

中图分类号: R921; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)18-0023-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.18.006



《中国药典》细菌 DNA 特征序列鉴定法探讨

安春艳, 牛振东[△]

(北京市药品检验研究院·国家药品监督管理局仿制药研究与评价重点实验室·中药成分分析与生物评价
北京市重点实验室, 北京 102206)

摘要:目的 为微生物鉴定标准的完善提供参考。方法 围绕2020年版《中国药典(四部)》通则1021“细菌DNA特征序列鉴定法”, 比较国内、国外药典(美国药典2024版、欧洲药典11.0版、日本药局方第18版)及相应标准中以核酸为基础的微生物鉴定方法, 对实际使用中存在的问题进行分析并提出建议。结果 国内外药典和标准中, 以微生物核酸为基础的鉴定相关内容可分指导原则和具体方法两类; 现标准实际使用中还存在DNA特征序列种类限定过严、标准数据库和结果判定不够明确、缺少对真菌相关的核酸鉴定方法等问题。建议现标准中方法的语言描述增加灵活性和包容性, 推进标准数据库建设, 明确结果判定标准, 适时增加真菌相关方法等。结论 现行标准虽为微生物污染控制提供了具体指导, 但仍与药品微生物鉴定的实际需求存在差距, 相关标准体系有待继续完善。
关键词: 药品; 药典; 细菌; 微生物鉴定; 核酸; DNA特征序列

Discussion on Bacterial DNA Signature Sequence Identification Method in Chinese Pharmacopoeia

AN Chunyan, NIU Zhendong

(Beijing Institute for Drug Control, NMPA Key Laboratory for Research and Evaluation of Generic Drugs, Beijing Key Laboratory of Analysis and Evaluation on Chinese Medicine Components and Biological Evaluation, Beijing, China 102206)

Abstract: Objective To provide reference for the improvement of microbial identification standards. **Methods** Focusing on the general chapter 1021 "Bacterial DNA signature sequence identification method" in the 2020 edition of Chinese Pharmacopoeia, problems in practical use were analyzed and suggestions were provided by comparing domestic and foreign pharmacopoeias (USP 2024, EP 11.0, JP 18) and corresponding standards for nucleic acid - based microbial identification methods. **Results** In domestic and foreign pharmacopoeias and standards, nucleic acid - based microbial identification content was divided into two categories: guiding principles and specific methods. Problems were identified in the practical application of current standards, such as overly strict limitations on DNA signature sequence types, insufficient clarity in standard databases and result determination, and lack of nucleic acid identification methods related to fungi. It is suggested to increase flexibility and inclusiveness in the language description of methods in current standards, promote the construction of standard databases, clarify result determination standards, and add fungal - related methods appropriately. **Conclusion** The current standards can provide specific guidance for microbial contamination control, but there is a gap compared to the actual needs of pharmaceutical microbial identification, and the relevant standard system needs to be further improved.

Key words: pharmaceutical; pharmacopoeia; bacteria; microbial identification; nucleic acid; DNA signature sequence

药品微生物自身及其分解代谢产生的有毒代谢产物会影响药品质量。提高对微生物的认知水平是控制药品微生物的前提, 而对微生物进行鉴定和系统分类是了解微生物的关键步骤^[1]。微生物鉴定是药品微生物数据偏差调查的重要部分, 关系到检验结果的有效性^[2]。微生物的鉴定和分类手段不断进化, 从依赖显微

镜的形态学方法, 到依赖化学反应的生物化学方法, 再到分子生物学方法和基因组学方法。但由于依赖核酸的鉴定方法(基因型方法)多需昂贵的设备和复杂的操作与分析, 其在药品微生物领域尚未广泛应用, 仅在分析产品失败原因等场景下使用。随着药品监管要求的提高和从业人员专业背景的增强, 药品全生命周期的

第一作者: 安春艳, 女, 博士, 主管药师, 研究方向为微生物药学, (电子信箱) anyanchina@foxmail.com。

[△]通信作者: 牛振东, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为微生物药学, (电子信箱) didividniu@163.com。

思考[J]. 中国药业, 2024, 33(15): 28-31.

