

# 药品无菌检查中微生物污染的鉴定和污染溯源分析

范一灵 蒋波 房蕊 鲍英 徐伟东

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

**摘要** 目的: 本研究结合无菌药品受微生物污染的案例, 通过多种技术手段分析药品微生物污染情况, 保证药品无菌检验结果判断的准确性, 对药品微生物污染追踪溯源提供技术支持。方法: 对从无菌检查阳性样品和实验环境中分离得到 14 株革兰氏阳性球菌进行鉴定和分型, 采用 VITEK 2 Compact、16S rRNA 基因测序技术、RiboPrinter 系统以及 DiversiLab 系统等手段对微生物进行同源性分析。结果: 无菌阳性样品中分离出的微生物经鉴定为 3 株溶血葡萄球菌、4 株沃氏葡萄球菌和 5 株表皮葡萄球菌, 从环境中得到 2 株表皮葡萄球菌。由同源性分析可知, 来源于不同产地的样品中分离出来的同种微生物亲缘关系较远, 来源不同, 与环境中收集到的微生物不相关。若仅考虑现有收集到的环境监控菌, 污染源是样品在加工或运输过程中引入的, 与无菌检查环境无关。结论: 通过对 14 株葡萄球菌的鉴定和溯源分析, 综合评价多种技术手段的分型效果, 以完善药品无菌检查过程控制, 为药品微生物污染的溯源调查提供解决方案。

**关键词:** 药品; 污染; 微生物; 溶血葡萄球菌; 沃氏葡萄球菌; 表皮葡萄球菌; 基因测序; 鉴定; 溯源

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)06-1067-06

## Identification and characterization of bacterial contaminations isolated from drug sterility test

FAN Yi-ling, JIANG Bo, FANG Rui, BAO Ying, XU Wei-dong

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China)

**Abstract Objective:** To analyze a case of drug contamination by several microbiological and biochemical methods to reassure the result of sterility test and give technical supports for inspectors to trace the microorganism. **Method:** Fourteen gram-positive cocci isolated from sterilized drug samples and inspection environment, were identified and characterized by VITEK 2 Compact system, 16S rRNA gene sequencing technique, RiboPrinter system and DiversiLab system. **Result:** Three strains of *Staphylococcus haemolyticus*, four strains of *Staphylococcus warneri* and five strains of *Staphylococcus epidermidis* were identified from drug samples, and two strains from environment were identified as *Staphylococcus epidermidis*. Strains in the same species but not isolated from same pharmaceutical product were characterized into different types by the analysis of phylogenetic relationships. If the strains isolated from environment were representativeness, the source of drug contamination would be introduced from process and transportation steps, and it was not related to the inspection environment. **Conclusion:** The methods for bacteria characterization was evaluated to supplement for the process control of drug sterility test and to give a support for investigation of drug contamination.

**Key words:** drug; contaminate pollute; microorganism; *Staphylococcus haemolyticus*; *Staphylococcus warneri*; *Staphylococcus epidermidis*; identification; characterization

药品微生物无菌检查是药品质量中对微生物限量的最高要求, 任何微生物的存活对于用药者而言都可能是致命的存在。我国早在 1953 年版中国药典就收载无菌检查方法, 经历数次修订, 2010 年版中国药典不仅完善了无菌检查方法, 还将无菌检查

