

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2017.5.14

《中华人民共和国兽药典》2015 年版三部培养基部分增修订概况

万建青,朱真,杨挺英,黄小洁

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2017-02-15 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2017) 05-0068-05 [中图分类号] S851.66

[摘要] 解读《中华人民共和国兽药典》2015 年版三部培养基质量标准的增修订内容和特点,以便广大使用者了解和掌握培养基质量标准的变化,并为《中华人民共和国兽药典》2020 年版的编制提供建议。

[关键词] 《中华人民共和国兽药典》2015 年版三部;培养基;标准;增修订

Revisions of Medium Including in the Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (Volume III, 2015 Edition)

WAN Jian-qing, ZHU Zhen, YANG Ting-ying, HUANG Xiao-jie

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Abstract: The article described the supplement and revision of medium including in the Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (volume III, 2015 edition), which would help users to understand and master the differences between the two Veterinary Pharmacopoeia of 2015 edition and 2010 edition. The article also gave some advices for Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2020 edition)

Key words: Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China (2015 edition); medium; standards; revisions

《中华人民共和国兽药典》(以下简称《中国兽药典》或兽药典)作为国家兽药技术法典,是国家兽药标准体系的核心,也是兽药研究、生产、检验、经营、使用以及监督管理等环节必须共同遵守、具有强制性的技术准则和法定依据。《中国兽药典》2015 年版^[1]已于 2016 年 8 月 23 日由农业部公告第 2438 号正式颁布,自 2016 年 11 月 15 日起实施。本文重点就培养基相关增修订概况进行介绍,为新

版兽药典的有效顺畅实施提供参考。

1 增修订概况

2005 年版兽药典收录了《中华人民共和国兽用生物制品规程》的主要内容,将其作为《中国兽药典》三部,使我国兽用生物制品首次有了独立法典。培养基作为一种重要的原辅材料,也因此首次出现在兽药典中,该部兽药典当时收录了 13 种培养基。2010 年版兽药典三部^[2]在 2005 年版兽药典基础

上,将培养基的品种增加至 15 种,增加了酪朊琼脂培养基(GA)和无血清支原体培养基。在《中国兽药典》2015 年版三部编撰过程中,结合工作实际,并借鉴国内外药典标准的一些先进经验,对培养基部分进行了较大的修改,包括培养基的品种、配方、

配制方法、检验方法等。与 2010 年版兽药典相比,《中国兽药典》2015 年版三部收录了 22 种培养基,其中新增 10 种、修订 12 种、删除 3 种,增修订概况见表 1。

表 1 《中国兽药典》2015 年版三部培养基品种增修订概况

Tab 1 Revisions of medium classes including in Chinese Veterinary Pharmacopoeia (volume III, 2015 edition)

培养基 数量及种类 medium number and classes	2015 年版 2015 edition	2010 年版 2010 edition	增减情况 fluctuation
无菌检验 培养基 asepsis medium	数量 number	2 种	3 种
	品种 classes	硫乙醇酸盐流体培养基(修订) 胰酪大豆胨液体培养基(新增)	硫乙醇酸盐培养基 酪朊琼脂培养基(删除) 葡萄糖蛋白胨培养基(删除)
支原体检验 培养基 mycoplasmas medium	数量 number	5 种	5 种
	品种 classes	改良 Frey 氏液体培养基(修订) 改良 Frey 氏固体培养基(修订) 支原体液体培养基(修订) 支原体固体培养基(修订) 无血清支原体培养基(修订)	改良 Frey 氏液体培养基 改良 Frey 氏固体培养基 支原体液体培养基 支原体固体培养基 无血清支原体培养基
检验用 培养基 test medium	数量 number	15 种	7 种
	品种 classes	检验培养基 13 种: 普通琼脂(营养琼脂)(修订) 马丁肉汤(修订) 胰蛋白 琼脂(修订) 明胶培养基(修订) SS 琼脂(修订) 麦康凯琼脂(修订) 普通肉汤(新增) 马丁琼脂(新增) 缓冲肉汤(新增) 厌气肉肝汤(新增) 含 1%醋酸铊普通肉汤(新增) 4%甘油琼脂(新增) 蛋白胨水(新增) 基础培养基 2 种: 牛肉汤(新增) 猪胃消化液(新增)	普通琼脂(营养琼脂) 马丁肉汤 肝汤琼脂(删除) 胰蛋白 琼脂 明胶培养基 SS 琼脂 麦康凯琼脂

