

附件：9204 微生物鉴定指导原则草案公示稿（第一次）

9204 微生物鉴定指导原则

本指导原则为药物原料、辅料、制药用水、中间产品、终产品、和环境、
包装材料和容器等中检出微生物的鉴定提供指导。当鉴定结果有争议时，以
《伯杰氏系统细菌学手册》（《Bergey's Manual of Systematic Bacteriology》）现行版的鉴定结果为准。

微生物鉴定是指借助现有的分类系统，通过对未知微生物的特征测定，
对其进行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分，或属、种及菌株水平确定的过程。
微生物鉴定是药品微生物检验中的重要环节，药典通用技术要求相应章节
中对检出微生物的鉴定做了明确规定，如非无菌产品微生物限度检查：控制菌
检查法（通则 1106）中选择培养基或指示培养基上发现的疑似菌落需进行鉴
定；对无菌检查法（通则 1101）的阳性实验结果中分离的微生物进行鉴定，
以判定试验是否重试；药品洁净实验室微生物监测和控制指导原则（通则 9205）
中建议对洁净室和其他受控环境分离到的微生物进行鉴定，以掌握环境微生
物污染情况，有助于污染调查。此外，在药品生产中，有时亦需对药物原料、
辅料、制药用水、中间产品、终产品和环境等中检出的微生物进行适当水平的
鉴定。

微生物鉴定需达到的水平视情况而定，包括种、属鉴定和菌株分型。大多
数非无菌药品生产过程和部分无菌生产环境的风险评估中，对所检出微生物
的常规特征包括菌落形态学、细胞形态学（杆状、球状、细胞群、孢子形成模
式等）、革兰染色或其它染色法及某些能够给出鉴定结论的关键生化反应（如
氧化酶、过氧化氢酶和凝固酶反应）进行分析，一般即可满足需要；非无菌产
品的控制菌检查一般应达到药典规定的水平；无菌试验结果阳性、无菌生产
模拟工艺（如培养基灌装）失败、环境严重异常事件时，对检出的微生物鉴定
至少达到种水平，必要时需达到菌株水平。

微生物的鉴定程序

微生物鉴定的基本程序包括分离纯化和鉴定，鉴定时，一般先将待检菌

27 进行初步的分类。鉴定的方法有表型微生物鉴定和基因型微生物鉴定，根据
28 所需达到的鉴定水平选择**合适的**鉴定方法。微生物鉴定系统是基于不同的分
29 析方法，其**局限性鉴定能力**与方法和数据库的局限性息息相关，未知菌鉴定
30 时通过与微生物鉴定系统中的参考微生物（模式菌株、标准菌株或经确认的
31 菌株等）的特征（基因型和/或表型）相匹配来完成。如果数据库中没有对应
32 的菌株信息，就无法获得正确的鉴定结果。在日常的微生物鉴定试验中，用户
33 应明确所采用鉴定系统的局限性及所要达到的鉴定水平（属、种、菌株），选
34 用最适合要求的鉴定技术，必要时采用多种鉴定方法进行确定。

35 待检菌的分离纯化

36 微生物鉴定的第一步是待检培养物的分离纯化，最常用的分离纯化方法
37 是挑取待检菌在适宜的固体培养基上连续划线分离纯化，以获取待检菌的纯
38 培养物（单个菌落），必要时可进一步进行纯培养，为表型鉴定和随后的鉴定
39 程序提供足够量菌体。从药物原**材料、辅料**、制药用水、~~生产环境~~中间产品
40 ~~和~~终产品、**环境、包装材料和容器**等的样品中检出的受损微生物，经分离纯
41 化程序使其由不利生存易产生变化的状态转变为在营养富集和最佳培养温度
42 条件下生存的**稳定状态**，以保证鉴定结果的**准确性**。

43 初筛试验

44 常规的微生物鉴定，一般要先进行初筛试验确定待检菌的基本微生物特
45 征，将待检菌做初步分类。常见的初筛试验包括形态观察、染色镜检（或氢氧
46 化钾拉丝试验）、重要的生化反应等。

