

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)04-0088-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.04.021



制药用水环境分离菌用于荧光染色快检技术的专属性研究*

任凤姣^{1,2}, 王杠杠², 马仕洪^{2△}

(1. 中国药科大学, 江苏 南京 211198; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要:目的 研究制药用水环境分离菌用于荧光染色快检技术的专属性。方法 根据国内外相关法规对微生物检验替代方法验证的要求, 取伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌和水杆状菌悬液(浓度 $\leq 1\ 000\ \text{cfu}/\text{mL}$), 参考传统染色时间(3, 7, 5 d), 分别在不同培养节点染色以确定微生物最佳染色时间。实验设快检方法组(培养至最佳染色时间)、复培养组(最佳染色时间染色后培养至传统染色时间)、传统培养组(培养至传统染色时间)、阴性对照组(快检方法及传统培养), 各组染色、培养后统计菌落数, 试验平行3次, 计算快检方法与传统培养、快检方法与染色后复培养及染色后复培养与快检方法计数结果平均值的比值(分别记为平均回收率1, 2, 3), 验证荧光染色快检技术的专属性。结果 3种菌的最佳染色时间分别为26, 72, 40 h。与药典方法相比, 3种菌平均回收率均大于0.7(水杆状菌除外, 其因菌落形态特殊, 无计数结果, 故无回收率3), 符合替代方法验证要求。结论 荧光染色快检技术适用于检测制药用水中引入的伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌和水杆状菌。

关键词: 伯克霍尔德菌; 慢生根瘤菌; 水杆状菌; 荧光染色法; 快检技术; 制药用水; 专属性; 回收率

Study on the Specificity of Bacteria Isolated from Pharmaceutical Water for Fluorescence Staining Rapid Detection Technology

REN Fengjiao^{1,2}, WANG Ganggang², MA Shihong²

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing, Jiangsu, China 211198; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 100050)

Abstract: Objective To study the specificity of bacteria isolated from pharmaceutical water for fluorescence staining rapid detection technology. **Methods** According to the requirements of relevant domestic and foreign regulations for the verification of alternative microbial testing methods, *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* and *Aquabacterium* (concentration $\leq 1\ 000\ \text{cfu}/\text{mL}$) suspensions were taken and stained at different culture time points based on the traditional staining times (3, 7, 5 d) to determine the optimal staining time for microorganisms. The strains were divided into the rapid detection method group (cultured to the optimal staining time), the re-culture group (cultured to the traditional staining time after the optimal staining time), the traditional culture group (cultured to the traditional staining time), and the negative control group (rapid detection method and traditional culture). After staining and cultivation, the bacterial colony was counted in each group, the ratio of average counts of rapid detection method to traditional culture, the ratio of average counts of rapid detection method to re-culture after staining, the ratio of average counts of re-culture after staining to rapid detection method were calculated (recorded as average recovery rates 1, 2, 3, respectively) to verify the specificity of fluorescence staining rapid detection technology. **Results** The optimal staining time for the three bacteria was 26, 72, 40 h, respectively. Compared with the pharmacopoeia method, the average recovery rates of the three bacteria were all greater than 0.7 (*Aquabacterium* had no recovery rate due to its special colony morphology and no counting results), which met the validation requirements of alternative methods. **Conclusion** Fluorescence staining rapid detection technology is suitable for the detection of *Burkholderia*, *Bradyrhizobium* and *Aquabacterium* introduced in pharmaceutical water.

Key words: *Burkholderia*; *Bradyrhizobium*; *Aquabacterium*; fluorescence staining method; quick detection technology; pharmaceutical water; specificity; recovery rate

制药用水是药品制造过程中用量大、使用范围广的辅料^[1]。对其中微生物的控制效果将直接影响药品的质量安全。目前, 制药用水的微生物检测必须按药典方法进行, 而药典微生物检测方法主要依赖微生物在培养基上的自然生长信号, 并进行人工判读。由于R2A培养基主要适用于缓慢生长和在低营养环境下生长的细

菌, 菌落形态较小且不易区分^[2], 且偏长(不少于5 d)的培养时间严重制约了制药用水的流通和使用^[3]。使得微生物限度检查成为制药用水质量控制中的耗时项目。

