU/mL 的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌的菌液 0.1 mL, 使充分混匀, 此时每毫升液体中含菌量不大于 100 CFU, 从中取 1 mL 加入平皿后, 倾注适宜温度(约不高于 45°C)的 TSA 约 20 mL 摇匀后置于培养箱中, 35°C 培养 3 d, 逐日观察并记录计数结果。

霉菌和酵母菌总数的验证。取 1.3.2 制备好的的供试液进行分装, 每份 10 mL。取 2 份供试液, 分别加入上述 1.3.1 中的浓度不大于 10000 CFU/mL 的白色念珠菌、黑曲霉菌液 0.1 mL, 混匀, 同上相同方法, 注入 TSA 约 20 mL 进行计数, 35°C 培养 5 d, 逐日观察记录结果。最后再取 2 份供试液, 分别加入上述不大于 10000 CFU/mL 的白色念珠菌、黑曲霉菌液 0.1 mL, 混匀, 同上相同方法, 倾注不超过 45°C 的 SDA 约 20 mL, 25°C 培养 5 d, 逐日观察并记录结果。

对照组: 同样的试验操作计数本次试验的试验菌数, 作为菌液组; 并且相同的试验步骤但不加入试验菌后进行菌落计数, 测定供试液中的本底菌数结果作为空白组。

最终根据 2020 年版《中华人民共和国药典》四部通则中回收值的计算公式^[1]计算各组的具体回收值。公式如下:

回收值 = (试验组平均菌落数 - 空白组平均菌落数) ÷ 菌液组平均菌落数

(2) 控制菌检查验证试验 - 常规法

铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌: 按《中华人民共和国药典》2020 年版四部通则 1106 相应的规定进行控制菌的检查,

分别取 1.3.2 制备好的供试液 10 mL, 用 TSB 进行稀释至浓度为 1 : 10, 然后加入 1.3.1 菌液的检验项下的菌液(浓度不大于 10000 CFU/mL) 1 mL, 混匀后置于 34°C 培养箱进行培养, 24 小时后观察并记录试验结果。试验同时进行同步的对照试验: 以等体积的稀释液代替供试液, 其他操作同试验组, 作为阳性对照组; 用稀释液代替供试液, 且不加试验用菌液, 作为阴性对照组; 供试品对照不加菌, 其他操作相同。

2 结果与分析

2.1 试验结果

2.1.1 试验用菌液的检验结果

本次试验所用的菌液计数均在 50-100 CFU 以内, 方便计数, 计数结果可靠。结果见表 1。

2.1.2 需氧菌总数及回收值测定结果

本次试验各组试验结果见表 2。实验结果表明, 供试品对照组无菌落生长, 试验组菌落回收值均在 0.5~2 之间, 结果符合要求。

表 1 试验用菌液的检查(菌落计数单位: CFU)

培养基	计数方法	铜绿假单胞菌	金黄色葡萄球菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌	黑曲霉					
TSA	平皿法	85	91	94	96	76	78	62	66	70	74
	平均	88	95	77	64	72					
SDA	平皿法	\	\	\	\	\	\	63	65	66	68
	平均	\	\	\	64	67					

表 2 需氧菌总数及回收值测定结果

项目	培养基	菌种名称	试验次数	菌液组			试验组		供试品对照组		回收值
				菌落数平均(CFU)	菌落数(CFU)	平均(CFU)	菌落数(CFU)	平均(CFU)	菌落数(CFU)	平均(CFU)	
需氧菌总数	TSA	金黄色葡萄球菌	1	95	94	96	95	0	0	0	1.00
			2	95	93	92	92.5	0	0	0	0.97
			3	95	91	96	93.5	0	0	0	0.98
		铜绿假单胞菌	1	88	85	91	88	0	0	0	1.00
			2	88	89	91	90	0	0	0	1.02
			3	88	86	88	87	0	0	0	0.99
		枯草芽孢杆菌	1	77	76	78	77	0	0	0	1.00
			2	77	77	74	75.5	0	0	0	0.98
			3	77	75	76	75.5	0	0	0	0.98

2.1.3 霉菌和酵母菌总数及回收值测定结果

本次试验各组试验结果见表 3。实验结果表明, 供试品对照组无菌落生长, 试验组菌落回收值均在 0.5~2 之间, 结果符合要求。

2.1.4 控制菌检查验证试验测定结果

本次试验各组试验结果见表 4。实验结果表明, 供试品对照组无菌落生长, 试验组菌落回收值均在 0.5~2 之间, 控制菌检查结果符合要求。

从表 1~4 可以看出: 分别 3 次独立试验, 在需氧菌的计数、

霉菌和酵母菌总数计数结果显示, 当用含 2% 吐温 80 的无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液制备的供试液, 然后采用平皿法计数, 试验组中 5 种试验菌株的回收值均在 0.5~2 范围内。方法可行, 结果表明, 可以通过平皿法进行该产品的需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的检查。从表 4 可以看出采用常规法进行控制菌的检查, 试验组和阳性对照组检出控制菌, 阴性对照组和供试品组未检出控制菌, 结果符合要求。可通过常规法进行检查。

对于本批次的液体敷料的微生物限度检查: 需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数可采用平皿法(用含 2% 吐温 80 的无菌氯化

钠-蛋白胨缓冲液制成 1:10 的供试液)的供试液计数,对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌的检查可采用常规法。