2 主要变化及特点

2.1 编写体例更加科学 在编写体例上,借鉴美国药典^[3]、欧洲药典^[4]、英国药典^[5]、日本药局方^[6](以下简称国际药典)和中国药典^[5]关于无菌检验法和支原体检验法的做法,对《中国兽药典》2015 年版三部的检验用培养基实行分类收载,将无菌检验、支原体检验培养基单独列出,融入相应方法中,

如无菌检验培养基收录至“附录 3306 无菌检验或纯粹检验法”,支原体检验培养基收录至“附录 3308 支原体检验法”中,其他检验培养基一并收录至“附录 3704 检验用培养基配制法”,具体见表 2。通过分类收录,调整了培养基相关内容在《中国兽药典》2015 年版三部中的内容分布,其编写体例与国际要求相统一,提高了科学性和规范性。

表 2 各类培养基收录情况
Tab 2 The inclusion of media

2015 年版兽药典 2015 edition		2010 年版兽药典 2010 edition
收录分类 Classes	分类收录 “附录 3306 无菌检验或纯粹检验法” “附录 3308 支原体检验法” “附录 3704 检验用培养基配制法”	统一收录 “CVP3/2010FL/016 检验用培养基配制法”

2.2 编写内容更加合理 对检验用培养基,借鉴国际药典的做法,对一些复杂配方的培养基,主要是新鲜培养基,采用二级结构的形式给出明确的配方。这种二级结构形成的配方称为基础培养基。在新版兽药典中,新增了牛肉汤和猪胃消化液两种常用的基础培养基,并以附注 1、附注 2 的形式收录,它们是普通肉汤、马丁肉汤、明胶培养基等多种培养基的基础培养基。通过收录基础培养基,使检验用培养基中营养成分的含量相对准确,对全面提升检验用培养基质量具有重要意义。

对无菌检验和支原体检验培养基,分别从培养基及配方和培养基的质量控制两部分进行阐述。同时,增加了前言部分,首次明确各培养基对质控菌的适用范围,使标准编写更加规范,提高了内容的整体性和逻辑性。

对编写细节的处理更加严谨,比如将温度设为一个范围,而不是一个点,如将金黄色葡萄球菌的培养温度设为“35~37℃”,替代原有的“37℃”。又如,根据中国普通微生物菌种保藏管理中心对菌种名称的最新规定,将“白色念珠菌”和“黑曲霉”的名称分别修订为“白假丝酵母”、“巴西曲霉”,同时保留了原有名称作为新旧名称衔接的依据,提高了编写的科学性和严谨性。

2.3 检验用培养基标准体系更加严谨 检验方法与检验用培养基有效衔接,通过整理兽药典检验方法中所涉及的培养基种类,新增 7 种制品质量标准中提到但未收录的培养基,删除 1 种与兽药典收录的检验项目无关的培养基,提高了新版兽药典检验方法与检验用培养基标准之间的衔接,加强了制品质量标准的原辅材料控制,丰富了检验用培养基标准的内涵。

增加了检验培养基的适用范围,提高了可追溯性。同时,根据实际工作,对个别培养基配制进行修订,提高了标准的可操作性。

2.4 无菌检验培养基质控标准基本与国际接轨 国际药典无菌检验培养基种类、配制方法及质控标准于 2005 年统一,中国药典无菌检验培养基种类及质控标准亦于 2015 年与国际通用标准接轨,而 2010 年版兽药典无菌检验培养基种类、配方仍沿用 1985 年版中国药典标准。在参照国际药典和中国药典的基础上,《中国兽药典》2015 年版三部无菌检验培养基部分不断借鉴和采用国际先进技术,完善质控标准。

