

卫生微生物：环境中与人类健康相关的微生物的统称。

卫生微生物学（sanitary microbiology）：研究卫生微生物与其环境相互作用的规律、对人类健康的影响以及人类应对这些微生物方略的科学。

卫生微生物学与微生物相关学科

普通微生物：微生物的分类、命名、形态、生理和生化特性、遗传与变异，以及分离培养和鉴定方法等；

医学微生物：针对人群中的个体，重在病原微生物感染后如何治疗和控制；定性，不需分型，只区分抗生素敏感性；目的是控制感染、缩短病程，减少后遗症和死亡；

卫生微生物：卫生微生物与其环境相互作用的规律、对人类健康的影响；定性定量,对微生物进行分型，从生态学的角度实现趋利避害、改善和保护环境与健康目的。

卫生微生物学的应用与研究前景

1.在感染性疾病控制和治疗中的应用

肠道正常菌群用于消化道炎症性。

2.在感染性疾病预防中的应用

疾病的扩散、传播受季节、气候、环境等因素影响。

3.在生物病原性突发事件中的应用

不同生境中卫生微生物的传播规律，在边防检疫、商品交易等活动中发挥作用。

4.在制定国家标准和行业规范服务中的应用

研究食品、水等环境产品中卫生微生物的分布特征，为预防食源性疾病的感染和相关标准和技术规范提供标准。

5.在应对生物危害和恐怖中的应用

开展具有生物危害风险微生物的研究工作，防范生物武器危害。

6.在生产、生活和各种产业开发中的应用

养殖、种植中微生物的利用、食品保健品等的开发等

卫生微生物学检测特点及基本原则

检测特点

检测的对象多

病原微生物+非致病和条件致病微生物

特别是能反映环境、食品、健康相关产品等样品卫生质量的卫生指示微生物

检测的范围广

标本的来源不仅局限于人体，也来源于空气、水、食品等环境

检测的方法更敏感

以检测环境标本中数量很低的致病微生物

检测程序灵活

标准不统一，根据微生物生物特征、样本质量要求不同而各有差异

检测的指标间接

以卫生指示微生物反映环境/产品的卫生安全性。

定量测定和分型检测

以探明感染性疾病的传染源、传播途径、流行情况

卫生微生物检测基本原则

1. 样品采集原则：

注意采样的代表性和针对性

保持原有的微生物状态

详细记录样品信息和标记

总原则：

生物安全
代表性
针对性
及时性
防污染
防杀菌
细标记

2. 样品运送原则

尽快送检
保护样品中待检微生物
完善样品交接

3. 样品储存原则

低温冷藏保存
超低温冷冻保存

4. 实验室检测原则

科学性，有效性，微生物检验优先原则

影响采样代表性的因素包括

采样量
采样部位
采样时间
采样的随机性和均匀性
以及按产品批号抽样

保护待检微生物

- A. 温度调节
- B. 加入保护剂
- C. 去除其他不利于待测微生物生存的因素

常温（15~30℃）保存 淋病奈瑟菌
保存在 4~8℃

如 24 小时内无法检测的标本则应置于-70℃或以下保存，但应避免反复冻融

注意冷冻对检测项目的影 响（副溶血性弧菌在标本中存在时）

其他不利于待测微生物生存的因素

pH: 标本的采集选用合适的保存液，普通碱性蛋白胨水、3%NaCl 碱性蛋白胨水；

抑制剂

渗透压

气体: 厌氧菌待检标本的保存；

实验室分级（bio-safety level）

基础实验室 —— 一级生物安全水平（BSL-1）
基础实验室 —— 二级生物安全水平（BSL-2）
防护实验室 —— 三级生物安全水平（BSL-3）
最高防护实验室 —— 四级生物安全水平（BSL-4）

抑菌物质 去除方法

一、中和法

二、滤膜过滤法

三、稀释法

四、吸附

五、免疫磁珠法

卫生微生物样品特点

目的菌数量低;细菌受损;杂菌多

数量低——浓缩

细菌受损——复苏

杂菌多——选择性增菌和分离

样品处理方法

1.样品混匀

液体样品-电动、手摇或敲打震荡

固体样品

灭菌乳钵内研磨

高速组织捣碎机

匀浆器中捣碎混匀

均质器混合

2. 样品浓缩

沉淀法

过滤法

吸附法

免疫磁珠法

定量计数方法

倾注平板计数法---见菌落总数测定

表面涂布计数法---见菌落总数测定

MPN 法---见大肠菌群测定

其他方法：显微镜直接计数法、比浊计数法、生化方法间接推算微生物量等

分型：血清学分型

噬菌体分型

细菌素分型

耐药谱分型

质粒图谱分型

毒素分型

脉冲场凝胶电泳分子分型

PCR 特点：灵敏，特异，快速，不用纯培养物

指示微生物 indicator microorganism: 是在常规卫生监测中，用以指示样品卫生状况及安全性的（非致病）微生物（或细菌）

指示微生物分型：

①菌落总数（细菌、霉菌和酵母菌数）

②大肠菌群、粪链球菌、产气荚膜梭菌

③其他指示菌：特定菌、某些致病菌

④病毒（包括噬菌体）

选择指示微生物的总原则

数量大易于检出

检验方法简单、经济、方便

有一定的代表性，其数量变化能反映样品卫生状况及安全性

作为粪便污染指示菌的条件有哪些？

- ①大量存在于人及温血动物肠道，未被粪便污染的样品中无此种菌存在
- ②在外环境中的抵抗力，包括对消毒剂的抵抗力与肠道致病菌大致相似或稍强
- ③在外环境中不繁殖，存活时间与肠道致病菌大致相似或稍长
- ④检验方法简便，易于定量计数

菌落总数：指被检样品的单位重量(g)、容积(ml)、表面积(cm²)或体积(m³)内，所含有的能在某种培养基上经一定条件、一定时间培养后长出的菌落数量。以菌落形成单位数（colony forming unit, CFU）表示

种类：菌落总数包括细菌菌落总数、霉菌菌落总数和酵母菌菌落总数。

卫生学意义：用于判定检样被微生物污染的程度或动态观察，也是某些样品的卫生限量标准。

测定方法：常用标准平板计数法(standard plate-counting method)和表面涂布法（Spatula Method）

平板菌落数的选择

选取菌落数在 30~300 之间的平板

两个平板平均数

其中一个平板有较大片状菌落生长时，应以无片状菌落生长的平板作为该稀释度的菌落数，若片状菌落不到平板的一半，而其余的一半中菌落分布又很均匀，即可计算半个平板后乘 2 以代表全皿菌落数

平皿内如有链状菌落生长时（菌落之间无明显界线），若仅有一条链，可视为一个菌落数；如果有不同来源的几条链，则应将每条链作为一个菌落计

粪便污染指示菌

大肠菌群（coliform group）

是一群能在 35~37℃、24 小时内发酵乳糖产酸产气的、需氧或兼性厌氧的、革兰阴性的无芽胞杆菌。是存在于人和温血动物肠道中的一大群菌

主要包括：四个属的菌

埃希氏菌属(Escherichae)

克雷伯氏菌属(Klebsiella)

肠杆菌属(Enterobacter)

枸橼酸杆菌属（Citrobacter）

根据生长温度的差异

将能在 37℃生长的称为总大肠菌群，

在 44.5℃仍能生长的大肠菌群称为耐热大肠菌群(thermo-tolerant coliform group) 或粪大肠菌群（faecal coliform Fc）

耐热大肠菌群的主要成员是埃希氏菌属的菌

大肠杆菌（Escherichae coli）

普遍存在于人和动物的肠道内（新鲜粪便中每克可达 10⁹ CFU），近年来随着测定新方法的发现和建立，大肠杆菌作为粪便污染的指示菌的应用越来越多。

利用大肠杆菌产生的葡萄糖苷酸酶，分解吲哚葡萄糖苷酸，产生有色物质，而使大肠杆菌菌落显色，对大肠杆菌数进行测定。

作用：作为粪便污染的指示菌

大肠杆菌检出的意义最大

其次是耐热大肠菌群

总大肠菌群的检出意义略差

粪链球菌 (fecal Streptococcus, Fs)

概念：肠球菌属中最常见的代表种，约占肠球菌分离株的30%—70%，是人及动物肠道中正常菌群，在自然界分布广泛，常存在于水、土壤、空气中。在人粪中所占数量少于大肠杆菌，在动物粪便中所占数量较高