表 3 霉菌和酵母菌总数及回收值测定结果

项目	培养基	菌种名称	试验次数	菌液组		试验组		供试品对照组		回收值	
				菌落数平均(CFU)	菌落数(CFU)	平均(CFU)	菌落数(CFU)	平均(CFU)			
霉菌和酵母菌总数	SDA	白色念珠菌	1	64	66	68	67	0	0	0	1.05
			2	64	62	64	63	0	0	0	0.98
			3	64	60	64	62	0	0	0	0.97
		黑曲霉	1	67	66	68	67	0	0	0	1.00
			2	67	66	67	66.5	0	0	0	0.99
			3	67	67	65	66	0	0	0	0.99
霉菌和酵母菌总数	TSA	白色念珠菌	1	64	62	63	62.5	0	0	0	0.98
			2	64	63	65	64	0	0	0	1.00
			3	64	62	61	61.5	0	0	0	0.96
		黑曲霉	1	72	70	74	72	0	0	0	1.00
			2	72	74	71	72.5	0	0	0	1.01
			3	72	68	73	70.5	0	0	0	0.98

表 4 金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌检查方法的验证结果

控制菌	试验序号	方法	试验组	阴性对照组	阳性对照组	供试品组
金黄色葡萄球菌	1	常规法	+	-	+	-
	2	常规法	+	-	+	-
	3	常规法	+	-	+	-
铜绿假单胞菌	1	常规法	+	-	+	-
	2	常规法	+	-	+	-
	3	常规法	+	-	+	-

注:表中“+”表示试验结果检出控制菌;“-”表示试验结果未检出控制菌。

3 讨论与结论

医用敷料可充当保护屏障,用来覆盖伤口,吸收伤口渗液,帮助创面愈合。液体敷料通过在创面表面形成保护层,起物理屏障作用,用于浅表性创面及周围皮肤的护理。在如今皮肤修复及护肤概念盛行的背景下,液体敷料作为重要的医用敷料类产品,其卫生安全状况及潜在的感染风险直接影响着现代医疗卫生的质量与安全,其微生物限度的控制至关重要。而液体敷料通常由具有成膜性的材料,如聚乙二醇、聚乙烯醇、海藻酸钠、羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆等材料,辅以甘油、纯化水等制成,所含成分可能涉及很多种类,影响其溶解性,并且因卡波姆等物质,具有抑菌性能^[2-4],故建立其适宜的微生物限度检查方法非常必要。

在此前各研究中^[5-8],不易溶性且含有抑菌成分的凝胶产品及乳膏类产品,因其不易溶于水大多不可直接用平皿法检查,且薄膜过滤法也容易堵塞滤筒,故通常使用氯化钙、氯化镁、硫酸镁等进行沉降后再取上清进行试验,或者进行水油分离后取上清再进行微生物限度的检查。另外也有研究,吐温 80 和大豆卵磷脂作为中和剂,既可以提高样品的溶解性又能够将成品的抑菌作用去除^[9-11]。

本研究中的液体敷料样品,浓稠度不高,且卡波姆等抑菌

成分含量低,基于此本研究采用含 2% 吐温 80 的无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液进行供试液溶解制备,可制备均匀的混悬液以供试验,并且结果表明,由此建立的微生物限度检查方法,试验可行,结果可靠。本研究建立的方法可以用于液体敷料的微生物限度指标的产品质量控制,可为含抗菌成分的液体敷料类制剂的微生物限度检查方法的研究提供借鉴思路。

参考文献

- [1] 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: 160.
- [2] 曲萍, 仇丽霞, 赵思俊, 等. 卡波姆抑菌凝胶剂微生物限度检查方法的建立[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(08): 1317-1321.
- [3] 冯璐, 曹敏, 钮晓淑, 等. 甲硝唑凝胶微生物限度检查方法适用性研究[J]. 中国药业, 2022, 31(18): 69-72.
- [4] 杜夏玮, 周伟明. 奥昔康唑凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 中国医药指南, 2012, 10(36): 72-73.
- [5] 张善革, 王磊, 安雅婷. 多剂型外用制剂微生物限度方法的研究[J]. 继续医学教育, 2024, 38(06): 171-175.
- [6] 牟建平, 滕宝霞, 顾海燕, 等. 林可霉素利多卡因凝胶微生物检验中和剂的选择及方法适用性[J]. 海峡药学, 2021, 33(08): 43-46.
- [7] 唐菱, 侯晓军, 周剑, 等. 硫酸新霉素凝胶微生物限度检查方法的适用性试验[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(09): 680-683.
- [8] 严佳, 檀巧婷, 钟桂香, 等. 盐酸普萘洛尔凝胶的微生物限度检查方法学验证[J]. 儿科科学杂志, 2015, 21(05): 43-46.
- [9] 李铭, 温子帅, 李峰, 等. 跌打止痛凝胶微生物限度检查的验证[J]. 中国当代医药, 2023, 30(16): 44-48.
- [10] 赵翠红, 刘布鸣, 黎瑞, 等. 复方苯佐卡因凝胶微生物限度检查方法的验证[J]. 中国药师, 2017, 20(07): 1328-1331.
- [11] 田勋, 连天雁, 凌旺, 等. 四草克银凝胶的微生物限度检查方法[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(05): 637-640.