

生物制品无菌制剂污染菌风险及无菌检查法培养条件调查

厉高慤^a, 赵宇豪^a, 杨燕^b, 凌今^a, 陈钢^a, 杨美成^b, 邵泓^{a*} (上海市食品药品检验研究院, a.国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室, b.国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室, 上海 201203)

摘要: 目的 调查中国药典无菌检查法中保留生物制品特殊培养条件的必要性。方法 对全国范围内的生物制品生产企业开展为期 2 年的产品和高等级洁净区中捕获污染菌种属和频数调查, 并对污染菌培养条件进行核实。结果 在生产企业上报的有明确鉴定结果的污染菌中, 未发现必须采用硫乙醇酸盐流体培养基低温(20~25 °C)培养的需求。结论 从培养谱角度, 在基于风险的前提下, 建议中国药典无菌检查法对生物制品特殊培养要求进行修订。

关键词: 生物制品; 无菌检查法; 特殊培养条件; 污染菌风险

中图分类号: R945 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2023)06-0840-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221999

引用本文: 厉高慤, 赵宇豪, 杨燕, 等. 生物制品无菌制剂污染菌风险及无菌检查法培养条件调查[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(6): 840-847.

Investigation on the Risk of Contaminating Microbe in Sterile Preparations of Biologics and the Culture Conditions of Sterility Test

LI Gaomin^a, ZHAO Yuhao^a, YANG Yan^b, LING Jin^a, CHEN Gang^a, YANG Meicheng^b, SHAO Hong^{a*} (Shanghai Institute for Food and Drug Control, a.NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, b.NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiology, Shanghai 201203, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the necessity of retaining special culture conditions for biologics in the sterility test of Chinese Pharmacopoei. **METHODS** To carry out a 2-year investigation on the species and frequency of contaminated microbes captured in products and high-grade clean areas of biologics manufacturers nationwide, and verify the culture conditions of contaminated microbes. **RESULTS** There was no need to adopt fluid thioglycollate medium for low temperature (20–25 °C) culture of contaminated microbes reported by manufacturers with definite identification results. **CONCLUSION** From the perspective of culture spectrum, it is suggested to revise the requirements of special culture conditions for biologics in the sterility test of Chinese Pharmacopoeia based on risk assessment.

KEYWORDS: biologics; sterility test; special culture conditions; risk of contaminated microbes

生物制品大多为采用非终端灭菌工艺生产的无菌制剂, 工艺涉及生物过程和生物材料, 如细胞培养、活生物体材料提取等, 生产中所用的物料往往是污染微生物生长的良好培养基, 属于较高染菌风险的品种。为了降低污菌风险, 除了对生产工艺做好完善的设计、验证和日常过程控制之外, 原液、中间品和成品等各质控点的无菌检查也是重要的安全性质控工作之一。

经典无菌检查法依赖于将产品中的污染微生物捕获回收后, 采用合适的广谱培养基在合适的培养温度下使微生物恢复, 从而观察到肉眼可见的生长迹象以进行判断。因此, 培养基和培养温

度是检出污染菌的 2 个关键影响因素。

在各国药典的无菌检查法中, 硫乙醇酸盐流体培养基(fluid thioglycollate medium, FTM)是一款经典金标准培养基, 具有不可替代的巨大优势, 其处方可以满足各种需氧和厌氧细菌的营养需求, 特别是其可以在实验室普通有氧环境下提供局部厌氧层, 使得氧气需求不一的兼性厌氧细菌和专性厌氧细菌在厌氧层的不同深度均能够良好生长, 同时在培养基表面的氧化层, 专性需氧细菌也能生长^[1]。与 FTM 搭配使用的是胰酪大豆胨液体培养基(tryptone soybean broth, TSB), 主要用于真菌、专性需氧细菌以及兼性厌氧细菌的培养。

基金项目: 国家药品标准提高课题(2020S06, 2021S04); 上海市研发公共服务平台项目(19DZ2294600)

作者简介: 厉高慤, 男, 硕士, 副主任药师 E-mail: ligaomin_yjs@smda.sh.cn *通信作者: 邵泓, 女, 硕士, 主任药师 E-mail: shaohong@smda.sh.cn

在各国药典的无菌检查法中,根据培养基特性,为了广谱覆盖各类细菌和真菌的检出需求,规定了相应培养基和温度的组合要求。美国药典自 20 世纪 50 年代开始采用 FTM 置于 30~35 °C,而 TSB 置于 20~25 °C 的组合设计,业内公认可较好地实现对污染菌的广谱检测,并已成为欧美日药典协调案的一部分^[2-4],不论对于化学药,植物药还是生物制品的无菌检查,均采用这一培养体系。世界卫生组织(WHO)的生物制品无菌检查报告在 1973 年修订后沿用至今,也采用基本一致的设计^[5]。

中国药典几经修订,无菌检查法的培养体系已基本与国外标准接轨,对于化学药、中药的培养要求与国外药典一致,但对生物制品却规定了额外的 FTM 低温(20~25 °C)培养要求^[6]。这一特殊要求沿袭自以往《中国生物制品规程》,并涉及年代久远的药企产品污染事件:曾在低温 FTM 培养管中捕获污染菌。但是,由于当时条件所限无法深入调查,目前已无法溯源。长期以来,在中国药典的历次修订中,此项特殊要求一直是企业集中反馈,建议修订的焦点议题之一。为了研究这一历史遗留问题及其现实风险,国家药典委已立项进行相关课题研究。考虑此问题与企业的历史污染事件相关,本研究对中国生物制品企业当前的污染状况进行了调查。

