

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.23.019

环境微生物数据库的建立及在溯源分析中的应用*

赵丽元, 丁红雨, 高洪霞, 张敬武, 张兴哲

(辽宁省大连市检验检测认证技术服务中心, 辽宁 大连 116021)

摘要:目的 建立无菌药品生产企业环境微生物数据库,为企业污染事件的溯源分析提供支撑。方法 通过16srRNA序列建立企业环境微生物数据库,利用数据库及核糖体分型等技术将污染微生物溯源至菌株水平,为生产出现的污染事件进行溯源分析。结果 通过环境微生物数据库和核糖体分型技术成功找到了污染源。结论 无菌药品生产企业环境微生物数据库的建立及核糖体分型技术为污染调查溯源分析起到了重要技术支持。

关键词: 无菌药品;环境微生物数据库;溯源分析;核糖体分型

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)23-0084-05

Construction of Environmental Microbial Database and Its Application in Traceability Analysis

ZHAO Liyuan, DING Hongyu, GAO Hongxia, ZHANG Jingwu, ZHANG Xingzhe

(Dalian Inspection, Testing and Certification Technical Service Center, Dalian, Liaoning, China 116021)

Abstract: Objective To construct an environmental microbial database of sterile drug manufacturers, and to provide a support for the traceability analysis of pollution events in manufacturers. **Methods** The environmental microbial database of manufacturers was constructed by the 16srRNA sequence, and the microorganisms were traced to the microbial strain by the database and ribotyping to conduct the traceability analysis for the pollution events in the production of drugs. **Results** The pollution source was successfully found out by the environmental microbial database and ribotyping. **Conclusion** The construction of environmental microbial database and ribotyping of sterile drug manufacturers provide an important support in the traceability analysis of pollution investigation.

Key words: sterile drug; environmental microbial database; traceability analysis; ribotyping