卫生学意义：粪大肠菌群/粪链球菌

比值大于4.1，污染主要来自人粪

比值小于0.7，污染主要来自动物粪

介于二者之间，混合污染

测定方法：多管法、平板表面涂布法、滤膜法

产气荚膜梭菌 (Clostridia perfringens)

是一类能还原亚硫酸盐为硫化物、厌氧生长的、革兰阳性梭状芽胞杆菌

是人和动物，特别是食草动物肠道内的常住菌，数量少于大肠杆菌，每克粪便约为10⁵~10⁶

由于该菌能形成芽孢，对含氯消毒剂及外界不良环境有较强的抵抗力，在外环境中存活时间较长，所以若样品中产气荚膜梭菌被大量检出而大肠菌群数量很少时，则表示样品曾受过粪便污染，即有陈旧性污染

常被作为水或土壤卫生细菌学检验中的指示菌

其他指示微生物

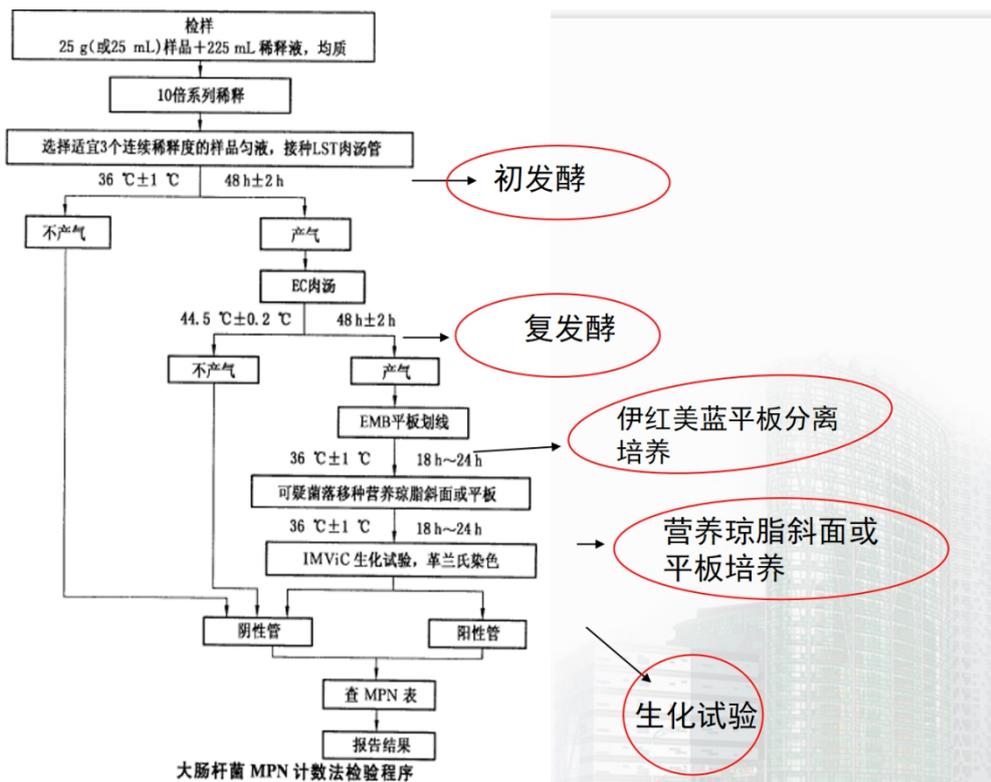
(1) 不得检出的致病菌

(2) 肠道病毒的指示微生物

1) 大肠杆菌噬菌体 f2(coliphage)

2) 脊髓灰质炎病毒(polio virus)减毒疫苗株 I

大肠杆菌MPN计数



生物战剂

战争中用于伤害人、畜和毁坏农作物、植被等致病微生物、毒素和其他生物活动物质称生物战剂

由生物战剂、生物弹药及其运载西永等组成的能杀伤有生力量和破坏动植物的特种武器、器材总称为生物武器

以生物武器达到军事目的的行动称为生物战

生物战剂伤害特征

侵入途径：呼吸道、消化道、皮肤和黏膜

效应的影响因素：

- 1、源的强度：每发弹药中装载人体半数致死剂量或半数发病剂量表示；
- 2、有效气溶胶回收率：悬液或干粉战剂形成 1-5um 粒子的活存微生物气溶胶百分率；
- 3、气溶胶的衰亡率：气溶胶衰亡率低，作用时间越长，污染范围越大；
- 4、其他因素：气象条件、地形和植被分布差异；

生物战剂危害的流行病学特征

流行过程异常

- 难查传染源
- 传播途径反常
- 人体免疫水平低

流行特征异常

- 地区分布异常
- 流行季节异常
- 职业分布异常
- 流行形式异常

抗性基因引入

鼠疫耶氏菌

前苏联

16 种抗生素抗性

炭疽芽孢杆菌

俄罗斯

几乎可以对抗任何抗生素

人种炸弹：是针对某一特定民族或种族群体的基因武器。只对某特定人种的特定基因、特定部位有效，故对其他人种完全无害，是新式的超级制导武器。

水微生物

水的生境特征

1. 温度：在相当大的温度范围内均可能有微生物存活
2. 静水压：不同微生物对静水压的耐受能力差别很大，所以静水压也能影响微生物的分布。
3. 光照：具有光合作用的微生物和藻类主要分布在水的表层。
4. 溶解氧：解氧含量的变化影响着微生物生长的种类和分布
5. 氢离子浓度：一般来说适宜微生物 pH 值范围是 6.5~8.5。这与一般自然水的 pH 值范围相适应。

6. 化学物质：水中有机物可成为异养微生物的营养来源。
7. 营养物质：水中微生物的共同特征之一是在低营养物浓度的条件下生长繁殖，但水中微生物数量与营养物质浓度的水平仍有较大关系。
8. 浑浊度：
9. 盐度：

革兰氏染色原理：

第一步：结晶紫使菌体着上紫色

第二步：碘和结晶紫形成脂溶性大分子复合物，分子大，能被细胞壁阻留在细胞内

第三步：酒精脱色，细胞壁成分和构造不同，出现不同的反应

第四步：沙黄复染，增加脱色菌与背景的反差并区别于未脱色菌

G⁺ 菌：细胞壁厚，肽聚糖网状分子形成一种透性障，当乙醇脱色时，肽聚糖脱水而孔隙缩小，故保留结晶紫-碘复合物在细胞膜上。呈紫色。

G⁻ 菌：肽聚糖层薄，交联松散，乙醇脱色不能使其结构收缩，其脂含量高，乙醇将脂溶解，缝隙加大，结晶紫-碘复合物溶出细胞壁，沙黄复染后呈红色。

水中病毒的检验及卫生标准

(1) 水中病毒的指标

水体的细菌学指示菌不能完全代表病毒的检测。

大肠杆菌噬菌体的抵抗力接近于肠道病毒，有人考虑用大肠杆菌噬菌体作为指标，但其在体外环境中仍有增殖的可能性，仅可以作为对水消毒实验的指示病毒。

近年来越来越多的研究集中在脊髓灰质炎病毒及多种大肠杆菌噬菌体。

常用的指示噬菌体：**SC 噬菌体、 F- 噬菌体和 B. fragilis 噬菌体。**

不同的指示噬菌体各有优缺点：

SC 噬菌体反映水的受污染程度和作为水中病毒存在的指示物

F- RNA 噬菌体适宜作为人肠道病毒的指示物

B. fragilis 噬菌体反映来自人类粪便的污染程度

但是，噬菌体指示物不能代替传统的细菌指标。

发达国家在饮用水、生活用水和地下水标准中都引入了病毒指标

对于再生水的微生物学指标，大多仍沿袭传统习惯，选择大肠菌群或粪大肠菌群作为指标。

水微生物的检测

大多数为非致病性的，少部分是致病性的。

水中致病微生物在传播肠道传染病上起很大作用。

应对不同类型的水质进行微生物的检测。

致病微生物含量少，检测难度较大。

首先检测卫生指示菌，必要时才对各种致病菌逐一检测。

主要关注是来自人或动物粪便中肠道致病菌。可用代表粪便污染的细菌作为有肠道致病菌危险的指示菌。

粪便污染指示菌的条件

理想的指示菌应具备以下条件：

1. 在污染的水中有致病菌存在时，指示菌亦应存在。
2. 不存在于未污染水中。
3. 指示菌在群落和个体数量上应大于致病菌数量。

- 4.指示菌的密度应与污染程度有一定的相关。
- 5.在水中生存寿命要比致病菌长，并对消毒剂有相同或较强的抵抗力。
- 6.作为微生物学标准，应适用于各种水源。
- 7.指示菌的特性应是稳定的，在水中不能繁殖。
- 8.检测方法简单、经济、快速、敏感、定量、准确性高。

