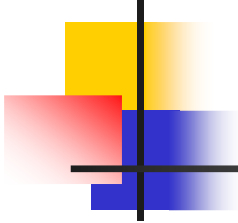


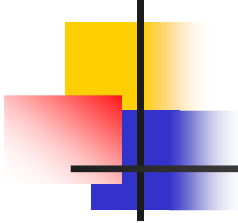
一般製劑藥廠 之 微生物實驗室管理

聯亞生技開發股份有限公司
溫燕卿



課程內容

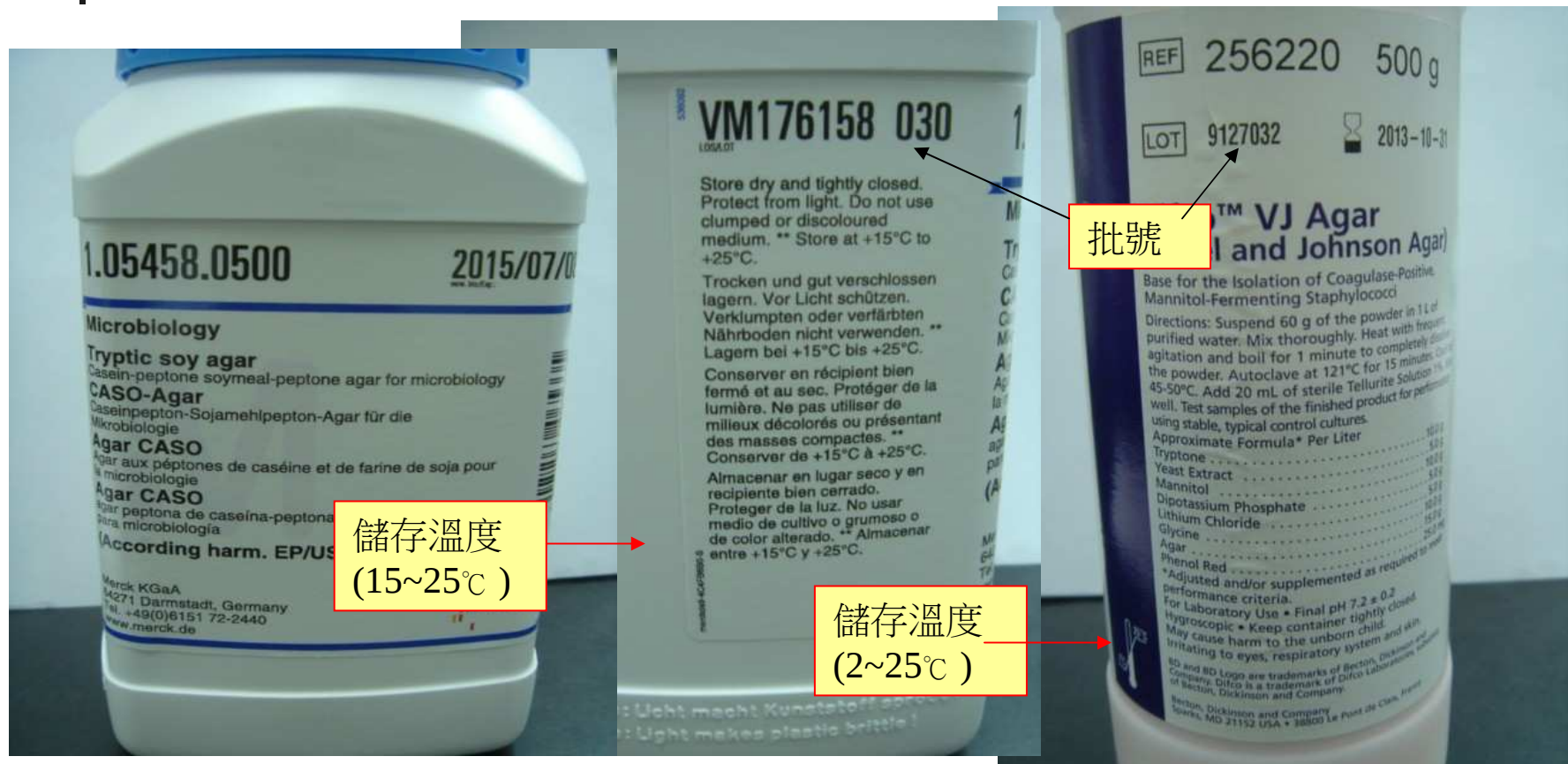
- 培養基驗收
 - 脫水培養基(Dehydrated media)
 - 培養基之配製
 - 培養基之品管
 - 培養基之儲存
- 標準菌種儲存/管理/鑑別