相比于传统方法, 微生物快速检测方法(RMM)具有检测速度快、灵敏度高和可自动化等优势, 可缩短产品放行时间, 并加快不合格或偏差响应速度, 从而加强

*基金项目: 国家药典委员会药品标准制修订研究课题[2022Y29]。

第一作者: 任凤姣, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为生物制药工程, (电子信箱)13848252560@163.com。

△通信作者: 马仕洪, 男, 硕士, 主任药师, 研究方向为药品质量分析与评价, (电子信箱)mash@nifdc.org.cn。

对产品质量的把控。鉴于此,本研究中采用基于生长的荧光快速微生物检测技术对微生物进行定量检测。培养一定时间后的样品使用羧基荧光素二乙酸酯(cFDA)进行染色,激发后通过荧光信号可对代谢活跃的微生物菌落直观计数,从而缩短培养时间。染色后还可继续培养直至长出菌落,为后续微生物的分析和鉴定提供可能性,满足对水系统监测的全面要求。然而,目前对此快速检测技术的验证研究普遍聚焦于药典规定的标准菌株^[4-5],仅少数研究中加入少量环境分离菌株^[6-8]。如要应用于制药用水系统的检测,仍存在代表性不足的问题,故应用时还应根据实际环境选取不同菌株进行专属性验证。为此,本研究中选取制药用水中常见且生长缓慢、耐药性强、不易计数,并分属不同菌属的3株环境分离菌株(伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌和水杆状菌)^[9-12]开展荧光染色快速检测技术的专属性研究,进一步探讨替代方法应用于制药用水实际检测的可行性。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与菌株

仪器:Milliflex® Quantum型快速微生物检测系统、MILLIFLEX PLUS型薄膜过滤集菌仪(德国Merck公司);NU-543-600S型生物安全柜(美国Nuair公司);KD-240型恒温培养箱(德国Binder公司)。

试剂:R2A琼脂培养基(美国BD公司,批号为9239322);R2A琼脂预制培养基(批号为F2KB01200)、荧光染色液(批号为F3BB87464),均购自德国Merck公司;0.9%无菌氯化钠溶液(国药集团化学试剂有限公司,批号为2203013202)。

菌株:伯克霍尔德菌(*Burkholderia*)、慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium*)、水杆状菌(*Aquabacterium*),均来自水系统环境分离,由中国食品药品检定研究院王杠杠助理研究员鉴定。

1.2 方法

1.2.1 供试液制备

分别取试验菌株的新鲜培养液,用0.9%无菌氯化钠溶液进行10倍梯度稀释,选取浓度不大于1 000 cfu/mL的菌悬液作为单菌供试液。分别取3种供试液各适量,混匀,制备每1 mL供试液中总含菌量不大于1 000 cfu的混菌供试液。

1.2.2 染色时间确认

不同微生物的生长速率不同,最佳染色时间也不同,故需在不同培养节点进行染色,以确定微生物的最佳染色时间。伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌、水杆状菌的传统培养时间分别为3,7,5 d。分别以各菌株传统培养时间的1/3为起始,伯克霍尔德菌每2 h设置1个时

间节点,慢生根瘤菌和水杆状菌每8 h设置1个时间节点。由于水杆状菌菌落较小,呈无色透明状,且紧贴薄膜,凸起不明显,在膜上无法准确计数,故采用涂布计数法进行培养。实验设快检方法组和传统培养组,具体如下。

快检方法组:在快检滤杯中加入100 mL 0.9%无菌氯化钠溶液,取100 μ L供试液,缓慢均匀地加入滤杯中,全量过滤后抽干滤膜,将滤膜贴至快检R2A琼脂预制平板上,30~35 $^{\circ}$ C培养至上述时间节点进行染色^[4]。各时间节点均独立进行实验,快检方法组与传统培养组平行加样。

传统培养组(伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌):基本同快检方法组,仅滤杯(使用传统滤杯)、平板(使用R2A琼脂平板)、培养时间(伯克霍尔德菌为3 d,慢生根瘤菌培养为7 d)不同。