调整无菌检验培养基种类,在充分验证的基础上,新增了胰酪大豆胨液体培养基(TSB)作为检验真菌和需氧菌的培养基;优化了硫乙醇酸盐培养基的配方并更名为硫乙醇酸盐流体培养基(TG);删除了酪胺琼脂培养基(GA)和葡萄糖蛋白胨培养基(GP)。同时,参照制品检验标准的编写体例,对培养基提出了明确的检验参数,如性状、pH 值、无菌检验、微生物促生长试验等,相关变化见表 3、表 4。

严格检验标准,提升检验质量,比如硫乙醇酸盐流体培养基的性状检验由“淡黄色澄明液体,溶液上层 0.5~1.0cm 为红色”修订为“流体,氧化层的高度(上层粉红色)不超过培养基深度的 1/3”。同时,明确质控菌种培养条件,细化接种步骤,保证了培养基的安全有效、质量可控。比如,删除了酪胺琼脂培养基(GA)和葡萄糖蛋白胨培养基(GP),原因是 GA 主用于纯粹检验,在必要时对 TG 的补充,且可被其他适宜病原菌生长的培养菌所替代;而 GP 是我们一直沿用中国药典的培养基,但 2015 年版中国药典采用了国际通用的检验真菌和需氧菌的 TSB 培养基,且经徐伟东等^[7]和本实验室验证,二者微生物促生长能力无差异,经中国兽药典委员会讨论,同意删除 GA、GP,同时用 TSB 代替 GP,用于检验真菌和需氧菌。

完善质控菌种管理,借鉴和采用国际药典的先进做法,根据菌种性质对质控菌种进行了分类,将 5 种

表 3 无菌检验培养基变化对比

Tab 3 Comparative change of asepsis medium

2015 年版 2015 edition	2010 年版 2010 edition
附录“3306 无菌检验或纯粹检验法”: 2.1.1.1 硫乙醇酸盐流体培养基(TG) 23~25 ℃;35~37 ℃培养	附录“CVP3/2010FL/016 检验用培养基配制法”: 1 硫乙醇酸盐培养基(TG) 25 ℃;37 ℃培养 2 酪朊琼脂培养基(GA) 25 ℃;37 ℃培养 3 葡萄糖蛋白胨培养基(GP) 25 ℃培养
2.1.1.2 胰酪大豆胨液体培养基(TSB) 23~25 ℃培养	

表 4 硫乙醇酸盐流体培养基配方及配制方法变化对比

Tab 4 Comparative change in confect and confect methods of fluid thioglycollate medium

	2015 年版 2015 edition	2010 年版 2010 edition		
配方 Confect	胰酪蛋白胨	15 g	胰酪蛋白胨	15.0 g
	酵母浸出粉	5.0 g	葡萄糖	5.0 g
	酵母浸出粉	5.0 g	硫乙醇酸钠	0.5 g
	无水葡萄糖	5.0 g	L-半胱氨酸盐酸盐	0.5 g
	硫乙醇酸钠	0.5 g	琼脂粉	0.5~0.7 g
	或硫乙醇酸	0.3 mL	氯化钠	2.5 g
	L-半胱氨酸盐酸盐 (或 L-胱氨酸)	0.5g	0.2%美蓝溶液 (或 1%刃天青溶液 1.0 mL)	0.5 mL
	氯化钠	2.5 g	注射用水	加至 1000 mL
	新配制的 0.1%刃天青溶液	1.0 mL		
	琼脂	0.75 g		
纯化水 (灭菌后 pH 值为 6.9~7.3)	1000 mL			