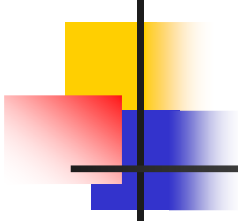


脫水培養基(Dehydrated media)

- 向合格供應廠商採購
- 收貨
 - 核對品名，批號，末效期和COA
 - 貼標籤，註明收到日期，末效期和瓶號
- 儲存
 - 依照廠商標籤上儲存溫度，例如15-25 °C 或2-25 °C
 - 監測儲存的溫度
 - 容器須緊閉，結塊或變色則不能使用
- 寫上開瓶日期

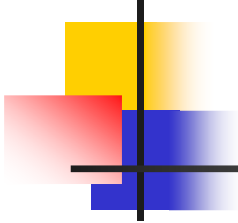
脫水培養基(Dehydrated media)





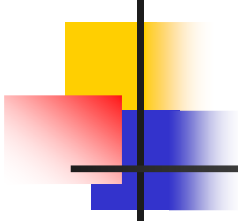
培養基之配製

- 依照廠商的指令製作配製方法(SOP)
- 需要的器具
 - 已校正的天平
 - 已校正的pH meter
 - 已確效的高壓蒸氣滅菌器(121 °C, 15分鐘)
 - 乾淨的容器
- 純水和1N NaOH或1N HCl



培養基之配製

- 完整的配製記錄
 - 配製培養基名稱
 - 脫水培養基重量
 - 總配製體積
 - 分裝體積和數量
 - 配製者和配製日期
 - 滅菌溫度和時間
 - pH (滅菌前和滅菌後)
 - 無菌培養試驗結果
 - 效能試驗結果
 - 核對者



培養基之配製

- 固體培養基再溶化
 - 最好使用水浴加熱溶化，只能溶化一次
 - 必須加熱至**45-50°C**，過高的溫度會產生過多的冷凝水
 - 在層流台內倒平板
 - 溶化後維持在**45-50°C**不能超過8小時

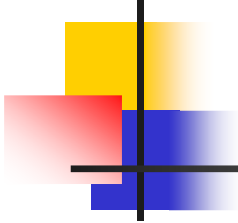
培養基之配製

- 標示

至少包括

- 培養基名稱
- 配製批號
- 末效日期





培養基之品管

- 所有配製的培養基要檢驗
 - pH
 - 無菌培養試驗(Sterility of media)
 - 效能試驗(Growth promotion test)
- 無菌培養試驗:可以取樣少數或全部的培養基，置於規定的溫度培養**1-2**天，以確定培養基本身無菌
- 效能試驗使用的菌種，可參考藥典或廠商的建議，菌數不超過**100 cfu**