传统培养组(水杆状菌):取100 μ L混匀后的供试液,置R2A琼脂平板表面,涂布均匀,30~35 $^{\circ}$ C培养至第5天计数。

分别进行单菌供试液实验及混菌供试液实验,其中混菌供试液实验中的染色时间设置以染色时间最长的菌株为准(下文同)。

1.2.3 专属性验证

实验设快检方法组、复培养组、传统培养组、阴性对照组,具体如下。

快检方法组:同1.2.2项下快检方法组,选择最佳染色时间。

复培养组:取快检方法组染色计数后的滤膜,贴至R2A琼脂平板上,30~35 $^{\circ}$ C继续培养至传统方法规定时间后计数。

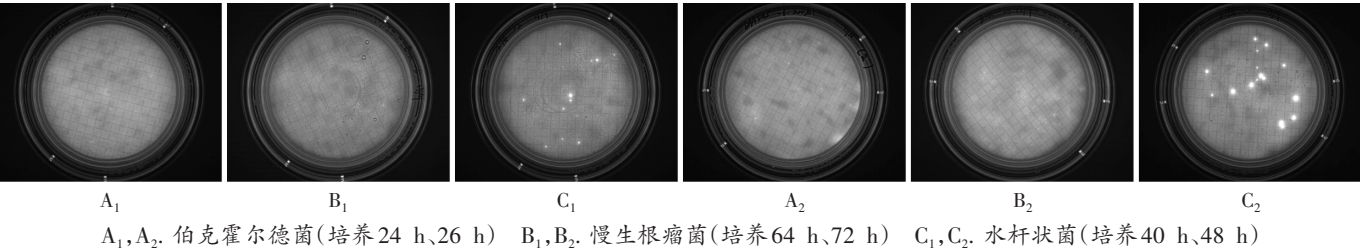
传统培养组:同1.2.2项下相应传统培养组。

阴性对照组:取快检滤杯和传统滤杯,分别加入100 μ L灭菌纯化水替代供试液,余同1.2.2项下快检方法组和传统培养组操作,共制备3个样本,分别作为快检方法组、传统培养组(伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌)及传统培养组(水杆状菌)的阴性对照。

分别进行单菌供试液实验及混菌供试液实验,其中混菌供试液实验中快检方法组、复培养组方法同1.2.2项下单菌供试液实验,传统培养组方法与传统培养组(水杆状菌)相同。每组设置3个平行。

1.2.4 数据分析

取染色至最佳时间、染色后复培养至传统染色时间和培养至传统染色时间的实验菌计数结果,分别计算回收率1、回收率2和回收率3,计算公式如下。平均回收率1=快检方法计数结果平均值/传统培养计数结果平均值;平均回收率2=快检方法计数结果平均值/



A₁,A₂. *Burkholderia* (cultured for 24 h,26 h) B₁,B₂. *Bradyrhizobium* (cultured for 64 h,72 h) C₁,C₂. *Aquabacterium* (cultured for 40 h,48 h)

图 1 3 种微生物不同时间染色结果

染色后复培养计数结果平均值;平均回收率 3 = 染色后复培养计数结果平均值 / 快检方法计数结果平均值。

以平均回收率 1 评价荧光快速微生物检测技术与传统检测方法的等效性(>70% 视为与传统方法等效);以平均回收率 2 评价染色时间节点的准确性(>90% 视为染色时间节点准确);以平均回收率 3 评价染色后菌株的生长能力(>90% 视为染色不影响菌株的生长能力,可以复培养)。其中,确定最佳培养时间时考察平均回收率 1 和平均回收率 2,进行专属性试验时考察平均回收率 1 和平均回收率 3。

2 结果

2.1 最佳染色时间

伯克霍尔德菌分别培养 24 h、26 h 后,慢生根瘤菌分别培养 64 h、72 h,水杆状菌分别培养 40 h、48 h 后染色,对比荧光信号强度、回收率 1 及回收率 2,选择菌落荧光清晰,且回收率 1>70%,回收率 2>90% 的时间节点。结果已能满足要求,见图 1。最终确认快检方法组中单菌培养时间伯克霍尔德菌、慢生根瘤菌、水杆状菌分别为 26,72,40 h(混合菌液试验中取 72 h)。3 种