1 调查方案设计

1.1 调查目的

从培养基的培养谱角度,调查生物制品生产过程中存在依赖 FTM 低温(20~25 °C)培养才能回收的污染菌的风险。

1.2 调查对象

调查对象为生物制品企业在高等级洁净生产环境和产品检验中发现的污染菌,包括成品检出污染菌、A/B 级环境污染菌,除此之外,还包括了无菌要求的原液、半成品、生物原辅料,以及培养基模拟灌装中发现的污染菌。

1.3 调查组织单位

由 7 家承担生物制品批签发职能的省级药检机构协同实施,设计统一问卷,历时 2 年在全国范围内对生物制品企业进行调查。

1.4 调查反馈信息

调查问卷要求企业对正在生产的各产品品种进行统计,反馈以下信息:品种名称和调查时段内的生产批数,污染菌捕获来源、数量以及鉴定

种属信息(鉴定方法不限)。并要求企业在反馈答卷的同时,做好污染菌的保存工作。

1.5 污染菌培养条件调查和分类

以属为基本单位,对企业反馈的污染菌类别和频数进行排序统计,考察其基本分布规律,并对污染菌鉴定结果,查询文献与药典培养基的匹配需求进行核实,判别是否有依赖 FTM 低温培养的需求,如发现可疑菌需核实调查。

由于 FTM 培养基主要用于培养细菌,而真菌可由 TSB 培养基进行培养,因此重点核查污染菌中的细菌鉴定信息,以伯杰系统细菌学手册第二版为标准,如为近年新报道的种属,则以该属首次报道的文献为依据。

1.6 产品加标条件下的高、低温培养试验

为排除生物制品本身性状可能对无菌检查带来的影响,要求企业将来自成品、原液以及中间品的污染菌分纯后,按统一方案进行高、低温培养试验:采用药典无菌检查方法适用性试验的方式,产品按日常检验数量和检验量取样并进行前处理,每个培养容器加标 ≤ 100 CFU 的污染菌,然后分别加入 FTM 和 TSB 培养基,每类培养基均设置高温组(30~35 °C)和低温组(20~25 °C),组内至少 3 份平行管,同步培养,逐日观察,考察报告阳性时间的快慢。

2 调查结果

2.1 参加调查的制品品种分布

参加调查的生物制品企业共 68 家,包括中国企业 67 家,国外企业 1 家,覆盖了所有现行生产血液制品和疫苗批签发品种的企业,共涉及品种 95 个,见表 1,包括血液制品、疫苗、重组单抗、重组激素/细胞因子/酶类、血筛诊断试剂、细胞治疗产品等,具有较好的代表性。

表 1 参加调查的品种数量

Tab. 1 Number of biologicals in the survey

品种类别	品种数量
疫苗	42
血液制品	21
重组单克隆抗体	7
细胞治疗产品	2
重组激素/细胞因子/酶类制品	17
体外诊断试剂	4
其他(生化药)	2
合计	95

2.2 涉及生产批数和报告污染菌数量

调查主要覆盖了 2020—2021 年期间生产和检验中捕获的污染菌，部分企业还上报了 2019 年甚至更早的数据。共涉及 32 556 批次产品的生产和检验，共报告污染菌数量 23 932 株。

污染菌的捕获来源包括了成品、A/B 级，以及其他无菌要求的过程控制样品、原辅料和模拟灌装，见表 2。

表 2 污染菌捕获来源

Tab. 2 Capture source of contaminating microbes

来源	污染菌数量/株
产品(成品)	158
A 级环境	4 200
B 级环境	18 580
其他	994
合计	23 932

2.3 污染菌鉴定结果的分布

2.3.1 总体分布情况 在上报的 23 932 株污染菌中，有明确鉴定结果的为 21 322 株(占比 89.09%)分布在 155 个属，其中细菌 21 234 株，分布在 131 个属；真菌 88 株，分布在 24 个属；而未鉴定或结果不明确的污染菌为 2 610 株，包括细菌 2 581 株和真菌 29 株。结果见表 3。

表 3 污染菌鉴定结果的分布

Tab. 3 Distribution of contaminating microbes identification results

鉴定结果的 分组	组内数 量/株	细菌或 真菌	所属门	备注
有明确鉴定 结果	21 322	细菌	Actinobacteria(放线菌门)	41 个属共 9 830 株
			Firmicutes(厚壁菌门)	37 个属共 10 422 株
			Proteobacteria(变形菌门)	46 个属共 940 株
			Bacteroidetes(拟杆菌门)	6 个属共 35 株
			Deinococcus-Thermus(异 常球菌-栖热菌门)	1 个属共 7 株
未鉴定或结 果不明确	2 610	真菌	/	24 个属共 88 株
		细菌	/	2 581 株
合计	23 932	真菌	/	29 株
		/	/	/

2.3.2 属水平的分布规律 对有明确鉴定结果的 21 322 株污染菌，以属水平进行频数排序，见表 4，频数最多的 10 个属包括 19 929 株，均为细菌，占 93.47%(以 21 322 株为分母，后同)。而其余 145

