

· 生产管理 ·

制药企业微生物鉴定技术和监测数据库的建立

黄家乐, 王玥, 何睿, 裘畅, 徐雪娥, 董铸雄 (广东天普生化医药股份有限公司, 广州 510520)

摘要 目的: 建立制药企业微生物鉴定技术和监测数据库, 以达到微生物溯源调查、回顾分析和法规符合性的要求。**方法:** 建立微生物定向和数值分类鉴定方法, 通过对标准菌株的分析鉴定, 以确认鉴定方法的适用性, 并将污染菌的来源、菌落、细菌形态和鉴定信息以图片形式保存于 Word、Excel 文档中。**结果:** 微生物定向和数值分类鉴定法经确认后均符合要求, 可用于微生物的鉴定。制药企业污染菌库、鉴定电子菌库和药品生产过程中微生物监测电子数据库, 可用于污染菌的测试、鉴定信息确认和分析调查。**结论:** 所述的微生物定向和数值分类鉴定法, 以及污染菌库、鉴定电子菌库和监测电子数据库为同行提供一套简单、应用性强、成本低的微生物鉴定技术和建立污染菌库的指导方法及技术平台。

关键词: 微生物定向鉴定法; 数值分类鉴定法; 微生物污染调查; 污染菌库

中图分类号: Q93-331; R95 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7777(2018)10-1393-07
doi:10.16153/j.1002-7777.2018.10.013

Establishment of Microbial Identification Technology and Monitoring Database in Pharmaceutical Company

Huang Jiale, Wang Yue, He Rui, Qiu Chang, Xu Xue'e, Dong Zhuxiong (Techpool Bio-Pharma Co., Ltd, Guangzhou 510520, China)

Abstract Objective: To establish microbial identification technology and monitoring database in the pharmaceutical company, so as to meet the requirements of microbial traceability investigation, analysis review and regulation compliance. **Methods:** Microbial orientation and numerical classification identification methods were established and the applicability of the methods was verified by analysis and identification of standard strains. Moreover, the following information of the identified bacterial, including source, colony, morphology and API identification information were stored in Word or Excel files in the format of pictures. **Results:** Both the microbial orientation identification and numerical classification identification methods met the requirements, which could be used for microbial identification. A library of contaminating bacteria of pharmaceutical company, electronic database of microbial identification and microbial monitoring database during the drug production could be used for testing, confirming the identification information and analyzing the contaminating bacteria. **Conclusion:** The microbial orientation identification and numerical classification identification methods, library of contaminating bacteria, electronic database of microbial identification and microbial monitoring database in this article could provide a simple, practical and low-cost microbial identification technology, guidance and platform for establishment of library of contaminating bacteria.

Keywords: microbial orientation identification; numerical classification identification; microbial contamination investigation; library of contaminating bacteria

微生物污染是无菌药品和非无菌药品质量评估的重要指标,当药物原料、辅料、制药用水、中间体、终产品和洁净环境受到微生物污染时,会出现风险持续、调查溯源难、应变慢等严重问题^[1]。因此,建立药品生产过程中环境污染菌库^[2]和微生物污染溯源分析的方法具有极其重要的意义^[3]。

微生物污染溯源分析与微生物鉴定技术息息相关,常采用两种或多种方法鉴定微生物,在许多质量控制调查中,单独的表型鉴定结果就能给出充足的信息帮助调查人员进行深入调查,并按需要制定适宜的纠正措施^[4]。

本文结合微生物定向^[5]和数值分类鉴定技术^[6]这两种表型鉴定法,在分享实践经验和实例参考的同时,为同行提供一套简单、应用性强、成本低的微生物鉴定方法确认和污染菌库建立的技术平台,以达到微生物溯源调查和回顾分析^[7]的要求。

