



《國際 GMP 標準專區》

微生物鑑定

一、前言

藥品之組成成分、製藥用水、製造環境以及中間產品與最終產品經常需要進行微生物鑑定。當原/物料或製造環境的微生物數目超過警戒及/或行動水準時，或無菌產品檢驗出微生物時，微生物鑑定是非常重要的。微生物鑑定是評估污染管制成效、排除非無菌藥物產品中不宜存在的微生物（objectionable microorganisms）以及無菌操作與產品無菌測試呈陽性時的重要品質管制過程。

在 USP 35 版中，新增了有關微生物特徵描述、鑑定與菌株分型的一般資訊專章<1113>（Microbial Characterization, Identification, and Strain Typing），針對微生物鑑定提供了新的資訊。該專章提供現今微生物鑑定方法、方法選擇以及鑑定方法確認（verification）的基本資訊。以下簡述重要部分，供業者參考。

二、菌株分離（ISOLATION OF PURE CULTURES）

微生物學上鑑定的第一個步驟就是要分離出純種菌株（culture），一般而言是將待測菌落在適當的微生物固態培養基上，分四個象限連續劃線（quadrant pattern），以獲得分離的純種單一菌落（discreet colonies）。這種技術也可運用於後續微生物鑑定中表現型分析（phenotypic expression）與菌種繁殖的程序。分析人員應了解微生物的表現（亦即細胞大小與形狀、孢子形成、細胞組成、抗原性、生化活性以及對於抗菌劑的敏感性）可能會受到分離來源、培養基選擇性以及生長條件所影響（參見表 1）。

表 1. 微生物分類學上所採用的表現型特徵 (Phenotypic Characteristics Employed in Microbial Taxonomy)	
類別	特徵
菌株 (Culture)	菌落形態，菌落色彩、形狀與大小，色素生成
形態學上 (Morphological)	細胞形態學，細胞大小，細胞形狀，鞭毛類型，分泌物質，革蘭氏染色，孢子與耐酸染色，孢子生成的模式
生理學上 (Physiological)	氧氣耐受性、pH 範圍、最佳溫度與範圍、耐鹽性
生物化學上 (Biochemical)	碳利用，碳水化合物氧化或發酵，酶的表現型態

抑制性 (Inhibition)	膽鹽耐受性、抗生素敏感性、染料耐受性
血清學上 (Serological)	凝集 (Agglutination)、螢光抗體
化學分類 (ChemoTaxonomic)	脂肪酸的形態 (fatty acid profile)、微生物毒素、整體細胞組成
生態學上 (Ecological)	微生物的來源

三、微生物菌株的初步篩選

從藥物的各種成分、製藥用水、製造環境、中間體/中間產物與最終產品之檢體分離出來，而培養在藥典規定之培養基上的微生物，很可能會在生理上受到抑制，因此需要小心地處理，因為這些微生物從適合生存於嚴苛環境的代謝狀態 (metabolic state)，進入到營養豐富而且最佳培養溫度的培養條件中。

在鑑定菌種時，將每個從培養基初步分離的代表性菌落，如上述方法在固態培養基上劃線培養出單一菌落 (monoclonal colonies) 後，第一個步驟是要確定其革蘭氏染色反應 (Gram reaction)、細胞形態學及臨床生化反應；此步驟對於微生物表現型的鑑定是非常關鍵的，如果在這個步驟對分離菌株特徵判斷錯誤，在接下來的測試可能就會因為選擇了錯誤的微生物鑑定套組 (identification kit)，而導致錯誤的結果。下面描述幾種常見的初步篩選方法。

1. 革蘭氏染色 (Gram Staining)

