

《中国药典》拟收载洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 检查法中标准菌株的稳定性研究

曹蕊¹, 余萌², 马仕洪^{2*} (1. 烟台大学, 烟台 264000; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 应用现有微生物分类鉴定技术手段, 对《中国药典》拟收载洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 检查法中所选用的标准菌株进行冻存及传代稳定性考察。方法: 选取美国药典USP43-NF38 Bcc检查法中的一株Bcc标准菌株ATCC25416为对照菌株。以3株拟收载标准菌株和1株对照标准菌株为试验菌株, 分别对这些试验菌株冻存0.5年、1年、2年的样本及连续6代的传代样本进行菌落表型观察、Biolog生化鉴定分析、16S rRNA基因测序及RiboPrinter全自动基因指纹图谱分析, 并使用BioNumerics 7.6对核糖体图谱数据进行聚类分析。结果: 试验菌株在经冻存及传代后, 各菌株表型无明显差异; 菌株的Biolog生化鉴定结果虽略有差异, 但菌株关键生化代谢属性稳定, 其鉴定结果均属Bcc; 同时, 各菌株的16S rRNA测序结果一致; 核糖体带型相似值均大于0.95。结论: 在本研究考察的冻存时间及传代次数内, 3株《中国药典》洋葱伯克霍尔德菌群检查法拟收载的标准菌株的表型、基因型相对稳定。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌群; 16S rRNA; RiboPrinter全自动基因指纹图谱鉴定系统; Biolog全自动生化鉴定系统; 菌株稳定性

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)07-0724-12

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.07.001

Stability Study on Standard Strains in the *Burkholderia cepacia* Complex (Bcc) Inspection Method to Be Included in the Chinese Pharmacopoeia

Cao Rui¹, Yu Meng², Ma Shihong^{2*} (1. Yantai University, Yantai 264000, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: Using the existing methods of microbial classification and identification techniques to investigate the cryopreservation and passage stability of the standard strains selected in the test of *Burkholderia cepacia* Complex in the Chinese Pharmacopoeia. **Methods:** A Bcc standard strain ATCC25416 in the USP43-NF38 Bcc inspection method was selected as the control strain. Three candidate standard strains and one control strain were selected as the test strains, then the colony phenotype, Biolog biochemical identification system, 16S rRNA gene sequencing and RiboPrinter automatic genetic fingerprinting analysis were performed on samples of these experimental strains cryopreserved for 0.5, 1 and 2 years and passage samples for 6 consecutive generations. The BioNumerics 7.6 software was used to perform the cluster analysis of the fingerprint data. **Results:** Subsequent to the cryopreservation or subculture of test strains of *Burkholderia cepacia* Complex, the phenotypes of the strains had no significant difference. The Biolog biochemical identification results of the strains were all

Bcc. Although there were slight differences, the key biochemical metabolic properties of the strains were stable; at the same time, the 16S rRNA sequencing results were consistent and the ribotyping bands similarity values of each strain were greater than 0.95. **Conclusion:** Within the freezing storage time and passage times investigated in this study, the phenotypes and genotypes of the these three standard strains included in the test of *Burkholderia cepacia* Complex in Chinese Pharmacopoeia are relatively stable.

Keywords: *Burkholderia cepacia* Complex; 16S rRNA; RiboPrinter automatic genetic fingerprint identification system; biolog automatic biochemical identification system; strain stability

洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* Complex, Bcc) 是隶属于伯克霍尔德菌属的一类革兰氏阴性菌的总称。这类菌表型近似、基因型存在差异, 可以定殖于患者呼吸道, 导致囊性纤维化患者和免疫力低下患者不同程度的肺部感染^[1-2]。Bcc生存能力强, 在土壤、水和植物根际等自然环境中广泛存在^[3], 对营养的需求较低, 能在蒸馏水中存活数月, 并且对部分抗生素、消毒剂及抑菌剂具有天然抗性^[4], 因而容易在制药用水中驻留并形成生物膜, 最终引入终产品。美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 已经将Bcc明确为不可接受微生物^[5]。据统计, 2004年至2021年, FDA执法报告中, 因Bcc污染而被召回的非无菌药品有100多种次^[6]。基于Bcc顽强的生理特性及危害性, 在非无菌药品中关注和控制Bcc势在必行。2017年和2021年, FDA建议制药企业关注非无菌水基质药品的Bcc污染风险^[7]。目前, 在高风险制剂的研发过程中, 美国及我国的药品审评部门都要求企业对产品的Bcc污染进行风险管理, 通过风险评估结果制定相应的控制和检验措施。目前, 在各国药典中仅美国药典收录了非无菌药品中Bcc的控制及检查方法^[8]。《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》) 拟收载洋葱伯克霍尔德菌群 (Bcc) 检查法。因此, 有必要对Bcc检查方法开展探索研究。