1 实验材料与方法

1.1 试剂和主要设备

Analytic Products Inc (API) 鉴定试剂(法国梅里埃诊断产品有限公司,用于微生物鉴定): API STAPH, API 20E, API 20NE, API CORYNE, API 20 C AUX, API 50CHB。定向鉴定试剂:革兰氏染色液(广东环凯微生物科技有限公司),接触酶试剂(法国梅里埃诊断产品有限公司),氧化酶试剂(法国梅里埃诊断产品有限公司),靛基质试剂(广东环凯微生物科技有限公司),3%NaOH溶液,芽孢染色液(广东环凯微生物科技有限公司)。主要设备:DM500型数码显微镜(德国Leica公司,用于细菌形态观察);AC2-4S1型生物安全柜(新加坡Esco公司,提供微生物操作环境);WH-11CA型低温培养箱(德国Wiggins公司,用于微生物培养);CL-32L型湿热灭菌柜(日本ALP公司,用于微生物灭活)。

1.2 菌种

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003],铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104],大肠埃希菌[CMCC(B)44102],

白色念珠菌[CMCC(F)98001],生孢梭菌[CMCC(B)64941],枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501],贪婪丙酸杆菌(实验室分离革兰氏阳性杆菌,用于API CORYNE鉴定条的确认)。

1.3 实验方法

1.3.1 微生物定向鉴定法确认

细菌的形态观察法^[8]用于鉴别球菌、杆菌、芽孢菌属、弧菌、酵母菌或弯曲菌^[9];革兰氏染色法鉴别革兰氏阳性或阴性菌,以金黄色葡萄球菌(+)和铜绿假单胞菌(-)为确认菌株;接触酶试验鉴别微球菌科,以金黄色葡萄球菌(+)和生孢梭菌(-)为确认菌株;氧化酶试验鉴别假单胞菌科,以铜绿假单胞菌(+)和金黄色葡萄球菌(-)为确认菌株;靛基质试验鉴别肠杆菌科,以大肠埃希菌(+)和金黄色葡萄球菌(-)为确认菌株;拉丝试验辅助革兰氏染色法,以金铜绿假单胞菌(+)和黄色葡萄球菌(-)为确认菌株;芽孢染色法鉴别芽孢杆菌属,以枯草芽孢杆菌(+)和金黄色葡萄球菌(-)为确认菌株。

1.3.2 API鉴定法确认

API STAPH鉴定葡萄球菌属和微球菌属,以金黄色葡萄球菌为确认菌株;API 20E鉴定肠杆菌科及其他革兰氏阴性杆菌,以大肠埃希菌为确认菌株;API 20NE鉴定非肠道革兰氏阴性杆菌,以铜绿假单胞菌为确认菌株;API CORYNE鉴定棒状杆菌科,以贪婪丙酸杆菌为确认菌株;API 20 C AUX鉴定酵母菌属,以白色念珠菌为确认菌株;API 50CHB鉴定芽孢杆菌属,以枯草芽孢杆菌为确认菌株;实验人员A、B、C分别对每种鉴定条进行平行操作。

1.3.3 甘油-生理盐水冷冻管保存法

取单菌落菌苔置菌生理盐水中,使其菌液浓度大于7.5麦氏浓度,取2 mL的冻存管,分别加入0.5 mL菌液和0.5 mL的20%无菌甘油,混匀,制备成10%甘油-生理盐水菌悬液,放置菌株保存盒内(见图1),至-20℃冰箱保存^[10](见图1)。

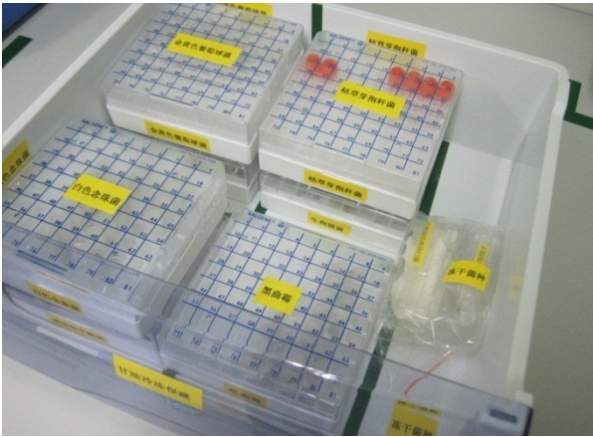


图1 10%甘油-生理盐水冷冻管保存法

1.3.4 微生物电子数据库的建立
将污染菌的来源、菌落、细菌形态和API鉴定信息以图片形式保存于Word、Excel文档中。

1.4 评价标准
微生物定向鉴定法确认：阳性或阴性确认菌株应为阳性或阴性反应；API鉴定法确认：将反应结果输入API鉴定分析软件进行分析，鉴定菌的鉴

定百分比（%ID）应 $\geq 80\%$ 。

2 结果

2.1 微生物定向鉴定方法确认
经确认，革兰染色法（见图2）、接触酶试验（见图3）、氧化酶试验（见图4）、靛基质试验（见图5）、拉丝试验（见图6）、芽孢染色法（见图7）均符合规定。