*基金项目:2018年辽宁省科学技术计划项目[20180551053]。

第一作者:赵丽元,女,硕士研究生,主任药师,研究方向为微生物检验,(电子信箱)38949340@qq.com。

复康丸HPLC分析结果的影响,综合分析色谱峰的数量、峰形分离效果,最终确定2.1项下色谱条件作为肝复康丸HPLC叠加指纹图谱的分析条件。

3.3 方法评价

建立的HPLC指纹图谱操作简单、准确、重复性好,与PLS-DA技术结合,可为肝复康丸的质量标准提升提供参考。

参考文献

- [1] WS₃-B-1146-92, 中华人民共和国卫生部药品标准 中药成方制剂(第七册)[S].
- [2] 林远凤, 黄燕萍. HPLC法同时测定肝复康丸中五味子醇甲等4种成分的含量[J]. 中国药师, 2012, 15(11): 1588-1590.
- [3] 陈庆伟, 陈志桃. 肝复康丸质量标准研究[J]. 中国药业, 2009, 18(3): 17-18.
- [4] 杨方良, 张晶, 孙国祥, 等. 中药组方指纹图谱研究方法和思路[J]. 色谱, 2016, 34(7): 715-725.
- [5] 张艳欣, 吴佩颖, 王丹丹. 中药指纹图谱中常用的数理统计方法[J]. 上海医药, 2019, 40(9): 74-77.
- [6] 李丹阳, 孙捷, 居永慧, 等. 模式识别结合多指标成分定性及定量分析3个主产区紫苏叶特征成分[J]. 中草药, 2020, 51(8): 2207-2213.
- [7] 吴琦, 王秋实, 陈乃江. 护肝宁制剂HPLC指纹图谱及化学模式识别研究[J]. 中国药师, 2020, 23(2): 273-276.
- [8] 占永良, 徐盛仙, 程志娟, 等. HPLC同时检测参芪五味子片中5种木脂素类成分含量[J]. 中药材, 2018, 41(5): 1148-1150.
- [9] 方红玫, 周秋亚. HPLC-DAD法同时测定小蓟配方颗粒中5种活性成分的含量[J]. 中国药师, 2018, 21(6): 1125-1128.
- [10] 刘源, 丁广军, 马灵珍. HPLC同时测定蜂糖宁胶囊中5种活性成分的含量及聚类分析[J]. 药品评价, 2020, 17(17): 17-21.
- [11] 邹妍, 鄢海燕. 基于PCA及PLS-DA算法分析决明子炒制前后化学成分的变化[J]. 中国医院药学杂志, 2018, 38(19): 2027-2030.
- [12] 艾阳文, 李维亮, 辛华雯. 中药五味子治疗药物性肝损伤的研究进展[J]. 中国药师, 2018, 21(3): 477-480.
- [13] 任海风, 王世华. 五味子药理作用研究进展[J]. 中国医院用药评价与分析, 2018, 18(8): 1151-1152.
- [14] 宋叶, 林东, 梅全喜, 等. 太子参化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国药师, 2019, 22(8): 1506-1510.
- [15] 龙全江, 王晓阁, 徐雪琴. 安徽与其它主产区地产太子参药材中太子参环肽B的含量比较研究[J]. 现代中药研究与实践, 2016, 30(3): 55-57.
- [16] 邹香妮, 闫珺. 白花蛇舌草抗肿瘤化学成分及作用机制研究进展[J]. 化学工程师, 2020, 34(3): 47-49.
- [17] 许虎, 葛建华, 朱琳, 等. 白花蛇舌草质量标准研究[J]. 海峡药学, 2020, 32(10): 45-49.
- [18] 王会品, 王金梅. UPLC-PDA同时测定肝复康丸中10个成分含量及主成分分析[J]. 中国现代中药, 2021, 23(6): 1081-1089.

(收稿日期:2021-12-14;修回日期:2022-05-23)

在无菌药品的生产中,环境监控是评估生产环境微生物污染情况的重要手段,我国《药品生产质量管理规范》(GMP)^[1]及美国 GMP^[2]中均有明确要求。环境监控数据中的微生物数据,不仅要关注数量,更应关注其种类和特点,即对环境监控过程中发现的污染菌进行鉴定,并根据情况选择性保存,定期对相应数据和信息进行汇总和分析,这一措施称为环境菌数据库建设^[2-3]。建设环境菌数据库,有助于建立和健全企业微生物监控方法,完善企业微生物风险评估和质量保证体系,增强微生物污染的溯源分析能力,从源头上避免微生物污染,保证药品质量^[4-9]。本研究中通过收集、鉴定一家无菌药品生产企业环境菌,建立了覆盖药品生产全过程的企业生产环境微生物数据库,形成环境微生物分布图,通过分布图全面客观地掌握生产环境。此外,利用数据库为企业成功进行了一次无菌污染事件溯源分析,供更多企业的溯源分析时借鉴。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、培养基和试剂、引物

仪器:AC2-4S1 型生物安全柜(新加坡 Esco 公司);VITEK 2 COMPACT 型全自动微生物药敏与分析系统,VITEK®MS 型 MODI-TOF 质谱仪,均购于法国梅里埃公司;BAXQ7 型全自动病原微生物快速检测系统,全自动微生物基因指纹鉴定系统均购于杜邦公司;DYCP-31CN 型琼脂糖凝胶电泳仪及成像系统(美国 Bio-Rad 公司);BD240 型生化培养箱(德国 Binder 公司)。

培养基和试剂:胰酪大豆胨琼脂培养基,沙氏葡萄糖琼脂培养基,均购于北京陆桥有限公司;裂解液,聚合酶链式反应(PCR)酶 Premix Taq,均购于宝生物工程(大连)有限公司。

引物:细菌用 16srRNA 通用扩增引物 27F 和 1492R,霉菌用引物 ITS1 和 ITS4,酵母菌用引物 D1 和 D2 进行测序,均购于生工生物工程(上海)股份有限公司。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Tab. 1 Sequences of the primers