培養基之品管

■ 藥典建議菌種

Microorganism	Preparation of Test Strain	Growth Promotion	
		Total Aerobic Microbial Count	Total Yeasts and Molds Count
<i>Staphylococcus aureus</i> such as ATCC 6538, NCIMB 9518, CIP 4.83, or NBRC 13276	Soybean-Casein Digest Agar or Soybean-Casein Digest Broth 30°-35° 18-24 hours	Soybean-Casein Digest Agar and Soybean-Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30°-35° ≤ 3 days	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> such as ATCC 9027, NCIMB 8626, CIP 82.118, or NBRC 13275	Soybean-Casein Digest Agar or Soybean-Casein Digest Broth 30°-35° 18-24 hours	Soybean-Casein Digest Agar and Soybean-Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30°-35° ≤ 3 days	
<i>Bacillus subtilis</i> such as ATCC 6633, NCIMB 8054, CIP 52.62, or NBRC 3134	Soybean-Casein Digest Agar or Soybean-Casein Digest Broth 30°-35° 18-24 hours	Soybean-Casein Digest Agar and Soybean-Casein Digest Broth ≤ 100 cfu 30°-35° ≤ 3 days	
<i>Candida albicans</i> such as ATCC 10231, NCPF 3179, IP 48.72, or NBRC 1594	Sabouraud Dextrose Agar or Sabouraud Dextrose Broth 20°-25° 2-3 days	Soybean-Casein Digest Agar ≤ 100 cfu 30°-35° ≤ 5 days	Sabouraud Dextrose Agar ≤ 100 cfu 20°-25° ≤ 5 days
<i>Aspergillus niger</i> such as ATCC 16404, IMI 149007, IP 1431.83, or NBRC 9455	Sabouraud Dextrose Agar or Potato-Dextrose Agar 20°-25° 5-7 days, or until good sporulation is achieved	Soybean-Casein Digest Agar ≤ 100 cfu 30°-35° ≤ 5 days	Sabouraud Dextrose Agar ≤ 100 cfu 20°-25° ≤ 5 days

培養基之品管

1.05458.0500 Cryptic soy agar Casein-peptone soymeal-peptone agar
for microbiology (According harm. EP/USP/JP and
ISO)

Batch VM166358

	Spec. Values	Batch Values
Appearance		
clearness	clear	clear
colour	yellowish brown	yellowish-brown
pH-value (25 °C)	7.1 - 7.5	7.3
Solidification behaviour (2 hrs., 45 °C)	liquid	liquid
Stability test (Colour and hemolysis)	non-hemolytic	non-hemolytic

*Typical composition (g/litre): Peptone from casein 15.0; Peptone from soymeal 5.0; Sodium chloride 5.0;
Agar-agar 15.0.*

Growth promotion test in accordance with the harmonised method of EP, USP and JP.

	Spec. Values	Batch Values
Inoculum		
Staphylococcus aureus ATCC 6538	10 - 100	93
Bacillus subtilis ATCC 6633	10 - 100	16
Escherichia coli ATCC 8739	10 - 100	16
Streptococcus pyogenes ATCC 21059	10 - 100	98
Pseudomonas aeruginosa ATCC 9027	10 - 100	28
Candida albicans ATCC 10231	10 - 100	94
Aspergillus brasiliensis ATCC 16404 (formerly A. niger)	10 - 100	64



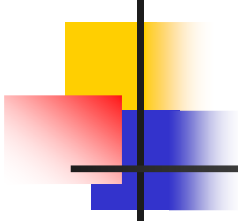
培養基之品管

Product Name	: BOTTLE VOGEL JOHNSON AGAR 500G		
Catalog Number	: 256220	Manufacture Date	: 2008/12/05
Batch Number	: 9127032		
Expiration Date	: 2013/10/31		

01. Dehydrated Medium Appearance: Pink, free-flowing, homogeneous
02. Solubility: 6% solution, soluble in distilled or deionized water on boiling
03. Solution Appearance: Red, very slightly to slightly opalescent, may have a slight white precipitate
04. Cultural Response: Medium was prepared per label instructions using 20 ml/l of Tellurite Solution 1%. Plates were inoculated with the test organisms and incubated at $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 18-48 hours.