生活饮用水卫生细菌学指标

1.菌落总数

- 2.大肠菌群（coliform group）
- 3.粪大肠菌群（faecal coliform）
- 4.产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens)
- 5.肠球菌（Enterococcus）

1.菌落总数 菌落总数是将 1ml 水样接种在营养琼脂培养基中，于 37 °C 经 18~24h 后所生长的细菌菌落总数。

菌落总数主要作为判断水质被污染程度的标志之一，所测得菌落总数增多，说明水被微生物污染，但不能说明污染的来源。必须结合大肠菌群数来判断水污染的来源和安全程度。测定方法：标准平板计数法和表面涂布法

采样（见标准）

（1）容器洗涤

（2）容器灭菌（p63）：干热

湿热-压力蒸气灭菌

（3）同一水源、同一时间采集几类检测指标的水样时，应先采集供微生物学指标检测的水样。采样时应直接采集，不得用水样刷洗已灭菌的采样瓶

送检：≤4h

检验方法：倾注培养法

报告方式：菌落形成单位数（CFU）

2.大肠菌群（coliform group）在生活饮用水的安全检测中，常采用大肠菌群作为粪便污染指标，而不是直接检测肠道致病菌。

大肠菌群是指一群需氧或兼性厌氧的能在 37°C、24h 内发酵乳糖产酸，产气的革兰阴性无芽胞杆菌。根据生化及血清学特性分为四个属，即埃希杆菌属、枸橼酸杆菌属、肠杆菌属和克雷伯杆菌属。

大肠菌群数是指 1L 水中所含大肠菌群的数目，即总大肠菌群数。

水中大肠菌群数的含量表明水被粪便污染的程度，并间接地表明有肠道致病菌存在的可能性。测定方法：分步发酵法和滤膜法。

发酵法（大肠菌群能分解乳糖产酸产气）

报告方式：水样大肠菌群数是以 100ml 中大肠菌群最可能数（MPN）表示

意义：含量表明水被粪便污染的程度，并间接提示有肠道致病菌存在的可能性

标准：（MPN /100ml）不得检出(生活饮用水)

查 MPN 表（most probable number）p49.

这种方法对样品进行连续系列梯度稀释，加入培养基进行培养，从规定的反应呈阳性管数的出现率，用概率论来推算样品中菌数最近似的数值。

（1）乳糖初发酵试验：产酸、产气

（2）分离培养：伊红美蓝琼脂平板（EMB）

（3）证实试验：革兰氏染色和复发酵试验

3.粪大肠菌群（faecal coliform） 为了与土壤等自然环境本身存在的大肠菌群区别，可将培养温度提高为 44.5℃，在此种条件下仍能生长并发酵乳糖产酸产气的总大肠菌群微生物，称为粪大肠菌群。

大肠菌群与粪大肠菌群在检测意义上的不同：前者在水样中检出机会大于后者，对水质安全的要求较高，而后者常用于表示近期污染。

粪大肠菌群是国际上通行的监测水质受粪便污染的指示菌，适用于河流、湖泊、水库、废水处理系统、野外浴场用水、海水等的一般性水质监测。

作为粪便指示菌，**大肠杆菌检出意义>粪大肠菌群>总大肠菌群**

4. 产气荚膜梭菌(Clostridium perfringens) 是肠道正常菌群成员，由于他可以形成芽胞，故在外环境存活时间长。有的学者主张在粪大肠菌群与肠球菌阴性时，可检查产气荚膜梭菌作为陈旧污染的指示菌。

5.肠球菌（Enterococcus） 原归于链球菌属的 D 血清群。是肠道中常住的菌种之一，因此它的存在可提示有粪便污染。

肠球菌在人和温血动物肠道内均有存在，但在人及各种动物粪便中的含量不同，在人类肠球菌少于粪大肠菌群，而动物则肠球菌多于粪大肠菌群。

可参考粪大肠菌群与肠球菌比值判别水污染的来源。该比值人为 4.4，鸭为 0.6，羊、鸡、猪均为 0.4，牛为 0.2，火鸡为 0.1。

>4.1，家庭污水

<小于 0.7，畜、禽来源污染

在此两数字之间为人及动物废水的混合污染

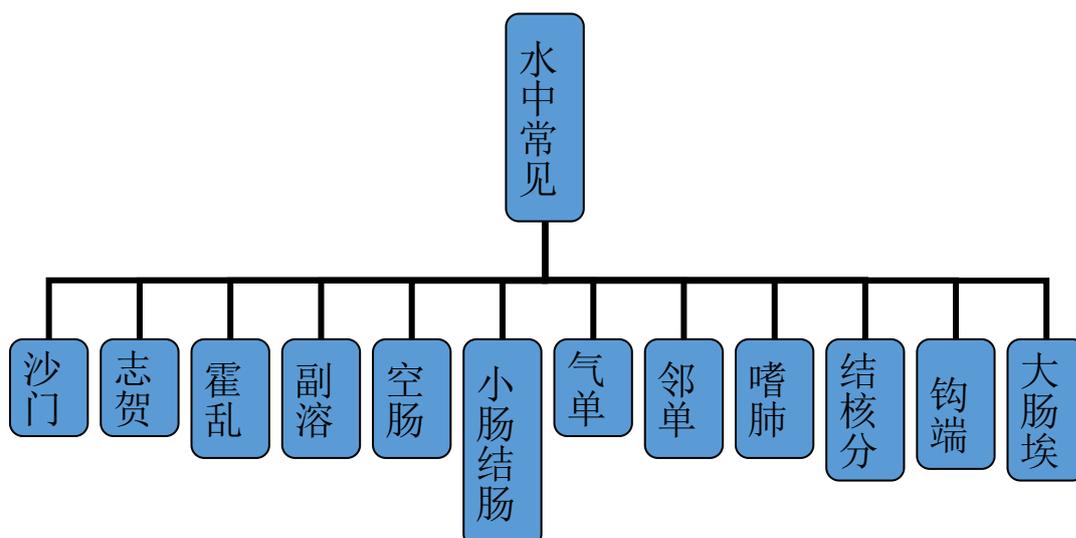
饮用水细菌学卫生标准

我国 2006 年颁布了新的《生活饮用水卫生标准》（GB5749-2006）：

每毫升水中菌落总数不得超过 100cfu，每 100ml 中不得检出总大肠菌群、耐热大肠菌群、大肠埃希氏菌。

有游离氯限量值：在与水接触 30 分钟后应不低于 0.3mg/L。集中式给水除了出厂水应符合上述要求外，管网末梢水不应低于 0.05mg/L。

水中常见的细菌病原体



(1) 沙门菌属 (*Salmonella*) : 水中的生存能力较强
污染水源的机会多

医院污水流放

屠宰场, 禽及鱼类加工厂的污水排放

鸡鸭和家畜在水边放养

患者及带菌者的粪便

(2) 志贺菌属 (*Shigella*) : 在水中的生存力比沙门菌弱, 感染剂量小
引起的细菌性痢疾, 致病作用主要依靠侵袭力和内毒素

传染源: 患者和带菌者, 无动物宿主

主要经粪-口途径传播

四季均可发病, 夏秋季发病率最高

(3) 大肠埃希菌属 (*Escherichia coli*)

是人类和动物肠道中的正常菌群, 多数血清型对人非致病

对人致病的大肠杆菌主要为:

肠致病性大肠杆菌 (EPEC)

肠产毒性大肠杆菌 (ETEC)

肠侵袭性大肠杆菌 (EIEC)

肠出血性大肠杆菌 (EHEC)

肠黏附性大肠杆菌 (EAEC)

传染源: 患者和健康带菌者

传播途径: 粪-口途径

在水中存活力强, 易分离

(4) 霍乱弧菌属 (*Vibrio cholerae*)