引物	序列
27F	5'AGAGTTTGATCMTGGCTCAG3'
1492R	5'GGTTACCTGTGTTACGACTT3'
ITS1	5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3'
ITS4	5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3'
D1	5'GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3'
D2	5'GCTCCGTGTTTCAAGACGG3'

1.2 方法

环境微生物监控:与企业共同制订环境监控方案,监测项目包括原辅料、包装材料、环境监测、人员、制药用水、表面消毒、除菌过滤膜、质量控制实验室 8 个方

面,基本覆盖了生产和检验的全过程,历时 10 个月,监测频率以生产情况和已往的风险评估数据为准。

微生物鉴定:将收集到的微生物分离培养、纯化后进行鉴定,同时用 20% 甘油保存菌种,作为环境微生物菌种实物库。鉴定以分子水平鉴定为主,如有疑问可以生化鉴定为补充。1)菌体裂解。取 1 接种环或枪头尖接种入 50 μL 裂解液中,80 ℃裂解 15 min(真菌需裂解 45 min),离心(转速为 3 000 r/min)2 min,取上清液,作为 PCR 模板。2)PCR 反应体系(50 μL)。模板 3 μL;Premix Taq 25 μL;上游引物 1 μL;下游引物 1 μL;双蒸水(ddH₂O)20 μL。3)PCR 条件。94 ℃预变性 10 min,94 ℃变性 1 min;55 ℃退火 1 min(真菌 58 ℃退火 1 min);72 ℃延伸 1 min,40 个循环;72 ℃再循环 5 min。4)测序。PCR 产物由生工生物工程(上海)股份有限公司以对应引物为测序引物进行一代测序。

测序结果分析:将测序结果拼接核对后,利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库进行 Blast 比分析,获得菌种的分类信息。经聚类分析比对正确后,同时得到环境微生物核酸序列库,用于分析和溯源。

2 结果与分析

2.1 环境微生物分布图建立

生产车间 B 级、C 级、D 级环境共 31 个房间和走廊中,共收集并鉴定到 24 个种属的 171 株微生物。生产车间 A 级环境控制良好,未收集到微生物。其中,葡萄球菌属和微球菌属是监控到的主要菌属,每个级别环境微生物鉴定结果见表 2。可见,尽管 B 级环境微生物很少,但 B 级环境与无菌生产的 A 级环境较接近,应高度重视 B 级环境出现菌。C 级环境中葡萄球菌属占比很高,几乎每个房间均含有;D 级环境也以葡萄球菌属(38.89%)、微球菌属(24.60%)为主,主要污染微生物还是人员污染菌,并以走廊、清洗室、烘干室及男女更衣室的种类较多。D 级环境中 126 株微生物分布图见图 1。

2.2 溯源分析

企业中试试验无菌检查样品中发现了阳性样品,经过 16srRNA 分离鉴定为蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* strain(菌种编号为 2019085,2019088),与环境库中找到的 7 株蜡样芽孢杆菌 *Bacillus cereus* strain(来源见表 3)进行菌株水平的鉴定,以找到真正的污染源。

由于 16srRNA 测序分析无法将蜡样芽孢杆菌分析到菌株水平,因此采用核糖体分型技术进行溯源分析。选用 2 种限制性内切酶进行酶切,分型结果见图 2。可见,用 *Eco*R I 酶切后,9 株菌聚类分析图谱很相近,基本都在 0.95 以上,故此酶无法将这些污染微生物进行溯源分析,区分能力有限;用 *Pvu* II 酶切,9 株菌可被较好地聚类,样品污染菌 2019085 和 2019088 与数据库中的

表 2 生产车间环境监控微生物鉴定结果 (n = 171)

Tab. 2 Results of environmental microorganism identification in a workshop (n = 171)