革蘭氏染色法包括四個步驟：結晶紫 (crystal violet) (初染)、碘 (媒染劑, mordant)、乙醇 (脫色劑) 以及番紅 (safranin) (複染劑, counterstain)；而三步驟法中，係將脫色步驟與複染步驟合併。在最佳條件下，革蘭氏陽性菌會保留結晶紫染料而出現紫色，革蘭氏陰性菌則只剩下複染的番紅 (counterstain safranin) 而呈現紅色，有些細菌可能是革蘭氏可變性的 (Gram-variable)。使用太多的脫色劑可能會導致革蘭氏結果偽陰性，而使用不夠的脫色劑可能會產生革蘭氏結果偽陽性；因此，在任何情況下，實驗中都應該包含革蘭氏陽性與革蘭氏陰性的對照菌，以識別染色過程的誤差。此外，因為革蘭氏染色反應必須在顯微鏡下檢視，所以可以同時確定細胞形態。

2. 孢子染色 (Spore Staining)

細菌的孢子可以使用孔雀綠 (malachite green) 染色。實驗中應該包括陽性對照菌，以識別孢子染色過程的誤差。

3. 生化篩選 (Biochemical Screening)

重要的生化篩選試驗包括：

氧化酶試驗 (oxidase test)：可將革蘭氏陰性桿菌分為非醱酵菌 (nonfermenters, 氧化酶陽性) 與腸道菌 (氧化酶陰性)。

觸酶試驗 (catalase test)：可將葡萄球菌 (觸酶陽性) 自鏈球菌 (觸酶陰性) 中分離。

凝固酶試驗 (coagulase test)：可將葡萄球菌分為凝固酶陰性 (可據以推定為非致病性) 與凝固酶陽性 (較可能是致病性)。

對於製造環境中生物負荷菌 (bioburden) 調查與例行檢查之結果，這些試驗可以提供充分的資訊以持續評估。但是，當遇到需要深入評估的情況時，鑑定到屬 (genus)、種 (species) 或株 (strain) 的等級，則可進一步了解環境生物負荷菌的本質與來源。而且，微生物鑑定到種甚至到株的等級，可能是評估及減輕微生物污染的風險關鍵要素。

四、表現型微生物鑑定法

表現型微生物鑑定法通常需要相當大量來自單一菌株的菌落。用於微生物計數與鑑定的培養與繁殖方法，常常會受培養時間以及環境中許多微生物不能用一般微生物培養基培養的限制。另外，剛繼代 (subculture) 的微生物，也可能因為處在壓力環境下而沒有表現其完整的表現型特性 (phenotypic properties)。

然而，根據碳利用 (carbon utilization) 與生化反應的方法，或是氣-液層析得到的脂肪酸型態 (fatty acid profiles)，以及利用 MALDI-TOF 質譜法 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-Time-of-Fight mass spectrometry) 獲得之全細胞組成情形 (whole-cell composition) 等實驗，都是利用以鑑別為目的而培養出的菌株進行之，因此，為獲得一致的鑑定結果，有賴依循規定的培養基與培養條件。

表現型微生物鑑定法已成功地運用於食品、水、臨床與藥物微生物檢測實驗室中，並使微生物學家能據以做出有關產品風險的決策，並且了解環境中微生物棲息菌群 (microflora) 的改變。在許多品質管制調查中，表現型微生物鑑別法已足使科學家執行徹底的調查，並視需要提出適當的改正方案。

五、基因型微生物鑑定法

理論上，基因型微生物鑑定法是較為可靠的，因為大多數微生物品種的核酸序列具有高度不變的特性 (highly conserved)。常用的基因型鑑定法包括 DNA-DNA 雜交、聚合酶鏈鎖反應 (PCR)、16S 與 23S rRNA 排序、多位基因座序列分析法 (multilocus sequence typing, MLST)、焦磷酸定序 (pyrosequencing)、DNA 探針與核糖體基因分型分析 (analytical ribotyping)；但是這些方法在操作上對藥物微生物學家而言較具有挑戰性的。

表 2 可被測定的基因型特徵 (Genotypic Characteristics)。

表 2. 在微生物分類學上可以使用的基因型/種系發生的特徵 (Genotypic/Phylogenetic Characteristics That Can Be Employed in Microbial Taxonomy)	
類別	特徵

