

附件：洋葱伯克霍尔德菌群检查法公示稿（第二次）

1 洋葱伯克霍尔德菌群检查法

2 洋葱伯克霍尔德菌群检查法系用于在规定的试验条件下，检查供试品中是否
3 存在洋葱伯克霍尔德菌群（*Burkholderia cepacia* complex, Bcc）。

4 当本法用于检查非无菌制剂及其原、辅料等是否含有洋葱伯克霍尔德菌群时，
5 应按下列规定进行检验，包括样品取样量和结果判断等。

6 供试品检出洋葱伯克霍尔德菌群或其他**致病菌不可接受微生物**时，**报告结果**
7 **前应进行充分的调查和评估按一次检出结果为准，不再复试。**

8 供试液制备及实验环境要求同“非无菌产品微生物限度检查：微生物计数法
9 （通则 1105）”。

10 如果供试品具有抗菌活性，应尽可能去除或中和。供试品检查时，若使用了
11 中和剂或灭活剂，应确认有效性及对微生物无毒性。

12 供试液制备时如果使用了表面活性剂，应确认其对微生物无毒性以及与所使
13 用中和剂或灭活剂的相容性。

14 培养基适用性检查和检查方法适用性试验

15 本检查中所使用的培养基应进行适用性检查。

16 检查方法应进行方法适用性试验，以确认所采用的方法适合于该产品的检查。

17 若检验程序或供试品发生变化可能影响检验结果时，检查方法应重新进行适
18 用性试验。

19 菌种及菌液制备

20 菌种 试验用菌株的传代次数不得超过 5 代（从菌种保藏中心获得的干燥菌
21 种为第 0 代），并采用适宜的菌种保藏技术进行保存，以保证试验菌株的生物学
22 特性。

23 洋葱伯克霍尔德菌（*Burkholderia cepacia*）〔CMCC（B）23 005〕

24 新洋葱伯克霍尔德菌（*Burkholderia cenocepacia*）〔CMCC（B）23 006〕

25 神秘伯克霍尔德菌（*Burkholderia aenigmatica*）〔CMCC（B）23 010〕

26 铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）〔CMCC（B）10 104〕

27 金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）〔CMCC（B）26 003〕

28 菌液制备 将洋葱伯克霍尔德菌、新洋葱伯克霍尔德菌、神秘伯克霍尔德菌、

29 铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌分别接种于胰酪大豆胨液体培养基中或胰酪大
 30 豆胨琼脂培养基上，30~35℃ 培养 18~24 小时，将培养物用 pH7.0 无菌氯化钠-
 31 蛋白胨缓冲液、pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液或 0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度
 32 的菌悬液。菌液制备后若在室温下放置，应在 2 小时内使用；若保存在 2~8℃，
 33 可在 24 小时内使用。

34 阴性对照

35 为确认试验条件是否符合要求，应进行阴性对照试验，阴性对照试验应无菌
 36 生长。如阴性对照有菌生长，应进行偏差调查。

37 培养基适用性检查

38 每批本检查用的商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基
 39 均应进行培养基的适用性检查。

40 检查用培养基的适用性检查项目包括促生长能力、抑制能力及指示特性的检
 41 查，检查项目及所用菌株见表 1。

42 表 1 培养基的促生长能力、抑制能力和指示特性

培养基	特性	试验菌株
洋葱伯克霍尔德菌群选 择性琼脂培养基	促生长能力+指示特性	洋葱伯克霍尔德菌、新洋葱伯克霍尔 德菌和神秘伯克霍尔德菌
	抑制能力	铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌

43 培养基促生长能力检查 用涂布法分别接种不大于 100 cfu 的试验菌（表 1）
 44 于被检培养基和对照培养基平板上，在检查规定的培养温度及不大于规定的最短
 45 培养时间下培养，各菌株在被检培养基与对照培养基上生长的菌落大小、形态特
 46 征均应一致。

47 培养基抑制能力检查 接种不少于 100 cfu 的试验菌（表 1）于被检培养基和
 48 对照培养基中，在检查规定的培养温度及不小于规定的最长培养时间下培养，各
 49 试验菌均应不得生长。

50 培养基指示特性检查 用涂布法分别接种不大于 100 cfu 的试验菌（表 1）于
 51 被检培养基和对照培养基平板上，在检查规定的培养温度及培养时间范围内培养，
 52 各菌株在被检培养基上生长的菌落大小、形态特征、指示剂反应情况等均应与对
 53 照培养基一致。

54 检查方法适用性试验

55 供试液制备 按下列“供试品检查”中的规定制备供试液。

56 **试验菌** 洋葱伯克霍尔德菌、新洋葱伯克霍尔德菌和神秘伯克霍尔德菌。

57 **适用性试验** 按照供试品检查法取规定量供试液及不大于 100 cfu 的试验菌
58 接入规定的培养基中；采用薄膜过滤法时，取规定量供试液，过滤，冲洗，在最
59 后一次冲洗液中加入试验菌，过滤后，注入规定的培养基或取出滤膜接入规定的
60 培养基中。按照检查方法，在规定的温度和最短时间下培养，应能检出所加试验
61 菌相应的反应特征。