等级	微生物种类	数量 (株)	占比 (%)	累计占比 (%)	等级	微生物种类	数量 (株)	占比 (%)	累计占比 (%)
B 级	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	7	70.00	10(5.85)	C 级	库克菌属 <i>Kocuria</i> sp.	3	2.38	
	芽孢菌属 <i>Bacillus</i> sp.	1	10.00			莫拉克斯氏菌属 <i>Moraxella</i> sp.	3	2.38	
	皮氏罗尔斯氏菌 <i>Ralstonia pickettii</i> strain	2	20.00			棒状杆菌 <i>Corynebacterium</i>	2	1.59	
C 级	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	18	51.43	35(20.47)		微杆菌 <i>Microbacterium</i>	2	1.59	
	微球菌属 <i>Micrococcus</i> sp.	9	25.71			苍白杆菌 <i>Ochrobactrum</i>	1	0.79	
	芽孢菌属 <i>Bacillus</i> sp.	4	11.43			红环菌 <i>Rhodocyclaceae</i>	1	0.79	
	库克菌属 <i>Kocuria</i> sp.	1	2.86			罗斯氏菌属 <i>Rothia</i> sp.	1	0.79	
	短赖氨酸杆菌 <i>Lysinibacillus</i>	1	2.86			沙雷氏菌属 <i>Serratia</i> sp.	1	0.79	
	玫瑰单胞菌 <i>Roseomonas</i>	1	2.86			鞘脂菌属 <i>Sphingobium</i> sp.	1	0.79	
	莫拉克斯氏菌属 <i>Moraxella</i> sp.	1	2.86			寡养单胞菌 <i>Stenotrophomonas</i>	1	0.79	
	葡萄球菌属 <i>Staphylococcus</i> sp.	49	38.89	126(73.68)		产吡啶金黄杆菌 <i>Chryseobacterium</i>	1	0.79	
	微球菌属 <i>Micrococcus</i> sp.	31	24.60			毛单胞菌属 <i>Comamonas</i> sp.	1	0.79	
D 级	芽孢菌属 <i>Bacillus</i> sp.	8	6.35			γ 变形杆菌 <i>Gammaproteobacteria</i>	1	0.79	
	不动杆菌属 <i>Acinetobacter</i> sp.	8	6.35			草螺菌属 <i>Herbaspirillum</i>	1	0.79	
	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i> sp.	5	3.97			黑曲霉 <i>Aspergillus</i>	1	0.79	
	短波单胞菌属 <i>Brevundimonas</i> sp.	4	3.17						

