

药品微生物限度检查中微生物污染鉴定与溯源

王春林

重庆市黔江食品药品检验所 重庆 409000

【摘要】本文结合新版药典微生物限度检查要求,对近年来我国药品微生物限度检查中微生物污染情况研究文献进行梳理,结果显示我国饮片总体微生物污染严重,总体呈现耐热菌和耐胆盐革兰阴性菌污染率高、其他控制菌检出率较低的现象。并结合前人研究成果,梳理了药品微生物污染鉴定和溯源技术,包括 API、Vitek2 Compact、FRIT、MALDI-TOF/MS、核糖体分型技术及 16 S rRNA 宏基因组高通量测序技术等,并对比研究各技术应用优势和局限性,以期为我国药品微生物限度检查中微生物污染鉴定和溯源提供依据。

【关键词】药品;微生物;限度检查;微生物污染;微生物鉴定

【中图分类号】R446.5 **【文献标识码】**A **【文章编号】**2096-1685(2021)37-0046-02

在微生物限度检查中,由于微生物在自然环境中广泛存在,并可能随检验人员、器材、包装容器等进入检验环境中,可能造成微生物限度检查中出现微生物污染问题,影响药品微生物限度检查结果准确性,进而影响药品安全。因此,新版药典中对微生物限度检查试验环境提出了更高的要求^[1],并明确微生物限度检查应核实影响因素,确保 OOS 溯源调查可追溯至试验操作各环节、各步骤,以此提高药品微生物限度检查结果再现性,防范和控制药品微生物限度检查质量风险,为药品质量监管体系建设提供可靠依据。随着我国药品微生物限度检查标准日益完善,药品微生物限度检查研究不断深入,现将微生物污染鉴定和溯源研究成果进行梳理和总结。

1 药品微生物限度检查中微生物污染现状研究

《中国药典》(2015 年版)仅规定了耐胆盐革兰阴性菌限度标准和不得检出沙门菌、大肠埃希菌等要求^[2],但外源性微生物污染问题可能对药品质量安全造成不良影响。我国专家学者对药品微生物限度检查中微生物污染问题进行了深入的研究。陈伟盛等人^[3]通过对中药饮片微生物污染问题进行研究,依据《中国药典》(2015 年版)中 TAMC 和 TYMC 指标对饮片微生物污染总体情况进行研究,指出我国饮片微生物总体污染水平高,且不同品种饮片微生物污染情况存在较大差异,并指出饮片微生物污染程度受饮片炮制工艺影响显著。

控制菌限度污染情况研究中,绳金房、杨晓莉等人^[4]通过对陕西省中药因饮片进行控制菌污染研究发现,饮片中检出最多的控制菌为大肠埃希菌、铜绿假单细菌、伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌,未见溶血性链球菌、白色念珠菌等污染物。

由此可见,我国药品质量受微生物污染问题严重,耐热菌及耐胆盐革兰阴性菌污染率高,控制菌检出率相对偏低。

2 药品微生物限度检查中微生物污染鉴定研究

根据《中国药典》微生物限度检查流程,微生物污染鉴定应先分离出可疑菌株,再采用传统的细菌表型方法进行鉴定。微生物污染鉴定方法主要包括基于细菌形态生理生化反应特征的鉴定方法、基于微生物化学成分或代谢产物的鉴定方法、基于细菌遗传物质的鉴定方法等。

2.1 基于细菌形态生理生化反应特征的鉴定和溯源

当前,基于细菌形态生理生化反应特征的微生物鉴定主要采用 API 鉴定系统、Vitek 2 Compact 鉴定系统等,通过对微生物生

理、生化特征进行在数值分类鉴定,逐渐取代了手工表型鉴定方法,其中,APU 鉴定方法通过人工判读试剂颜色、浊度变化记录生化反应结果。Vitek 系统为集成化全自动微生物鉴定系统,可鉴定的细菌形态生理生化反应特征更多,系统可自动判读卡片内各孔培养基生长变化情况,基于生长动力学方式记录和判断鉴定结果。与 API 系统相比,Vitek 系统集成化程度高、效率高,有效降低了人为因素对污染物检测结果的影响。江志杰等人^[5]基于 Vitek2 Compact 系统对鳖甲中典型污染菌进行鉴定,对鳖甲中典型污染菌进行鉴定,对 23 批鳖甲中细菌数、霉菌、酵母菌数进行测定,并对大肠菌群、金黄色葡萄球菌、铜绿假单菌、沙门氏菌等控制菌进行鉴定,共计分离污染菌 68 株,革兰氏阳性菌 29 株,革兰氏阴性菌 23 株,菌种鉴定显示部分条件致病菌;杨燕等人^[6]通过对两种鉴定系统进行常见药品微生物污染鉴定进行方法学一致性评价,结果显示,API 和 Vitek 2 Compact 系统均可用于药品控制均鉴定,但在非控制菌鉴定方面鉴定结果存在一定的差异,主要体现在非控制菌种、属水平鉴定结果差异方面。API 系统对枯草芽孢杆菌鉴定结果重新性差,对啤酒酵母菌和肺炎克雷伯菌鉴定准确性、重复性较差。Vitek 2 Compact 系统对枯草芽孢杆菌鉴定重现性较差,需引起检验人员注意。