62 **结果判断** 各试验菌若在上述试验中均被检出，按此供试液制备方法和检查
63 方法进行供试品检查；若未检出任一试验菌，应消除供试品的抑菌活性 [见非无
64 菌产品微生物限度检查：微生物计数法（通则 1105）中的“抗菌活性的去除与灭
65 活”]，并重新进行方法适用性试验。

66 如果经过试验确证供试品对试验菌的抗菌作用无法消除，可认为洋葱伯克霍
67 尔德菌群不易存在于该供试品中，选择抑菌成分消除相对彻底的方法进行供试品
68 的检查。在此情况下，生产单位或研制单位应根据原辅料的微生物污染情况、生
69 产工艺及产品特性进行产品的风险评估，以保证检验方法的可靠性，从而保证产
70 品质量。

71 供试品检查

72 供试品的检查应按经方法适用性试验确认的方法进行。

73 **阳性对照试验** 实验室应基于质量风险管理的要求，根据产品特性、方法适
74 用性试验结果、人员技能与经验、数据可靠性、污染控制措施和实验室质量控制
75 水平等因素，综合评估确定日常检验过程中阳性对照试验的必要性和频次、要求。
76 阳性对照试验方法同供试品的洋葱伯克霍尔德菌群检查，对照菌的加量应不大于
77 100 cfu。根据方法适用性试验结果，选择 1 株试验菌作为阳性对照菌株，阳性对
78 照试验应检出相应的试验菌。

79 **阴性对照试验** 以稀释剂代替供试液照相应检查法检查，阴性对照试验应无
80 菌生长。如果阴性对照有菌生长，应进行偏差调查。

81 **供试液制备和增菌培养** 除另有规定外，取供试品，照“非无菌产品微生物
82 限度检查：微生物计数法（通则 1105）”制成 1:10 供试液。取相当于 1g 或、
83 1ml、1 贴或 10cm² 供试品的供试液，接种至适宜体积（经方法适用性试验确定）
84 的胰酪大豆胨液体培养基或适当稀释（经方法适用性试验确定）的胰酪大豆胨液

85 体培养基中（如：对制药用水进行检验时，可考虑用稀释 10 倍的胰酪大豆胨液
86 体培养基进行增菌培养），混匀，30~35℃ 培养 48~72 小时。

87 **选择和分离培养** 取上述培养物划线接种至洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂
88 培养基平板上，30~35℃ 培养 48~72 小时。

89 **结果判断** 若洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂培养基上有菌落生长，如表现
90 为表 2 中的生长特征等，应进行分离、纯化，并采用适宜的鉴定试验，确证是否
91 为洋葱伯克霍尔德菌群；若洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂培养基上没有菌落生
92 长，或有菌落生长但鉴定结果为阴性，判供试品未检出洋葱伯克霍尔德菌群。

93 表 2 洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂培养基上生长特征

培养基	生长特征
洋葱伯克霍尔德菌群选 择性琼脂培养基	菌落呈灰白、灰粉色或土黄（棕）色，周围培养基由黄色变橘 红或玫红色

94 稀释液

95 稀释液配制后，应采用验证合格的灭菌程序灭菌。

96 1. pH7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液 照无菌检查法（通则 1101）制备。

97 2. pH6.8 无菌磷酸盐缓冲液、pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液、pH7.6 无菌磷酸盐
98 缓冲液 照缓冲液（通则 8004）配制后，过滤、分装，灭菌。

99 3. pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液 取磷酸二氢钾 34g，加水 500ml 使溶解，用氢
100 氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 ，加水稀释至 1000ml，分装，灭菌，即为储备
101 液，在 2~8℃ 保存。将水与储备液按 800:1（ml/ml）混合，灭菌。

102 如需要，可在上述稀释液灭菌前或灭菌后加入表面活性剂或中和剂等。

103 34. 0.9% 无菌氯化钠溶液 照非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法（通
104 则 1106）制备。

105 培养基及其制备方法

106 培养基可按以下处方制备，也可使用按该处方生产的符合要求的脱水培养基。
107 配制后，应按验证过的高压灭菌程序灭菌。

108 1. 胰酪大豆胨液体培养基（TSB）、胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA）照无菌
109 检查法（通则 1101）制备。

110 2. 洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂培养基（BCCSA）

胰蛋白酶	1010.0g	丙酮酸钠	77.0g
蔗糖	22.0g	氯化钠	55.0g
酵母提取物	1.5g	酚红	0.02g20mg
庆大霉素	10mg	万古霉素	2.5mg
多粘黏菌素 B	600000U	琼脂	1414.0g
磷酸二氢钾	1.54g	结晶紫	0.001g1mg
水	1000ml		

111 除琼脂、庆大霉素、万古霉素、多粘黏菌素 B 外，取上述成分，混合，微温
 112 溶解，调节 pH 使灭菌后在 25°C 的 pH 值为 6.2±0.2，加入琼脂，加热融化后，
 113 摇匀，分装，灭菌。灭菌后，冷至 45~50°C，加入多粘黏菌素 B、庆大霉素、万
 114 古霉素，混匀，倾注平皿。