表 1 3 种微生物染色时间确认试验结果

Tab. 1 Results of staining time confirmation test of three microorganisms

菌株	培养时间	计数(cfu)			回收率(%)	
		快检方法	染色后复培养	传统培养	1	2
伯克霍尔德菌	24 h	25	30	33	0.76	0.83
	26 h	12	13	13	0.92	0.92
慢生根瘤菌	64 h	1	94	113	0.01	0.01
	72 h	83	91	117	0.71	0.91
水杆状菌	40 h	14	15	8	1.75	0.93
	48 h	17	17	11	1.55	1.00

微生物染色时间确认实验结果见表 1。

2.2 专属性验证

结果见表 2(A 为伯克霍尔德菌,B 为慢生根瘤菌,C 为水杆状菌,D 为混合菌;/ 为未检出)。可见,伯克霍尔德菌和慢生根瘤菌的平均回收率 1 均大于 0.7,平均回收率 3 均大于 0.9;水杆状菌和混合菌 3 次实验平均回收率 1 均大于 0.7,达到药典的替代方法验证要求。但由于水杆状菌的菌落形态特殊性,在膜上无法准确计数,因此无复培养计数结果,无法计算平均回收率 3。

表 2 专属性考察结果

Tab. 2 Results of specificity test

实验次数	供试液	快检方法计数(cfu)				染色后复培养计数(cfu)				传统培养计数(cfu)				平均回收率 1				平均回收率 3			
		A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D	A	B	C	D
第 1 次	平行 1	38	50	60	68	38	53	/	/	28	50	42	59	1.02	0.99	0.98	1.17	1.04	1.07	/	/
	平行 2	24	44	57	59	25	47	/	/	32	40	91	47								
	平行 3	22	49	77	68	24	53	/	/	22	55	65	61								
	阴性对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
第 2 次	平行 1	41	60	117	31	42	62	/	/	46	65	119	16	0.80	0.88	1.13	1.53	1.06	1.03	/	/
	平行 2	34	57	143	30	40	58	/	/	48	69	127	33								
	平行 3	34	59	153	29	34	62	/	/	42	67	118	10								
	阴性对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								
第 3 次	平行 1	50	56	104	69	53	61	/	/	54	52	115	32	0.85	0.97	0.91	1.88	1.03	1.03	/	/
	平行 2	55	54	103	45	55	52	/	/	49	56	124	34								
	平行 3	40	52	105	46	42	54	/	/	68	59	105	19								
	阴性对照	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0								

结果显示,荧光染色快检技术比药典方法的检测时间更短,且荧光信号较强,可用于3种菌株的定量检测。但对于水杆状菌和混合菌,由于复培养无法计数,实际应用中可能会给后续调查带来困难。

3 讨论

本研究中选用的是一种基于生长的荧光快速微生物检测技术,与药典方法的取样、过滤和集菌等步骤均相同,仅在培养阶段利用荧光染色观察肉眼不可见的微小菌落,读数结果可直接与药典方法比较。

现有的验证研究多选用药典规定的标准菌株,但考虑到实际污染情况,应增加制药用水系统的环境微生物进行验证。本研究中以3种制药用水环境分离菌作为目标样本,对荧光染色快速检测技术的专属性进行了验证研究。3种菌株分属不同菌属,均为革兰阴性杆菌。其中伯克霍尔德菌是近些年被广泛关注的条件致病菌^[13-14],在营养较低的水性环境中生存能力较强,且对常用的抑菌剂具有耐药性^[9-11];且伯克霍尔德菌已被明确列为不可接受微生物^[15]。慢生根瘤菌和水杆状菌是制药用水系统中多药类抗性基因的潜在宿主^[12],难以杀灭且易形成生物膜,且前者生长缓慢(传统培养需7 d),后者菌落形态特殊,在膜上无法准确计数,传统检测方法计数困难。