在药品微生物检验方法的建立过程中, 标准菌株的选择和确定至关重要。标准菌株会用于方法的开发、方法的验证(方法适用性)、培养基的评价和研究以及检验方法的质量控制(如阳性对照试验)等方面。由于标准菌株的重要作用和意义, 其稳定性对于药品微生物检查至关重要, 为保证标准菌株的质量和可溯源性, 应使用多种方法对所选菌株进行准确鉴定, 开展稳定性研究以尽量降低表型变异、遗传漂变和污染的概率, 并定期进行期间核

查。目前, 各国药典^[8-10]均要求试验用菌种的传代次数不得超过5代。美国药典43版<1117>微生物实验室良好操作规范及《中国药典》9203药品微生物实验室质量管理指导原则中均有提到: 1代是指将活的培养物接种到微生物生长的新鲜培养基中培养, 任何形式的转种均被认为是传代1次^[8-9]。标准菌株的期间核查主要包括标准菌株的活性、纯度、稳定性和关键生化特性等指标。

常用的菌株稳定性的研究方法包括表型方法如显微镜下观察细菌形态; 利用VITEK2 Compact、Biolog等^[11-12]自动生理生化方法, 以及使用核糖体型分析技术的RiboPrinter全自动指纹鉴定系统^[13-14]、基因型的序列分析如16S rRNA序列分析、看家基因序列分析^[15-16]等方法。

根据前期课题组对Bcc的关注和研究, 主要采用细菌形态观察、菌株在选择性培养基上的菌落形态、基于碳源利用的Biolog技术的表型方法, 以及包括16S rRNA序列分析和RiboPrinter全自动指纹鉴定系统在内的基因型方法, 对所选菌株在传代和冻存后进行分析, 以探究其稳定性。

1 仪器与材料

1.1 仪器

RiboPrinter全自动指纹鉴定系统, 美国DuPont公司; Nuaire NU-437-600S二级生物安全柜, 美国Nuaire公司; KD-240生物培养箱, 德国Binder公司; Biolog全自动生化鉴定系统, 美国BIOLOG公司; PCR扩增仪, 美国BIO-RAD公司。

1.2 试剂和培养基

细菌基因组DNA提取试剂盒, 美国ZyGEM公司; Biolog GEN III细菌鉴定板, 美国BIOLOG公司; EcoRI限制性内切酶, 美国Hygiena公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基 (Trypsin Soybean Agar, TSA), 上海诺狄生物科技有限公司; 洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂培养基 (*Burkholderia cepacia*

Selective Agar, BCSA)、洋葱伯克霍尔德菌群选择性培养基添加剂,北京三药科技开发公司; *Burkholderia cepacia* Agar (BCA)、BCA添加剂,英国OXOID公司;蛋白胨,美国BD公司;酵母浸粉,安琪酵母股份有限公司;蔗糖、乳糖、氯化钠、磷酸二氢钾,国药集团化学试剂有限公司;丙酮酸钠、酚红、结晶紫,美国Sigma-Aldrich公司。

1.3 试验菌株

CICC10857洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*),购自中国工业微生物菌种保藏管理中心,该菌株同美国药典中ATCC25416菌株一致;CMCC(B)23005洋葱伯克霍尔德菌、CMCC(B)23006新洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)以及CMCC(B)23010神秘伯克霍尔德菌(*Burkholderia aenigmatica*),均来自中国食品药品检定研究院。

2 方法

利用表型观察、Biolog生化鉴定系统及RiboPrinter全自动基因指纹图谱鉴定系统对新鲜菌落进行鉴定分析。用BioNumerics软件(版本7.6)对试验菌株的核糖体带型图谱进行聚类分析。

2.1 培养基制备

按照干粉培养基制备说明制备TSA、BCSA、BCA培养基。

BCCSA培养基配方:琼脂14 g、蛋白胨10 g、丙酮酸钠7 g、氯化钠5 g、蔗糖2 g、磷酸二氢钾1.54 g、酵母提取物1.5 g、酚红0.02 g、结晶紫0.001 g、多粘菌素B 600000 U、庆大霉素10 mg和万古霉素2.5 mg。除琼脂、抗生素外,加纯水至1 L,混合上述配方成分,溶解后调节pH至(6.2±0.2)(25℃),然后加入琼脂,混匀,121℃灭菌15 min,冷却至45~50℃加入抗生素,混匀,倾注平皿。