的药品范围扩大到所有眼用制剂和烧伤或严重创伤的外用剂型<sup>[1]</sup>。这为加强我国药品质量, 降低药品微生物污染风险起到了推动作用。

但是, 无菌检查法作为终产品检查法虽能防止问题产品流向消费领域, 却无法对药品检验进行过

程控制,无法解决药品微生物污染来源问题,也无法向监管机构提供有效的微生物风险评估和风险管理的信息。随着技术的进步,分子生物学技术在微生物鉴定和分型领域得到广泛的认可和应用,包括聚合酶链式反应(PCR)技术、DNA测序技术<sup>[2,3]</sup>、脉冲电场泳(PFGE)技术<sup>[4]</sup>、核糖体分型(RiboTyping)技术<sup>[5]</sup>、重复序列PCR(Rep-PCR)分型技术<sup>[6]</sup>和多位点序列分析(MLST)技术<sup>[7]</sup>等。尤其是自动化仪器的出现,克服了微生物分型手工操作烦琐、稳定性差的问题,极大地缩短了检验时间<sup>[8]</sup>。研究表明,全自动的分型技术(RiboPrinter和DiversiLab等)虽然分辨率较PFGE稍差,但比PFGE的耗时缩短一半以上,且灵敏度和重复性则有较大提高<sup>[5,9]</sup>。另外,充分利用各种分子生物学分型技术,可以为微生物溯源调查提供可信的标准化数据支持<sup>[10-12]</sup>。而我国还未建立起有效的药品无菌检查微生物污染溯源调查方法和判断依据。

对来自不同产地的多批药品进行无菌检查,连续出现多批样品无菌检查阳性结果。对阳性样品中的微生物进行胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)平板分离培养后得到12株细菌革兰氏阳性球菌。在实验过程中,TSA沉降平板亦收集到2株革兰氏阳性球菌。因此,怀疑检测环境受到微生物污染,影响无菌检查结果。本实验通过采用多种国际先进的微生物鉴定和溯源方法(VITEK 2 Compact、16S rRNA基因测序

技术、RiboPrinter系统以及DiversiLab系统),对这14株革兰氏阳性球菌进行详细的菌种鉴定和基因分型,分析无菌检查过程中微生物污染来源,判断样品的无菌检验结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 细菌菌株来源

2位实验人员在独立的2个局部百级的万级无菌环境内,根据2005年版中国药典要求对来源于2个产地不同批次的药品进行无菌检查。样品在硫乙醇酸盐培养基(Fluid thioglycollate medium,FTM)(35℃±1℃,24h)和改良马丁培养基(modified martin broth,MMB)(25℃±1℃,24h)中均有微生物浑浊生长。取上述培养物经胰蛋白胨大豆琼脂(TSA)划线分离,于35℃培养24h得到12株细菌,经革兰氏染色后均为革兰氏阳性球菌(表1)。在同一实验过程中,无菌室环境监控时收集到2株沉降菌也为革兰氏阳性球菌,怀疑存在实验过程中球菌交叉污染的可能,因此对14株革兰氏阳性球菌进行鉴定和基因分型。

微生物基因组DNA提取采用细菌基因组DNA提取试剂盒(美国QIAGEN公司),按其操作说明操作。细菌DNA置于TE缓冲液[10mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl;1mmol·L<sup>-1</sup> EDTA,pH 8.0]中-20℃保存备用。

表1 微生物来源及鉴定结论

Tab 1 The resources and identification results of bacteria tested

编号 (No.)	来源 (source)	样品批号 (batch)	培养基 (medium)	人员 (inspector)	细菌鉴定结论 (identification conclusions)
BD4	无菌室(clean room)	/	TSA <sup>1</sup>	/	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD6	无菌室(clean room)	/	TSA	/	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD7	A	SIFDCA01	FTM <sup>2</sup>	甲(inspector 1)	溶血葡萄球菌( <i>Staphylococcus haemolyticus</i> )
BD8	A	SIFDCA01	MMB <sup>3</sup>	乙(inspector 2)	溶血葡萄球菌( <i>Staphylococcus haemolyticus</i> )
BD9	B	SIFDCB01	FTM	甲(inspector 1)	沃氏葡萄球菌( <i>Staphylococcus warneri</i> )
BD10	B	SIFDCB01	FTM	甲(inspector 1)	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD11	B	SIFDCB01	FTM	乙(inspector 2)	沃氏葡萄球菌( <i>Staphylococcus warneri</i> )
BD12S	B	SIFDCB01	MMB	甲(inspector 1)	沃氏葡萄球菌( <i>Staphylococcus warneri</i> )
BD13	B	SIFDCB01	MMB	乙(inspector 2)	沃氏葡萄球菌( <i>Staphylococcus warneri</i> )
BD14	B	SIFDCB01	MMB	乙(inspector 2)	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD15	B	SIFDCB02	FTM	甲(inspector 1)	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD16	B	SIFDCB02	FTM	乙(inspector 2)	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD17	B	SIFDCB02	MMB	甲(inspector 1)	表皮葡萄球菌( <i>Staphylococcus epidermidis</i> )
BD18	B	SIFDCB02	MMB	乙(inspector 2)	溶血葡萄球菌( <i>Staphylococcus haemolyticus</i> )