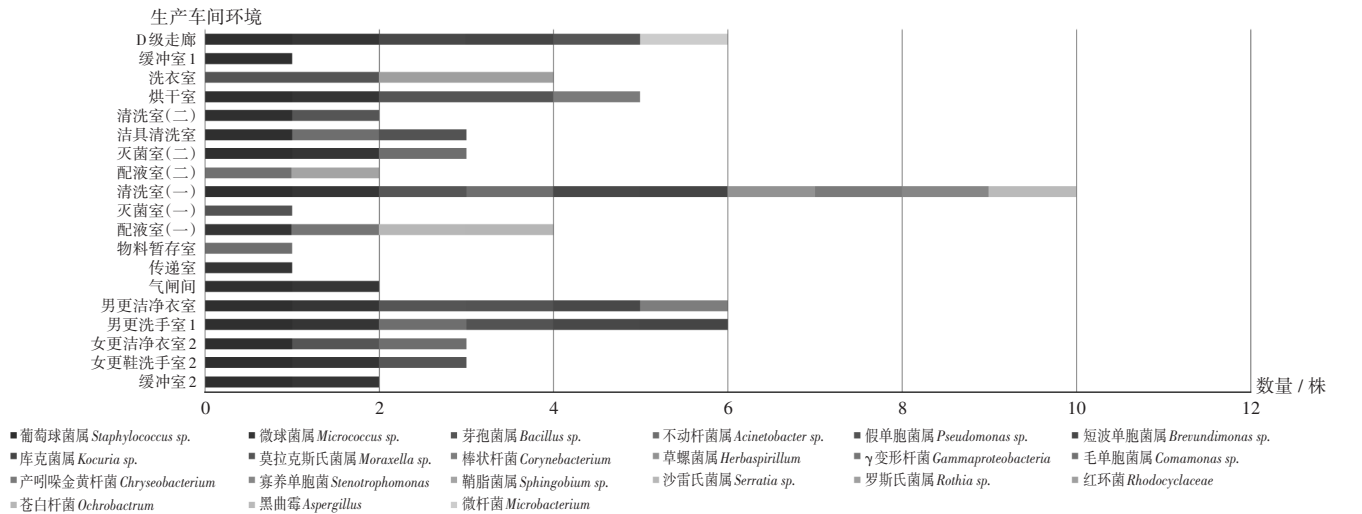


图 1 生产车间 D 级环境不同区域微生物分布图

Fig. 1 Microbial distribution in different areas of level - D environment in a workshop

表 3 环境中蜡样芽孢杆菌的来源

Tab. 3 Sources of *Bacillus cereus* strain in the environment

菌种编号	具体位置	菌种鉴定结果
2019235	纯化水罐口	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019261	生产区 B 级脱无菌衣室	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019494	生产区 C 级脱无菌衣室	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019322	原料	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019054	质量控制实验室	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019291	质量控制实验室阳性间	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain
2019357	原料	蜡样芽孢杆菌 <i>Bacillus cereus</i> strain

环境菌 2019261 和 2019291 聚类到一起,基本达到 0.95 的遗传距离,可认为带型一致,而其他菌的相似度低于

0.7,应不是同源。故样品污染菌与环境菌 2019261 和 2019291 亲缘关系较近,中试样品中的污染微生物很可能来源于生产区 B 级脱无菌衣室(2019261)或质量控制实验室阳性间(2019291)。质量控制实验室阳性间的操作是在检验结束后,而无菌试验过程全程监控未发现异常,故在质量控制实验室污染的可能性不大。在生产区 B 级脱无菌衣室发现的蜡样芽孢杆菌与产品生产非常接近,更可能为真正的污染源。

3 讨论

3.1 环境微生物数据库的建立

所建立的环境微生物数据库涵盖了生产的全过

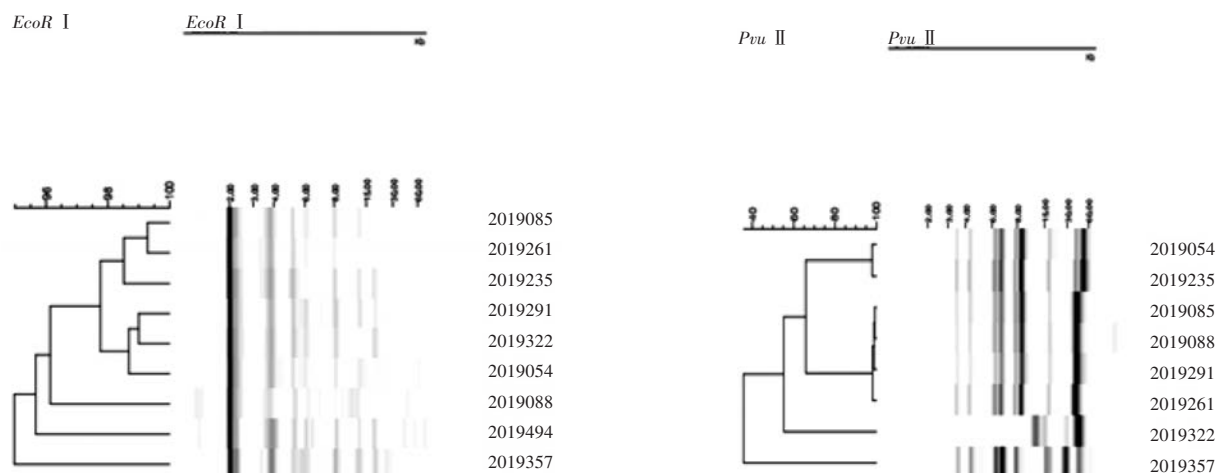


图2 蜡样芽孢杆菌 *EcoR* I 和 *Pvu* II 酶切核糖体分型结果

Fig. 2 Results of ribotyping of *Bacillus cereus* strain by *EcoR* I and *Pvu* II