[13] 史扬帆, 付佳男, 颜建周, 等. 国外药品生产远程检查模式介绍及启示[J]. 中国药房, 2023, 34(4): 385-390.

[14] 陈晓春, 李富强, 陈焱彤. 多元主体协同视角下药品智慧监管的演化博弈研究[J]. 中国软科学, 2023(7): 168-177.

[15] 杜雅娟, 郭朝晖, 杨平荣, 等. 药品化妆品抽样及检验的有关问题探讨[J]. 中国药事, 2020, 34(4): 407-411.

[16] 宋家鸿, 黄晓燕. 关于利用药品追溯码优化药品抽检监管的设想[J]. 中国检验检测, 2024, 32(3): 75-77.

(收稿日期: 2024-11-29; 修回日期: 2025-04-07)

微生物污染风险控制理念逐步建立,新技术逐步在药品微生物控制过程中得到应用。在药品污染物溯源和环境微生物防治方面,微生物鉴定和分类方法逐步从细菌经典的形态和生理分类,到后来主要以基因组 DNA 杂交、16S 核糖体 RNA (16S rRNA) 基因序列相似性为依据的分子分类^[1]。为准确快速实现药品污染微生物的定性和溯源,2020 年版《中国药典(四部)》在检查法 1000“分子生物学检查法”项下新增了通则 1021“细菌 DNA 特征序列鉴定法”^{[3]155-156},对细菌鉴定方法进行了明确和细化,此外,通则 9204“微生物鉴定指导原则”^{[3]503-506}中也对该类方法进行了指导。该通则主要内容是通过对细菌 16S rRNA 基因特征序列的测定,通过与数据库中的已知序列比对来实现细菌的生物学鉴定,以核酸为基础鉴定微生物种属方法中的一种重要手段,《伯杰氏细菌鉴定手册》即主要依据 16S rRNA 基因对细菌进行分类。实践表明,该法适用于葡萄球菌、芽孢杆菌、库克氏菌、微球菌、柠檬酸杆菌、肠杆菌、肠球菌、假单胞菌、不动杆菌、鞘氨醇单胞菌和罗尔斯通氏菌等药品微生物常见属中近百种细菌的鉴定,甚至可鉴定到菌株水平^[4-7]。但广泛应用的同时,在药品微生物检验实践中也发现该检查法存在一些问题。本研究中通过国内外微生物鉴定相关标准的比较及微生物鉴定实例总结,针对该类问题提出微生物特征序列鉴定法的改进建议,以期对相关标准的修订提供参考。现报道如下。

1 国内外微生物核酸鉴定方法相关标准比较

1.1 概述

2020 年版《中国药典(四部)》通则 1021 的含义可通过将其题目拆解为几个关键(限定)词来理解,即细菌、DNA、特征序列、鉴定、法。该通则的适用对象是细菌(不包括真菌、病毒、支原体、古菌等微生物),分析对象为 DNA,标志物为具有某种特征的 DNA 序列(指 16S rRNA 基因),目的是鉴定细菌的种属(未明确要求系统进行发育等分类分析),内容的性质是试验方法(带有强制标准性质,而非推荐性的“指导原则”)。一般而言,限定条件越多,实施的可操作性越强,如该通则中对试剂和步骤的描述非常详尽,利于相关人员的培训和方法实施,有助于减少形态鉴定中专业知识和主观判断带来的局限;同时,也意味着该通则适用范围有限,如国内外相关的标准中,有些标准中的研究对象不限于“细菌”而是更广泛的“微生物”或“病原体”,分析对象也非限定为“DNA”而是其上位概念“核酸”,相对应的研究手段也不仅限于序列比对,还包括 DNA 杂交等,这些标准或指南大多适用于药品微生物。在比对各国药典时,发现国际主要药典中中国药典(ChP 2020, 通则

1021)、美国药典(USP 2024, 通则 1113, 1125, 1127, 1129)、欧洲药典(EP 11.0)及日本药局方(JP 18, G4 章节)此相关的内容在形式和内容上差异较大,无法逐一对应项目比较,在此进行概括性比较。详见表 1。