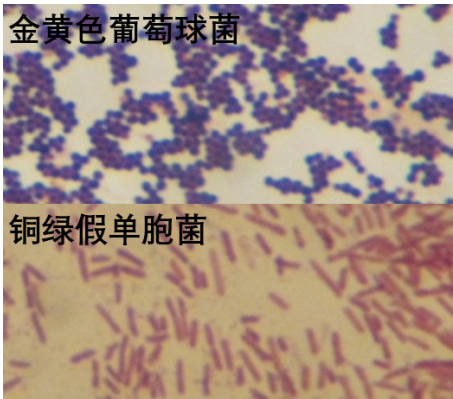


图 2 革兰氏染色法

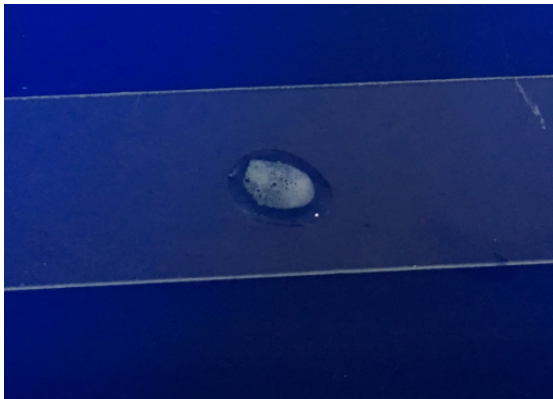


图 3 接触酶试验



图 4 氧化酶试验

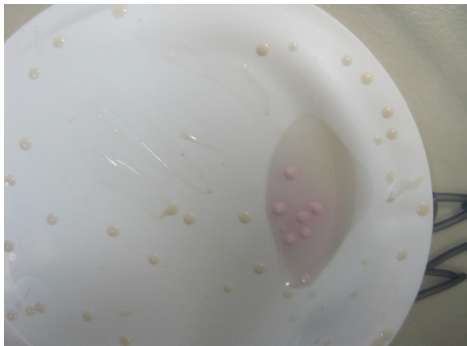


图 5 靛基质试验

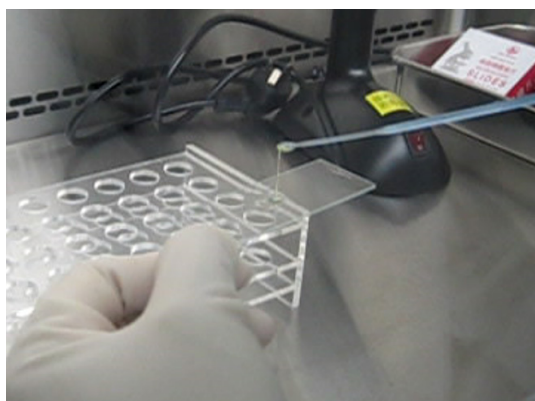


图6 拉丝试验图

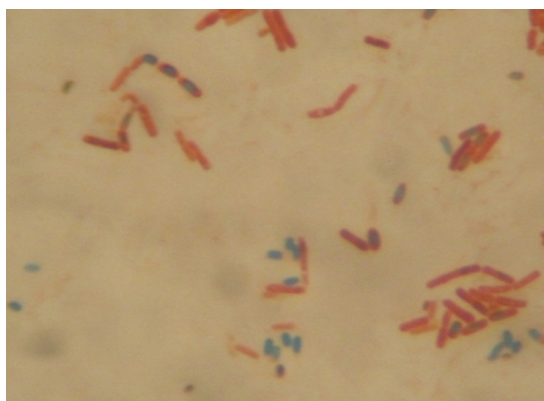


图7 芽孢染色法

2.2 API鉴定法确认

经确认, 各种标准菌株的API鉴定试条结果均

符合规定(见表1及图8~13)。

表1 API鉴定法确认

试验条	鉴定菌株	操作人员	鉴定结果	鉴定百分比及评价
API STAPH	金黄色葡萄球菌	A、B、C	金黄色葡萄球菌(图8)	97.8%, 好的鉴定
API 20E	大肠埃希菌	A、B、C	大肠埃希菌(图9)	99.9%, 极好的鉴定
API 20NE	铜绿假单胞菌	A、B、C	铜绿假单胞菌(图10)	98.6%, 好的鉴定
API CORYNE	贪婪丙酸杆菌	A、B、C	贪婪丙酸杆菌(图11)	96.6%, 好的鉴定
API 20 C AUX	白色念珠菌	A、B、C	白色念珠菌(图12)	97.2%, 好的鉴定
API 50CHB	枯草芽孢杆菌	A、B、C	枯草芽孢杆菌(图13)	99.8%, 很好的鉴定



图8 API STAPH金黄色葡萄球菌