表 4 污染菌中频数最多的 10 个属

Tab. 4 Ten genera with the highest frequency of contaminated microbes

排序	属别	频数/ 株	占比(有鉴 定结果的 21 322 株)/ %	所属门	细胞形态
1	<i>Staphylococcus</i> (葡萄 球菌属)	9 349	43.85	厚壁菌门	阳性球菌
2	<i>Micrococcus</i> (微球菌 属)	6 759	31.70	放线菌门	阳性球菌
3	<i>Corynebacterium</i> (棒 杆菌属)	1 884	8.84	放线菌门	阳性杆菌
4	<i>Kocuria</i> (库克菌属)	628	2.95	放线菌门	阳性球菌
5	<i>Bacillus</i> (芽孢杆菌属)	568	2.66	厚壁菌门	阳性杆菌
6	<i>Moraxella</i> (莫拉菌属)	232	1.09	变形菌门	阴性，细胞 形态多变
7	<i>Paenibacillus</i> (类芽孢 杆菌属)	200	0.94	厚壁菌门	阳性杆菌
8	<i>Acinetobacter</i> (不动杆 菌属)	127	0.60	变形菌门	阴性杆菌
9	<i>Brevibacterium</i> (短杆 菌属)	91	0.43	放线菌门	阳性杆菌
10	<i>Streptococcus</i> (链球菌 属)	91	0.43	厚壁菌门	阳性球菌
/	上述 10 个属合计	19 929	93.47	/	/
/	其余 145 个属合计	1 393	6.53	/	/

个属仅有 1 393 株，占 6.53%，其中不少属出现频率极低，仅报告一两株。

在前 10 个属中：以葡萄球菌属、微球菌属等为代表的革兰氏阳性球菌 16 827 株，占比 78.92%(以 21 322 株为分母)；以棒杆菌属，芽孢杆菌属为代表的革兰氏阳性杆菌 2 743 株，占比 12.86%；以莫拉菌属、不动杆菌属为代表的革兰氏阴性球菌、杆菌 359 株，占比为 1.68%。

虽然在调查过程中，部分企业参与程度有所保留，或因质控体系的硬件软件水平的局限性，可能难以提供本企业所有的污染菌数据，但已上报数据的分布情况仍然符合国内外报道^[7-14]的制药洁净环境污染菌分布的一般规律：绝大多数污染菌集中在少量常见属中；数量占比从大到小为革兰氏阳性球菌-革兰氏阳性杆菌-革兰氏阴性杆菌，真菌和厌氧细菌检出为极小概率。

2.4 污染菌培养条件调查和分类

2.4.1 氧气需求和偏好温度分类 在上报的 23 932 株污染菌中，除未获得鉴定结果无法追溯的细菌 2 581 株外，剩余 21 351 株(有明确鉴定结果的细菌 21 234 株，明确鉴定的真菌 88 株，未明确鉴定的真菌 29 株)分布在不少于 155 个属。对这 155 个属，即使出现频数极低，也从严逐一文献核

实^[15-45],包括细胞形状、革兰氏染色、氧气需求、生长分离温度等信息。

对于培养检出影响最大的因素为氧气需求和生长温度。在伯杰手册及各文献报道中,关于氧气需求(严格需氧/兼性厌氧/严格厌氧)一般有明确说明;但关于生长温度的描述,不同作者来源的文字描述有一定差异,因此在核实分类时遵循以下从严原则:

①以2个温区的中间点28℃为划分偏好高温和低温的分界线;

②如明确记载最适生长温度(单点或范围),则以此为准从严判断;

③如某属的最佳生长温度范围>28℃,判定为≥28℃的高温菌类别,例如报道“最佳30~37℃”的情况;

④如某属的温度范围有部分<28℃,则从严判为低温菌。例如报道“通常25~30℃”的情况。

2.4.2 污染菌分类和培养条件需求 各国药典培养基与培养温度的经典组合中,FTM设置在30~35℃培养可良好支持兼性和专性厌氧细菌的生长,并兼顾需氧细菌和一部分真菌的生长,同时在大多数情况下,30~35℃可以获得比20~25℃更快的生长速度。

作为互补的TSB设置在20~25℃可良好支持包括偏好低温霉菌在内的真菌生长,也能良好支持需氧细菌的生长,对于后者,即使培养温度偏低,在长达14d的培养周期内,也可观察到生长迹象。

在这个培养体系设计中,即使出现真菌和厌氧细菌的小概率污染事件,也可保证检出。唯一可能存在漏检风险,而需要保留FTM 20~25℃条件仅有那些偏好低温的厌氧细菌,这也是本研究的焦点。

根据155个属的文献报道,综合各属的氧气需求(按专性厌氧细菌、兼性厌氧细菌、专性需氧细菌、真菌划分)和生长温度偏好(最适生长温度范围均≥28℃;最适生长温度范围部分<28℃)两方面的关键指标进行了分类,评估了药典培养基组合的漏检风险,见表5。结果表明,在企业所上报的污染菌中,暂未发现需要偏好低温FTM培养的厌氧细菌。所有发现的3个属75株专性厌氧细菌均为偏好30~35℃培养。

2.5 产品加标条件下的高低温培养试验

虽然上述调查未发现可疑的低温厌氧污染菌,为降低遗漏风险,排除生物制品本身性状可

能对无菌检查带来的影响,要求企业将来自成品,原液以及中间品的污染菌进行了产品加标条件下的高低温培养试验。

根据各企业上报,排除未保种或保种失败的污染菌,共有141株污染菌完成了试验,并未发现低温培养更快的情况,见表6。

课题组从企业处收集了此141株菌,并采用MALDI-TOF质谱方法对鉴定结果进行了复核,虽然部分鉴定结果与企业的鉴定结果有所差异,但所有鉴定的属信息均在表5的第1,2,3,5类中,不属于可疑的低温污染菌。