本研究中确定的3种菌株的最佳染色时间均仅为传统培养时间的1/3~1/2,与药典标准菌株实验结果一致^[4]。与药典方法相比,3种菌株的平均回收率1均大于0.7,达到药典的替代方法验证要求。伯克霍尔德菌和慢生根瘤菌的平均回收率3均大于0.9,染色后可复培养,适合作为微生物检测的替代方法。水杆状菌由于菌落特性较特殊,传统培养组和复培养组计数困难,肉眼不易观察,而快检方法组时间更短且荧光信号较强,更适合用荧光染色快速检测技术进行检测。

另外,混菌供试液实验中由于菌株的培养时间差距大,不同生长速度的菌落之间出现覆盖现象,且水杆状菌菌落难以观察,导致传统培养组计数结果小于快检方法组染色计数结果。平均回收率1均大于1,表明荧光染色快检技术用于该实验可满足检测要求。

企业在使用快检技术检测之前,应根据实际情况进行专属性验证,建议在验证时增加高频污染菌株。制药企业应在日常控制过程中,通过对异常情况的积累,采用微生物溯源等方式,建立专属菌株库^[16],提高企业的风险控制能力。有利于在设计替代方法验证方案时确定专属性验证的菌株类型,为微生物检验替代方法的应用提供数据支持,从而降低药品微生物污染的风险^[17]。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 33-34.
- [2] 李珏, 王知坚, 郑小玲. 制药用水微生物检验方法合理性的探讨[J]. 中国现代应用药学, 2014, 31(6): 735-738.
- [3] 杨晓莉, 李辉, 绳金房. 中、美、英、欧药典制药用水微生物检查法对比研究[J]. 西北药学杂志, 2013, 28(5): 515-517.
- [4] 李培珏, 侯晨晔, 李勇, 等. 荧光快检法用于工艺用水微生物检测的研究[J]. 工业微生物, 2016, 46(1): 42-46.
- [5] 顾珉, 许丹, 顾炳仁. 荧光染色计数法在制药用水微生物限度检查替代应用初探[J]. 中国药品标准, 2017, 18(4): 298-303.
- [6] GORDON O, GOVERDE M, STAERK A, et al. Validation of Milliflex® Quantum for Bioburden Testing of Pharmaceutical Products [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2017, 71(3): 206-224.
- [7] 高春银, 吴国平, 马卫东, 等. 皮氏罗尔斯顿菌 Milliflex Quantum 快速检测替代方法验证[J]. 中国卫生检验杂志, 2015, 25(3): 348-350.
- [8] 高春银, 吴国平, 马卫东, 等. 制药用水中环境菌的 Milliflex Quantum 快速检测方法验证[J]. 中国新药杂志, 2015, 24(1): 85-89.
- [9] AHN Y, KIM JM, KWEON O, et al. Intrinsic Resistance of Burkholderia cepacia Complex to Benzalkonium Chloride [J]. mBio, 2016, 7(6): e01716-16.
- [10] 沈海英, 王星月, 徐锐琳, 等. 两批次抗真菌乳膏中洋葱伯克霍尔德菌群的检测结果及其耐药性考察[J]. 抗感染药学, 2020, 17(11): 1565-1568.
- [11] 王似锦, 余萌, 杨美琴, 等. 凝胶剂中1株洋葱伯克霍尔德菌的分离、鉴定与生长特性研究[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1617-1624.
- [12] 刘晨旭, 白晓慧. 不同供水管材生物膜抗生素抗性基因分布特征[J]. 环境科学, 2023, 44(3): 1537-1541.
- [13] TORBECK L, RACCASI D, GUILFOYLE DE, et al. Burkholderia cepacia: This Decision Is Overdue [J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2011, 65(5): 535-543.
- [14] 甘永琦, 农浚, 黄慧, 等. 盐酸美沙酮口服溶液中抑菌剂处方合理性评价及污染菌鉴定分析[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(12): 2193-2200.
- [15] 周发友, 王似锦, 马韦钰, 等. 一株样品分离菌-洋葱伯克霍尔德菌对抑菌效力评价体系的启示[J]. 中国药事, 2019, 33(12): 1449-1455.
- [16] 赵丽元, 丁红雨, 高洪霞, 等. 环境微生物数据库的建立及在溯源分析中的应用[J]. 中国药业, 2022, 31(23): 84-88.
- [17] 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.

(收稿日期: 2024-02-01; 修回日期: 2024-12-16)