47 重要的生化筛选试验包括：

48 **氧化酶试验** 用于区分不发酵的革兰阴性杆菌（氧化酶阳性）和肠道菌
49 （氧化酶阴性）。

50 **过氧化氢酶试验** 用于区分葡萄球菌（过氧化氢酶阳性）和链球菌（过
51 氧化氢酶阴性）。

52 **凝固酶试验** 用于区分凝固酶阴性葡萄球菌（可推测为非致病性）和凝
53 固酶阳性葡萄球菌（**很可能为可能具有**致病性）。

54 初筛试验可为评估提供有价值的信息，对于微生物鉴定方法来说，初筛
55 试验是**非常最**关键的一步，若给出了错误的结果，将影响后续试验，包括微生

56 物鉴定试剂盒或相关引物等的选用。

57 表型微生物鉴定

58 表型微生物鉴定依据表型特征的表达来区分不同微生物间的差异，是经
59 典的微生物分类鉴定法，以微生物细胞的形态和习性表型为主要指标，通过
60 比较微生物的菌落形态、理化特征和特征化学成分与典型微生物的差异进行
61 鉴别。微生物分类中常用的表型特征见表 1。

62 表 1 微生物分类中常用的表型特征

分类	特征
培养物	菌落形态、菌落颜色、形状、大小和产色素
形态学	细胞形态、细胞大小、细胞形状、鞭毛类型、内容物、革兰染色、芽孢和抗酸染色、孢子形成模式
生理学	氧气耐受性、pH 值范围、最适温度和范围、耐盐性
生化反应	碳源的利用、碳水化合物的氧化或发酵、酶的模式
抑制性	胆盐耐受性、抗生素敏感性、染料耐受性
血清学	凝集反应、荧光抗体
化学分类	脂肪酸构成、微生物毒素、全细胞组分
生态学	微生物来源

63 微生物细胞的大小和形态、芽孢、细胞成分、表面抗原、生化反应和对抗
64 菌剂的敏感性等表型的表达，除受其遗传基因的控制外，还与微生物的分离
65 环境、培养基和生长条件等因素有关。表型微生物鉴定通常需要大量的纯培
66 养物，而微生物的恢复、增殖和鉴定易受培养时间影响，事实上许多环境微
67 生物在普通的微生物增殖培养基中是无法恢复的；此外，一些从初始培养物中
68 刚分离出的受损微生物还可能不能完整地表达其表型属性。因此，在表型鉴
69 定时应注意采用的培养基、培养时间和传代次数对鉴定结果的影响。目前已
70 有的基于化学分类的鉴定方法，如气相色谱法分析微生物的脂肪酸特征、基
71 质辅助激光解吸电离飞行时间质谱法 (MALDI-TOF MS) 质谱法分析微生物的
72 特征蛋白等微生物鉴定系统，在进行结果判断时需借助于系统自身的鉴定数
73 据库，还依赖特定的培养基和培养方法以确保鉴定结果的一致性。

74 表型微生物鉴定方法已广泛应用于药品微生物实验室。根据微生物表型

75 鉴定所提供的信息可以判断药品中污染的微生物种类，也可掌握环境微生物
76 菌群的变化，并进行产品的风险评估。在许多质量控制调查中，表型鉴定结果
77 能给出一定的信息帮助调查人员进行深入调查，并按需要制定适宜的纠正措
78 施。

79 基因型微生物鉴定

80 与表型特征不同，微生物基因型通常不受生长培养基或分离物活性的影
81 响，只需分离到纯菌落便可用于分析。由于大部分微生物物种中核酸序列是
82 高度保守的，所以聚合酶链式反应（PCR），DNA 探针、DNA-DNA 杂交，多位点
83 序列分型、核糖体分型分析，16S 核糖体 RNA（16S ribosomal RNA）核酸测
84 序、18S 核糖体 RNA（18S ribosomal RNA）核酸测序、内转录间隔区（Internal
85 transcribed spacer, ITS）核酸测序和全基因组核酸测序等基因型微生物鉴
86 定方法理论上更值得信赖。基因鉴定方法通常在无菌检查试验结果阳性、非
87 无菌药品控制菌检查中疑似菌的鉴定、环境监控异常、偏差调查、培养基模拟
88 灌装失败等微生物调查中使用。