基因型 (Genotypic)	DNA 鹼基比 (G+C 含量)、限制片段模式與 DNA 探針
種系發生 (Phylogenetic)	DNA-DNA 雜交 (hybridization), 及 16S 與 23S rRNA 密碼子序列 (codon sequences)

由於基因型微生物鑑定法需要較昂貴的分析設備與耗材，所以這些分析常常是交由受託實驗室、政府實驗室、大學、研究機構或產業公司內部的專業實驗室來執行；因此，基因型微生物鑑定法大多限於重大的微生物調查中使用，例如：產品不合格之調查。此外，當調查過程中需要鑑定到菌株的等級 (strain-level identification) 時，分析人員必須確保方法是適當的。

與微生物鑑定相反，以核酸為基礎的方法可以用於篩選出特定的微生物，其相關的步驟為檢品採集、核酸萃取、標的序列放大 (target amplification)、雜交 (hybridization) 與檢測。放大死菌 DNA 的問題也已經能被克服，即使用反轉錄 (reverse transcription) 的方式，將 rRNA 轉換成 DNA，再進行聚合酶鏈鎖反應 (Polymerase Chain Reaction)；此方法須考慮之問題包括微生物變種的偵測、檢測極限、基質效應、陽性閥值確認 (positive cutoff verification)、儀器與系統的殘留物 (carry-over)、診斷的準確性及可再現性。

六、結語

微生物鑑定是微生物管制實驗室的重心，雖然美國藥典中，產品或環境污染相關的微生物鑑定試驗至今仍採用傳統方法，但是，由於科技的發展已經證明結合傳統技術的新技術有助於微生物鑑定的正確性，進而有利於找出污染源並採取有效的污染防範措施。因此，從事微生物鑑定的品質管制實驗室，對於微生物鑑定的新趨勢也有瞭解的必要。美國藥典納入的這一篇新專章，正是業界想瞭解這個新趨勢，而值得參考的重要官方資訊。

參考資料：

USP <1113> Microbial Characterization, Identification, and Strain Typing

《法規公告》

1. 行政院衛生署食品藥物管理局 100 年 7 月 4 日 FDA 風字第 1001100836 號函
主旨：為配合行政院阻斷偽劣假藥源頭策略，請轉知所屬會員，確實依說明段辦理，請 查照。

說明：

- 一、查本局 99 年 11 月 17 日 FDA 藥字第 0991414734 號函略以：「依藥事法第 16 條第 2 項規定，藥品製造業者輸入自用原料時，應於每次進口之前向中央衛生主管機關申請核准，始得進口；已進口之自用原料，非經中央衛生主管機關核准，不得轉售或轉讓。……」先予敘明。