图9 API 20E大肠埃希菌



图10 API 20NE铜绿假单胞菌



图11 API CORYNE 贪婪丙酸杆菌

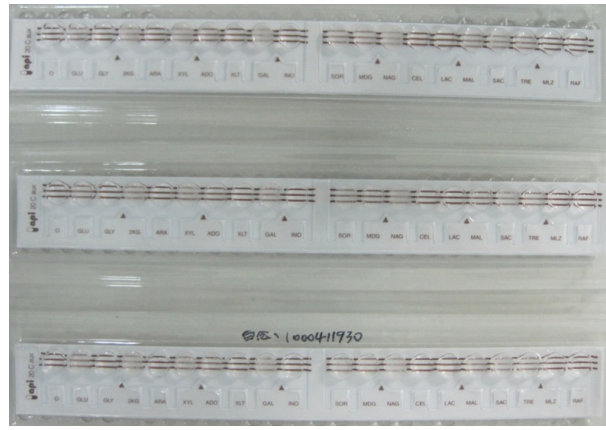


图12 API 20 C AUX 白色念珠菌



图13 API 50CHB 枯草芽孢杆菌

2.3 制药企业污染菌库的建立

污染菌库来源于药物原料、辅料、制药用水、中间体、终产品和洁净环境，用于培养基和检验方法的补充验证，包括微生物污染调查、灭菌效果补充验证^[11]以及环境分离菌株消毒剂杀灭效果评估^[12]。污染菌库包括样品菌库和电子菌库。

样品污染菌库：对所有污染微生物进行微生物定向和API鉴定；每种污染菌使用10%甘油-生理盐水冷冻管法保存2管，1管用于传代，1管用于使用，编号为YYMM-N（保存年月+序号），至药品有效期1年后销毁。

电子污染菌库：将污染菌的来源、菌落、细菌形态和API鉴定信息以图片形式保存于Word文档中，用于污染菌回顾、对比和培训（见图14）。

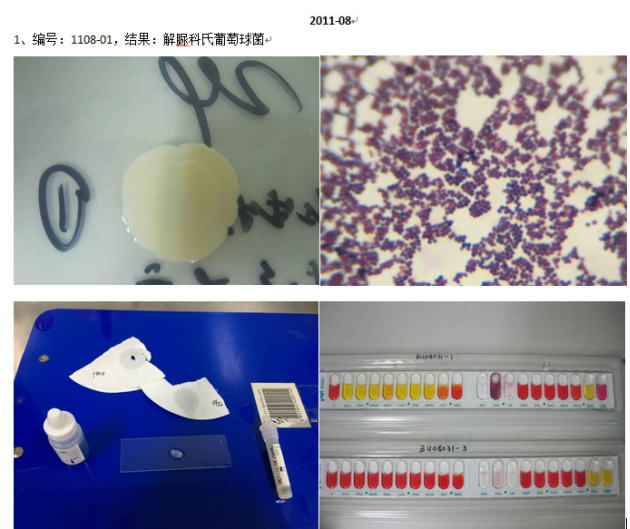


图14 电子污染菌库样式

2.4 鉴定电子菌库

根据API鉴定试剂条,分为API STAPH微球菌科、API CORYNE棒杆菌科、API 50CHB芽孢杆菌属、API 20NE假单胞菌科、API 20CAUX酵母菌属、API 20E肠杆菌科6个Word文档;用于鉴定结果参考、培训和通过菌落快速鉴定污染菌种属(见图15)。