89 目前《伯杰氏系统细菌学手册》中对细菌分类的描述是通过遗传物质的
90 分析比较来实现的。通过未知微生物的 DNA 与已知微生物的 DNA 比较，能够
91 确定亲缘关系的远近。基因型的鉴定可通过 DNA 杂交、限制性酶切片段图谱
92 的比较和/或 DNA 探针完成，比如在图谱分析中，若 DNA-DNA 的杂交亲缘关系
93 大于 70%时，可判定相关微生物是属于同一个种属；表 2 系统发育典型的分析
94 方法通过比较细菌 16S rRNA 基因，真菌 18S rRNA 基因、ITS 区域碱基核酸序
95 列来实现，即经过聚合酶链式反应-PCR 进行基因扩增、电泳分离扩增产物、
96 以双脱氧链终止法进行核酸碱基测序，然后与经验证过的专业用数据库或利用
97 用公共数据库进行比对鉴定分析。

98 表 2 微生物分类学的基因型/系统发育的特征

类别	特征
基因型	DNA-DNA 杂交、DNA 碱基比例（如 G+C）、核酸序列、限制性酶切片段图谱和 DNA 探针
系统发育结构	16S rRNA 基因序列、18S rRNA 基因序列、26S rRNA 基因序列、ITS 序列、全基因组序列

99 基于核酸的方法可以用来筛选处于过渡期受损的微生物。将存在于过渡
100 期与菌株生存能力相关的 rRNA，通过逆转录的方法转换为可用于 PCR 扩增的
101 DNA。解决了不能存活可培养的微生物细菌细胞中 DNA 的扩增问题。该方法经
102 过样品收集、核酸提取、目的片段扩增和检测等步骤，涉及了变异微生物的检
103 测、检测限、基质效应、正向截点的核查、仪器设备和系统携带污染、分析的
104 精确性和试验的重现性等内容。

105 rRNAs 记录了微生物的进化历史，对这些序列进行分析可以对微生物进行
106 系统分类和鉴定。

107 微生物鉴定方法的确认

108 微生物鉴定系统的确认试验按下述方法之一进行：①采用现有方法和待
109 确认方法对日常检验中分离的微生物约 50 株进行平行鉴定试验，鉴定结果的
110 差异可使用仲裁方法判定。②使用 12~15 种已知的能代表常规分离到的微生
111 物的储备菌种，共进行 50 次鉴定试验。③待确认方法对 20~50 株微生物（包
112 括 15~20 个不同的种）进行鉴定，结果应与参照实验室的鉴定结果一致。确
113 认试验所用的菌株应包括鉴定方法供应商和药典推荐的适宜质控菌株。

114 对所用的微生物鉴定系统的鉴定结果应进行评估，同时还应考虑其一致
115 性水平。合适的微生物鉴定系统中，试验菌株与参考微生物的一致性水平通
116 常应大于 90%。若可能，微生物鉴定方法确认所用的挑战微生物应包括非发酵
117 型细菌、棒状杆菌和凝固酶阴性的葡萄球菌等，但其一致性水平可能比较低。

118 微生物鉴定系统不能鉴定所有的微生物，因为数据库中未包含此微生物，
119 或系统参数无法充分识别该微生物，或该微生物在系统中无反应、或该微生
120 物尚未被分类描述等。错误鉴定结果确认是比较难的，任何微生物鉴定都应
121 从微生物形态学、生理要求和微生物来源等多方面判断鉴定结果是否合理。
122 错误的鉴定会导致不恰当的纠正和预防措施及产品处置。

123 微生物鉴定方法的确认应包括准确度、专属性、重现性、灵敏度、阳性预
124 测值、阴性预测值。

125 确认试验最重要的是准确度和重现性。这些测量值按下述定义：

126 准确度(%) = (结果正确的数量/总的结果数量) × 100%

127 重现性(%) = (结果正确且达到一致性的数量/总的结果数量) × 100%

128 用户应该考虑鉴定方法的适用性，建立准确^{度性}和重现性的接受标准。

129 其它测定值如灵敏^{度性}、专属性、阳性或阴性预测值。通过以下例子能很
130 好的说明这些测定值。例如，临床微生物实验室，分别用 DNA 杂交探针和传
131 统培养方法处理了 100 个临床样本，前者阳性结果比后者高 10%，结果列于表
132 3。