3 讨论

3.1 低温FTM培养要求的历史因素

生物制品因其不同于化学药的质量属性,长期以来具有独立的标准体系,WHO关于生物制品无菌检查的报告最早可以追溯至1959年,对于培养温度确有双温区设计(15~22℃和35~37℃)的保守建议,但也提出了单温区设计(30~32℃)也可满足要求^[46]。需注意的是,WHO在做出上述建议时提到,当时世界各国对于培养基品种和温度的选择是多元化的,因此后续还需研究最适合的培养基品种和培养温度。1973年,WHO修订上述报告^[5],明确了沿用至今,且与现行多国药典基本一致的培养基品种和温度设计:FTM置于30~36℃;TSB置于20~25℃。当然其中也提到了部分国家可能还采用其他温度用于培养嗜热菌或嗜冷菌。

中国药典无菌检查法对生物制品的FTM低温培养要求还关联自企业的历史污染事件,已无法溯源调查,更无法排除此为污染菌在低浓度下分布不均匀所导致的可能性。同时,该要求在中国的实践还有其他历史原因。在20世纪70~90年代,非终端灭菌的生物制品生产工艺无菌保障的硬件水平还较低,在无菌检查中额外增加1组培养管和相应的制品抽样支数可提高污染的检出率;无菌检查法还未引入TSB培养基,与FTM培养基搭配的是培养谱相对偏向真菌的改良马丁培养基,担心培养谱在互补中可能出现纰漏,为提高检出率,保留了FTM低温培养。

而在21世纪前20年,中国生物制品无菌生产条件已有了巨大的进步,生产工艺无菌保障的硬件水平有了很大的提高;同时质量源于设计,制品的无菌保障应更多依靠从源头开始的工艺验证和过程控制,而非依赖无菌检查,已成为业内的理念

表 5 污染菌按温度偏好和氧气需求分类

Tab. 5 Contaminating microbes classified by temperature preference and oxygen demand