- 二、本局自 99 年 11 月起，查核國內藥廠自用原料使用情形，發現部分藥廠申請進口之數量與入庫數量不符、未經核准轉售（讓）或先行挪用等情事。
- 三、為確保國人用藥安全，有效管理自用原料之使用，杜絕非法流入偽劣假藥之製造，凡經查獲自用原料使用異常者，將依違反藥事法第 16 條第 2 項規定，處新臺幣三萬元以上十五萬元以下罰鍰；且若製造廠無法提出合理之使用說明，亦將依嚴重違反 GMP 相關規定處辦。
2. 行政院衛生署、經濟部 100 年 7 月 6 日署授食字第 1001100780 號、經工字第 10004604010 號令
修正「藥物製造業者檢查辦法」部分條文。
附修正「藥物製造業者檢查辦法」部分條文
（檔案下載 http://www.fda.gov.tw/people_laws.aspx?peoplelawssn=1363&classifysn=68）
3. 行政院衛生署 100 年 7 月 11 日署授食字第 1001100624 號公告
主旨：預告修正「西藥及醫療器材查驗登記審查費收費標準」第二條、第三條草案。
依據：行政程序法第一百五十一條第二項準用第一百五十四條第一項。
公告事項：
一、修正機關：行政院衛生署。
二、修正依據：藥事法第一百零四條之二第二項。
三、「西藥及醫療器材查驗登記審查費收費標準」第二條、第三條修正草案如附件。本案另載於本署網站（<http://www.doh.gov.tw/法令規章>衛生法令查詢系統>法規草案>），及本署食品藥物管理局網站（<http://www.fda.gov.tw/公告資訊>本局公告>）。
四、對公告內容如有意見或疑問，請於本公告刊登公報次日起 10 日內陳述意見或洽詢，逾期視同無意見。
（一）承辦單位：行政院衛生署食品藥物管理局
（二）地址：11561 臺北市南港區昆陽街 161-2 號
（三）電話：(02)27877137
（四）電子郵件：1726cc@fda.gov.tw
附件：「西藥及醫療器材查驗登記審查費收費標準」第二條、第三條修正草案（含其總說明及條文對照表）
（檔案下載 http://www.fda.gov.tw/people_laws.aspx?peoplelawssn=1368&classifysn=68）
4. 行政院衛生署 100 年 7 月 20 日署授食字第 1001101204 號函
主旨：有關藥物製造工廠於原核定廠區外，另設立倉庫儲存原物料、半製品及最終成品等應遵循之事項，請轉知所屬會員知照，請查照。
說明：

- 一、依據藥事法第 27 條後段規定，藥商登記事項如有變更時，應辦理變更登記。其管制目的，係透過登記使主管機關得以對藥商進行相關管理與稽查。
- 二、另，依藥物製造工廠設廠標準第 4 條第 1 項第 4 款規定，設置原料、物料、半製品及最終產品等倉庫，屬於藥物製造工廠所應具備之基本條件及共同設備。此外，依據 PIC/S GMP 第三章規定，有關原物料、半製品及最終產品之儲存區域，無論於廠內或於廠外另設倉庫儲存，皆應符合 GMP 之規定。
- 三、綜上，藥物製造工廠若於原核定廠區外另設倉庫儲存原物料、半製品及最終產品，屬於應符合 GMP 規範且為應受管理及稽查之範圍，應依規定主動向相關主管機關申請變更登記，經實地查核通過後，始准於從事 GMP 相關作業。

《活動訊息》

1. 本局訂於 100 年 9 月 5 及 6 日分別於臺大校友會館及中國文化大學推廣教育部台中教育中心辦理 2011「藥廠 GMP QMS 研習營－供應商評估與管理」(藥事人員繼續教育積點 7.2 點)，意者洽社團法人台灣藥物品質協會報名，線上報名 <http://www.tpqri.org.tw>，聯絡人林聖文，電話(02)87928550 或 (02)87923100 分機 19145，電子郵件信箱 swlin@mail.tpqri.org.tw。
2. 本局訂於 100 年 9 月 13 日於集思台大會議中心柏拉圖廳辦理「無菌藥品 GMP 研習營(二)」(藥事人員繼續教育積點 3.2 點)，意者洽社團法人中華無菌製劑協會報名，電話(02)25509301，或線上報名 <http://www.pdatc.org.tw>。
3. 本局訂於 100 年 9 月 21 及 22 日分別於中國文化大學推管教育部高雄分部及集思台大會議中心阿基米德廳辦理「醫用氣體 GMP 品質論壇(二)」(藥事人員繼續教育學分 3.2 小時)，意者洽社團法人中華無菌製劑協會報名，電話(02)25509301，或線上報名 <http://www.pdatc.org.tw>。
4. 本局訂於 100 年 10 月 4 及 6 日分別於國立成功大學國際會議廳及台灣大學凝態科學中心暨物理學館國際會議廳辦理「GMP 無菌作業技術論壇(三)」(藥事人員繼續教育學分 3.2 小時)，意者洽社團法人中華無菌製劑協會報名，電話(02)25509301 或 pdatc@ms17.hinet.net，或線上報名 <http://www.pdatc.org.tw>。
5. 本局委託社團法人中華無菌製劑協會辦理「無菌藥品 GMP 研習營(一)」(藥事人員繼續教育積點 2.4 點)，於 100 年 6 月 16 日圓滿落幕，與會總人數 56 人。
6. 本局委託社團法人台灣藥物品質協會辦理 2011「藥廠 GMP QMS 研習營」(藥事人員繼續教育積點 8.6 點)，北區及中區各於 100 年 6 月 23 及 24 日圓滿落幕，與會總人數 183 人。

