

环境分离菌在药品微生物检验中的应用

王似锦, 余萌, 王杠杠, 马仕洪* (中国食品药品检定研究院, 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要 目的: 讨论环境分离菌在药品微生物检验中的应用。方法: 通过对各国药典、法规、指导原则、行业标准和行业指南等文件的梳理和分析, 列出了环境分离菌在药品微生物检验中的应用建议和要求, 并结合实例, 进一步介绍了环境分离菌的应用范围。结果: 各国药典和行业指南均要求或建议在消毒剂效能验证、抑菌效力检查、培养基方法适用性(培养基促生长试验)、检验方法的适用性、快速微生物检验方法和微生物检验替代方法验证等检验项目中增加使用环境分离菌(包括生产检验过程中人员、环境以及样品中分离菌)。结论: 与标准菌株相比, 环境分离菌更能够反映样品或环境实际存在微生物的情况, 因此, 在药品微生物检验中应用环境分离菌能够使检验结果对产品质量或环境做出更客观和科学的评价。可根据检验项目、药品的生产工艺和产品本身的特点, 在风险评估的基础上选择适当的环境分离菌应用于检验过程中。

关键词: 环境分离菌; 药品; 微生物检验; 质量控制; 应用

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)12-1424-06

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.12.012

Application of In-house Microbial Isolates in Microbiological Tests of Pharmaceutical Products

Wang Sijin, Yu Meng, Wang Ganggang, Ma Shihong* (NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To discuss the application of in-house microbial isolates in microbiological tests of pharmaceutical products. **Methods:** By combing and analyzing documents such as pharmacopoeia, regulations, guiding principles, industry standards and industry guidelines of various countries, the suggestions and requirements for the application of environmental isolates in drug microbiological testing were listed, and the application scope of environmental isolates was further introduced with examples. **Results:** Pharmacopoeia and industry guidelines require or suggest that the use of in-house microbial isolates (including personnel, environment and isolated bacteria in samples during production tests) should be added to such inspection items as disinfectant challenge testing, antimicrobial effectiveness testing, suitability of culture medium (growth promotion tests), suitability of test methods, rapid microbiological methods and validation of alternative methods for microbiological testing. **Conclusion:** Compared with the standard strains, the actual microbial situation in the sample or environment could be reflected by using in-house isolates. Therefore, the application of in-house isolates in microbiological tests can make a more objective and scientific evaluation of product quality or environment.

According to the test items, the production process and the characteristics of the product itself, in-house isolates could be selected and applied to the microbiological test of pharmaceutical products based on risk assessment.

Keywords: in-house microbial isolates; pharmaceutical products; microbiological tests; quality control; application

药品微生物的检验结果受多种因素影响,因此,在药品微生物检验中,为保证检验结果的可靠性,必须使用经验证的检测方法并严格按照药品微生物实验室质量管理指导原则要求进行检验^[1]。一方面,在对检测方法进行验证或确认时,需要使用菌株来进行相应的判断。例如,药品的无菌检查、微生物限度检查、原辅料的生物负载检测等试验过程的方法适用性、培养基适用性试验均需要使用菌株。具体步骤大致为:制备菌液后接种至供试液或培养基,根据生长情况来对方法进行确认,一些定量方法要求回收率达到50%~200%,一些定性方法要求判断生长情况,一些培养基适用性中需要判断微生物在培养基上的菌落大小、形态特征、指示剂反应等情况^[1]。另外一方面,部分检验方法的目的是测定高负载微生物下降的水平,评价对微生物的抑制或杀灭作用,例如抑菌效力检查、消毒剂消毒效能验证等,这些检验项目亦需要使用菌株^[1-2]。

包括《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)在内的各国药典中,一般都规定使用标准菌种进行上述试验^[1-4]。虽然这些标准菌株的应用可以使各个实验室的结果在一定程度上具有可比性并且便于在实验室之间进行方法转移确认,但是又存在另一问题,就是标准菌株无法代表环境和样品中实际污染的微生物。因此,各国药典指导原则和行业指南中均提出在进行药品微生物检验时应增加环境分离菌的使用,从而使检验方法的针对性更强。

从本质上来讲,检验的目的是希望能够检出样品或环境中可能存在的微生物,尽可能反映样品或环境污染微生物的真实情况,从而为产品质量或环境的评估做出客观科学的评价。“未检出”中的假阴性结果可能会导致实际存在污染微生物甚至超标的产品放行到市场上威胁人们的健康,也会导致不良的生产或检验环境未被发现,从而影响产品的质量。因此,环境分离菌在药品微生物检验中