2.2 试验菌株的处理

将试验菌株进行为期0.5年、1年与2年的冻存,-70℃长期冷冻保存,同时选用冻存时长为1年的各菌株进行连续6次的传代。将冻存及传代后的菌株划线至TSA,30~35℃培养18~24 h,获得新鲜的纯培养物。

2.3 菌落形态观察

将活化后的菌株新鲜培养物用生理盐水调节至适宜的浊度,并稀释至30~100 cfu/100 μL,分别

取100 μL菌液涂布至TSA、BCSA、BCCSA和BCA培养基平板上,于30~35℃培养48~72 h,进行菌落形态观察。

2.4 Biolog生化鉴定分析

挑取新鲜纯培养物,使之在接种液中分散并均匀混合,按照Biolog全自动生化鉴定系统操作要求,调节接种菌液的透光度,使其为90%~98%。按每孔100 μL的量将制好的接种菌液依次加入BiologGEN III细菌鉴定板的所有孔中,再将鉴定板置于仪器中对应的位置,创建试验批次,开始试验。应用Biolog生化鉴定分析仪将待测菌株的生化结果同数据库中生化谱进行比较,获得菌株的鉴定结果及生化反应图。

2.5 16S rRNA序列分析

使用细菌基因组快速提取试剂盒,提取上述经传代后的新鲜菌株的基因组核酸,采用紫外分光光度计检测所提取核酸的质量。对细菌16S rRNA序列进行特异性扩增,扩增引物:27f:5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',1492r:5'-TACGGCTACCTTGTACGACTT-3';扩增条件:1)预变性:95℃ 4 min;2)扩增循环:95℃ 30 s、50℃ 45 s、72℃ 1 min 30 s,共做35个循环;3)延伸:72℃ 5 min。

扩增产物的检测及测序委托北京诺赛基因组研究中心有限公司完成。将所得16S rRNA序列置于权威数据库(NCBI: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行比对,获得待测微生物16S rRNA分析结果。

2.6 RiboPrinter全自动基因指纹图谱鉴定分析

用接种环挑取TSA平皿上生长的新鲜单菌落至添加有缓冲液的无菌离心管中,每个样品制成一定浓度的菌悬液;各吸取30 μL菌悬液于样品架对应孔中,将样品架置于热处理工作站中进行加热处理。热处理后的样品中各加入5 μL的裂解缓冲液A和B,备用。按照仪器使用指南创建试验批次,将样品架放置于RiboPrinter样品孔中并加载试剂、耗材,选用EcoRI酶切系统,运行程序。

试验结束后系统会自动将待测菌株条带与Dupont ID数据库进行比对,对菌株进行鉴定分析,得到菌株鉴定结果。使用BioNumerics 7.6软件处理所得条带,基于皮尔森相关系数(Pearson Correlation Coefficient),采用非加权配对算术平

均法 (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages, UPGMA) 进行聚类分析。

3 结果与分析

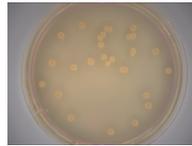
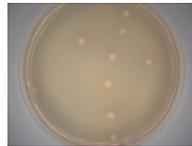
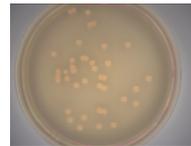
3.1 表型结果

为了更好地观察菌株的菌落形态, 本试验采用涂布培养后观察的方法。将0代各标准菌株活化后连续传代划线至TSA上, 30~35℃培养18~24 h, 获得1~6代新鲜的纯培养物。将1~6代菌株新鲜培养物用生理盐水调节至适宜的浊度, 取适量菌液 (<100 cfu) 涂布至TSA、BCSA和BCA培养基平板上, 于30~35℃培养48~72 h后进行菌落形态观察。涂布培养相当于又传了一代, 因而实际观察到的是

2至7代菌株的表型图。结果如表1~5所示, 表1~4展示了4种菌株连续传代后在4种培养基上的表型图, 表5为菌株在4种培养基上的形态学表型特征描述。

结果显示, 不同的Bcc菌株在同种培养基上的菌落颜色、形态存在差异。但整体而言, 相同培养时间内, 4种菌株在4种培养基上表面光滑、边缘较平整, 部分菌株表面略凹陷, 有金属光泽。各代次菌株的菌落形态、大小、颜色无明显差异, 在BCSA、BCCSA及BCA培养基上色素的颜色表征及色素产生时间无明显差异。各冻存菌株与传代菌株表型结果一致, 由此表明这4种菌株在表型特征方面具有稳定性。