7. 本局委託社團法人中華無菌製劑協會辦理「GMP 無菌作業技術論壇(二)」(藥事人員繼續教育積點 3.2 點), 南區及北區各於 100 年 7 月 14 及 18 日圓滿落幕, 與會總人數 214 人。

《業者交流》

1. 有關台灣區製藥工業同業公會 100 年 5 月 3 日區藥企字第 106 號函建議衛生署核發之 GMP Certificate 不加註有效期限乙案, 衛生署 100 年 6 月 20 日署授食字第 1001100933 號函復如下:
 - 一、GMP 檢查之目的在於確保製造業者能持續穩定的產製出符合既定規格與品質的產品, 以保護消費者用藥安全。藥物製造業者通過 GMP 一次檢查後, 並不能保證永久符合 GMP 標準, 每次的 GMP 檢查僅能代表藥廠在某段時間內 GMP 之維持狀態, 因此, 世界各國對於藥物製造業者之管理, 均透過定期之後續檢查機制, 以確保藥物之品質與安全。依據藥物製造業者檢查辦法第八條之規定, 國產藥品製造業者以每 2 年檢查 1 次為原則。
 - 二、目前 GMP Certificate 明列有效期限, 係參考各國 GMP Certificate 核發內容之慣例及 PIC/S 國際組織規定其會員核發製造證明書內容基本要求之作法, 以確保 GMP 狀態之維持。
2. 有關台灣區製藥工業同業公會 100 年 6 月 20 日區藥會字第 202 號函建請本局重新考量有關原料藥廠 3 年未生產之 GMP 品項認定問題乙案, 本局 100 年 7 月 8 日 FDA 風字第 1000039553 號函復如下:
 - 一、對於藥品製造進行 GMP 檢查之目的在於確保製造業者能持續穩定的產製出符合既定規格與品質的產品。藥品製造業者通過 GMP 一次檢查後, 並不能保證永久符合 GMP 標準, 每次的 GMP 檢查僅能代表藥廠在某段時間內 GMP 之維持狀態, 因此, 世界各國對於藥物製造業者之管理, 均透過定期之後續檢查機制, 以確保藥品之品質與安全。
 - 二、考量原料藥廠 GMP 之推動現行係採自由認證及鼓勵措施, 針對多年未生產之 GMP 品項之後續處理如下:
 - (一) 針對 3 年未生產之 GMP 品項, 因該品項未能於後續查核時確認其符合 GMP 規範之狀態, 故暫不核發 GMP Certificate; 若廠商需要 GMP Certificate 時, 則至少須實際生產一批產品並經本局查核通過後核發。
 - (二) 針對 5 年仍未生產之 GMP 品項, 將廢止該品項之原 GMP 核備函; 廠商未來如需恢復該 GMP 品項, 則需重新向本局申請 GMP 評鑑, 並需執行併行性之再確效作業。

GMP 電子報 第 27 期 中華民國 100 年 8 月 15 日出刊

機關名稱：行政院衛生署食品藥物管理局 電話：(02)27878000

11561 台北市南港區昆陽街 161-2 號 網址：<http://www.fda.gov.tw>

發行人：康照洲

召集人：陳惠芳

總編輯：李明鑫 黃琴曉 陳映樺

編輯：林忠義 周慧琴 洪鼎超 黃文譽（依姓氏筆劃排序）

中華民國 97 年 3 月 12 日創刊

訂閱電子報請洽 gmp@fda.gov.tw