115

116 附表 洋葱伯克霍尔德菌群种水平成员

序号	名称	中文名称	备注
1	<i>B.cepacia</i>	洋葱伯克霍尔德菌	基因型 I
2	<i>B.multivorans</i>	多噬（食）伯克霍尔德菌	基因型 II
3	<i>B.cenocepacia</i>	新洋葱伯克霍尔德菌	基因型 III
4	<i>B.stabilis</i>	稳定伯克霍尔德菌	基因型 IV
5	<i>B.vietnamiensis</i>	越南伯克霍尔德菌	基因型 V
6	<i>B.dolosa</i>	狡猾伯克霍尔德菌	基因型 VI
7	<i>B.ambifaria</i>	双向伯克霍尔德菌	基因型 VII
8	<i>B.anthina</i>	花园伯克霍尔德菌	基因型 VIII
9	<i>B.pyrrrocinia</i>	吡咯菌素伯克霍尔德菌	基因型 IX
10	<i>B.latens</i>	隐蔽伯克霍尔德菌	/
11	<i>B.diffusa</i>	广布伯克霍尔德菌	/
12	<i>B.arboris</i>	森林伯克霍尔德菌	/
13	<i>B.seminalis</i>	种子伯克霍尔德菌	/
14	<i>B.metallica</i>	金属伯克霍尔德菌	/
15	<i>B.ubonensis</i>	乌汶伯克霍尔德菌	/
16	<i>B.contaminans</i>	污染伯克霍尔德菌	Taxon K
17	<i>B.lata</i>	普通伯克霍尔德菌	
18	<i>B.stagnalis</i>	湖水伯克霍尔德菌	/
19	<i>B.territorri</i>	领土伯克霍尔德菌	/
20	<i>B.pseudomultivorans</i>	假多噬伯克霍尔德菌	/
21	<i>B. catarinensis</i>	圣卡塔琳娜伯克霍尔德菌	/
22	<i>B.puraquae</i>	纯水伯克霍尔德菌	/
23	<i>B.paludis</i>	沼泽伯克霍尔德菌	/
24	<i>B.aenigmatica</i>	神秘伯克霍尔德菌	Taxon K

25	<i>B. orbicola</i>	/	/
----	--------------------	---	---

117 注：数据统计截止 20212024 年 64 月，将根据分类发展进行更新

起草单位：中国食品药品检定研究院 联系电话：67095695

参与单位：天津市药品检验研究院、河北省医疗器械检验检测研究院、辽宁省药品检验检测院、上海市食品药品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、河南省食品药品检验所、广东省药品检验所、苏州市药品检验检测研究中心、四平市食品药品检验所、淄博市食品药品检验研究院

洋葱伯克霍尔德菌群检查法第二次公示稿修改说明

根据 2022 年 11 月洋葱伯克霍尔德菌群检查法首次公示稿的反馈意见和建议，国家药典委员会微生物专业委员会进行了研讨，在第一次公示稿的基础上修订了部分内容，主要为：

1. 阳性对照

本次修订在阳性对照试验部分增加表述“实验室应基于质量风险管理的要求，根据产品特性、方法适用性试验结果、人员技能与经验、数据可靠性、污染控制措施和实验室质量控制水平等因素，综合评估确定日常检验过程中阳性对照试验的必要性和频次、要求”，以帮助使用者正确认识检验全过程控制的重要性。

2. 检出洋葱伯克霍尔德菌群或其他不可接受微生物时应先进行调查

考虑到结果判断的科学性，根据反馈意见，将“供试品检出洋葱伯克霍尔德菌群或其他致病菌时，按一次检出结果为准，不再复试”调整为“供试品检出洋葱伯克霍尔德菌群或其他不可接受微生物时，报告结果前应进行充分的调查和评估”。

3. pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液配方调整

将 pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液的配制方式调整为“取磷酸二氢钾 34g，加水 500ml 使溶解，用氢氧化钠溶液调节 pH 值至 7.2 ± 0.2 ，加水稀释至 1000ml，分装，灭菌，即为储备液，在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存。将水与储备液按 800:1 (ml/ml) 混合，灭菌”，并在菌液制备部分增加 pH7.2 无菌磷酸盐缓冲液作为稀释液。

4. 增加“ 10cm^2 ”和“1 贴”作为贴剂、贴膏剂的单位。

5. 增加附表中 Bcc 种水平成员 *B. orbicola*。

6. 修订 BCCSA 配方中质量书写格式。

7. 将“偏差调查”修订为“调查”，明确培养基适用性检查要求。

8. 将“本检查用的商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基的适用性检查”修订为“每批本检查用的商品化的预制培养基、由脱水培养基或按处方配制的培养基均应进行培养基的适用性检查”。

9. 将“培养基抑制能力检查 接种不少于 100 cfu 的试验菌（表 1）于被检培养基和对照培养基中”，修订为“培养基抑制能力检查 接种不少于 100 cfu 的试验菌（表 1）于被检培养基中”。