表1 4种菌株连续传代6次于TSA培养基上的菌落形态

CICC10857					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23005					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23006					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23010					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7

注: P2、P3……P7为代次, 分别为2代、3代……7代。

表 2 4 种菌株连续传代 6 次于 BCSA 培养基上的菌落形态

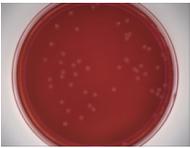
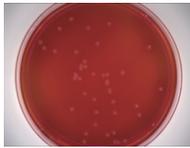
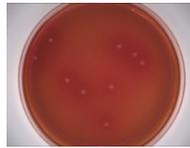
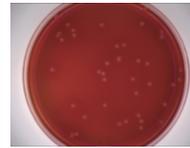
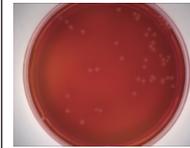
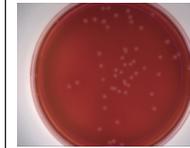
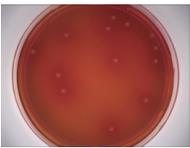
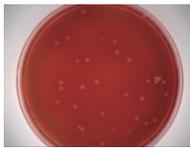
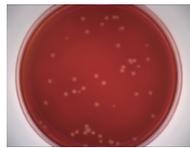
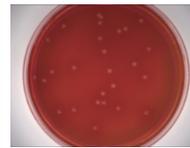
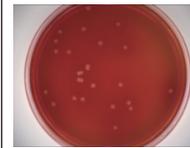
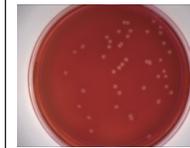
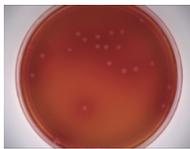
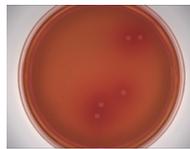
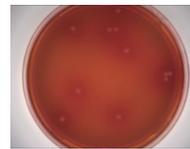
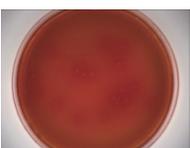
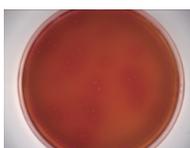
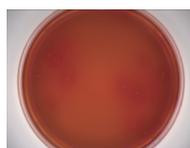
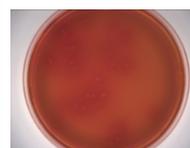
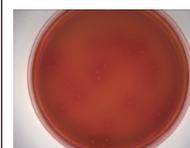
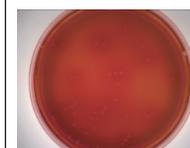
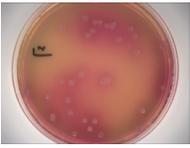
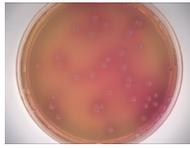
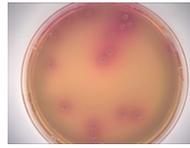
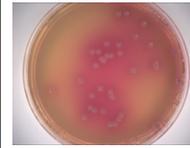
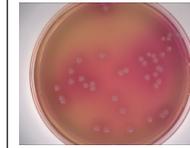
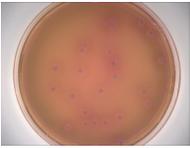
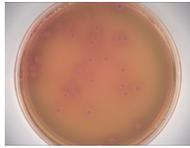
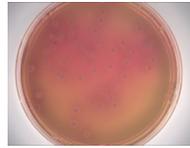
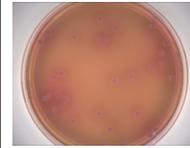
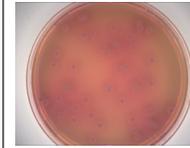
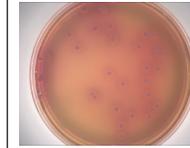
CICC10857					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23005					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23006					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23010					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7