注(note): 1. TSA: 胰蛋白胨大豆琼脂(Tryptic soy agar); 2. FTM: 硫乙醇酸盐培养基(Fluid thioglycollate medium); 3. MMB: 改良马丁培养基(modified martin broth)

## 1.2 细菌鉴定方法

**1.2.1 全自动微生物生化鉴定** 对分离得到微生物用 VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定仪(法国生物梅里埃公司),选择革兰氏阳性鉴定卡片(GPI)根据仪器生产厂商提供的说明书进行操作。

### 1.2.2 16S rRNA 基因测序鉴定方法

采用正向引物 27F: 5′-AGAGTTTGATCCTG-GCTCAG-3′和反向引物 1492R: 5′-ACGGCTAC-CTTGTTACGACT T-3′扩增细菌 16S rRNA 基因序列。PCR 体系为: 2 μL 细菌基因组 DNA; 1 U *rTaq* DNA 聚合酶; 1 × PCR 缓冲液 (Mg<sup>2+</sup> plus); 4 种 dNTP 各 200 μmol · L<sup>-1</sup>; 上、下游引物各 200 pmol · L<sup>-1</sup>; 加蒸馏水至终体积 50 μL。PCR 反应条件为: 100 °C 热盖; 95 °C 持续变性 1 min; 95 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min 于 4 °C 保存。将 PCR 产物 7 μL 经 1.5% 琼脂糖凝胶在 1 × TAE 缓冲液, 180 V 电压下电泳 40 min 后, 用 3 × GelRed 核酸染料溶液浸泡 15 min, 置于紫外成像仪进行观察。

DNA 测序由 Invitrogen 公司、生工公司和上海基康公司 3 家分别独立提供, 测序结果经信号分析和核对后汇总确定。测序序列提交 GenBank 网站 ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)) 比较, 选取具有最大核酸相似度的一种或几种细菌结果作为参考。

**1.2.3 RiboPrinter 仪器鉴定方法** 采用 RiboPrinter (美国 DuPont 公司) 全自动微生物鉴定系统, 通过 *EcoRI* 内切酶酶切, 根据仪器生产厂商提供的说明书操作, 得到微生物 DNA 杂交指纹图谱, 与仪器提供的标准数据库比较, 得到菌株的最近似鉴定结果。

## 1.3 菌株同源性分析方法

**1.3.1 16S rRNA 基因同源性分型** 采用 ContigExpress 9.1.0 软件对 16S rRNA 基因测序结果进行拼接和对齐, 根据 ClustalX 1.83 软件和 MEGA 3.1 软件的 Neighborhood - Joining 算法构建 16S rRNA 基因同源性关系图。

**1.3.2 RiboPrinter 仪器分型** 根据 DNA 显影后指纹图谱中条带的数量、位置和颜色深浅度, 利用数据分析软件 BioNumerics 进行分析, 构建基于 RiboPrinter 方法的基因分型同源性关系图。

**1.3.3 DiversiLab 仪器分型** 根据 DiversiLab 仪器(法国生物梅里埃公司)配套的葡萄球菌试剂盒配

置 Rep - PCR 反应体系, Rep - PCR 扩增程序如下: 94 °C 变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 45 °C 退火 30 s, 70 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 最后 7 °C 延伸 3 min; 保存于 4 °C。吸取 1 μL 的 PCR 产物加入芯片的标本孔中, 按仪器生产厂商提供的说明书进行芯片电泳操作, 采用仪器自带软件绘制基因分型同源性关系图。