需求和氧气 需求的类型	药典培养基组合 检出可能性	属的 数量/个	株的 数量/株	涉及的属
第 1 类: 最适温度 $\geq 28^{\circ}\text{C}$ 的细菌	不属于调查针对的低温偏好菌。其中专性厌氧细菌、兼性厌氧细菌由 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 培养检出。 专性需氧细菌由 TSB 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养检出, 而 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 也有培养检出的可能。	68	19 325	<i>Staphylococcus</i> (葡萄球菌属); <i>Micrococcus</i> (微球菌属); <i>Corynebacterium</i> (棒杆菌属); <i>Paenibacillus</i> (类芽孢杆菌属); <i>Moraxella</i> (莫拉菌属); <i>Streptococcus</i> (链球菌属); <i>Acinetobacter</i> (不动杆菌属); <i>Actinomyces</i> (放线菌属); <i>Kytococcus</i> (皮肤球菌属); <i>Cutibacterium</i> (贫氧杆菌属); <i>Roseomonas</i> (玫瑰单胞菌属); <i>Aerococcus</i> (气球菌属); <i>Neisseria</i> (奈瑟菌属); <i>Rothia</i> (罗斯氏菌属); <i>Stenotrophomonas</i> (寡养单胞菌属); <i>Dermabacter</i> (皮杆菌属); <i>Paracoccus</i> (副球菌属); <i>Amycolatopsis</i> (拟无枝酸菌属); <i>Sphingobacterium</i> (鞘氨醇杆菌属); <i>Lysinibacillus</i> (赖氨酸芽孢杆菌属); <i>Achromobacter</i> (无色杆菌属); <i>Burkholderia</i> (伯克霍尔德菌属); <i>Deinococcus</i> (奇异球菌属); <i>Fictibacillus</i> (假芽孢杆菌属); <i>Brucella</i> (布鲁菌属); <i>Facklamia</i> (费克蓝姆菌属); <i>Pantoea</i> (泛菌属); <i>Alicyclobacillus</i> (环酸芽孢杆菌属); <i>Massilia</i> (马赛菌属); <i>Nocardia</i> (诺卡氏菌属); <i>Pasteurella</i> (巴斯德菌属); <i>Propionibacterium</i> (丙酸杆菌属); <i>Comamonas</i> (丛毛单胞菌属); <i>Cronobacter</i> (克罗诺杆菌属); <i>Delftia</i> (戴尔福特菌属); <i>Exiguobacterium</i> (微小杆菌属); <i>Myroides</i> (类香味菌属); <i>Prauserella</i> (普劳瑟氏菌属); <i>Promicromonospora</i> (原小单胞菌属); <i>Arthrobacter</i> (节杆菌属); <i>Dietzia</i> (迪茨氏菌属); <i>Dolosigranulum</i> (狡诈菌属); <i>Enterococcus</i> (肠球菌属); <i>Granulicatella</i> (颗粒链菌属); <i>Shewanella</i> (希瓦氏菌属); <i>Shigella</i> (志贺氏菌属); <i>Bhargavaea</i> (布哈加瓦氏菌属); <i>Clostridium</i> (梭菌属); <i>Domibacillus</i> (房屋芽孢杆菌属); <i>Gemella</i> (孪生球菌属); <i>Geobacillus</i> (地芽孢杆菌属); <i>Klebsiella</i> (克雷伯菌属); <i>Providencia</i> (普罗威登斯菌属); <i>Pseudobacter</i> (假杆菌属); <i>Pseudoclavibacter</i> (假棍状菌属); <i>Pseudoxanthomona</i> (假黄单胞菌属); <i>Yersinia</i> (耶尔森菌属); <i>Alloiococcus</i> (差异球菌属); <i>Auricoccus</i> 属; <i>Aneurinibacillus</i> (硫胺素芽孢杆菌属); <i>Cellulomonas</i> (纤维单胞菌属); <i>Macrococcus</i> (巨型球菌属); <i>Mycobacterium</i> (分枝杆菌属); <i>Robertmurraya</i> 属; <i>Turicella</i> 属; <i>Gardnerella</i> (加德纳菌属); <i>Mixta</i> 属; <i>Mycolicibacterium</i> 属; <i>Niallia</i> 属
第 2 类: 最适温度范围 25°C 部分覆盖 $< 28^{\circ}\text{C}$ 区间且需氧	由 TSB 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养检出, 而 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 也有培养检出的可能。	49	1 275	<i>Dermacoccus</i> (皮生球菌属); <i>Ralstonia</i> (罗尔斯通氏菌属); <i>Chryseobacterium</i> (金黄杆菌属); <i>Janibacter</i> (两面神菌属); <i>Rhizobium</i> (根瘤菌属); <i>Leifsonia</i> (雷夫松氏菌); <i>Ochrobactrum</i> (苍白杆菌属); <i>Gordonia</i> (戈登氏菌属); <i>Methylobacterium</i> (甲基杆菌属); <i>Streptomyces</i> (链霉菌属); <i>Agrobacterium</i> (土杆菌属); <i>Alcaligenes</i> (pH 碱杆菌属); <i>Cupriavidus</i> (贪铜菌属); <i>Xanthomonas</i> (黄单胞菌属); <i>Aureimonas</i> (金色单胞菌); <i>Cohnella</i> (科恩氏菌); <i>Micromonospora</i> (小单胞菌属); <i>Ornithinibacillus</i> (鸟氨酸芽孢杆菌属); <i>Psychrobacillus</i> (嗜冷芽孢杆菌属); <i>Rhodococcus</i> (红球菌属); <i>Solibacillus</i> (土壤芽孢杆菌属); <i>Sporosarcina</i> (芽孢八叠球菌属); <i>Tsukamurella</i> (塚村菌属); <i>Variovorax</i> (贪噬菌属); <i>Ancylobacter</i> (屈曲杆菌属); <i>Aquicola</i> (水居菌属); <i>Curtobacterium</i> (短小杆菌属); <i>Elizabethkingia</i> (伊丽莎白菌属); <i>Haematobacter</i> (血液杆菌属); <i>Mariniluteicoccus</i> 属; <i>Raoultella</i> (拉乌尔菌属); <i>Weeksella</i> (威克氏菌属); <i>Alkalihalobacillus</i> (碱性卤杆菌属); <i>Leucobacter</i> (亮杆菌属); <i>Metabacillus</i> 属; <i>Nesterenkonia</i> (涅斯特连科氏菌属); <i>Nocardia</i> (诺卡菌属); <i>Priestia</i> 属; <i>Pseudarthrobacter</i> (假节杆菌属); <i>Pseudoglutamicibacter</i> (假谷氨酸杆菌属)
第 3 类: 温度范围部分覆盖 $< 28^{\circ}\text{C}$ 区间且兼性厌氧	TSB 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 和 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 都有培养检出能力	14	634	<i>Bacillus</i> (芽孢杆菌属); <i>Aeromonas</i> (气单胞菌属); <i>Cellulosimicrobium</i> (纤维微菌属); <i>Vibrio</i> (弧菌属); <i>Escherichia</i> (埃希菌属); <i>Leuconostoc</i> (明串珠菌属); <i>Serratia</i> (沙雷氏菌属); <i>Cytobacillus</i> 属; <i>Enterobacter</i> (肠杆菌属); <i>Pediococcus</i> (片球菌属); <i>Sanguibacter</i> (血杆菌属); <i>Skermanella</i> (斯克耳曼氏菌属); <i>Pelomonas</i> (嗜糖假单胞菌); <i>Peribacillus</i> 属
第 4 类: 温度范围部分覆盖 $< 28^{\circ}\text{C}$ 区间且厌氧	为本次调查的焦点: 偏好低温的专性厌氧细菌, 可能需要 FTM 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养检出。 但也不排除 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 也能培养检出。如有发现, 应进一步核实调查	未发现	未发现	未发现
第 5 类: 真菌(霉菌和酵母)	由 TSB 在 $20\sim 25^{\circ}\text{C}$ 培养检出, 同时 FTM 在 $30\sim 35^{\circ}\text{C}$ 也有检出可能	至少 24	117	<i>Aspergillus</i> (曲霉属); <i>Penicillium</i> (青霉属); <i>Cladosporium</i> (分枝孢子菌属); <i>Candida</i> (假丝酵母菌属); <i>Alternaria</i> (链格孢属); <i>Rhodotorula</i> (红酵母属); <i>Arthrini</i> (节菱孢霉属); <i>Aureobasidium</i> (短梗霉属); <i>Botryotinia</i> (葡萄孢盘菌属); <i>Cryptococcus</i> (隐球酵母属); <i>Deniquelata barringtoniae</i> 属 <i>Eurotium</i> (散囊菌属); <i>Fusarium</i> (镰孢菌属); <i>Lichtheimia</i> (横梗霉属); <i>Pyrenopeziza</i> (火丝菌属); <i>Byssosclamyces</i> (丝衣霉属); <i>Chaetomium</i> (毛壳菌属); <i>Eupenicillium</i> (正青霉属); <i>Ascotricha</i> (刺囊壳菌属); <i>Curvularia</i> (弯孢属); <i>Microascus</i> (小囊菌属); <i>Sarocladium</i> (帚枝霉属); <i>Scopulariopsis</i> (帚霉属) 另有未明确种属的酵母或霉菌 29 株
合计		至少 155	21 351	

注: 155 个属中, 专性厌氧细菌包括 *Clostridium* (梭菌属) 3 株, *Cutibacterium* 属 68 株, *Propionibacterium* (丙酸杆菌属) 4 株, 均属于第 1 类。

Note: Among the 155 genera, obligate anaerobic bacteria included 3 strains of *Clostridium*, 68 strains of *Cutibacterium* and 4 strains of *Propionibacterium*, all of which belonged to the first category.