霍乱是经水传播为主的疾病

“最可怕的瘟疫”

霍乱在人类历史上曾发生过 7 次世界性大流行

(5) 副溶血性弧菌 (*Vibrioparaemolyticus*)

海洋细菌, 主要栖息于入海口, 嗜盐性, 无盐不长, 含盐 3.5% 生长繁殖良好, 含盐 8% 以上时停止生长。对营养要求不高, 生长条件类似霍乱弧菌。

分布受季节的影响, 一般 4~10 月份易从水中分离到。水、沉积物、浮游动物三者副溶血性弧菌的生态中具有重要作用。

副溶血性弧菌可通过水污染食品, 特别是污染海产品, 是夏秋季沿海地区引起食物中毒和急性腹泻的主要病原菌。

水体自净

水体自净指天然水体受到污染后, 在无人为处理的条件下, 借水体自身的净化能力使之得到净化的过程。包括:

物理作用: 稀释、沉降、扩散等,

化学作用: 氧化、还原、分解、凝聚等

生物学作用: 水中大部分有机物经过生物氧化分解作用而得到降解与去除的。

污水微生物处理的基本过程, 一般可分为三级。

一级处理: 又称预处理

去除污水中的固体物质、油脂等颗粒状物质，对污水进行中和与调节，除去污水中的悬浮固体物和部分生化需氧量(biochemical oxygen demand,BOD)，减少后续处理的固体负荷和容积，使排入二级处理系统的污水更适于微生物的生长繁殖，加快处理速度和增强处理效果。

包括三步：

第一步是利用格栅、筛网、砂滤等去除污水中悬浮的粗大固体物；

第二步是将污水排放入沉砂池中，沉出砂子；

第三步是将上述处理过的污水再排入沉淀池中，某些生物量和有机物便沉淀下来，形成粗污泥从污水中分离开来。粗污泥可作为厌氧处理的对象，干燥后的污泥可作为肥料，但要注意重金属的含量。一级处理可以除去 70%~80%的 BOD。

二级处理：大致可分为两大类：

厌氧法

好氧法

其原理是人工给予一定的理化条件，利用所生成的微生物群落的生物活性加速对污染物的降解或转化。在这一生物群落中细菌有着重要作用，细菌在利用降解底物进行代谢时，可分为需氧及厌氧两种不同类型的生化过程，在污水处理中亦有相应的处理方法。

污水二级处理的方法

需氧处理法：

生物滤膜法

生物滤池中生物膜的微生物群落组成种类，不同于活性污泥，基本区别是在生物滤池中繁殖大量的真菌，在此条件下积极参与去除污水中有机物的作用。

(3) 三级处理：三级处理的目的在于除去微生物无法降解的污染物和无机物，如含氮、含磷的无机盐等。可采用：

厌氧污泥消化

污泥压滤晒干

某些情况下，还需消毒处理

空气微生物

空气生境特征

电离层（散逸层和暖层）和平流层微生物难以生存

对流层是大气中微生物生存和扩散的主要场所

营养：空气中缺乏微生物生长繁殖所需的营养物质和充足的水分。

温度：适宜气温是重要条件，但气候条件的影响重大

日照：日光辐射对微生物有杀灭作用，细菌不能在空气中繁殖，但受时间、季节、地域及气候条件影响。

空气流动及污染：无固有微生物丛，空气微生物是暂时的、可变的；一般情况下，空气中污染物越多，污染越严重，空气微生物的种类和浓度也会越高。

湿度：

阴霾、潮湿空气微生物种类多，干燥空气相对较少；

湿生型（RH > 90%）：大多细菌、酵母菌及部分霉菌；

中生型（80% ≤ RH ≤ 90%）：多数霉菌

干生型（RH < 80%）：部分曲霉

酸碱度：

反映空气中所含的成酸物质或成碱物质数量的多少；

酸碱性质的改变也影响空气浮游微生物的生存环境；

空气微生物的来源

空气微生物来源于其它外环境和人、动植物的活动等，是自然因素和人为因素污染的结果

室外空气微生物来源

- ◆ 土壤
- ◆ 水面
- ◆ 工农业产生

室内空气微生物来源

人和动物呼吸道排出微生物

机械性移动

微生物实验室操作不当

呼吸道感染患者

种类：细菌，真菌，病毒

分布：

一般不繁殖

微生物在空气中为过路客

生存能力强

经空气传播的微生物具有耐干燥、抵抗力强

时空分布不均

室外空气分布：主要是非致病性腐生菌，以及对干燥和辐射有抵抗力的真菌孢子

室内空气分布：室内空气中微生物可来自室外空气，但主要来自人体或人类活动

高度分布：离地面越高，微生物含量越少，粒子也越小，抵抗力越强，致病性越小

水平分布：与室内外分布关系密切。城市上空和人群密集场所的微生物、尤其是病原微生物数量明显增高

时间分布：一天内不同时间微生物分布不一样，也有季节性变化

易受气象和大气污染影响

气象、气候(湿度、温度、风力等)对空气微生物的种类和数量影响较大

空气微生物样品的特点

- 1.一般情况下，空气微生物浓度较低。
- 2.能够存活的微生物都有较强的耐受力。
- 3.与各种颗粒物结合形成微生物气溶胶。

空气微生物的检测和卫生标准

1.自然沉降法 根据空气中携带有微生物气溶胶粒子在地心引力的作用下，以垂直的自然方式沉降到琼脂培养基上，经 24h 37℃温箱培养基计算出菌落数。应以菌落形成单位 cfu/皿或 cfu/m³ 表示。

简单方便，缺点是采集效率低、稳定性差。

2.惯性撞击式采样法：利用抽气装置在单位时间将一定容量的含有微生物粒子的空气，通过某些装置形成直线或曲线运动的高速气流，使气流中微生物粒子也随之高速运动，当气流改变方向时，运动着的粒子因惯性继续照直前进撞击并粘集于培养基上。

直线气流惯性撞击法

全玻璃液体撞击式采样器：利用喷射气流的方式将空气中的微生物粒子收集在小体积的液体中。

固体撞击式采样器：单级撞击式采样型将空气中不同大小的含菌粒子撞击于一个采集面上，只能测定空气中微生物的浓度。

多级撞击式采样型将空气中不同大小的含菌粒子采集于不同的采集面上,可测定空气中微生物的浓度,也可了解粒子大小分布情况,但结构比较复杂,采样耗费较大。

曲线气流惯性撞击法

3.过滤阻留式采样法

4.静电沉着采样法

5.温差迫降采样法

6.其他

全玻璃液体撞击式采样器的优点：

适于高浓度的空气微生物采样。

样品可接种不同的培养基培养计数。

分布均匀,能测出空气中活微生物数量。

采样液有保护作用,对脆弱的微生物(如病毒、立克次氏体)也能采样。

捕获率高,尤其是对于小颗粒。

采样器一般由玻璃制成,利于消毒灭菌处理,使用方便、价格低廉、可反复使用。

Anderson 采样器使用注意事项

采样器流量为 28.3L/min。可用转子流量计进行校对。

注意各节的密封度。

撞击距离对采样有影响。平皿中培养基厚度影响采样距离,以加 27ml 培养基较为合适,此时撞击距离为 2.5mm 左右。

采样器的消毒可用酒精擦拭,也可用高压蒸气灭菌或环氧乙烷熏蒸。

微生物浓度过高时,颗粒重叠,会产生误差。最多的一节菌落数以 50~250cfu/m² 为宜。

空气采样：(1) 选择有代表性的采样点,一般在室内四角及室中央,放置含营养琼脂的平皿。

(2) 打开皿盖(将皿盖置于平皿底下,不可仰放,以防污染),将有培养基的平皿,暴露于空气 5 分钟(视空气清洁程度而定),采样毕合上皿盖,记录采样时间。

(3) 将已采集的培养基在 6h 内送实验室,置于 37℃ 温箱培养 48 小时。

(4) 记录 5 个平皿的菌落总数。

(5) 采样时关闭门窗 15-30min,记录室内人员数、温湿度和天气等。

结果计算

$$\text{空气含菌量 (cfu/m}^3\text{)} = \frac{\text{六级采样平板上总菌数 (cfu)} \times 1000}{28.3\text{L/min} \times \text{采样时间 (min)}}$$

$$\text{空气微生物大小分布 (\%)} = \frac{\text{各级菌落数 (cfu)} \times 100\%}{\text{所有采集幅度皿菌落总数 (cfu)}}$$