表 3 4 种菌株连续传代 6 次于 BCCSA 培养基上的菌落形态

CICC10857					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23005					
					

续表 3

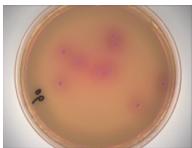
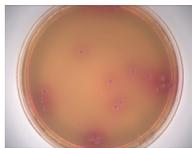
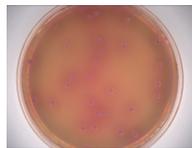
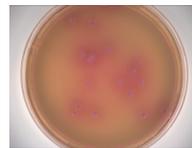
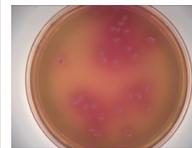
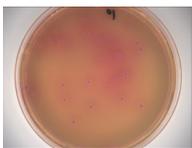
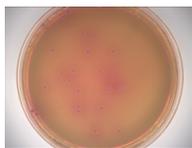
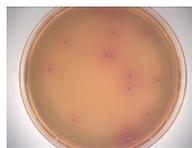
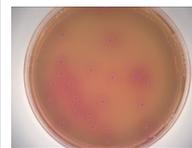
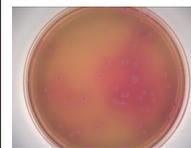
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23006					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23010					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7

表 4 4 种菌株连续传代 6 次于 BCA 培养基上的菌落形态

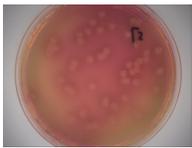
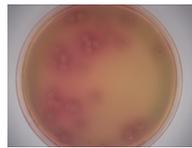
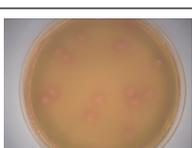
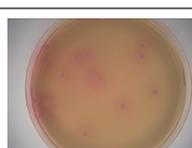
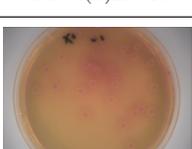
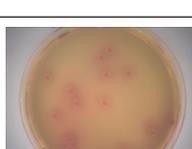
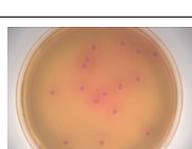
CICC10857					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23005					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23006					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7
CMCC(B)23010					
					
P2	P3	P4	P5	P6	P7

表5 4种菌株在4种培养基上形态学的表型特征描述

菌株	TSA	BCSA	BCCSA	BCA
CICC10857 (ATCC25416)	菌落圆形、亮黄色、 表面凸起、中间偏白	菌落圆形、灰白色、 表面凸起,菌落周围 培养基呈红色	菌落圆形、灰黄或土 黄色,菌落周围培养 基由黄色变玫红色	菌落圆形、扁平、灰黄 色、表面凸起,菌落 周围培养基呈玫红色
CMCC(B)23005	菌落圆形、黄色、表 面凸起	菌落圆形、黄灰色、 表面凸起,菌落周围 培养基呈红色	菌落圆形、灰粉色、 表面凸起,菌落周围 培养基呈现橘色或粉 红色	菌落圆形、扁平、灰 黄色、中间有凹陷、 颜色较深,菌落周围 培养基呈淡粉色
CMCC(B)23006	菌落圆形、黄色偏白、 表面凸起	菌落圆形、灰白色、 表面凸起,菌落周围 培养基呈红色	菌落圆形、灰粉色、 菌落周围培养基呈橘 色或粉红色	菌落圆形、灰粉色、 菌落扁平,菌落周围 培养基呈淡粉色
CMCC(B)23010	菌落圆形、灰黄色、 表面凸起、中心颜色 较深	菌落圆形、浅灰色、 菌落相对较小,表面 凸起菌落周围培养基 呈红色	菌落圆形、灰粉色、 菌落相对较小,菌落 周围培养基呈粉红色 或玫红色	菌落圆形、灰粉色、 菌落周围培养基呈粉 红色

3.2 Biolog生化鉴定分析结果

4种菌株各代的Biolog生化鉴定结果见表6。上述Biolog生化分析,均为种水平鉴定结果,受限于

现有数据库包含的菌株不全,各菌株代次之间鉴定结果略有差异,但菌株关键生化代谢属性稳定,鉴定结果均属Bcc。

表6 Biolog生化鉴定分析结果

菌株编号	代次	Biolog生化鉴定结果
CICC10857(ATCC25416)	P1	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P2	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P3	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P4	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P5	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P6	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
CMCC(B)23005	P1	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P2	<i>Burkholderia ambifaria/cepacia</i>
	P3	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P4	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P5	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>
	P6	<i>Burkholderia pyrrocinia/cepacia</i>