表 1 各国药典微生物 DNA 特征序列鉴定法比较

Tab. 1 Comparison of microbial DNA signature sequence identification method in pharmacopoeias of different countries

项目	ChP 2020	USP 2024	EP 11.0	JP 18
前言 / 简介	+	-	-	+
试验环境和仪器	+	+	-	+
试剂及其制备方法	+	-	-	+
方法适用性试验	+	-	-	-
待检菌测定	+	-	-	+
真菌鉴定方法	-	+	-	+

注:“+”为有相关内容,“-”为无相关内容。

Note: + indicates relevant content, - indicates none.

1.2 USP 2024

USP 2024 版通则 1113“微生物鉴定、鉴别和菌株分型”(2013 年起实施)是与微生物分类方法直接相关的章节。该通则适用对象为细菌和真菌,方法包括利用表型特征和基因型特征进行微生物鉴别。利用基因型特征的方法包括 DNA-DNA 杂交、PCR、16S 和 23S rRNA 基因测序、多位点序列分析(MLST)、焦磷酸测序、DNA 探针及核糖体分型等。该章节内容包括方法的使用场景、方法的选择原则、菌株分离纯化、初步筛选与表征、利用表型进行微生物鉴别、利用基因型进行微生物鉴别、微生物鉴别方法的确认等。上述内容,与 ChP 2020 通则 9204“微生物鉴定指导原则”中相关内容基本一致。

USP 2024 版通则 1226“基于核酸的技术——提取、检测和测序”中规定了关于核酸测序方法、检测方法、序列完整性等内容;通则 1127“基于核酸的技术——扩增”中介绍了核酸扩增的种类和优化;通则 1129“基于核酸的技术——基因型”概述了关于单核苷酸多态性(SNP)基因分型技术,可应用于微生物系统发育分析。这些通用技术对微生物 DNA 特征序列鉴定法起到了间接指导作用。

1.3 EP 11.0

EP 11.0 版未将微生物 DNA 特征序列鉴定法列为单独的章节,但 2.6.21 节“核酸扩增技术”和 5.1.6 节“微生物质量控制的替代方法”中的内容均与此相关。2.6.21 节中原则性规定了取样、存储和转移核酸样品要防止目标序列降解,并要求采取多种措施防止污染,以保证质量。5.1.6 节指出以原核生物 16S rDNA 基因分析为代表的微生物基因组测序方法是微生物基因型鉴定的重要内容,由于该类方法依赖数据库,因此需在

方法验证时考虑数据库的扩展问题,如可采用合适的软件实现数据库定制功能,将特定微生物核酸序列添加到数据库中。

1.4 JP 18

JP 18(2021年6月7日实施)中关于分子生物学方法鉴定微生物的章节为G4“基于分子生物学方法的微生物快速鉴定”,内容与ChP 2020通则1021相似。JP 18的G4-7-160内容包括应用范围、仪器、操作规程、结果判断、试剂等。相应的,ChP 2020通则1021包括范围、实验环境和仪器的一般要求、试剂及其制备方法、方法适用性试验、待检菌的测定规程等。JP 18与ChP 2020通则的最大的区别:1)适用对象,前者包括了药品中的细菌和真菌,而后者限制了仅适用于药品中的细菌,也未在其他章节中涉及真菌的DNA特征序列鉴定的具体方法;2)结果判断,前者将PCR产物的核酸序列与BLAST数据库比对,将一致性高于90%的结果进行排序,排序相似性越高,亲缘关系越近(USP 2024通则1113中提到,一般序列相关度 $\leq 97\%$ 认为是不同的属, $\leq 99\%$ 认为是不同的种,但也有许多例外),而后者中提到“将获得的细菌DNA特征序列与经验证过的专用数据库进行比对”,未明确规定可用何种数据库和鉴定为某微生物的判定标准,也未提及数据库的扩展。