表 6 部分污染菌高低温培养试验结果

Tab. 6 Test results of high and low temperature incubation of some contaminating microbes

培养基	30~35℃更快	高低温无显著差异	20~25℃更快	合计
FTM	121	20	未发现	141
TSB	114	27	未发现	141

共识。此外，中国药典在 2015 年版修订时已与国外药典接轨，将培养谱更广的 TSB 培养基引入无菌检查法与 FTM 培养基互补。

因此，在新的时代背景下，继续执行原有的要求存在思考商榷之处。

3.2 培养基组合与污染菌漏检风险调查

无菌检查法要求其采用的培养基具备广谱的促生长能力，尽可能地保证所捕获的各类污染微生物均能恢复生长，FTM 和 TSB 的互补组合是各国药典公认的经典金标准。

培养温度是微生物生长的另一重要因素，微生物的最适生长温度因种类不同而异。一般来说，嗜热和嗜冷菌在日常环境中不常见，与人类生产生活相关的为中温菌，最常见的中温菌在 20~45℃内均能生长，经典文献并未刻意区分 20~25℃和 30~35℃的差异。而大多数致病细菌在长期进化过程中适应了人体环境，其最适生长温度多为 35~37℃；浅部感染真菌最适生长温度一般为 22~28℃，部分深部感染真菌在 37℃生长最适宜^[47]。

从培养谱角度考虑，各国药典经典的 FTM 高温培养互补 TSB 低温培养的模式，可以较好地实现对制药环境和产品中包括厌氧细菌在内的各类污染菌检出。如需保留 FTM 低温培养的要求，主要检测对象为可能存在偏好低温的专性厌氧细菌。制药环境中出现专性厌氧细菌的污染本身为小概率事件^[7-14]，而作为制药环境中最大的污染原因人源，与人相关的常见厌氧细菌也一般采用 35~37℃条件进行分离培养^[48]。

为排查实际生产中的风险，本次研究对近 70 家企业 95 个品种生产线进行了污染菌调查，排查>3 万批产品，获得>2 万 1 千株至少 155 个属的鉴定信息，所获数据的总体分布符合制药环境污染菌的一般规律；对所获鉴定信息，无论频数高低，在属水平进行核查，未发现可疑的低温厌氧细菌；企业对这部分污染菌进行产品加标条件下的高低温培养试验，也未发现可疑情况。

此外，课题组还进行了部分标准菌高低温培

养试验和针对制药洁净生产环境的厌氧菌采集试验(数据另发表)，未发现可疑的低温厌氧菌。

在制药洁净生产环境中，对输入空气采取除菌过滤处理，并维持高频次换气，造就了富氧环境，使得专性厌氧的污染细菌受到极大抑制，一般认为这类污染风险较小；同时考虑无菌检查所用 FTM 和 TSB 培养基的广谱检测能力，即使发生污染也能检出，因此在制药洁净环境中开展厌氧菌采样的相关报道极少。不过，在其他行业(例如行星生命探测的航天器制造)中，有少数研究尝试了非标准要求的厌氧菌采样，在其报道的专性厌氧细菌信息中，经课题组核实，也未发现偏好 20~25℃的菌属^[49]。

3.3 基于风险的修订考量

从培养体系的广谱检测角度，本研究的调查工作尚未发现可疑的低温厌氧细菌。但是考虑到无菌检查为重要的安全性质控项目，生物制品属于无菌制品中风险较高的类别，作为一项证伪性研究，本次研究所搜集的数据并不一定能确保覆盖中国企业在实践无菌检查法时面临的所有情况。因此在中国药典未来的修订和实践中，建议从以下几个方面考虑。

考虑点 1：从检测谱角度考察，无论是国内外经典文献的报道，国外标准多年的实践，还是本研究的数据，尚未发现明确证据支持 FTM 低温培养的必要性，因此可考虑不再强制要求生物制品进行低温 FTM 培养。

考虑点 2：在实际生产环境中污染菌的状态可能与日常研究时的纯化菌落存在差异，对于那些在生产、储存和流通中长期处于低温环境或者包装容器内为厌氧环境的生物制品品种，建议企业基于自身的风险评估，考虑是否继续维持 FTM 的低温培养。

考虑点 3：从抽样数量角度考虑，虽然产品的无菌保障水平并非依赖于无菌检查，但无菌检查的抽样数量对于低水平污染下的检出率有重要影响，而药典的抽样数量仅为最低要求。如企业取消了原先的低温 FTM 培养管，并取消了此份培养基中的相应抽样数量，建议企业应进行风险评估，确定是否要扩大总体抽样数量。