续表 6

菌株编号	代次	Biolog 生化鉴定结果
CMCC (B) 23006	P1	<i>Burkholderia dolosa</i>
	P2	<i>Burkholderia dolosa</i>
	P3	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	P4	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	P5	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	P6	<i>Burkholderia dolosa</i>
CMCC (B) 23010	P1	<i>Burkholderia ambifaria/cepacia</i>
	P2	<i>Burkholderia ambifaria/cepacia</i>
	P3	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	P4	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>
	P5	<i>Burkholderia anthina</i>
	P6	<i>Burkholderia vietnamiensis</i>

3.3 16S rRNA序列分析结果

16S rRNA序列分析结果显示, 不同冻存时间及

传代次数的同一株菌鉴定结果一致, 在该鉴定水平上, 菌株未发生遗传突变, 基因型稳定。见表7。

表 7 16S rRNA 鉴定分析结果

菌株编号	16S rRNA 鉴定结果 (NCBI 比对结果)
CICC10857-P1~P6 (1Y)、1/2Y、2Y	<i>Burkholderia cepacia complex</i>
CMCC(B)23005-P1~P6 (1Y)、1/2Y、2Y	<i>Burkholderia cepacia complex</i>
CMCC(B)23006-P1~P6 (1Y)、1/2Y、2Y	<i>Burkholderia cepacia complex</i>
CMCC(B)23010-P1~P6 (1Y)、1/2Y、2Y	<i>Burkholderia cepacia complex</i>

注: 1/2Y、1Y、2Y 代表冻存时间, 分别为 0.5 年、1 年、2 年。

3.4 RiboPrinter鉴定及聚类分析结果

3.4.1 RiboPrinter鉴定结果

RiboPrinter试验中待测菌的鉴定结果是根据试验数据与现有数据库进行比对, 以相似值 (DuPont ID Similarity) 最接近的结果为准得到的。如表8所示。受数据库收录参考微生物种类有限、覆盖性不够全面因素的影响, 导致部分菌株与已知菌种名

称不一致, 然而这并不影响对菌株稳定性的结果判读。根据RiboPrinter结果显示, 不同冻存时间及传代次数的同一株菌, 在RiboPrinter全自动基因指纹图谱鉴定系统上的鉴定结果是一致的。且每株 Bcc菌各冻存及各代次菌株与数据库中同一菌株的 DuPont ID Similarity值接近, 表明菌株6个代次间无明显差异。

表8 RiboPrinter鉴定结果

菌种编号	RiboPrinter 鉴定结果	DuPont ID Similarity
10857-1/2Y	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.95
10857-2Y	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.94
10857-1Y/10857-P1	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.96
10857-P2	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.95
10857-P3	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.94
10857-P4	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.95
10857-P5	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.96
10857-P6	<i>Burkholderia cepacia</i>	0.95
23005-1/2Y	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }*	{0.84}
23005-2Y	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.79}
23005-1Y/23005-P1	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.79}
23005-P2	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.83}
23005-P3	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.80}
23005-P4	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.79}
23005-P5	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.77}
23005-P6	{ <i>Burkholderia cepacia</i> }	{0.80}
23006-1/2Y	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.69}
23006-2Y	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.71}
23006-1Y/23006-P1	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.70}
23006-P2	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.68}
23006-P3	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.69}
23006-P4	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.76}
23006-P5	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.77}
23006-P6	{ <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> }	{0.76}
23010-1/2Y	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.66}
23010-2Y	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.62}
23010-1Y/23010-P1	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.64}
23010-P2	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.65}

续表 8

菌种编号	RiboPrinter 鉴定结果	DuPont ID Similarity
23010-P3	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.67}
23010-P4	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.64}
23010-P5	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.66}
23010-P6	{ <i>Achromobacter species</i> }	{0.66}

注：* 当与数据库中现有菌株的核糖体带型比对的相似值（DuPont ID Similarity，即 SIM 值）低于 0.85 时，RiboPrinter 全自动指纹鉴定系统显示的结果会添加“{}”。

3.4.2 聚类分析结果

由于RiboPrinter数据库中目前仅收录了Bcc成员中的4个种，分别是*Burkholderia cepacia*、*Burkholderia pyrrocinia*、*Burkholderia stabilis*及*Burkholderia vietnamiensis*。其中*Burkholderia cepacia*收录了40余个核糖体型，而其他几种只有1到2个核糖体型的收录。因此，RiboPrinter对于Bcc菌株尤其是野生菌株的鉴定效果不佳，绝大多数呈现偏低的DuPont ID Similarity值，无法得到可靠的鉴定结果。