1.5 其他相关标准

GB/T 39367.1—2020《体外诊断检验系统 病原微生物检测和鉴定用核酸定性体外检测程序第1部分:通用要求、术语和定义》等同于国际标准化组织(ISO)的标准ISO/TS 17822-1:2014,包含利用特征核酸序列进行医学病原微生物鉴定的内容。ISO 17822:2020《体外诊断检验系统 病原微生物检测和鉴定用核酸定性体外检测程序 实验室和质量实践指南》(2020年12月1日发布实施)中就实验室生物安全、结果的判定与报告、方法开发与实施、质量保证等进行了规定。

通过上述标准的比较,可以看出药品微生物核酸鉴定方法的规定可分为两类。一类以“指导原则”的形式对药品微生物核酸鉴定方法中的原理、适用场景及风险管理等进行推荐性指导,如ChP 2020通则9204、USP 2024通则1113和EP 11的5.1.6节。“指导原则”涉及的因素更全面和概括,除鉴定的一般流程外,还包括多种方法的使用、筛选、方法的确认和系统发育等,有利于全面理解菌种的分类鉴定,一般无具体方法规程。另一类以“方法”的形式规定,如ChP 2020通则1021和JP 18的G4-7-160。“方法”的内容更详尽、操作性更强,有助于企业和检验机构的检验人员进行微生物鉴定,但涉及的各种因素限于方法本身。根据我国药品微生物控制发展的实际情况,这两种形式都有其必要性,

在实际应用时宜综合衡量。

2 现行标准执行过程中的问题

2.1 DNA特征序列选择限定较严

16S rRNA基因长约1 540 bp,有9个高变区(V1-V9)和10个保守区(C1-C10),在结构上有高度保守性,因此作为细菌分类学的标志物。由于目前二代测序技术无法测得全长,因此常选择1个或几个高变区进行测序,如ChP 2020通则1021中选择V1-V3区。16S rRNA特征序列鉴定法因其操作简单、数据库较丰富,已成为一种最常用的分子生物学鉴定手段,可鉴定大部分细菌,包括环境微生物、临床病原微生物和实验室难培养微生物等^[8-10]。但在药品检验实践中仍发现,有些微生物无法用16S rDNA基因的V1-V3区实现属水平的鉴别,此时如何用DNA特征序列法进行微生物的鉴定,以及是否可以使用其他特征序列进行鉴别等问题,在ChP 2020通则1021中未明确规定。

已有研究者利用V1-V3区以外的其他DNA特征序列实现微生物鉴定。如已证明V4区的特异性强且能鉴别大多数细菌到属水平^[11];可利用重组酶A基因*recA*或DNA促旋酶亚基B基因*gyrB*鉴定洋葱伯克霍尔德菌群^[12-14];利用RNA聚合酶亚基D基因*rpoD*快速鉴定铜绿假单胞菌^[15];有时需要将多个DNA特征序列联合进行聚类分析,如利用16S rRNA基因(1483-1489 bp),*rpoB*基因(3486-3495 bp)和*recA*基因(1041-1056 bp)及部分*hsp65*基因(420 bp)和*sodA*基因(441 bp)的序列,鉴定快速生长分枝杆菌^[16],基于16S rRNA基因和*gyrB*基因串联DNA特征序列鉴定副溶血弧菌^[6],利用16S rRNA和沙门氏菌侵袭蛋白A基因(*invA*)鉴定沙门氏菌^[17]等。上述研究表明,当16S rRNA基因难以鉴别时,也可选择其他合适的DNA特征序列作为鉴定细菌的依据,需要根据具体问题进行试验评估^[18-19]。

除了特征核酸序列,其他基于微生物基因组的工具也可用于菌种鉴定。如平均核苷酸一致性(ANI)是基于两基因组间所有直系同源蛋白编码基因序列相似性平均值得到的,两菌株基因组ANI值为95%~96%时,相当于DNA-DNA杂交值70%。因此,当两菌株基因组ANI值 $> 96\%$ 时可鉴定为同一个物种, $< 95\%$ 时鉴定为不同物种^[20]。