2.2 基于微生物化学成分或代谢产物的鉴定和溯源

MALDI-TOF/MS 测定方法通过检测微生物裂解物中丰度高且保守的核蛋白质谱信号,并将信号与公开的基因图谱中菌株质谱进行核对,优先匹配菌株鉴定分值和排名最高的属、种/亚种进行判定。当前,MALDI-TOF/MS 测定方法已广泛应用于食品检验检疫领域,通过检验食品中腐败真菌、厌氧菌和病原菌判定食品安全。在药品微生物限度检查中,部分学者将 MALDI-TOF/MS 测定技术用于微生物污染鉴定和溯源。甘永琦等人对通草饮片进行微生物限度检查中,基于 MALDI-TOF/MS 测定技术对紫红胆盐葡萄糖琼脂平板、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂平板和麦康凯琼脂平板上生长的可疑菌株进行初筛,系统初筛结果与药敏分析系统判定结果一致。同时,甘永琦等人基于该方法对黄芪等 7 个品种 40 批次样品进行微生物污染鉴定,共计检出菌株 23 种、菌属 4 个,检出率最高的品种为小通草、通草,检出率最低的药品为南五味子和鸡血藤,检出率最高的菌株为枯草芽孢杆菌。由此可见,MALDI-TOF/MS 测定方法在药品微生物污染鉴定和溯源中具有效率高、准确率高、耗时短、样品污染风险小等特点,在微

作者简介:王春林(1988.1—),女,土家族,大学本科,工程师,研究方向为食品药品质量安全研究。

生物污染鉴定和溯源方面具有显著应用优势。

2.3 基于细菌遗传物质分析的鉴定和溯源

基于细菌遗传物质分析的药品微生物污染鉴定和溯源方法包括核糖体分型技术和16S rRNA宏基因组高通量测序技术。核糖体分型技术是将微生物染色体DNA经限制性内切酶处理后,经琼脂糖凝胶电泳分离出片段,并将片段转印至硝化纤维素膜上,并运用标记23S、16S和5S的rRNA序列探针杂交检测,以此获得由不同分子量大小、不同数目的片段组成的指纹图谱,并基于BioNumerics数据库软件对指纹图谱进行带型识别,作为微生物污染鉴定依据。16S rRNA宏基因组高通量测序技术是基于16S rDNA扩增子高通量测序技术的检查鉴定方法。与16S rDNA技术相比,16S rRNA宏基因组高通量测序技术不需细菌培养即可实现细菌群落多样性鉴定。甘永琦等人在饮片污染耐热菌群落鉴定研究中,基于16S rRNA技术对9种复方桔梗麻黄碱糖浆进行微生物污染鉴定,对同一企业样品污染源菌株进行同源性分析,结果发现样品中存在微生物超标和污染不均匀问题,微生物污染主要为厚壁菌门、蓝菌门、变形菌门等,不同品种药品包括土壤芽孢杆菌属、甲基杆菌属、泛菌属等细菌,可为药品微生物污染鉴定和溯源提供有效依据,并可用于潜在致病菌检查,尤其适用于丰度低、传统培养方法难以分离鉴定的菌属鉴定。但因该方法测序长度有限,多种水平微生物污染检测结果准确性低,一般用于微生物属水平测序鉴定。

3 结语

药品微生物污染鉴定和溯源是药品质量安全保障的重要举措,关系到人民群众生命健康。随着我国药品微生物限度检查标准日益规范,加强药品微生物污染鉴定和溯源迫在眉睫。通过对我国饮片微生物污染研究成果进行梳理和总结,不难发现我国饮