## 2 结果

**2.1 菌株鉴定结果** 采用“1.2”项下所列 3 种方法对 14 株革兰氏阳性球菌的鉴定结果进行汇总分析, 所得最终鉴定结论列于表 1。其中 BD4、BD6、BD10、BD14、BD15、BD16 和 BD17 号细菌鉴定为表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*); BD7、BD8 和 BD18 号细菌鉴定为溶血葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)。对于 BD9、BD11、BD12S 和 BD13 号细菌鉴定结果, 3 种方法均为沃氏葡萄球菌 (*Staphylococcus warneri*) 或巴斯德葡萄球菌 (*Staphylococcus pasteurii*) 中的 1 种。VITEK 2 Compact 鉴定仪提示: 沃氏葡萄球菌的菌落颜色为奶白色, 而巴斯德葡萄球菌的菌落颜色为黄色, 综合平板菌落颜色为奶白色的信息, 判定上述 4 种细菌为沃氏葡萄球菌。

### 2.2 葡萄球菌的同源性分析结果

**2.2.1 16S rRNA 基因同源性分型结果** 3 株溶血葡萄球菌 (BD7、BD8 和 BD18) 和 4 株沃氏葡萄球菌 (BD9、BD11、BD12S 和 BD13) 在各自种内的 16S rRNA 基因水平无差异, 同种菌株可以分为一类。表皮葡萄球菌可分为 2 组: RA1 (BD4、BD6、BD15 和 BD16); RA2 (BD10、BD14 和 BD17) (图 1)。通过独立的 3 次测序结果证实, RA1 和 RA2 两组之间在 16S rRNA 基因序列上仅存在 1 个腺嘌呤 (A) 到胸腺嘧啶 (T) 的突变。

**2.2.2 RiboPrinter 仪器同源性分析结果** 采用 RiboPrinter 仪器对分离的微生物进行基因分型, 假定相似率大于或等于 93% 可以归为一组 (图 2)。溶血葡萄球菌 (BD7、BD8 和 BD18) 之间在此方法下分型无差异。沃氏葡萄球菌可分为 2 组: BD9 和 BD12S 为一组, BD11 和 BD13 可分为另一组; 表面葡萄球菌可分为 3 组: RP1 (BD4、BD6、BD15 和 BD16), RP2 (BD10 和 BD17), RP3 (BD14)。对于 RP1 类葡萄球菌的探针杂交图条带的位置和浓度基本一致, 只是由于电泳和转膜时条带的位置整体有漂移, 造成分型结果有偏差。