程。生产区是核心部分,主要对生产区进行了考察,其中葡萄球菌属是主要的污染菌,B级、C级、D级分别占70.00%,51.43%,38.89%。可见,人员污染是环境污染的主要原因,与文献[5-8,10]结果相似。D级环境菌种类别相对较多,可能是采样时为了扩大采集范围增加了很多表面微生物的采集,因此收集到较多种类的微生物。质量控制实验室的监控主要为污染调查时应用,当出现污染事件时,要排除试验误差,客观掌握无菌环境中的微生物,才能很好地判定试验结果。

3.2 溯源分析方法

环境微生物数据库的主要作用之一是用于溯源分析,当出现污染或有可疑结果时,可通过数据库对可疑菌进行查询。环境微生物数据库一般是以基因库16srRNA序列库为基础,结果的准确性全依靠16srRNA的准确性,受16srRNA的局限性影响,部分菌种只能将菌鉴定属水平,无法进一步分析。对于环境微生物中风险不是很高的区域的微生物,鉴定到属水平可满足相关的监管需求^[1-2]。当需要进行溯源分析时,再将污染微生物从菌种保藏管中取出,采用其他适宜的方法进行菌株水平鉴定^[11-15],如核糖体分型、多位点序列分型(MLST)、脉冲场电泳、看家基因和全基因组测序等。每种溯源分析方法针对不同的菌属均有不同优势,需通过实验具体分析。本研究中采用核糖分型方法对蜡样芽孢菌进行溯源分析,以及不同酶进行酶切,结果差异大。因此,溯源分析的实验人员须具有一定的经验和技巧。

3.3 风险评估

环境监控需要更多考虑到风险评估风险调查的数据,以及潜在的风险区域。本研究中D级应当是个相对风险较低的区域,如果D级区有A级层流,就应加强重视,D级区的菌是否可通过屏障带入A级区域就需进行一定的风险调查。

3.4 无菌保障

环境微生物数据库的建立在企业生产中有很多应用^[16],主要用于为企业溯源分析提供依据。药品生产工艺复杂,生产步骤多,对于无菌药品更是对环境控制要求更高,一旦出现污染事件则调查难度大。随着监管和数据完整性要求的加大,建立环境微生物数据库将成为无菌保障的重要手段,溯源分析能力将成为企业风险管理的重要能力。

参考文献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 药品生产质量管理规范(2010年修订)[EB/OL]. (2011-01-17)[2021-06-21]. http://www.gov.cn/gongbao/content/2011/content_1907093.htm.
- [2] U. S. Food and Drug Administration. Guidance for industry:sterile drug products produced by aseptic processing - current good manufacturing practice[EB/OL]. (2004-09-01)[2021-06-21]. <https://www.fda.gov/media/71026/download>.
- [3] 王似锦,余萌,王杠杠,等. 制药企业洁净区环境监控与环境菌库的建设[J]. 中国医药工业杂志,2020,51(10):1334-1340.
- [4] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药理学杂志,2015,50(20):1747-1751.
- [5] 范一灵,冯震,钟玮,等. 无菌药品生产企业核心区微生物污染调查与分析[J]. 中国药事,2014,28(6):586-590.
- [6] 刘卫德,刘绪平,熊骏,等. 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析[J]. 中国医药工业杂志,2019,50(11):1335-1340.
- [7] 江莉,王石全,陈佩,等. 疫苗分装区环境监测与质量控制分析[J]. 国际生物制品学杂志,2019,41(3):120-124.
- [8] 宋明辉,李琼琼,秦峰,等. 无菌药品生产企业过程污染微生物菌株库的建立及数据分析[J]. 药物分析杂志,2019,39(11):1954-1960.
- [9] 袁力,余萌,王似锦,等. 药品微生物实验室水系统分离37株微生物的鉴定及分析[J]. 食品与药品,2020,22(5):