制备方法
Preparation

除葡萄糖和 0.1%刃天青溶液外,取上述成分混合,加热溶解,然后加入葡萄糖和 0.1%刃天青溶液,摇匀,将加热的培养基放置室温,用 1.0 mol/L 氢氧化钠溶液调节 pH 值,使灭菌后的培养基 pH 值为 6.9~7.3,分装,116 ℃灭菌 30 min。制备好的培养基应保持在 2~25 ℃灭菌、密封容器中。若培养基氧化层(粉红色)的高度超过培养基深度的 1/3,需用水浴或自由流动的蒸汽加热驱氧,至粉红色消失后,迅速冷却,只限加热 1 次,并防止污染。

将以上成分混合,加热溶解。用氢氧化钠溶液调整 pH 值至 7.0~7.4。分装于中性容器中,以 116 ℃灭菌 20~40 min。

质控菌的分为需氧菌、厌氧菌和真菌。增加菌种溯源,或追溯到美国典型菌种保藏中心 ATCC、或追溯到中国医学微生物菌种保藏管理中心(CMCC),规范了质控菌种的来源。

修订后无菌检验培养基种类设置科学、检查项目系统、质控菌种规范,基本实现了与国际药典和

中国药典同步。

2.5 支原体检验培养基检验方法更加完善 整合检验方法。按照归类阐述的原则,将 5 种支原体检验培养基整合为液体和固体培养基两类检验方法,替代了原有 5 种培养基 5 个相似的检验方法。同时,删除不适用质控方法,液体培养基仅保留灵敏

度测定;固体培养基仅保留微生物促生长试验,减少了重复,提升了检验的可操作性,为进一步建立更加科学的质量标准奠定基础。

完善培养基配方。一是规范了固体培养基基础成分的名称,基本培养基成分称为“固体培养基基础成分”,辅助液成为“辅助培养基成分”。二是统一了配方中的个别成分及名称,用“无水磷酸二氢钾”替代“磷酸二氢钾”;用“葡萄糖(含 1 个结晶水)”替代“葡萄糖”,用“琼脂”替代“琼脂粉”。

新增质控菌种溯源,或追溯到美国典型菌种保藏中心 ATCC,或可在兽医微生物菌种保存中心查询到菌种来源,规范了质控菌种的来源。

3 结 语

《中国兽药典》2015 年版三部培养基部分在积极推行检验检测新技术、提供质控标准方面取得了很大进步,但仍存在一些不足,比如培养基的标准化研究不够深入,新鲜培养基替代方法研究基础薄弱等,这些问题在今后的研发工作中需进一步加强。

总之,《中国兽药典》2015 年版三部不仅扩大了培养基品种的收载,也扩大了对培养基新技术新方法的收载和应用,加强了培养基对产品质量标准的可控性,在检验方法和质控标准上更加细化、科学,对进一步建立严格的质量标准,丰富培养基标准的内涵,全面提升培养基对兽用生物制品的技术支撑作用具有重要意义。

参考文献:

- [1] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2015 年版三部[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China volume III 2015 edition[S].
- [2] 中国兽药典委员会. 中华人民共和国兽药典 2010 年版三部[S]. Commission of Chinese Veterinary Pharmacopeia. Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China volume III 2010 edition[S].
- [3] 美国药典[S]. 35:71. USP[S]. 35:71.
- [4] 欧洲药典[S].7.0:151. EP[S].7.0:151.
- [5] 英国药典[S].2011:A407. BP[S].2011:A407.
- [6] 日本药局方[S].16:114. JP[S].16:114.
- [7] 许伟东,徐华玉. 胰酪胨大豆培养基和改良马丁培养基的微生物促生长能力考察[J]. 中国药品标准,2013,14(4):271. XU W D, XU H Y. Microbial growth promotion evaluation of tryptic soybean medium and modified martin medium[J]. Drug Standards of China 2013, 14(4):271.

(编辑:陈希)