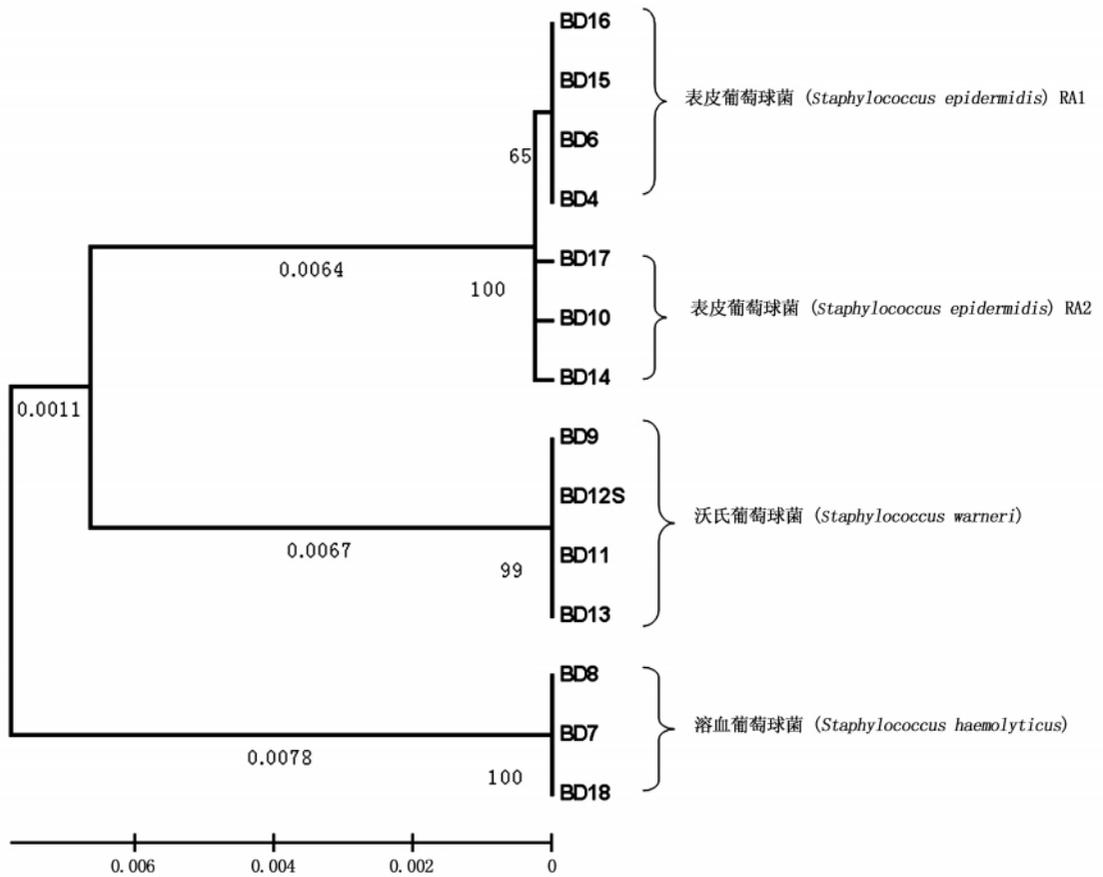


图1 葡萄球菌 16S rRNA 基因序列同源性分析图(N-J法)

Fig 1 The phylogenetic relationship of *Staphylococcus* spp. from partial 16S rRNA gene sequencing analysis (N-J method)

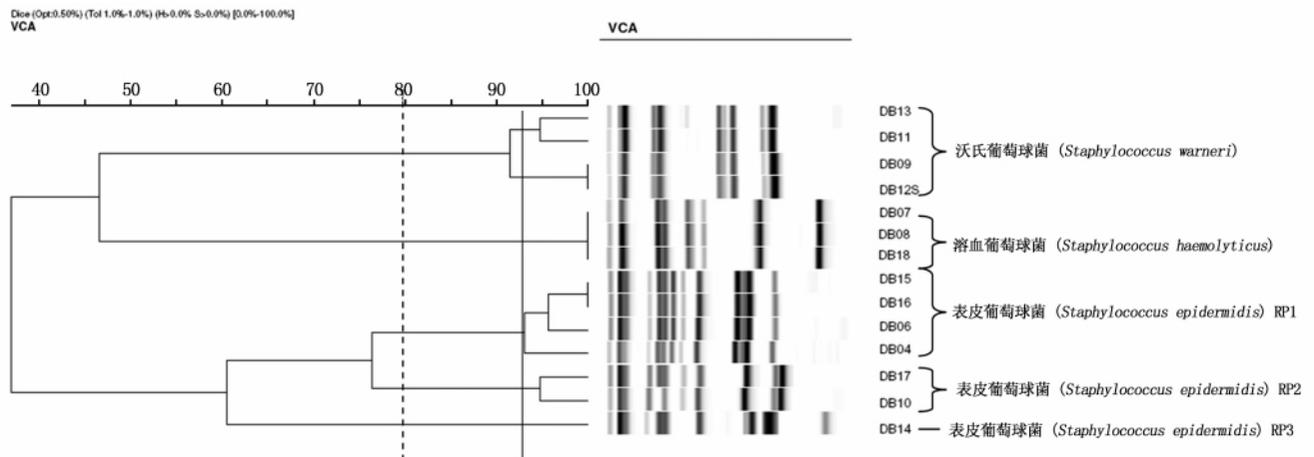


图2 葡萄球菌 RiboPrinter 核酸探针杂交分型同源性分析图

Fig 2 The phylogenetic relationship of *Staphylococcus* spp. from RiboPrinter analysis