空气微生物卫生标准(菌落总数)

《室内空气质量标准》 GB/T 18883-2002

菌落总数 撞击法 2500 cfu/m³

撞击法:采用撞击式空气微生物采样器采样,通过抽气动力作用,使空气通过狭缝或小孔而产生高速气流,使悬浮在空气中的带菌粒子撞击到营养琼脂平板上,经 37℃ 48h 培养后,计算出每立方米空气中所含的菌落总数的采样测定方法。

一般情况下采样量为 30L~150L,应根据所用仪器性能和室内空气微生物污染程度,酌情增加或减少空气采样量。

样品采完后，将带菌营养琼脂平板 $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 恒温箱中，培养 48h，计数菌落数，并根据采样器的流量和采样时间，换算成每立方米空气中的菌落数。以 cfu/m³ 报告结果。

我国公共场所空气卫生细菌学标准

	沉降法 (cfu/皿)	适用范围
≤1000	≤10	3~5 星级宾馆、饭店
≤1500	≤10	2 星级以下宾馆和非星级带空调宾馆、饭店
≤2500	≤30	撞击法 (cfu/m ³)
≤4000	≤40	理发店、美容院 (店)、游泳馆、体育馆、展览馆、商场 (店)、书店、医院候诊室、候机室、旅客列车车厢、轮船客舱
≤7000	≤75	候车室、候船室

WHO 推荐的医院各部门空气细菌标准

级别	菌量 (cfu/m ³)	适用范围
I 级区	<10	器官移植、心血管、矫形等外科手术室保护性隔离等，灌注或配制注射液实验室
II 级区	<200	无菌或手术室、供应室、婴儿室、中尽灭菌单位术后恢复室、早产儿及产房、石膏室 (如在手术区内)、重症监护病房
III 级区	200~500	一般病房、治疗室、放射室、衣帽室、小手术室浴室、按摩室、洗浴室
IV 级区		传染病室、放射性核素室
V 级区		卫生间、贮藏室、太平间等

居室内空气卫生细菌学评价的参考指标

夏季标准		冬季标准			
评价	细菌总数 (cfu/m ³)	绿色和溶血性链球菌 (cfu/m ³)		细菌总数 (cfu/m ³)	绿色和溶血性链球菌 (cfu/m ³)
清洁空气	<1500	<16		<4500	<36
污染空气	>2500	>36		>7000	>124

空气微生物传播方式

经尘埃传播

经飞沫传播: 5μm

经飞沫核传播:组成, 1-2μm, 传播性最强

尘埃(dust): 指灰尘等空气中悬浮的颗粒, 受区域、来源、空气流动、环境卫生状况、人类活动影响较大。

飞沫(droplet): 人与动物的呼吸、咳嗽、喷嚏及发声等活动, 将上呼吸道内的分泌物液体爆破成的微粒。携带唾液、分泌物及痰液中大量的微生物。

飞沫核 (droplet nuclei): 较小飞沫与空气摩擦或蒸发后失去水分子, 剩下的由唾液中的黏液、蛋白质、盐类及所载微生物组成。粒径最小, 传染性最强。

气溶胶(aerosol): 以固体或液体微小颗粒分散于空气中的分散体系, 它是由分散相(固体或液体微粒)和分散介质[又称连续相(空气)]组成的均匀体系, 大小一般在 0.1~10μm 之间

微生物气溶胶(microbial aerosol)属分散性气溶胶, 包括液态和固态, 主要特点为微粒上附着

有各种微生物

微生物气溶胶大小与其感染性的关系

直径 $>5\ \mu\text{m}$ ，被阻于鼻腔

直径 $4\sim 5\ \mu\text{m}$ ，仅到支气管

直径 $1\sim 4\ \mu\text{m}$ ，到达肺泡

直径 $<1\ \mu\text{m}$ ，部分停留于肺泡，其余随呼吸排出

预防：

1.综合性措施

控制污染源

个人防护

2.物理方法

物理通风法

紫外线照射

负离子发生器

3.化学消毒剂消毒

极端环境中微生物

嗜热微生物种类

耐热菌：最高 $45\sim 55\ ^\circ\text{C}$ ，最低 $<30\ ^\circ\text{C}$

兼性嗜热菌：最高 $50\sim 65\ ^\circ\text{C}$ ，最低 $<30\ ^\circ\text{C}$

专性嗜热菌：最高 $65\sim 70\ ^\circ\text{C}$ ，最低 $40\sim 42\ ^\circ\text{C}$

极端嗜热菌：最高 $>70\ ^\circ\text{C}$ ，最适 $>65\ ^\circ\text{C}$ ，最低 $>40\ ^\circ\text{C}$

超嗜热菌：最高 $113\ ^\circ\text{C}$ ，最适 $80\sim 110\ ^\circ\text{C}$ ，最低 $\sim 55\ ^\circ\text{C}$

嗜热微生物的耐热机制：

酶和蛋白质有更强的耐热性

细胞膜中饱和脂肪酸含量高，更易形成疏水键，以确保在高温下膜的稳定性和正常生理功能
能产生多胺、热亚胺及高温精胺，以稳定核糖体等以及保护蛋白质大分子免受高温破坏

其核酸有热稳定性的结构

生长速率快，合成大分子迅速，能及时弥补高温对大分子的破坏

嗜热微生物特点

生长速率高，代谢作用强

产物/细胞重量之比值较高

高温下具有竞争优势，在发酵生产中可防止杂菌污染

所含耐高温酶有重要的生产潜力和应用前景

乙醇等代谢产物容易收得

发酵过程不需冷却，可省去深井水消耗

嗜热微生物卫生学意义

超嗜热菌的发现使人们相信生命不仅存在于地球，还可能存在于其他星球

嗜冷微生物

定义：最适生长温度在 $15\ ^\circ\text{C}$ 、最高生长温度低于 $20\ ^\circ\text{C}$ 和最低生长温度在 $0\ ^\circ\text{C}$ 以下的微生物。嗜冷微生物遇到 $20\ ^\circ\text{C}$ 高温即死亡。与耐冷微生物的区别：在 $5\ ^\circ\text{C}$ 以下生长，不考虑其最适和最高生长温度

嗜冷微生物生存机制

细胞膜内含有大量不饱和脂肪酸，且含量会随温度降低而增加，从而保证了膜在低温下的半

流动性，有利于营养物质的吸收和代谢产物的分泌，因此能在低温条件下进行生命活动

卫生学意义

低温酶制剂

低温食品腐败

嗜酸微生物：生长最适 pH 为 3~4 以下，在中性 pH 下即死亡的微生物，少数可生活在 pH<2
与耐酸微生物的区别：耐酸微生物在中性 pH 下能生活

公共场所

公共场所生境特征

一、公共场所

概含是人群至重的场所。是为满足人们的各种生活需求，由人工建成的供公众进行工作学习、休闲娱乐体育、参观、旅游等活动的空间。

《公共场所卫生管理条例》：

二、公共场所的生境特征

(一)生境有利于病原传播：

1. 人群主角，人员流动在大。
2. 公共设施及物品供公众重复使用。
3. 健康与非健康个体混杂。
4. 管理较困难。

(二)管理控制病原传播

国家卫生标准与法规的更新与变化

公共卫生用及微生物

公共用品：指在公共场所中专门供给客人反复使用和从业人员专门用于直接为客户服务的各种用品、用具、设备和设施的总称。(病原载体&传播媒介) 种类：大肠菌群、葡萄球菌(主要为金黄色葡萄球菌)、溶血性链球菌、铜绿假单胞菌、霉菌(青霉属和曲霉属)、乙肝病毒、寄生虫卵等。

2. 分布均有不同程度的微生物污染，主要为细菌总数、大肠菌群超标真菌污染人体密切接触的公共用品表面 HBV 污染。

3. 卫生学意义通过日常生活接触，易传播肠道传染病、皮肤感染。甚至乙肝病毒感染，直接关系到人群的健康水平。

公共场所微生物的来源

(一)自然来源的微生物：1. 土壤。2. 空气

(二)人为来源的微生物：1. 人群。2. 公共用品，

公共场所微生物的种类、分布及其卫生学意义

(一)空气微生物

1. 种类细菌占大多数。霉菌污染率增高。
2. 分布人群活动频繁、密集区微生物数量多，
3. 卫生学意义在通风不良、空气污染，细菌数量多的室内公共场所，易传播呼吸系统传染病。