2.2 核酸序列比对结果判定标准未明确规定

2.2.1 用于比对的核酸数据库

获得待测菌的DNA序列后,需与数据库中已有的序列比对,根据序列一致性等指标来判断待测菌的种属。随着技术发展进步,核酸测序成本大幅降低,核酸数据库也逐渐增加。数据库的质量关系着微生物鉴定结果,进而对溯源和微生物风险控制产生影响。ChP

2020 通则 1021 中规定“与经验验证过的专用数据库进行比对”,具体选择哪个数据库未进行明确。

常用的多为公开的核酸数据库。例如,国际核酸数据库(International Nucleotide Sequence Databank, <https://www.insdc.org/>),由3个数据库共同构成国际核酸序列数据库联盟,数据共享,同步更新:美国国家生物技术信息中心(NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)维护的 GenBank,可用比对工具 BLAST 进行比对(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),欧洲的核酸档案库(ENA, <https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>),和日本的 DNA 数据库(DNA Databank of Japan, DDBJ, <https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html>);中国国家生物信息中心(CNCB)也建立了核酸序列比对的在线版 BLASTN(<https://ngdc.cncb.ac.cn/blast/blastn>)。除了综合数据库,还有专门的微生物核酸数据库,如国家微生物科学数据中心(NMDC)提供了微生物核酸数据及比对界面(<https://nmdec.cn/analyze/blast-tools/blastn>),Ensembl 计划中的 EnsemblBacteria 汇集了大量细菌的基因组信息,也提供 BLAST 功能(<http://bacteria.ensembl.org/Multi/Tools/Blast>)。

目前,ChP 2020 9109“标准核酸序列建立指导原则”为标准核酸序列库的建立提供了指导。药品微生物控制领域的标准核酸数据库的建立宜加快推进,不断增加数据、反复验证,以满足药品微生物鉴定的需求。

2.2.2 比对结果的判定标准

如前 1.3 节所述,对待测菌与核酸数据库中核酸序列的一致性未规定阈值,导致确定药品污染微生物种属时存在不确定性。

2.3 缺少真菌 DNA 特征序列的鉴定

相较细菌,真菌可通过孢子等方式繁殖、传播和休眠,生存能力更强,是药品生产微生物控制中的重点和难点。对药品和环境中的霉菌和酵母,如何通过 DNA 特征序列法进行鉴定,进而制订相应的对策进行防治的问题,目前 ChP 2020 中尚未进行明确规定。

3 讨论

3.1 ChP 2020 中微生物鉴定内容概述

ChP 2020 中微生物鉴定是一个体系^[21],相关的内容除四部通则 1021 外,还包括 9204“微生物鉴定指导原则”、9108“DNA 测序技术指导原则”^{[3]492-493}、9109“标准核酸序列建立指导原则”^{[3]493-494}及“微生物全基因组测序技术指导原则”公示稿^[22]等,这些内容相辅相成,如标准核酸序列库为通则 1021 检查法中的标准序列库奠定了基础,通则 9108 为通则 1021 中 16S rDNA 基因测序的峰图质量、序列拼接质量、结果判定等提供了原则性指导。将来,微生物的基因组测序、蛋白质质谱

等方法也可能收入药典,其相关方法和指导原则会进一步扩充完善,形成微生物鉴定的完整布局。就通则 1021 检查法本身而言,针对前述使用中发现问题,提出如下建议供专家学者探讨。

3.2 真菌 DNA 特征序列鉴定方法

尽管真菌的鉴定方法包括形态观察、生理生化试验、免疫学鉴定法等,但分子生物学鉴定是其中相对准确性较高的鉴定方法。真菌的分离纯化、核酸提取、引物选择等方面与细菌有所区别,但后续基因扩增、测序及比对等较相似,可考虑合并或增加相关内容。

3.3 判定标准和标准数据库

可考虑在 ChP2020 通则 1021 的“结果判定”中增加具体的标准和可使用的数据库。例如,与标准核酸序列数据库或公开数据库(NCBI 等)中的序列比对的一致性高于 99%。企业或检测机构也可建立自己的环境微生物核酸数据库,用于微生物数据偏差调查。