**2.2.3 DiversiLab 仪器同源性分析结果** 采用 DiversiLab 系统对分离的菌株样品进行分型,假定相似率大于 95% 以上可以归为一组(图 3)。溶血葡萄球菌可分为 2 组: BD7 和 BD8 为一组, BD18 单独为一组; 沃氏葡萄球菌可分为 2 组: BD9 和 BD12S 为一组, BD11 和 BD13 为一组; 表皮葡萄球菌可分

为 3 组: DL1( BD4 和 BD6) ,DL2( BD10 ,BD15 ,BD16 和 BD17) ,DL3( BD14) 。

**2.3 葡萄球菌污染源溯源结果**

**2.3.1 溶血葡萄球菌** 这 3 株溶血葡萄球菌的生化反应、16S rRNA 基因分析和 RiboPrinter 分析结果无差异。根据 DiversiLab 数据分析 BD7、BD8 号亲

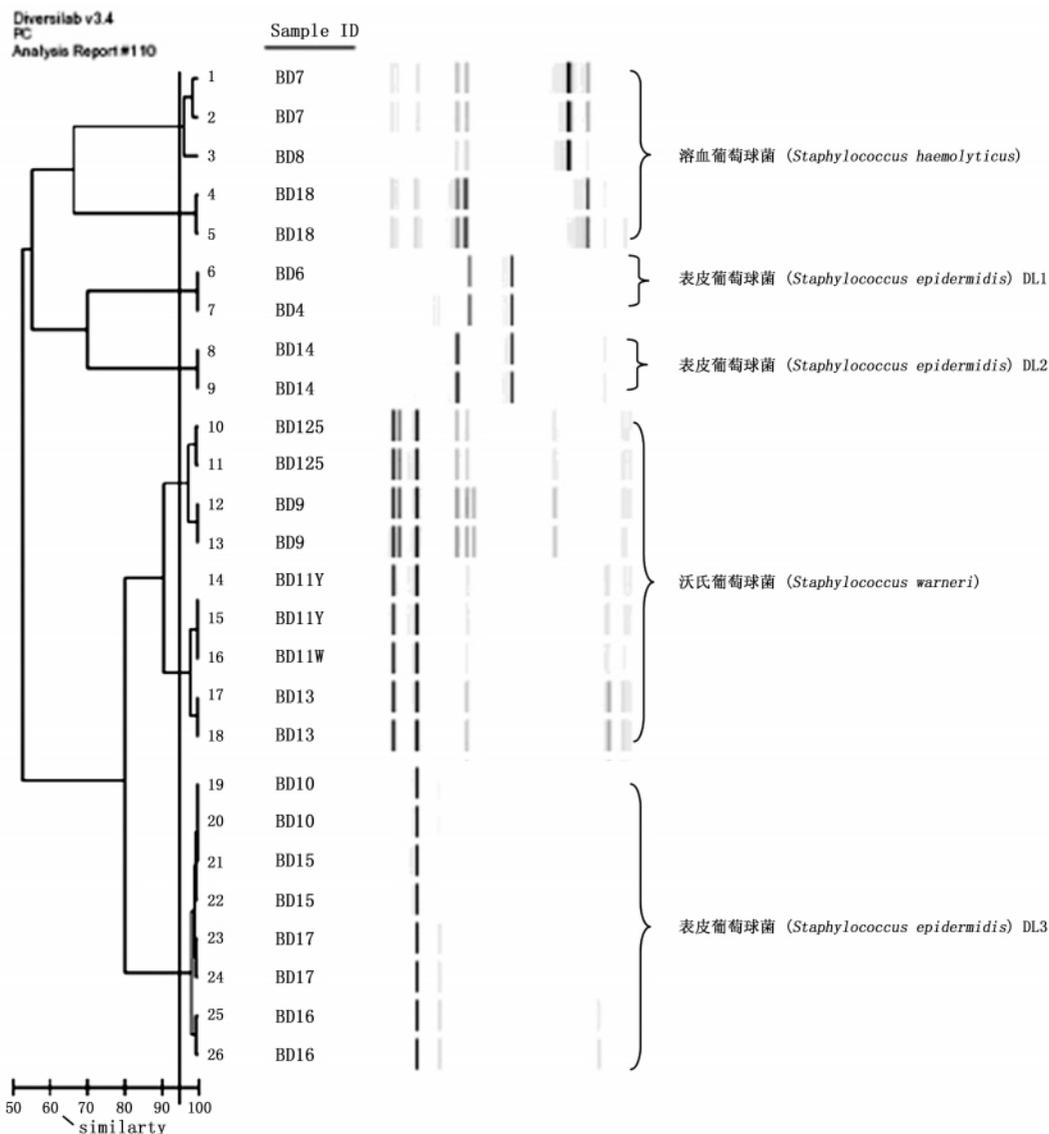


图3 葡萄球菌 DiversiLab 重复序列基因分型同源性分析图

Fig 3 The phylogenetic relationship of *Staphylococcus* spp. from DiversiLab analysis

缘关系很近,同源性很高;BD18号菌株与他们有差异。因此样品A和B中各自污染了不同的溶血葡萄球菌菌株,2个样品间没有交叉污染同种溶血葡萄球菌。

### 2.3.2 沃氏葡萄球菌

在16S rRNA基因分析水平上,4株沃氏葡萄球菌无显著差异。在生化反应中,BD11和BD13号菌株的乳糖发酵(LAC)和甘露醇发酵(MAN)反应均为阴性,而BD9和BD12S号菌株的LAC和MAN反应阳性。根据RiboPrinter和DiversiLab数据分析,沃氏葡萄球菌可分为两类,菌株BD9和BD12S同源性很高,BD11和BD13同源性很高,且两组之间有显著差异。