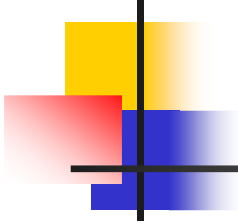
TEST ORGANISMS	RECOVERY	TELLURITE REDUCTION	MANNITOL FERMENTATION
Escherichia coli ATCC® 25922	markedly to completely inhibited	-	-
Proteus mirabilis ATCC® 25933	partial to complete inhibition	+	-
Staphylococcus aureus ATCC® 25923	good	+	+
Staphylococcus epidermidis ATCC® 12228	fair to good	±	-

KEY: + = positive, black colony for tellurite reduction
yellow medium for mannitol fermentation



培養基之儲存

- 液體培養基分裝於緊密容器可儲存於**2-25℃ / 3個月**
- 固體培養基分裝於培養皿可儲存於冰箱 / **3個月**
- 培養皿應堆疊裝入塑膠袋封存，避免水份流失
- 末效期的訂定須有效能試驗證明



標準菌種儲存/管理

- 購買標準菌種 (ATCC or BCRC)
 - 使用二級以上感染性生物材料之機構，須設置生物安全委員會
 - 二級以上實驗室標示牌
 - 生物安全櫃和滅菌設備
 - 門禁管制or儲存冰櫃上鎖管制
 - 備有感染性生物材料清單
 - 第二級感染性生物材料有新增、銷毀、寄存或分讓等異動情事時，其持有人應填寫感染性生物材料異動單，並取得該設置單位生物安全委員會之同意。

標準菌種儲存/管理

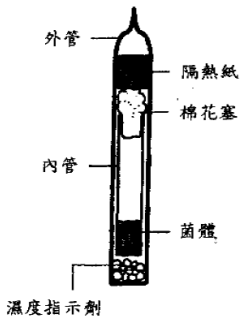
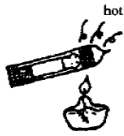
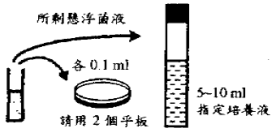


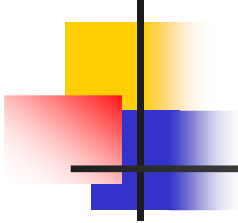
僅准許被授權人員進入
ADMITTANCE TO AUTHORIZED PERSONNEL ONLY II

實驗室生物安全等級：	BSL-	2
實驗室名稱：	Analytical Lab.	
實驗室主管：	電話：	
緊急聯絡人：	電話：	
	手機：	
操作人員：		
操作病原體名稱：		

標準菌種儲存/管理

菌瓶開封及菌株活化

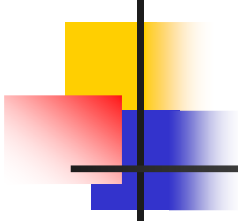
菌瓶雙層管結構	
 外管 隔熱紙 棉花塞 內管 菌體 溫度指示劑	3. 以鑷子取出隔熱紙及內管 
1. 加熱外管頂端 (菌體處不可過熱) 	4. 以鑷子取出內管之棉花塞 
2. 立即滴加無菌水，並以鑷子敲破玻璃外管 小心傷手!! 	5. 滴加 0.3~0.5 ml 指定培養液於內管中，使菌體溶解成懸浮菌液 
	6. 取出 0.1 ml 懸浮菌液培養於指定平板培養基，所剩懸浮菌液加入原指定培養液，兩者同時置於指定溫度培養  所剩懸浮菌液 各 0.1 ml 請用 2 個平板 5-10 ml 指定培養液



標準菌種儲存/管理

■ 冷凍保存管製作

- 將凍乾管的菌液置入約200 ml之TSB，培養在30-35 °C 18-24小時
- 若是黴菌，置入約200 ml之TSB，培養在20-25°C 5-7天
- 4500rpm 離心5分鐘
- 去除上清液
- 加入TSB(含10%甘油)混合均勻菌液
- 吸取適量菌液到冷凍保存管進行分裝
- 貼上標籤



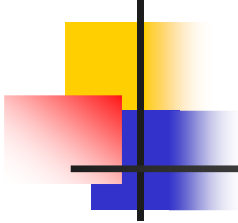
標準菌種儲存/管理

- 凍乾管開封活化和分裝儲存記錄
 - Name of microorganism
 - BCRC strain no./lot no.
 - Date of resuscitation
 - Media used/lot no.
 - Incubation temperature/time
 - Date of preparation of cryovials
 - Total numbers of cryovials prepared