片总体微生物污染问题严重,耐热菌和耐胆盐革兰阴性菌检出率较高,其主要原因是受栽植土壤环境和粪肥使用等因素影响。同时,在药品加工企业微生物污染检查中发现,同一企业药品存在部分药品污染严重、污染程度不一、微生物污染多样等问题,突出体现出企业药品净制不彻底、灭菌不到位等问题,要求药品生产企业、药检机构加强微生物污染鉴定和溯源,合理选用API系统、Vitek 2 Compact系统、FRIT、MALDI-TOF/MS等技术进行微生物污染鉴定和溯源,及时、快速、准确分离出致病菌,确保药品质量安全。

参考文献

- [1] 徐昕怡,许华玉,尚悦,等.《中国药典》2020年版第四部通用技术要求增修订概况[J].中国药品标准,2020,21(4):299-306.
- [2] 杨美成,山药等18种中药饮片污染微生物状况及微生物限度标准的研究.上海:上海市食品药品检验所,2015-07-14.
- [3] 陈伟盛,关倩明,朱荣峰,等.药品微生物限度检查中微生物污染的鉴定和溯源分析[J].药物分析杂志,2014,34(1):58-63.
- [4] 绳金房,陕西省中药饮片微生物污染状况调查及微生物限度标准研究.陕西:陕西省食品药品监督检验研究院,2017-04-12.
- [5] 江志杰,刘文杰,张光华,等.鳖甲中污染微生物检测、分离鉴定及耐药性分析[J].中药材,2014,37(10):1739-1742.
- [6] 杨燕,孙梦家,蒋波,等.药品无菌检查中污染微生物的鉴定与OOS调查分析[J].中国医药工业杂志,2016,47(12):1559-1563.

(上接第45页)生产面临一定的困难。钟国庆等人通过对26种医院制剂进行微生物限度检查中发现,26种医院制剂中19种制剂回收率低于70%,控制菌检查中有10种试验菌不能检出,需综合运用培养基稀释法、薄膜过滤法、离心法、中和法等方法进行微生物限度检查,但医院在检验仪器投入方面不足,甚至部分医院严重缺乏微生物限度检查设备而无法开展限度检查,菌种保存质量无法得到有效保障,人员专业素质偏低,大部分限度检查以简单检验为主,导致医院制剂未经微生物限度检查投入使用,影响了制剂使用安全;马鸣晓等人通过对地市级药检所微生物限度检查情况进行调研,发现地市级药检所开展无菌和微生物限度检查工作的不多,导致“无菌”和“微生物限度”检查形同虚设,并形成了药品监管盲区,其原因在于微生物方法学验证工作量大、不同药检所方法欠佳,重复劳动过多等问题。结合笔者药检工作经验,发现药品生产厂家微生物限度检查中,大型企业检查检验相对规范,而中小型药企则相对薄弱,对药典中规范要求和限度检查标准理解不到位,进而出现验证项目不全、试验设计不合理、试验过程操作不当等问题。

4 结语

新时代背景下,随着《中国药典》日益完善,实现了我国抑菌性药品检查检验与国际通用标准接轨,有利于从微生物方面把关和控制药品质量,提高药品生产和流通环节的安全性。为提高药品微生物限度检查质量,药品生产企业、药检机构、医院应根据药

典要求配备专职人员、专用设备,制定符合药典要求的药品微生物限度检查制度,促进药品微生物限度检查要求落实到位。

参考文献

- [1] 洪小栩,许华玉,尚悦,等.2015年版《中国药典》四部增修订概况[J].中国药学杂志,2015,50(20):1782-1786.
- [2] 兰茜,李萍.清湿热止痒洗液微生物限度检查方法的验证[J].食品与药品,2015,17(5):342-346.
- [3] 李珏.药品微生物实验室计数培养基的质量控制[C].中国药理学学会.2010年度全国医药学术论文交流会暨临床药学与药学服务研究进展培训班论文集,2010:162.
- [4] 李霞,周剑,刘理,等.2005年版中国药典微生物限度检查法验证试验中加菌时间的探讨[J].药物分析杂志,2009,29(2):288-291.
- [5] 刘绪平,张文婷,易路遥,等.肠炎宁片2015年版药典微生物限度检查法验证与评价[J].中国药师,2017,20(5):946-948.
- [6] 刘广文,苑艳飞.养肝解毒丸微生物限度检查法的验证实验[J].中国医药科学,2016,6(13):54-57,129.
- [7] 李超美.全省9个地市药检所对中成药香莲丸微生物限度检查结果的研讨[J].海峡药学,2010,22(12):78-80.
- [8] 李佩蓉,范秋汝.药品微生物限度检验的误差影响因素[J].北方药学,2011,8(3):81,119.