甲实验员在硫乙醇酸盐培养基和改良马丁培养

基中分离到具有较高同源性的沃氏葡萄球菌菌株BD9和BD12S;乙实验员在硫乙醇酸盐培养基和改良马丁培养基中均分离到具有较高同源性的沃氏葡萄球菌菌株BD11和BD13,且这2组沃氏葡萄球菌有明显差异。因此,B样品自身可能被2株来源不同的沃氏葡萄球菌污染。

### 2.3.3 表皮葡萄球菌

在生化反应中,BD4和BD6的LAC反应阴性,BD15和BD16的LAC反应阳性。根据16S rRNA基因分型结果,将表皮葡萄球菌分为2类,结合DiversiLab分析结果,BD4和BD6号同源性很高,BD15和BD16号同源性很高,BD10和BD17号同源性很高,BD14号菌株与前3组之间均有差异。环境中收集到的表皮葡萄球菌BD4和BD6来源相同,样品B中分离到3种表皮葡萄球

菌,这3种表皮葡萄球菌与环境收集到的2株表皮葡萄球菌来源均不相同。因此,污染来源于样品自身,而非来源于检测环境。

### 3 讨论

经实验比较生化反应谱鉴定、16S rRNA 基因测序技术、RiboPrinter 技术和 DiversiLab 技术都能在微生物分型鉴定过程中提供十分有用的信息。

生化鉴定方法是经典的微生物鉴定技术,具有实验简单,判断方便,结果可靠的优势。但针对复杂的环境微生物种类和普遍存在的变异,使得生化鉴定方法的可信度受到怀疑。但作为基础的鉴定手段,其结果仍可以在微生物分型鉴定领域提供参考信息。

16S rRNA 基因测序已被广泛应用于微生物鉴定和分型领域,其鉴定功能在种属一级具有较高的准确度。但该技术只有在菌株进化距离相对较远时才能检测到有1个至几个碱基的突变。另外,还要考虑到测序技术自身的识别误差和16S rRNA 基因在微生物细胞内的多拷贝差异。因此,16S rRNA 基因测序技术在菌株层面上的分辨率较低。