133 **表 3 DNA 探针和培养方法的阴阳性结果分布对照**

		培养方法结果	
		阳性	阴性
DNA 杂交探 针结果	阳性	9	2
	阴性	1	88

134 准确度 (%) = $(9+88) / 100 \times 100\% = 97\%$

135 灵敏度 (%) = $(9 / (9 + 1)) \times 100\% = 90\%$

136 专属性 (%) = $(88 / (88 + 2)) \times 100\% = 97.7\%$

137 阳性预测值 (PPV) (%) = $(9 / (9 + 2)) \times 100\% = 81.8\%$

138 阴性预测值 (NPV) (%) = $(88 / (88 + 1)) \times 100\% = 98.9\%$

139 应注意到试验的阳性预测值不是固定的，它取决于临床样本中微生物的
140 普遍程度。阳性预测值与流行疾病和条件成正比。如果在一组人群试验中感
141 染人数比例较高，则阳性预测值较高，阴性预测值较低。如果组中所有人都被
142 感染，则阳性预测值为 100%，阴性预测值为 0%。这些函数引出的数字列于表
143 4 中。

144 **表 4 关于培养方法和替代方法 PCR 法的两行两列表**

		聚合酶链式反应		
		阳性	阴性	总数
培养方法	阳性	a 真阳性	b 假阴性	a + b
	阴性	c 假阳性	d 真阴性	c + d
总数		a + c	b + d	

145 灵敏度 (%) = $(a / (a + b)) \times 100\%$

146 专属性 (%) = $(d / (c + d)) \times 100\%$

147 阳性预测值 (%) = $(a / (a + c)) \times 100\%$

148 阴性预测值 (%) = $[d / (b + d)] \times 100\%$

149 分析准确度 (%) = $[(a + d) / (a + b + c + d)] \times 100\%$

150 Kappa Index 系数 = $2(ad - bc) / [(a + c) \times (c + d) + (a + b) \times (b +$
151 $d)]$

152 系统发育的相关内容

153 《伯杰氏系统细菌学手册》(第二版)内容是依据核糖体小亚基 16S rRNA
154 的核苷酸序列分析,按照系统发育为框架编写的,而不是按照表型结构编写
155 的。

156 系统发育树或树状图可显示遗传关系最接近的微生物,这项技术的应用
157 导致了分类的修正和一些已知微生物的重命名,如真菌黑曲霉 ATCC16404 被
158 重名为巴西曲霉。系统进化分析中,一般而言,同源性小于或等于 97%被认定
159 为不同的属,同源性小于或等于 99%被认定为不同的种,但是这种普遍性有很
160 多的例外情况。

161 基因型鉴定与表型鉴定的结果差异的情况相对比较少见,例如,具有相同
162 或非常相似基因型的微生物具有不同的表型、具有相似表型的却具有不同的
163 基因型,以及基因型遗传距离较远的微生物不能被归为同种或同属。多相
164 分类学的概念是汇集和吸收了分子生物学、生理学、形态学、血清学或生态学
165 资源的等多层信息进行微生物分类,例如,微生物特征描述、表型和基因数据
166 及微生物来源等,都可被成功地应用于微生物鉴定中,以避免因使用单一鉴
167 定方法做出毫无意义错误的结论。

168 溯源分析

169 溯源分析是通过对目标污染微生物和相关环节监控发现的同种微生物进
170 行比对,以菌株之间同源性的差异程度为依据,确认目标污染微生物来源的
171 过程。实现目标微生物有效的溯源调查分析,一般需采用较高分辨力的菌株
172 分型和鉴定方法对相关微生物进行同源性分析。

173 菌株水平的鉴定在污染调查过程中非常重要,尤其适用于产品中的微生
174 物数量高于建议水平或出现异常高的微生物检出情况时。菌株水平的鉴定在
175 无菌工艺中也很重要,在无菌试验结果阳性和培养基灌装等模拟工艺失败时,

176 ~~应对检出的微生物进行评估。~~

177 ~~同一地点的同种菌，其表型特征和基因型特征是基本一致的。不同地点的~~
178 ~~同种菌，表型特征可能基本一致，但保守及可变区域的基因特征序列会有一~~
179 ~~定的差异性。因此，污染调查等应以基因型特征鉴定为主，表型特征鉴定为~~
180 ~~辅。~~