试验中就RiboPrinter全自动指纹鉴定系统的另

一主要功能——菌株分型来讨论该仪器在菌株稳定性考察中的应用。图1显示，不同冻存时间的各菌株将聚类至各自分支，菌株分型的方法在菌株水平区分效果良好；CMCC(B) 23005和CICC10857（ATCC25416）同为*Burkholderia cepacia*，二者在核糖体分型同源性上更为接近，与另外两株不同种的Bcc区分显著。就单个菌株而言，冻存0.5年、1年以及2年的菌株，其核糖体条带可能会出现轻微的整体偏移，但同一个标准菌株核糖体带型高度相似，相似值可达0.95以上。

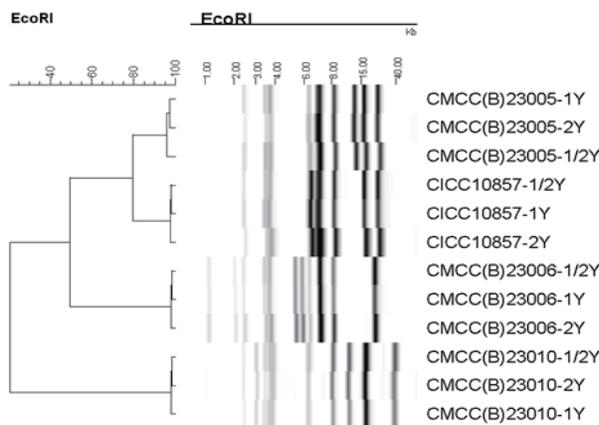


图1 冻存0.5年、1年与2年的菌株核糖体分型系统发育树状图

连续传代后菌株的分型结果与冻存稳定性结果一致，不同Bcc菌株的核糖体带型将聚类至各自的分支，体现该聚类分析方法在菌株水平的区分效果良好。个别带型在较大（>50kb）或较小（<2kb）的条带位置会出现浅带，可能是由每次

试验的菌悬液浓度、曝光程度的差异导致，并不影响聚类分析结果。图2表明，4株Bcc菌株连续传代至第6代，同一标准菌株不同代次的核糖体带型高度相似，相似值可达0.95以上。

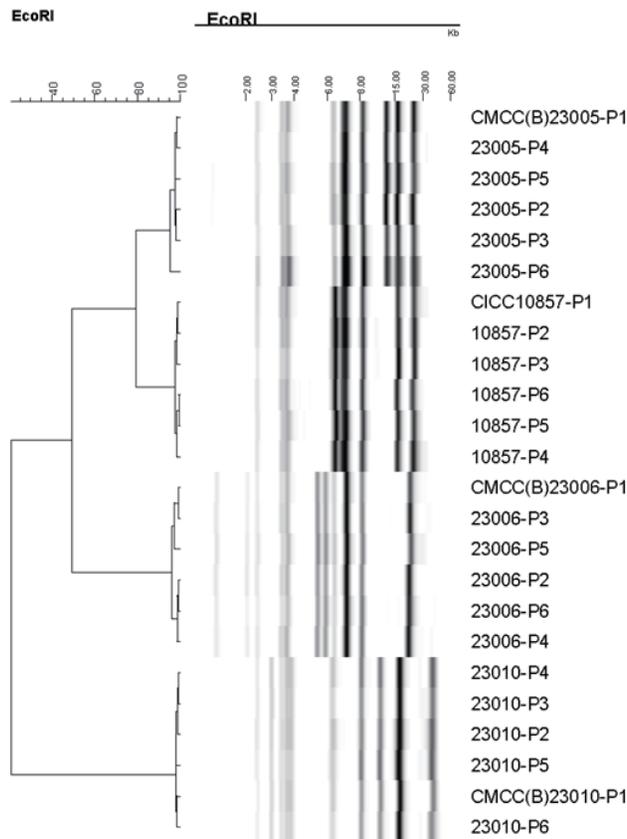


图2 试验菌株连续传代后的核糖体分型系统发育树状图

4 讨论

标准菌株是药品微生物检验中重要的质量控制工具。在药品微生物检验中,通常利用试验菌株在特定培养基上的表型(如菌落大小、形态、颜色等)、显微特征(革兰氏染色、菌体细胞形态等),以及在固体或液体培养基上的生长状态和活性、对抑菌物质的耐受能力等对相应的试验方法进行适用性考察或试验过程的有效性考察。各国药典均要求试验菌株在一定的传代或冻存条件下使用,以保证上述特性的稳定。