3.4 语言表述

可考虑参考 JP18(G4)、USP2022(通则 1126 和 1127),在描述时使用表现宽容度的语言,增加方法适用的灵活性,列举如下。

关于方法的定位:微生物鉴定方法有利用表型和基因型等多种,DNA 特征序列鉴别是其中一种较可靠的方法,但不可完全代替其他方法。如 JP 18 中在描述了特征序列鉴定法的优势后,同时说明该方法不可代替其他鉴定方法,可根据情况改进和选择。

关于引物序列的选用:细菌利用 16S rDNA 基因的可变区进行属或种水平的鉴定是适用性最广的方法,但某些细菌利用 1021 中的 V1-V3 区无法实现属或种水平的区分,此时需结合其他特征序列(如重组酶 A 基因 *recA*、RNA 聚合酶亚基 D 基因 *rpoD*、DNA 促旋酶亚基 B 基因 *gyrB*,或 16S rDNA 基因的其他可变区等)进行联合鉴别。因此,DNA 特征序列鉴定法除了列举典型特征序列(16S rDNA 基因的 V1-V3 区)外,还应明确表明其他经过验证的特征序列也可使用。类似的情况在 JP18 中也进行了说明。

关于商品化试剂盒/试剂的使用:在试剂制备和待检菌测定步骤中,有些已有商品化试剂盒或成品试剂,如细菌/真菌核酸提取试剂盒、核酸聚合酶链式反应(PCR)试剂盒、核酸扩增产物的纯化(胶回收)试剂盒、核酸序列测定试剂盒、50×TAE 试剂等。商品化试剂盒所用方法可能与原有正文中的方法有差异(如核酸提取,ChP 2020 通则 1021 中采用了最常用的溶液型抽提法中的 CTAB 法,而试剂盒可能是柱式抽提或磁珠纯化法),原则上只要方法经过验证,具有稳定的可重复性,均应被允许使用。验证的原则可参考 ChP 2020 通则

9204中“微生物鉴定方法的确认”。ChP 2020通则1001“聚合酶链式反应法”中对类似情况有描述,PCR体系的一般要求中“组成PCR体系的试剂可采用自制、商品化试剂或为供试品检测设计的专用试剂盒。自制试剂应尽量现配现用并经验证后方可使用,商品化试剂和专用试剂盒需经过质量确认,并严格遵照说明书使用和储存。”方法适用性试验中“采用商品化试剂或试剂盒…应按说明书操作,并符合试剂盒说明书中的质量控制及方法适用性要求。”因此,建议增加关于商品化试剂盒/试剂使用的许可及条件。

关于质量保证:可考虑参考USP 2024和EP 11.0,增加防止核酸污染、生物安全防护和方法学质量保证等内容。微生物的DNA特征序列鉴定法是利用PCR法的一种特定应用场景,应遵循PCR法的相关要求,如对实验室、人员、数据等的要求。为防内容重复,可直接指向相关规定(如ChP 2020通则1001“附注”)。

3.5 结论

ChP 2020通则1021具有方法明确、可操作性强的特点。国内外药典在以微生物核酸为基础的鉴定方法的形式和内容上有较大差异。细菌DNA特征序列鉴定法在实际使用中还存在一些问题,不能完全满足药品微生物的鉴定需求,上述建议供参考,以期完善药典微生物鉴定标准体系。微生物鉴定技术与标准的发展,可有效控制药品生产中的微生物污染风险,助力医药产业升级。