181 菌株分型通常需在菌种鉴定基础上开展。常见的菌株分型方法包含限制
182 性核酸内切酶 Southern 杂交方法、脉冲场凝胶电泳方法、多位点序列分型、
183 全基因组测序方法等。细菌 16S rRNA 基因核酸序列和真菌的 ITS 核酸序列在
184 结构与功能上具有高度保守性，是微生物核酸测序鉴定和分类中得到广泛应
185 用的 DNA 特征性核酸序列之一，方法易标准化，鉴定结果可以满足一般菌株
186 鉴定的要求。限制性核酸内切酶进行酶解的 Southern 杂交根据菌株基因组
187 DNA 中的特定区域是否具有相似的酶切位点，是否可得到一致的酶切杂交谱
188 带，进行菌株的鉴定和分类，适用于菌株之间的同源性分析。脉冲场凝胶电泳
189 是根据菌株基因组 DNA 中限制性内切酶酶解后条带的数量和大小，进行菌株
190 分型的技术手段，应用于菌株之间的同源性分析时，结果较限制性核酸内切
191 酶酶解的方法更准确。全基因组核酸测序可以得到菌株核酸水平的全部遗传
192 信息，通过核酸序列的比对分析，进行菌株的鉴定、分型与溯源，结果更加客
193 观、准确，是溯源分析技术发展的主要趋势。

194 不同菌株分型方法原理和效果具有一定差异性，溯源调查时应根据菌株
195 自身特点和应用场景选择适合的方法，采用基因型鉴定方法或多种方法联用，
196 并结合菌株来源数据等信息进行综合判断，实现目标微生物的溯源调查分析。
197 ~~在区分同源性高的不同种或同种中的不同株时，应根据需要，采用适宜的基~~
198 ~~因型鉴定方法或采用多种方法联用，对鉴定结果进行确认。~~

199 ~~实际工作中无菌试验阳性结果中分离出的微生物，经对其溯源分析，确认~~
200 ~~污染归因于无菌试验过程中所使用的材料或无菌技术的差错，该试验可判无~~
201 ~~效，否则判该产品不符合要求。对洁净室和其他受控环境分离到的微生物进~~
202 ~~行适当的鉴定，掌握环境微生物污染情况，有助于污染调查。~~

203 高分辨力的菌株分型方法能够有效实现菌株水平的鉴定，这对于微生物
204 污染调查分析非常重要，尤其适用于产品中的微生物数量高于建议水平或标

205 准限值时。菌株水平的鉴定在无菌保障中也很重要，在无菌试验结果阳性和
206 培养基灌装等模拟工艺失败时，应对检出的微生物进行溯源调查及评估分析。
207 其中无菌试验结果阳性，经溯源调查分析，确认污染归因于无菌试验中所使
208 用的物品和（或）无菌操作技术不当引起的，或无菌检查试验所用的设备及环
209 境的微生物监控结果不符合无菌检查法的要求等因素，可判该试验结果无效。

210 对药物原料、辅料、制药用水、中间产品、终产品、环境、包装材料和容
211 器等开展有效的监控分析，并对分离到的微生物进行适宜水平的种属鉴定，
212 基于种群多样性趋势分析建立生产过程微生物分布地图，充分掌握药品及生
213 产全过程微生物污染情况，有助于污染微生物的溯源调查。

214 为了确证微生物为同种中的两个相同株，需比对更多的基因序列和特征
215 基因片段，甚至是全基因组序列的比对，实现既鉴定又溯源的目的，同时保证
216 结果的准确性。此外，有些微生物的溯源还需结合表型特征鉴定，如沙门菌属
217 的血清型鉴定。

起草单位：上海市食品药品检验研究院 联系电话：18001677839

复核单位：天津市药品检验研究院

9204 微生物鉴定指导原则修订说明

经过国内外现行标准比对分析、执行反馈问题评估等，《中国药典》四部通则 9204 微生物鉴定指导原则标准内容比较完善，引入了微生物鉴定与溯源相关的新技术和新方法。结合标准实施和企业实践中遇到的问题反馈，对标准进一步修订完善。

主要修订内容包含：

1、在“溯源分析”章节增明确了溯源调查相关要求。强调日常环境监控和微生物鉴定分析的重要性。提出对分离到的微生物进行适宜水平的种属鉴定，基于种群多样性趋势分析建立生产过程微生物分布地图，充分掌握药品及生产全过程微生物污染情况。此外，调整了相关段落的逻辑顺序。

2、对标准全文中的部分描述进行了修订完善。