以酶切图谱显示的 RiboPrinter 系统,可以在仪器数据库中比较相近图谱达到微生物鉴定目的,并根据酶切图谱的距离计算微生物亲缘关系的远近。虽然同样是针对核糖体 DNA 序列,但相比16S rRNA 基因要丰富很多,它还包括23S rRNA 基因和5S rRNA 基因以及这些基因间的间隔序列。本文所得出的同源性关系是在93%相似度的假设下得出,如果将相似度限值提高到95%(图2中虚线所示),则分类情况为:沃氏葡萄球菌中的DB13和DB11均单独成为1个分类;表皮葡萄球菌RP2的DB17和DB10之间也会有相对较大的差异,成为2个单独的分组。但由于这些数据不是同一批次进行的电泳分析,图谱存在相对位移偏差,因此将分类阈值放宽至93%。该技术为全自动集成设备,操作简单,在相同操作环境下能得到稳定和可比较的结果。

DiversiLab 系统是以 REP-PCR 技术为基础开发的。通过对微生物重复序列之间的 DNA 序列长度进行分析,对特定的微生物能提供较为丰富的微生物基因组 DNA 信息。本实验中通过 DiversiLab 系统将表皮葡萄球菌 RP1 组中又细分出 DL1 和 DL2 2 个组,并由生化实验进行了辅助验证。但 Di-

versiLab 系统操作步骤较多,对 PCR 的质量要求较高,由于引物竞争导致某些特征性的片段的扩增效率偏低,使得微生物分型出现偏差。

本研究采用了4种微生物鉴定分型方法,通过综合微生物多个方面的信息,分析了药品检验领域常见的污染菌(溶血葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和表皮葡萄球菌)之间的亲缘关系,以解决药品无菌检查中实际遇到的微生物污染和溯源问题。

### 参考文献

- 1 ChP(中国药典).2010. Vol II(二部): Appendix(附录) I
- 2 Song Y, Liu C, Bolanos M, et al. Evaluation of 16S rRNA sequencing and reevaluation of a short biochemical scheme for identification of clinically significant Bacteroides species. *J Clin Microbiol*, 2005, 43 (4): 1531
- 3 Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol*, 2007, 45 (9): 2761
- 4 Gerner-Smidt P, Hise K, Kincaid J, et al. PulseNet USA: a five-year update. *Foodborne Pathog Dis*, 2006, 3 (1): 9
- 5 Pavlic M, Griffiths MW. Principles, applications, and limitations of automated ribotyping as a rapid method in food safety. *Foodborne Pathog Dis*, 2009, 6 (9): 1047
- 6 Lyautey E, Lu Z, Lapen DR, et al. Optimization and validation of rep-PCR genotypic libraries for microbial source tracking of environmental Escherichia coli isolates. *Can J Microbiol*, 2010, 56 (1): 8
- 7 Maiden MC. Multilocus sequence typing of bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 2006, 60: 561
- 8 Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ, et al. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1999, 34 (4): 263
- 9 Tenover FC, Gay EA, Frye S, et al. Comparison of typing results obtained for methicillin-resistant staphylococcus aureus isolates with the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 2009, 47 (8): 2452
- 10 Mammina C, Manfreda G, Aleo A, et al. Molecular typing reveals frequent clustering among human isolates of listeria monocytogenes in Italy. *J Food Prot*, 2009, 72 (4): 876
- 11 Grisold AJ, Zarfel G, Strenger V, et al. Use of automated repetitive-sequence-based PCR for rapid laboratory confirmation of nosocomial outbreaks. *J Infect*, 2010, 60 (1): 44
- 12 Meays CL, Broersma K, Nordin R, et al. Source tracking fecal bacteria in water: a critical review of current methods. *J Environ Manage*, 2004, 73 (1): 71

(本文于2010年7月29日收到)