致谢

感谢四川省食品药品检验检测院、北京市药品检验所、吉林省药品检验所、甘肃省药品检验

研究院、湖北省药品检验监督研究院、广东省药品检验所, 以及参与调查的国内外生物制品企业对本研究的支持。

REFERENCES

- [1] 王似锦, 高春. 硫乙醇酸盐流体培养基成分、历史起源及应用研究进展[J]. 中国药业, 2014, 23(1): 92-94.
- [2] USP General Chapter 〈71〉[S]. DocID: GUID-481C30EA-8A49-4A77-9E81-D0CD7C533498_1_en-US.
- [3] EP 10.0[S]. 2019: 191-194.
- [4] JP XVIII[S]. 2021: 144-174.
- [5] World Health Organization Technical Report Series 530[S]. 1973: 49-50.
- [6] 中国药典. 三部[S]. 2020: 520-524.
- [7] LIU Y R, YU M, XIAO H, et al. Analysis of microflora in clean areas of five pharmaceutical enterprises[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2019, 33(7): 796-802.
- [8] ZHANG W T, LIU X P, XIONG J. Monitoring of microbial contamination in sterile products workshop[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2019, 39(10): 1895-1901.
- [9] SONG M H, LI Q Q, QIN F, et al. Establishment and data analysis of a contaminated microorganisms library for sterile pharmaceutical production processes[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2019, 39(11): 1954-1960.
- [10] FAN Y L, FENG Z, ZHONG W, et al. Investigation and analysis of microbiological contamination in core area of sterile drug manufacturing enterprises[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2014, 28(6): 586-590.
- [11] XU Q H, WANG Y. Identification and population analysis of microorganisms in sterile drug manufacturing environment[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2019, 33(12): 1411-1418.
- [12] CHEN P, YAN D Z, MENG L. Study on establishing a microorganism database of clean areas and GMP manufacturing process-control for sterile medicinal products[J]. Prog Micro Immunol(微生物学免疫学进展), 2013, 41(3): 33-36.
- [13] PARK H K, HAN J H, JOUNG Y, et al. Bacterial diversity in the indoor air of pharmaceutical environment[J]. J Appl Microbiol, 2014, 116(3): 718-727.
- [14] SANDLE T. A review of cleanroom microflora: Types, trends, and patterns[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2011, 65(4): 392-403.
- [15] BRENNER D J, KRIEG N R, STALEY J T, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Two: The Proteobacteria, Part A: Introductory Essays[M]. 2nd Ed. Boston, MA: Springer US, 2005.
- [16] BRENNER D J, KRIEG N R, STALEY J T, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Two: The Proteobacteria, Part B: The Gammaproteobacteria[M]. Boston, MA: Springer US, 2005.
- [17] GARRITY G, BRENNER D J, KRIEG N R et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Two: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria[M]. 2nd Ed. New York: Springer, 2005.
- [18] VOS P, GARRITY G, JONES D et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Three: The Firmicutes[M]. 2nd Ed. New York: Springer, 2009.
- [19] WHITMAN W B, KRIEG N R, STALEY J T, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Four: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes[M]. 2nd Ed. New York: Springer, 2010.
- [20] WHITMAN W B, GOODFELLOW M, KAMPFER P, et al. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume Five: The Actinobacteria[M]. 2nd Ed. New York: Springer, 2012.
- [21] KRISHNAMURTHI S, CHAKRABARTI T, STACKEBRANDT E. Re-examination of the taxonomic position of *Bacillus silvestris* Rheims et al. 1999 and proposal to transfer it to *Solibacillus* gen. nov. as *Solibacillus silvestris* comb. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(Pt 5): 1054-1058.
- [22] AHMED I, YOKOTA A, YAMAZOE A, et al. Proposal of *Lysinibacillus boronitolerans* gen. nov. sp. nov., and transfer of *Bacillus fusiformis* to *Lysinibacillus fusiformis* comb. nov. and *Bacillus sphaericus* to *Lysinibacillus sphaericus* comb. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(5): 1117-1125.
- [23] SIDDIQI M Z, IM W T. *Pseudobacter ginsenosidimutans* gen. nov., sp. nov., isolated from inseng cultivating soil[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(9): 3449-3455.
- [24] SUN Q L, SUN L. Description of *Domibacillus iocacae* sp. nov., isolated from deep-sea sediment, and emended description of the genus *Domibacillus*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(2): 982-987.
- [25] CRAPART S, FARDEAU M L, CAYOL J L, et al. *Exiguobacterium profundum* sp. nov., a moderately thermophilic, lactic acid-producing bacterium isolated from a deep-sea hydrothermal vent[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 2): 287-292.
- [26] MOHAN KULSHRESHTHA N, KUMAR R, BEGUM Z, et al. *Exiguobacterium alkaliphilum* sp. nov. isolated from alkaline wastewater drained sludge of a beverage factory[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2013, 63(Pt 12): 4374-4379.
- [27] THIERRY S, MACARIE H, IIZUKA T, et al. *Pseudoxanthomonas mexicana* sp. nov. and *Pseudoxanthomonas japonensis* sp. nov., isolated from diverse environments, and emended descriptions of the genus *Pseudoxanthomonas* Finkmann et al. 2000 and of its type species[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2004, 54(Pt 6): 2245-2255.
- [28] MAYR R, BUSSE H J, WORLICZEK H L, et al. *Ornithinibacillus* gen. nov., with the species *Ornithinibacillus bavariensis* sp. nov. and *Ornithinibacillus californiensis* sp. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2006, 56(6): 1383-1389.
- [29] KRISHNAMURTHI S, RUCKMANI A, PUKALL R, et al. *Psychrobacillus* gen. nov. and proposal for reclassification of *Bacillus insolitus* Larkin & Stokes, 1967, *B. psychrotolerans* Abd-El Rahman et al., 2002 and *B. psychrodurans* Abd-El Rahman et al., 2002 as *Psychrobacillus insolitus* comb. nov.,