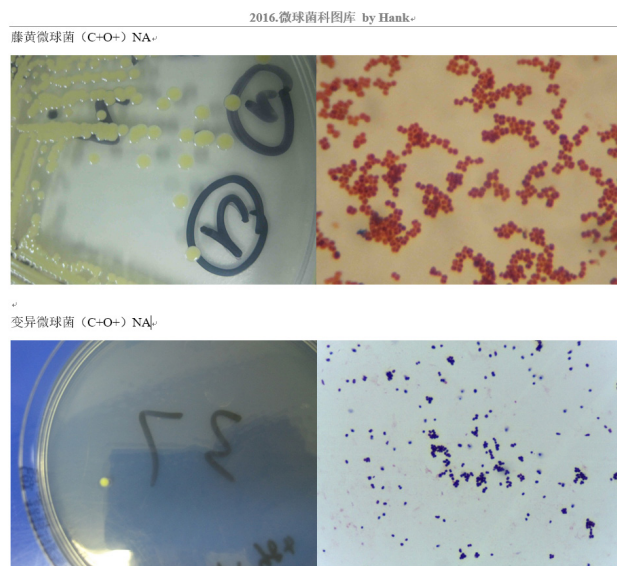


图15 微球菌科鉴定电子菌库样式

2.5 药品生产过程中微生物监测电子数据库的建立

建立Excel文档,以不同生产车间的洁净环境监测结果、原料、辅料或制药用水为工作簿进行记录,记录生产过程的微生物污染情况(见图16);使用Excel中的“筛选”功能^[13],能快速筛选某位点或某微生物的染菌情况,用于污染菌或监控位点的溯源调查,并进行定期的菌群回顾分析(见图17)。

监测日期	批号	染菌位置/是否长菌	菌落总数 (cfu)	鉴定微生物的菌落数(cfu)									
				微球菌属	葡萄球菌属	棒状杆菌属	芽孢杆菌属	乳杆菌属	放线菌属	假单胞菌属	肠杆菌属	酵母菌属	霉菌属