標準菌種儲存/管理

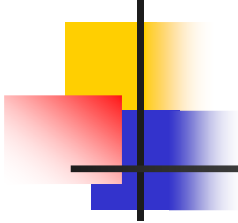
菌種冷凍保存管





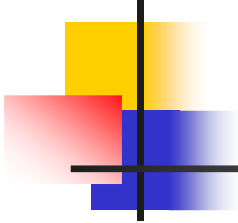
標準菌種儲存/管理

- 標準菌種儲存 (Storage of stock cultures)
 - The “Seed-Lot” technique is recommended for storage of stock cultures.
 - Aliquots of stock culture (the first transfer or passage) are suspended in a cryoprotective medium, transfer to vials, and frozen at -30°C or below, until use.
 - If stored at -70°C , or in lyophilized form, strains may be kept indefinitely.
 - The freezer should be calibrated and mapped.



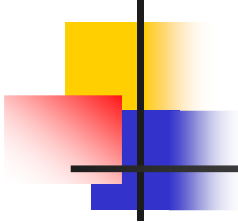
標準菌種儲存/管理

- Those frozen stocks can then be used to inoculated monthly or weekly working cultures.
- Once opened, do not refreeze unused cell suspensions after culturing a working suspension.
- The number of transfers of working cultures should be tracked and not more than five passages.



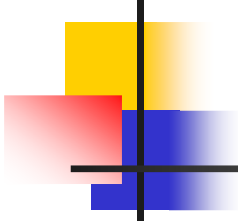
標準菌種儲存/管理

- One passage is defined as the transfer of organisms from a viable culture to a fresh medium with growth of the microorganisms.
- Any form of subculturing is considered to be a transfer/passage.



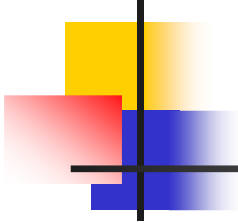
標準菌種儲存/管理

- 冷凍保存管使用記錄
 - Date of use
 - Cryovial no.
 - Use by
 - Subculture medium/Lot no.



標準菌種鑑別

- Confirmation of the purity of the culture and the identity of the culture should be performed prior to its use in quality control testing.
- 菌體懸浮液於TSA Agar上，做劃線分離培養，用無菌L型玻棒均勻塗抹，以檢驗菌種之純度



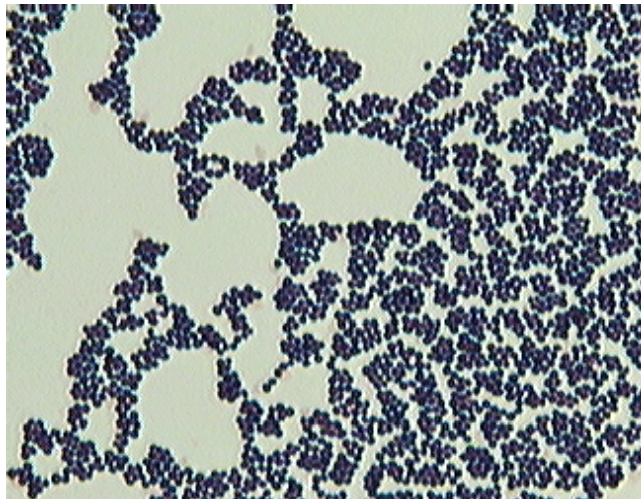
標準菌種鑑別

- 革蘭氏染色
- 選擇性瓊脂培養基鑑定
- **API strip鑑定(if needed)**
- 每年鑑定冷凍保存管的菌種一次
- 記錄結果

標準菌種鑑別

■ 革蘭氏染色

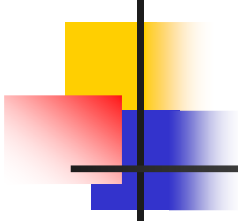
- 原理：利用細菌細胞壁脂質含量多寡而將細菌染成不同顏色
- 革蘭氏陽性菌呈藍紫色，革蘭氏陰性菌呈粉紅色