本文采用常用的微生物鉴定和分型方法,以美国药典USP43-NF38<60>中的Bcc标准菌株CICC10857(ATCC25416)作为参考菌株,对《中国药典》Bcc检查方法所选标准菌株CMCC(B)23005、CMCC(B)23006和CMCC(B)23010分别进行传代和冻存稳定性考察,结果表明,冻存及连续传代6代,各Bcc菌株在TSA培养基和选择性培养基上的表型稳定;经Biolog生化鉴定分析,不同

Bcc菌株的各代次菌样鉴定结果略有差异,但均属于Bcc。这是由Bcc的表型特征决定的,Bcc各成员之间表型近似,很难用有限的碳源代谢特征进行区分,试验结果表明各菌株的不同代次均表现出典型的Bcc代谢特征且稳定性良好。从基因型上看,16S rRNA序列分析结果表明各菌株的不同代次菌样无碱基变化,与NCBI数据库比对结果一致;利用RiboPrinter全自动基因指纹图谱技术对上述Bcc菌株传代和冻存的核糖体分型进行分析,结果表明连续传代6代,冻存0.5年、1年及2年的各菌株核糖体带型高度相似,相似值均可达0.95或以上,稳定性较好。

综上,通过表型和基因型鉴定/分型技术,对《中国药典》Bcc检查法所选标准菌株的传代和冻存稳定性进行考察,结果发现上述菌株满足药典要求,稳定性良好,可以作为《中国药典》Bcc检验方法的标准菌株使用。

参考文献：

- [1] Correa-Ruiz A, Girón R, Buendía B, et al. Burkholderia Cepacia Complex Infection in an Adult Cystic Fibrosis Unit in Madrid[J]. Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 2013, 31 (10) : 649-654.
- [2] Garcia B A, Carden J L, Goodwin D L, et al. Implementation of a Successful Eradication Protocol for Burkholderia Cepacia Complex in Cystic Fibrosis Patients [J]. BMC Pulmonary Medicine, 2018, 18 (1) : 35.
- [3] Zurita J, Mejia L, Zapata S, et al. Healthcare-Associated Respiratory Tract Infection and Colonization in an Intensive Care Unit Caused by Burkholderia Cepacia Isolated in Mouthwash[J]. International Journal of Infectious Diseases, 2014, 29: 96-99.
- [4] Mahenthiralingam E, Urban T A, Goldberg J B. The Multifarious, Multireplicon Burkholderia Cepacia Complex [J]. Nature Reviews Microbiology, 2005, 3 (2) : 144-156.
- [5] Torbeck L, Raccasi D, Guilfoyle DE, et al. Burkholderia Cepacia: This Decision is Overdue[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology, 2011, 65 (5) : 535-543.
- [6] Sutton S, Jimenez L. A Review of Reported Recalls Involving Microbiological Control 2004-2011 with Emphasis on FDA Considerations of Objectionable Organisms[J]. American Pharmaceutical Review, 2012, 15 (1) : 42-57.
- [7] FDA. FDA Advises Drug Manufacturers that Burkholderia Cepacia Complex Poses a Contamination Risk in Non-sterile, Water-based Drug Products[EB/OL]. [2021-12-07]. <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability>.
- [8] USP43-NF38[S]. 2019: 6454-6457, 7845-7850.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部 [S].北京: 中国医药科技出版社, 2020: 499-500.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. EP 10.0: Vol I [S]. Strasbourg: EDQM, 2019: 201-205.
- [11] 范一灵, 蒋波, 房蕊, 等. 药品无菌检查中微生物污染的鉴定和污染溯源分析[J]. 药物分析杂志, 2011, 31 (6) : 1067-1072.
- [12] 王似锦, 余萌, 胡昌勤, 等. 14株伯克霍尔德菌的鉴定分析[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44 (10) : 1214-1219.
- [13] 周江林, 孔娜, 张琪, 等. 洋葱伯克霍尔德菌复合群部分菌株基于基因组的物种水平重鉴定[J]. 生物技术通讯, 2019, 30 (6) : 733-739.
- [14] 余萌, 王似锦, 戴翠, 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.
- [15] 黄新新, 何苗, 韩伟, 等. 迟缓爱德华氏菌EcoR I核糖体自动化分型与聚类分析[J]. 微生物学通报, 2016, 43 (10) : 2249-2253.
- [16] Matloob Mazin, Griffiths Mansel. Ribotyping and Automated Ribotyping of Listeria Monocytogenes[J]. Methods in Molecular Biology, 2014, 1157: 85-93.

(收稿日期 2021年12月22日 编辑 邹宇玲)