图16 微生物监测电子数据库样式

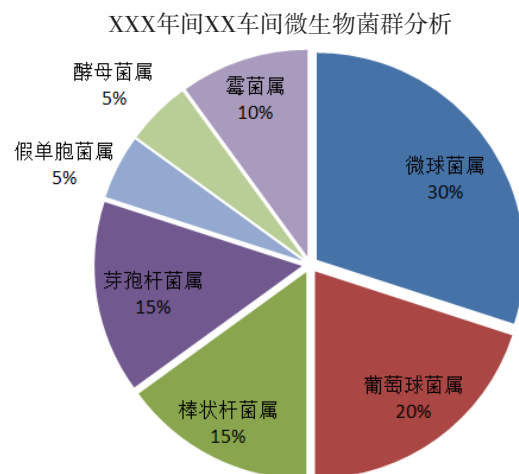


图17 年度车间微生物菌群分析样式

3 讨论

在微生物鉴定过程中,首先完成的实验称为基本定向试验,错误的定向鉴定结果引导我们选用错误的鉴定条或鉴定试剂,导致鉴定失败、结果无效。

微生物定向鉴定注意事项:①革兰氏染色法,要求使用18~24小时的培养物,有的革兰氏阳性菌在幼龄时呈阳性,超过24小时可变为阴性;有的在幼龄时也呈阴性,故培养物越陈旧,菌细胞衰老、死亡,则染色常为阴性,造成错判^[14]。当革兰染色实验不确定时,拉丝试验可辅助判断。②接触酶试验,也要求使用18~24小时的培养物,因为陈旧培养物可能丧失酶活性,出现假阴性反应。③氧化酶试验,需要在有氧条件下进行,试剂不能滴加过多,以免妨碍菌苔与空气接触造成假阴性结果,也不能将试剂直接滴在含培养物的平皿上。④拉丝试验^[15],应在15秒钟之内溶液的粘性增强并有粘丝形成,但可能会因为菌落本身的粘性而造成误判;遇到难以判断的情况时,可将粘液固定、染色,如果在显微镜下观察不到单个菌体,说明细胞壁已被破坏,结果为阳性。⑤芽孢杆菌属,未确定的可疑菌株包括含气泡的细菌以及没有形成芽孢的新鲜菌落,鉴定时应取菌落中心的样品,并结合细菌学特征和逐日观察结果辅助判断;可疑菌落大而扁平(有鞭毛)、外观粗糙(折光)、边缘不规则(有鞭毛)、蔓延生长(有鞭毛)。⑥菌落或细菌形态

截图留档,照片越清晰越好,在电子数据库建立过程中,图片较文字更有说服力,能克服不同技术人员之间的判断差异,对技术人员所需菌落和细菌形态学的知识要求不高。

不同于药典标准菌株,实验室分离菌API生化反应特异性不强,这是由于其生长繁殖代数较多,在不适合原种的生长条件下发生衰退现象^[16],导致细胞内缺少大部分酶。在使用API鉴定法时有以下问题值得探讨:①反应管阴阳性的颜色难以辨别。②大多数反应管呈阴性结果,其鉴定百分比小于80%(见图18)。



图18 API 50CHB鉴定结果

建议:一是结合微生物定向鉴定结果和鉴定电子菌库做出最终判断;二是对于微生物溯源调查而言,即使鉴定百分比小于80%,只要各个反应管的结果一致,通过电子污染菌库比对,仍可做出为同种属微生物的判断。

参考文献:

- [1] 何国强,王玮,张贵良. 制药洁净室微生物控制[M]. 北京:北京工业出版社,2013:2-3.
- [2] 郑小玲,王征南,王知坚,等. 药品微生物检测实验室环境菌库的建立[J]. 中国现代应用药学,2015,32(7):847-850.
- [3] 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.
- [4] 中国药典:四部[S]. 2015:通则9204.
- [5] 杨燕兰,梁嘉雯. 浅谈微生物实验室中细菌的鉴定方法建立及探索[J]. 中国卫生标准管理,2016,7(9):116-118.
- [6] 杨兰芬. API微生物鉴定系统在实验室质控及微生物检验中的应用[J]. 中国卫生检验杂志,2003,13(4):513-514.
- [7] 户美玲,陈佩,严东珍,等. 建立洁净区微生物数据库与无菌药品GMP生产过程控制的探讨[J]. 微生物学免疫学进展,2013,41(3):33-36.
- [8] 姜荣玲. 形态学检查法在临床细菌鉴定中的作用[J]. 检验医学与临床,2009,6(5):381-382.
- [9] 马绪荣,苏德模. 药品微生物学检验手册[M]. 北京:科学出版社,2000:374-377.
- [10] 干迪郁,任利珍,朱立军. 两种不同的细菌菌种保存方法比较[J]. 中国乡村医药,2010,17(10):49-50.
- [11] 莫凌,吴武. 湿热灭菌工艺验证的探讨[J]. 化工与医药工程,2012,33(4):23-25.
- [12] 张倍宁,陈亮亮,卢勉飞,等. 洁净车间手部消毒剂杀菌效果的评价[J]. 食品与发酵科技,2013,(6):55-58.
- [13] 常惠. 浅谈《计算机应用基础》中EXCEL筛选的基本应用[J]. 青年时代,2016,(17):185-185.
- [14] 刘春爽,赵朝成,顾莹莹,等. 微生物教学实验中菌株革兰氏染色反应快速判定[J]. 实验技术与管理,2015,32(1):51-53.
- [15] 潘友文,钱维清,熊家娟. 现代医药工业微生物实验室质量管理与验证技术[M]. 北京:中国协和医科大学出版社,2004:208-210.
- [16] 周德庆. 微生物学教程[M]. 北京:高等教育出版社,1993:271-272.

(收稿日期 2017年3月8日 编辑 王萍)