公共场所微生物的检验与卫生标准

空气卫生微生物检测

常以细菌总数和溶血性链球菌来指示空气清洁程度和潜在的致病性。

(一)平板暴露沉降法(自然沉降法) 9cm 营养琼脂 5min 暴露

(二)空气采样器法

二公共卫生用具微生物检测

(一)采样:

- 1 涂抹法:无菌棉拭子蘸取灭菌生理盐水(营内 10mL)后涂抹用品、用具。然后将拭子放入生理盐水管中。及时送检培养,
2. 戳印法:持被检物品放平。将特制戳印培养基在被检物品表面用手轻按压 3-4S。取下平皿、盖上回盖,送 37C 恒温培养植培养 24h 计数。
3. 无菌滤纸斑贴法用灭菌生理盐水浸润 5cmx5cm 大肠菌群快迪测定纸片两张,分别粘贴在公共卫生用贯规定部分和面积范围内. 约 30s 后取下置于无菌塑料袋内。

公共场所微生物的检验与卫生标准

公共卫生用具微生物检测

(二)采样数量:不超过各类物品投入使用总数的 5%,或投入使用总数不超过 10 件的单位,应在 1 件以上。

(三)采样部位

- 1、餐饮具茶杯内、外缘高 1-15cm 处(口唇接触处)涂抹一圈约 50cm²
- 2、毛巾、枕中(套) 对折平面中央 5cmx5cm 面积上均匀涂抹 5 次
3. 床单被平 床单、被罩的两端中间 5cmx5cm 及中央多位 5cmx5cm 均匀涂抹 5 次
- 4、脸(脚)盆、浴盆内缘 1/2 高度涂抹一周
5. 拖鞋鞋面与脚趾接触处采样,一双拖鞋为一份样品
- 6、马桶坐垫圆前边 1/3 部分
- 7、理发推子推子前都上下均匀各涂抹三次, 一个推子为一份样品
- 8、理发刀、刀和修脚工具 刀、刀刃两侧西各涂珠一次,两个刀成两个剪为一份样品

(四)送检

明标记(编号)、细记录(名称、亲源,数量。采样地点、采样人及采样时间)

(五)监测项目和检设方法:

细菌菌落总数、大肠菌群、致病菌

公共场所集中空调通风系统改生物检测

(一)送风中微生物检验

- 1 采样点一般在距送风口下风方向 15-20 cm 处
- 2 采样环境条件采样时集中空调通风系统必须在正前运转条件下,并关闭门窗 1 小时以上,尽量减少人员活动幅度与频率。记要室内人员数量、温湿度与天气状况等。
3. 检验项目送风中细菌总数检验、送风中真菌总数检验、送风中 β -溶血性链球菌国检验

(二) 冷却水冷凝水中嗜肺军团菌检验

1 原理;待测水样经过滤膜或离心浓缩后后,一部分样已经酸处理与热处理。以减少杂色(BCYE)琼重平板并进行培养,生成典型菌落并经生化培养和血清学实验鉴定、定确认则判定为嗜肺军团菌。

公共场所微生物的检验与卫生标准

(三)空气净化消毒装置效果检验

1. 原理通过测定一定状态下空中微生物数量在空气净化消毒装置前后的变化来计算净化或消毒效率,从而评价空气净化消毒装置的净化消毒效果。
- 2 实验方法按空气净化消毒装置的技术要求将其安装在实验设备上
- 3 评价规定两除率均 $\geq 50\%$ 为净化合格。 $\geq 90\%$ 者为消毒合格。阴性对照组应无菌生长;净化消毒的菌量在 500--2500CFU/m²

$$\text{消除率} = \frac{\text{装置菌样本平均菌落数} - \text{装之后样本平均菌落数}}{\text{装置前样本平均菌落数}}$$

风管内表面微生物检验

1. 采样

●采样点:每套集中空调通风系统的主风管中至少选择 5 个代表性采样点。 . 采样面积:每点采样面积应为 50cm²。

●采样方法:空调风管内表面积尘较多时用刮式法采样。积尘较少不适宜刮式法采样时用擦拭法采样、整个采样过程应无菌操作。

2 样品检测刮式法、擦拭法、培养与计数。

公共场所的预防性卫生监督

●任何家公共场所开业前的卫生审查中应对应经营场所的卫生状况。消毒设施,卫生制度,预防性健康检查以及卫生知识培训进行全面的审查。严格执行《公共场所卫生管理条例和《公共场所卫生标准》。

二坚持经常性的公共场所及其用品消毒

(一)空气消毒:自然对流通风、机械通风、紫外线照射、化学药剂喷雾

(二)公共用具消毒:茶具、理发工具、毛巾(浴巾,面巾)、拖鞋、床上用品(被罩。床单,枕巾等)、卫生间的消毒(浴缸,洗脸池。座便器等)

(三)游泳池水消毒:定期换水,及时补充新鲜水,尽是缩短换水周期,连续消毒

医疗用品微生物生境特征

1. 高度危险性物品: 即关键性物品,微生物污染后可造成严重危害的物品;穿过皮肤或黏膜进入无菌的组织的用品;与破损组织、皮肤密切接触的用品;接触新生儿和免疫功能低下者的用品

2. 中度危险性物品: 即半关键性物品,可造成中等程度危害的物品

仅和完整的皮肤或黏膜相接触,不进入无菌的组织的用品;

3. 低度危险性物品: 即非关键性物品,受到一定量的病原微生物污染时才造成危害;不直接接触患者;只接触患者正常无损的皮肤

医疗用品生境特征

1. 一般的手术器械和器材: 使用前,表面清洁干燥,缺乏营养物质;使用后,清洗不彻底,消毒处理不当。

2. 血液和血液制品: 营养丰富,要防止污染。

医疗用品微生物的检测及卫生标准

(一) 医疗用品的分类 可反复使用、一次性使用

(二) 医疗用品的检测目的 检测消毒或灭菌的效果

(三) 医疗用品的检测指标

1. 细菌总数

2. 大肠菌群数

3. 致病菌和真菌

4. 无菌检测

5. 需氧菌、厌氧菌检测等

(三) 医疗用品的检测指标

1. 一次性使用医疗用品产品细菌和真菌污染的检测

2. 无菌检验实验

3. 卫生监督抽样

4. 医疗用品的卫生标准

一次性使用医疗用品产品细菌和真菌污染的检测

(3) 抽样要求：3 个不同批号---3 个大包装--25%首检，25%留样，50%复检

抽样数量：同一品牌、不同型别

医疗用品的检测指标

1. 一次性使用医疗用品产品细菌和真菌污染的检测

- (5) 细菌检测操作程序：
- 培养基
 - 需氧 - 厌氧培养基
 - 真菌培养基
 - 洗脱液
 - 100级层流超净台

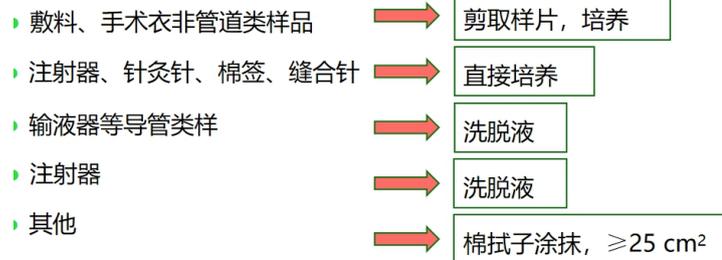
样本制备后，应立即检测

稀释液，15~300 CFU/平板

原液，<15 CFU/平板

每一样本洗脱液--接种 1.0 ml/平皿×2--倾注营养琼脂培养基 37 °C，48 小时培养--菌落计数

细菌检测操作程序：



阴性对照：

营养琼脂直接培养

洗脱液与缓冲液各 1.0 ml×2

阳性对照：

金黄色葡萄球菌（ATCC6538）

真菌检测操作程序：

阴性对照：

营养琼脂直接培养

洗脱液与缓冲液各 1.0 ml×2

阳性对照：

白假丝酵母菌（ATCC10231）

结果计算：

2 个平板计数的平均数×稀释度

表达单位：CFU/g；CFU/样本

无菌检验试验：

(1) 目的：评价医疗用品经灭菌处理后是否达到无菌标准。

(2) 试验器材：

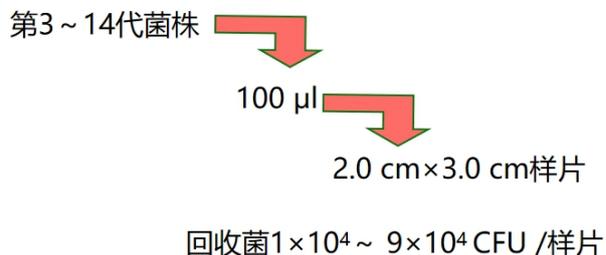
检测样本的处理:

检测数量: 首次检测: 1/4 个样本/最小包装

复测: 2/4 个样本/最小包装

无菌检验检测样本的处理:

● 染菌样片制备



样本处理-培养

1. 杀菌性能测试方法

● 杀菌试验



结果评价:

结果评价



一次性使用卫生用品杀菌性能、抑菌性能及其稳定性鉴定

1. 杀菌性能测试方法

样本处理——培养

- 需氧 - 厌氧菌培养管
- 阴性对照管
- 阳性对照管
- 30 ~ 35 °C, 5天
- 逐日观察
- 真菌培养
- 20 ~ 25 °C, 7天
- 逐日观察

抑菌性能测试方法

-----抑菌性能测试方法同杀菌性能测试

抑菌率 $\geq 50\% \sim 90\%$ ，产品有抑菌作用；

抑菌率 $\geq 90\%$ ，产品有较强抑菌作用

稳定性能测试方法

自然留样：将原包装样品置室温下按使用说明书规定的时间抽样进行抑菌或杀菌性能测试。

加速实验：将原包装样品置 $54 \sim 56^\circ\text{C}$ 恒温箱内 14 天或 $37 \sim 40^\circ\text{C}$ 恒温箱内 3 个月，保持相对湿度 $\geq 75\%$ ，抽样进行抑菌或杀菌性能测试。

置 $54 \sim 56^\circ\text{C}$ ，14 天，抽样检测：保质期：室温下至少 1 年

置 $37 \sim 40^\circ\text{C}$ ，3 月，抽样检测：保质期：室温下至少 2 年

化妆品 (cosmetic)：指以涂抹、喷洒或其他类似方法，散布于人体表面（皮肤、毛发、指甲、口唇等），以达到清洁、消除不良气味、护肤、美容和修饰目的化学工业品。

一次污染和二次污染

一次污染：原料：①最易污染：天然动植物成分及其提取物

②较易污染：增稠剂、成膜剂、色素等

③较少污染：油脂、醇、香料等

生产过程：

① 生产设备

② 厂房环境

③ 生产人员

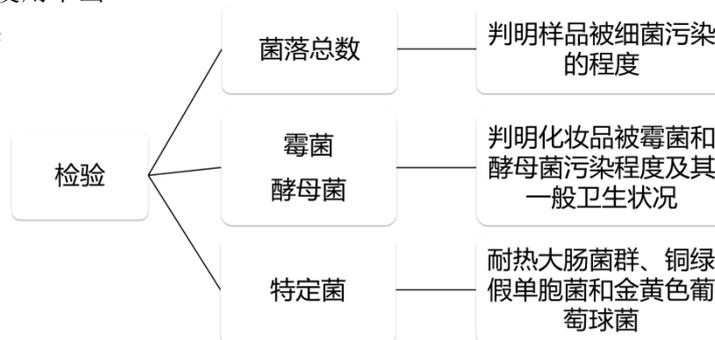
④ 包装材料

化妆品的二次污染

指化妆品在运输、贮藏、销售以及消费者使用过程中造成的污染。

1. 使用时不注意卫生
2. 包装设计不科学
3. 防腐剂使用不当

检测的内容：



(一)菌落总数：指 1g 或 1mL 检样经过处理，在卵磷脂吐温 80 营养琼脂培养基上，于 37°C 培养 48h 后所生长的一群嗜中温的需氧及兼性厌氧的菌落总数。

(二)霉菌和酵母总数：指 1g 或 1mL 化妆品检样在虎红（孟加拉红）培养基上，于 28°C 培养 3 天后，所生长的菌落和酵母菌菌落总数。

(三) 特定菌 (specified microorganisms): 指化妆品中不得检出的特定细菌。

特定菌的卫生学意义

耐热大肠菌群: 判明化妆品是否被粪便污染

铜绿假单胞菌: 引起人的眼、耳、鼻、咽喉和皮肤等处的化脓性感染 (条件致病菌)

金黄色葡萄球菌: 引起人体局部化脓性病灶, 严重时可导致败血症 (葡萄球菌中致病力最强)

化妆品检验: 1、亲水性样品 (水包油型)

10g 或 10mL 样品直接加入 90mL 生理盐水稀释成 1:10 的稀释液;

2、疏水性样品 (油包水型)

先用液体石蜡混匀, 再加吐温 80 进行均质化, 最后加入生理盐水稀释成 1:10 稀释液;

3、中和防腐剂:

加入防腐剂相应的中和剂。酚类防腐剂加入卵磷脂和吐温 80。

4、高营养成分:

卵磷脂、吐温 80、大豆及酪蛋白消化培养基 (SCDLP 培养基)

我国化妆品的卫生标准

参照《化妆品卫生规范》进行。

1. 眼部、口唇、口腔黏膜用以及婴儿和儿童用化妆品菌落总数 ≤ 500 CFU/ml(g);
2. 其他化妆品菌落总数 ≤ 1000 CFU/ml(g);
3. 每克或每毫升产品中不得检出粪大肠菌群、铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌;
4. 霉菌和酵母菌总数 ≤ 100 CFU/ml(g)。

针对一次污染的预防:

原料: 灭菌或除菌处理

生产设备: 设备的设计和选材应考虑容易清洁消毒

对设备和管道需要采用三道清洗程序

容器与器具: 玻璃容器和塑料容器在罐装前需清洗、消毒、吹干

生产环境: 保证化妆品生产车间及包装室的空气清洁

操作人员: 个人卫生

针对二次污染的预防:

消费者: 洗净手再用手指蘸取化妆品; 粉扑和毛刷经常清洗

包装材料和方式: 方便消费者使用, 减少微生物污染

防腐剂: 符合《化妆品安全技术规范》的要求

药品微生物

剂型 (dosage form): 药品生产过程中, 为适应诊断、治疗和预防疾病的需要而将药物制成的不同形式, 是药品应用于临床的最终给药形式。

按照给药途径划分:

口服给药剂型、口腔内给药剂型、注射给药剂型、呼吸道给药剂型、其他腔道或粘膜给药剂型

微生物角度的药品生境特征分类:

- 1、具备微生物所需的营养物质和生长条件-注射针剂
- 2、含有一定的营养物质, 但也含有各种抑菌剂或防腐剂, 对微生物具有一定的杀灭或抑制作用-口服液体制剂

药品微生物污染的来源

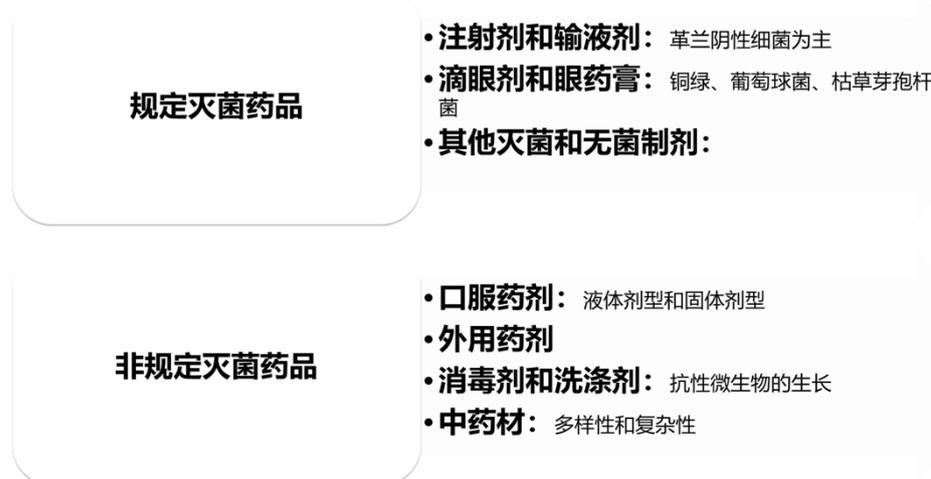
原辅料本身：厌氧性芽孢梭菌、酵母菌、霉菌、经血传播病毒等

空气：葡萄球菌、链球菌、棒状杆菌等

水：假单胞菌、枯草杆菌、产碱杆菌等

其他：工作人员衣物、体表及与外界相通的腔道；制药设备和包装容器等处的微生物

不同种类药品的常见污染微生物



药品制剂（制剂）：依据国家药典或药政管理部门批准的标准，应治疗或预防需要而制备的不同给药形式的具体品种。

规定灭菌制剂：指采用灭菌法杀灭或去除包含芽孢在内的所有活微生物的一类药物制剂。

无菌制剂：在无菌环境下采用无菌技术制备不含微生物的一类药物制剂。

一般，规定灭菌或无菌制剂受微生物污染导致的后果比非无菌制剂严重。

药品微生物污染的微生物学意义

（一）药品变质现象

异味

变色

黏稠

颗粒感

其他（沉淀、混浊或云雾状）

（二）药品变质判定依据

药品中分离到病原微生物

口服及外用药品菌落总数超过限量值

无菌制剂中检出微生物

药品未检出微生物，但存在微生物毒性代谢产物

药品出现肉眼可见的感官或理化性状改变

（三）药品变质的后果

出现有害的微生物代谢产物

失去药用价值

危害用药者健康

药品变质的后果：出现有害的微生物代谢物，失去药用价值，危害用药者健康

药品微生物检测与卫生标准

包括：无菌检查 微生物限度 热原检查 细菌内毒素

无菌检查

指用于检查国家药典要求无菌的药品、生物制品、原料、辅料、及其他品种是否无菌的一种方法。包括有需氧菌、厌氧菌和真菌三类微生物的检查。

目的：消除要求无菌的药品制剂污染细菌而对患者带来的危害，保证用药安全。

无菌检验的环境要求： 在严格控制的无菌保障条件下进行。

无菌检查方法： 薄膜过滤法和直接接种法

无菌检查的局限性与规定灭菌药品的无菌保证

非无菌药品的微生物限度检验

指检查非无菌药品及其原料药、辅料或敷料受到微生物污染程度的方法。包括微生物计数法和控制菌检查法。

目的：保证药品质量；评审药品生产企业管理和质量体系；反映药品生产工艺的科学性、合理性和质量管理水平。

1. 微生物计数法

细菌菌落总数：是指每克、每毫升或每 10 cm² 在需氧条件下，30~35 °C 培养 3 天，在营养琼脂平板上生长的菌落数。

霉菌和酵母菌菌落总数：采用玫瑰红钠琼脂或酵母浸出粉胨葡萄糖琼脂为培养基，23~28 °C 培养 5 天。

控制菌检查法：非无菌药品中不得检出的细菌称为控制菌。包括大肠埃希菌、沙门菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、梭菌属和白色念珠菌。

热原和细菌内毒素检验法

(1) 热原 (pyrogen)：能引起机体发热的物质。热原普遍存在于自然水、自来水、尘埃中，细菌内毒素也是热原的来源之一。

(2) 细菌内毒素 (endotoxin)：革兰阴性菌细胞壁的组分，是在细菌死亡破裂后释放出的毒性脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)。

药品微生物污染的预防和控制

1. 加强药品的生产管理
2. 药品制剂的优化
3. 从产品检验方面预防和控制最终成品的微生物污染
4. 合理贮存药品

药品生产质量管理规范 (GMP) 是对药品生产过程实施全面管理，最大限度地将产品质量置于可控状态，确保持续生产出合格产品的一种管理方法。

第 3 章 微生物实验室生物安全

生物安全：

指避免由于对具有感染力的有机体或遗传改良有机体的研究和商品化生产而对人类的健康和安全以及环境的保护带来的风险，尤其是外来物种的侵入级转基因物种的产生、转移及应用等。

实验室生物安全：

指实验室在生物安全条件和状态不低于容许水平，可避免实验室人员、来访人员、社区及环境受到不可接受的损害，符合相关法规、标准等队实验室生物安全责任的要求

实验室生物安全保障

指单位和个人为防止病原体或毒素丢失、被窃、滥用、转移或有意释放而采取的安全措施。

实验室生物安全防护

指实验室工作人员所处理的实验对象含有致病的微生物及其毒素时，通过在实验室设计建造、使用安全防护设备和个体防护措施、严格遵从标准化的工作及操作程序和规范等方面采取综合措施，确保实验室工作人员不受实验对象侵染，确保周围环境不受其污染。

生物安全实验室

通过防护屏障和管理措施，达到生物安全要求的生物实验室和动物实验室，由硬件设施、操作规范、人员培训和规章制度所形成的严密防控体系。

微生物实验室获得性感染

指与微生物实验室有关的感染。

实验室获得性感染的特征

- (一) 来源特殊且广泛
- (二) 微生物实验室可能成为对外的污染源
- (三) 实验室获得性感染的常见病原体
布鲁氏菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、炭疽杆菌、肝炎病毒、HIV 等。
- (四) 实验室感染相关的高风险实验因素
接种器/材、移液器、离心管、搅拌、混匀和震荡、开启安瓿、感染性物质倾注

生物因子分级

病原微生物实验室生物安全管理条例》		WHO《生物安全手册》（第三版，2004）	
第一类	能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物。	危险度 4 级	（个体和群体的危险均高） 病原微生物通常能引起人或动物的严重疾病，并且很容易发生个体之间的直接或间接传播，对感染一般没有有效的预防和治疗措施。
第二类	能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物。	危险度 3 级	（个体危险高，群体危险低） 病原微生物通常能引起人或动物的严重疾病，但一般不会发生感染个体向其他个体的传播，并且对感染有有效的预防和治疗措施。
第三类	能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，	危险度 2 级	（个体危险中等，群体危险低）病原微生物能够对人或动物致病，但对实验室工作

	传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物。		人员、社区、牲畜或环境不易导致严重危害。实验室暴露也许会引起严重感染，但对感染有有效的预防和治疗措施，并且疾病传播的危险有限。
第四类	在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物。	危险度 1 级	（无或极低的个体和群体危险）不太可能引起人或动物致病的微生物。

生物安全实验室

防护水平分为

一级、二级、三级、四级，

BSL-1、BSL-2、BSL-3、BSL-4

ABSL-1、ABSL-2、ABSL-3、ABSL-4

（表示动物活体操作）

一级防护水平最低，四级防护水平最高

一级（BSL-1）实验室

适用于操作在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物

二级（BSL-2）实验室

适用于操作能够引起人类或者动物疾病，但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害，传播风险有限，实验室感染后很少引起严重疾病，并且具备有效治疗和预防措施的微生物；

三级（BSL-3）的实验室

适用于操作能够引起人类或者动物严重疾病，比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物

四级（BSL-4）实验室

适用于操作能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物，以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物

生物安全柜

生物安全柜	循环气流	排出气流	排风系统	保护对象
I 级	0%	100%	实验室内/连接建筑物排风系统/排到建筑物外	操作者/环境
II 级 A1 级	70%	30%	实验室内/连接建筑物排风系统	操纵者/环境/样品
II 级 A2 级	70%	30%	实验室内/连接建筑物排风系统	操纵者/环境/样品
II 级 B1 级	30%	70%	连接建筑物排风系统	操纵者/环境/样品
II 级 B2 级	0%	100%	全外排式	操纵者/环境/样

				品
III 级	0%	100%	全外排式	操纵者/环境/样品

实验室生物安全评审与监督

新建、改建或者扩建一级、二级实验室，应当向设区的市级人民政府卫生主管部门或者兽医主管部门备案。

三级、四级实验室应当通过实验室国家认可。

证书有效期为 5 年。

三级、四级实验室应当通过实验室资格审批和实验活动审批。证书有效期为 5 年。

需要在动物体上从事高致病性病原微生物相关实验活动的，应当在符合动物实验室生物安全国家标准的三级以上实验室进行。

从事高致病性病原微生物相关实验活动应当有 2 名以上的工作人员共同进行。

在同一个实验室的同一个独立安全区域内，只能同时从事一种高致病性病原微生物的相关实验活动。