- Psychrobacillus psychrotolerans* comb. nov. and *Psychrobacillus psychrodurans* comb. nov.[J]. Syst Appl Microbiol, 2010, 33(7): 367-373.
- [30] MANORAMA R, PINDI P K, REDDY G S N, et al. *Bhargavaea cecembensis* gen. nov., sp. nov., isolated from the Chagos-Laccadive ridge system in the Indian Ocean[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2009, 59(10): 2618-2623.
- [31] RATHSACK K, REITNER J, STACKEBRANDT E, et al. Reclassification of *Aurantimonas altamirensis* (Jurado et al. 2006), *Aurantimonas ureilytica* (Weon et al. 2007) and *Aurantimonas frigidaquae* (Kim et al. 2008) as members of a new genus, *Aureimonas* gen. nov., as *Aureimonas altamirensis* gen. nov., comb. nov., *Aureimonas ureilytica* comb. nov. and *Aureimonas frigidaquae* comb. nov., and emended descriptions of the genera *Aurantimonas* and *Fulvimarina*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2011, 61(Pt 11): 2722-2728.
- [32] SCHOLZ C F P, KILIAN M. The natural history of cutaneous propionibacteria, and reclassification of selected species within the genus *Propionibacterium* to the proposed novel genera *Acidipropionibacterium* gen. nov., *Cutibacterium* gen. nov. and *Pseudopropionibacterium* gen. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(11): 4422-4432.
- [33] PATEL S, GUPTA R S. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2020, 70(1): 406-438.
- [34] LECHNER U, BRODKORB D, GEYER R, et al. *Aquicola tertiarycarbonis* gen. nov., sp. nov., a tertiary butyl moiety-degrading bacterium[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 6): 1295-1303.
- [35] PRAKASH O, MUDULI S, KUMAR R, et al. Description of *Auricoccus indicus* gen. nov., sp. nov., isolated from skin of human ear[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(5): 1212-1218.
- [36] HELSEL L O, HOLLIS D, STEIGERWALT A G, et al. Identification of “*Haematobacter*,” a new genus of aerobic Gram-negative rods isolated from clinical specimens, and reclassification of *Rhodobacter massiliensis* as “*Haematobacter massiliensis* comb. nov.”[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(4): 1238-1243.
- [37] ZHANG D F, WANG H F, XIONG Z J, et al. *Mariniluteicoccus flavus* gen. nov., sp. nov., a new member of the family Propionibacteriaceae, isolated from a deep-sea sediment[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2014, 64(Pt 3): 1051-1056.
- [38] DRANCOURT M, BOLLET C, CARTA A, et al. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov.[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2001, 51(Pt 3): 925-932.
- [39] PALMER M, STEENKAMP E T, COETZEE M P A, et al. *Mixta* gen. nov., a new genus in the *Erwinaceae*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2018, 68(4): 1396-1407.
- [40] GUPTA R S, LO B, SON J. Phylogenomics and comparative genomic studies robustly support division of the genus *Mycobacterium* into an emended genus *Mycobacterium* and four novel genera[J]. Front Microbiol, 2018(9): 67.
- [41] GUPTA R S, PATEL S, SAINI N, et al. Robust demarcation of 17 distinct *Bacillus* species clades, proposed as novel *Bacillaceae* genera, by phylogenomics and comparative genomic analyses: Description of *Robertmurraya kyonggiensis* sp. nov. and proposal for an emended genus *Bacillus* limiting it only to the members of the *Subtilis* and *Cereus* clades of species[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2020, 70(11): 5753-5798.
- [42] XIE C H, YOKOTA A. Reclassification of *Alcaligenes latus* strains IAM 12599T and IAM 12664 and *Pseudomonas saccharophila* as *Azohydromonas lata* gen. nov., comb. nov., *Azohydromonas australica* sp. nov. and *Pelomonas saccharophila* gen. nov., comb. nov., respectively[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2005, 55(Pt 6): 2419-2425.
- [43] GOMILA M, BOWIEN B, FALSEN E, et al. Description of *Pelomonas aquatica* sp. nov. and *Pelomonas puraquae* sp. nov., isolated from industrial and haemodialysis water[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(Pt 11): 2629-2635.
- [44] BUSSE H J, SCHUMANN P. Reclassification of *Arthrobacter enclensis* as *Pseudarthrobacter enclensis* comb. nov., and emended descriptions of the genus *Pseudarthrobacter*, and the species *Pseudarthrobacter phenanthrenivorans* and *Pseudarthrobacter scleromae*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2019, 69(11): 3508-3511.
- [45] BUSSE H J. Review of the taxonomy of the genus *Arthrobacter*, emendation of the genus *Arthrobacter sensu lato*, proposal to reclassify selected species of the genus *Arthrobacter* in the novel genera *Glutamicibacter* gen. nov., *Paeniglutamicibacter* gen. nov., *Pseudoglutamicibacter* gen. nov., *Paenarthrobacter* gen. nov. and *Pseudarthrobacter* gen. nov., and emended description of *Arthrobacter roseus*[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2016, 66(1): 9-37.
- [46] World Health Organization Technical Report Series 200[S]. 1973: 5-6.
- [47] 甘晓玲. 微生物学检验[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010.
- [48] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 3 版. 上海: 上海科学技术出版社, 2012.
- [49] PROBST A, VAISHAMPAYAN P, OSMAN S, et al. Diversity of anaerobic microbes in spacecraft assembly clean rooms[J]. Appl Environ Microbiol, 2010, 76(9): 2837-2845.

收稿日期: 2022-06-01
(本文责编: 沈倩)