G+ve cocci



G-ve rods



標準菌種鑑別

- 選擇性瓊脂培養基鑑定其菌落特徵，例如
 - MacConkey Agar (*Escherichia coli*)，磚紅色，圍有膽汁沉澱環
 - Baird-Parker Agar (*Staphylococcus aureus*)，黑色，發亮，圍以澄清環
 - Ceftrimide Agar (*Pseudomonas aeruginosa*)，一般為綠色
 - Xylose-Lysine-Desoxycholate Agar (*Salmonella* Species)，紅色，有或無黑色中心

標準菌種鑑別

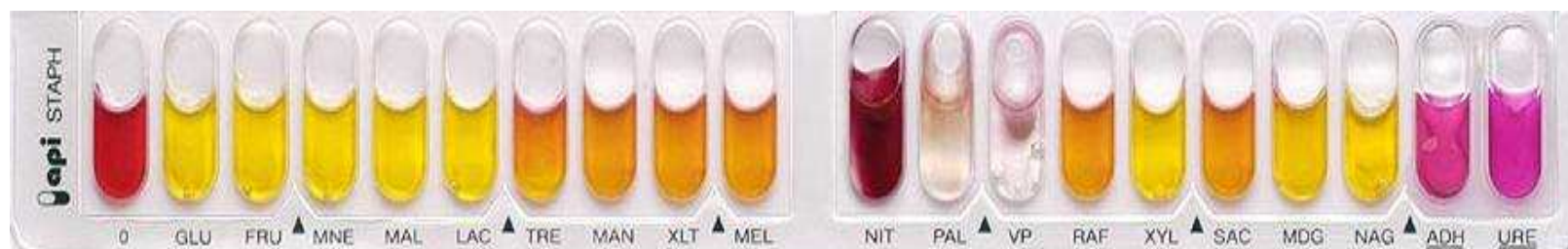
■ API strip 鑑定

各個試驗孔中含有不同的化學物質及培養基，由接種細菌之後，細菌在其中生長所造成的生化反應的顏色變化，來判定細菌的種類。

- API 20E (*E. coli*)
- API 20NE (*Pseudo a.*)
- API STAPH (*Staph a.*)



標準菌種鑑別

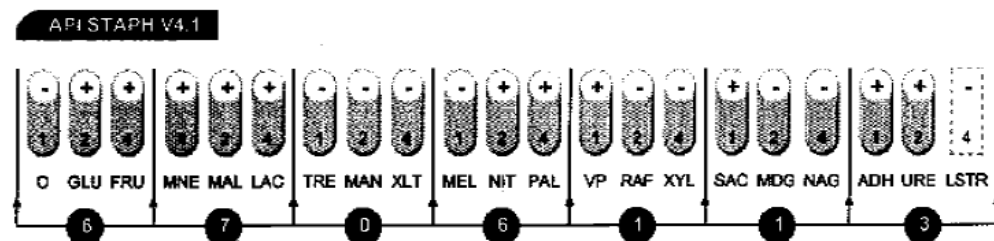


顏色反應判讀

試驗	負反應 (-)	正反應 (+)
0 (Negative Control)	紅色	-
GLU 至 MEL 9項試驗	紅色	黃色
NIT	無色	紅色
PAL	黃色	紫色
VP	無色	紫紅色
RAF 至 NAG 5項試驗	紅色	黃色
<u>ADH</u>	黃色	橘紅色
<u>URE</u>	黃色	紅紫色

標準菌種鑑別

範例說明



参考 日期
2010/10/1
注译
S. epidermidis 鑑定

試驗集	API STAPH V4.1
生化譜	6706113
注	

有意義的分類單位	鑑定%	T值(T指數)	不一致的試驗			
Staphylococcus epidermidis	97.9	1.0				

下一個分類單位	鑑定%	T值(T指數)	不一致的試驗			
Staphylococcus capitis	1.0	0.76	LAC 22%	PAL 23%		