参考文献

- [1] 李文均,陈 瑛,田新朋,等.《伯杰氏鉴定细菌学手册》和“伯杰氏国际系统微生物学学会”历史回顾、发展现状及未来展望[J]. 微生物学报,2023,63(5):1714-1723.
- [2] Parenteral Drug Association. Technical Report No. 88, Microbial Data Deviation Investigations in the Pharmaceutical Industry [EB/OL]. (2022-01)[2024-01-09]. <https://www.pda.org/bookstore/product-detail/6471-tr-88-microbial-data-deviation>.
- [3] 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.
- [4] 阎雅宁,曹晓云. 无菌药品生产企业微生物洁净室微生物污染的鉴定与结果分析[J]. 中国药品标准,2023,24(1):45-51.
- [5] MILLER SE. DNA barcoding and the renaissance of taxonomy[J]. Proc Natl Acad Sci,2007,104(12):4775-4776.
- [6] 冯 震,张芝华,肖珊珊,等. 基于16S rRNA和gyrB基因串联DNA特征序列的副溶血性弧菌鉴定[J]. 上海预防医学,2021,33(5):372-376.
- [7] 冯 震,蒋 波,李 芳,等. 细菌DNA特征序列鉴定法在常见种属中的鉴定水平研究[J]. 药物分析杂志,2019,39(11):1924-1932.
- [8] CHURCH DL, CERUTTI L, GÜRTLER A, et al. Performance

and application of 16S rRNA gene cycle sequencing for routine identification of bacteria in the clinical microbiology laboratory[J].

Clin Microbiol Rev,2020,33(4):e00053-19.

- [9] JOHNSON JS, SPAKOWICZ DJ, HONG Y, et al. Evaluation of 16S rRNA gene sequencing for species and strain-level microbiome analysis[J]. Nat Commun,2019,10(1):5029.
- [10] FRANCO-DUARTE R, ČERNÁKOVÁ L, KADAM S, et al. Advances in chemical and biological methods to identify microorganisms—from past to present[J]. Microorganisms,2019,7(5):130.
- [11] ZHANG J, DING X, GUAN R, et al. Evaluation of different 16S rRNA gene V regions for exploring bacterial diversity in a eutrophic freshwater lake[J]. Sci Total Environ,2018,618:1254-1267.
- [12] 余 萌,王似锦,戴 犛,等. *recA* 基因及核糖体分型技术在洋葱伯克霍尔德菌复合体鉴别与溯源分析中的应用[J]. 药物分析杂志,2019,39(8):1521-1526.
- [13] 冯 震,杨 燕,张 宁,等. 基于 *gyrB* 基因的伯克霍尔德菌属核酸测序鉴定与系统进化分析[J]. 药物分析杂志,2019,39(11):1940-1944.
- [14] PAYNE GW, VANDAMME P, MORGAN SH, et al. Development of a *recA* gene-based identification approach for the entire *Burkholderia* genus[J]. Appl Environ Microbiol,2005,71(7):3917-3927.
- [15] 李羽翥,祖 新,李羽翠,等. 铜绿假单胞菌 LAMP 快速检测方法建立及微滴数字 PCR 验证[J]. 食品工业科技,2020,41(11):267-272.
- [16] ADÉKAMBI T, DRANCOURT M. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing[J]. Int J Syst Evol Micr,2004,54(Pt 6):2095-2105.
- [17] 牛振东,孙 伟,高 春. 保健食品中沙门菌的快速检测方法[J]. 中国卫生检验杂志,2013,23(1):262-264.
- [18] 张军毅,朱冰川,徐 超,等. 基于分子标记的宏基因组16S rRNA 基因高变区选择策略[J]. 应用生态学报,2015,26(11):3545-3553.
- [19] 吴悦妮,冯 凯,厉舒祯,等. 16S/18S/ITS 扩增子高通量测序引物的生物信息学评估和改进[J]. 微生物学通报,2020,47(9):2897-2912.
- [20] RICHTER M, ROSSELLÓ-MÓRA R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition[J]. Proc Natl Acad Sci,2009,106(45):19126-19131.
- [21] 张文燕,解 慧,曹晓云.《中国药典》污染微生物鉴定相关标准体系建立的回顾及展望[J]. 中国药品标准,2023,24(6):567-572.
- [22] 国家药典委员会. 关于微生物全基因组测序技术指导原则标准草案的公示(第二次)[EB/OL]. (2024-05-31)[2024-08-27]. <https://www.chp.org.cn/?#/business/standard>.

(收稿日期:2024-09-12;修回日期:2025-03-27)