的应用会在一定程度上避免假阴性结果的出现,使检验结果更具针对性,更能反映真实情况。本文就环境分离菌在不同检验项目、检验过程中不同环节中的应用进行讨论和分析,并给出环境分离菌选择和使用的建议,希望能够引起相关从业者对药品研发、质量控制和监管的思考,在日常工作中酌情考虑环境分离菌的应用,进一步保障药品微生物的检验方法更具针对性,使检验结果准确、可靠。

1 消毒剂效能验证

消毒剂广泛应用于药品生产和检验环境,其主要目的是作用于环境,降低环境的生物负载量。因其主要作用于环境中的微生物,各国药典、法规和指南均要求使用环境分离菌来进行消毒剂效果的确认,并且都要求根据消毒剂类型选择合适的微生物进行考察^[5]。

美国药典第43版的《1072消毒剂和防腐剂》^[2]章节中明确:因为各种菌对不同消毒剂的耐受性都有实际差异,因此,在消毒剂管理程序中,应定期使用悬液法,将环境监控中最常见的分离微生物用于确认其敏感性。为了证明消毒剂对制药环境的效能,应进行如下试验:(1)使用悬液法(筛查不同浓度消毒剂在不同的接触时间条件下对于标准菌株和典型环境分离菌的消毒效能);(2)载体法(将消毒剂置于载体表面作用于一定浓度标准菌株或环境分离菌一定的时间,测定微生物的lg下降值);(3)在新的消毒剂使用前,采用统计学的方法对比分离微生物的数量以及种类出现频率的变化。

日本药典第17版《消毒剂和除菌方法》^[4]章节包括了消毒剂效果验证,其中载体试验的试验菌的选择要求为:为了评估消毒剂效果,除了选择所列出的标准菌株,应选择1~2株常见的环境监控分离菌。

美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在2004年发布的《行业指南-使用无菌生产工艺生产的无菌药品的现行生产质量管理规范(cGMP)》^[6](以下简称FDA2004年

无菌生产工艺指南)在环境的消毒程序部分也明确要求应重视消毒剂对环境菌的作用,即日常使用的消毒剂应当对从厂房分离的常见微生物有效。必要时,可以调查评估从洁净区域中分离的与不良趋势相关的微生物对该洁净区域中所使用的消毒剂的敏感性。

美国注射剂协会(Parenteral Drug Association, PDA)第13号技术报告《环境监控计划基础》^[7]在清洁消毒程序中明确要求,应使用微生物降低的挑战试验来证明消毒程序。推荐使用来自环境监控程序所分离的常见微生物对所选的消毒剂进行挑战试验,来证明消毒剂的实际有效性。

美国材料协会的《洁净室消毒剂的评估标准指南》^[8]专门对环境分离菌在消毒剂效果确认试验中的使用进行了论述,该指南首先指出法规和监管部门已经明确,应将环境分离菌应用于消毒剂效果确认中,并引用了FDA2004年无菌生产工艺指南。该指南还指出,没有必要包括所有的分离菌,但是有必要在选择试验菌时建立有效的基本原则。其基本原则是使消毒剂的消毒效果能够达到控制潜在污染微生物风险的目的。

2 抑菌效力试验

为了防止药物制剂在正常贮藏或使用过程中,因微生物的污染和繁殖使药物变质而对使用者造成危害,如果制剂本身没有充分的抗菌效力,应根据制剂特性添加适宜的抑菌剂,尤其是多剂量包装的制剂。在添加抑菌剂的同时,应考虑到抑菌剂的毒性,保证用药安全。因此,成品制剂中的抑菌剂有效浓度应低于对人体有害的浓度,从而达到“最低”“有效”的目的^[1]。因此,需要在制剂研发和稳定性试验中进行抑菌效力检查,测定无菌及非无菌制剂的抑菌活性。抑菌效力检查方法的基本原理都需要在药物制剂中加入菌液,放置一定时间后再进行活菌数测定,根据菌数对数值的下降来判断其抑菌效力。

《中国药典》四部通则《1121抑菌效力检查法》^[1]中明确要求,若需要,制剂中常见的污染微生物也可作为试验菌株,例如含高浓度糖的口服制剂还应该选用鲁氏接合酵母为试验菌株。美国药典、欧洲药典和日本药典的抑菌效力检查方法中也有类似的描述。

本研究团队曾经从某凝胶剂分离出1株污染的

洋葱伯克霍尔德菌,并将该菌作为挑战菌应用到不同浓度的苯扎氯铵防腐体系中的抑菌效力评价,这表明在特定环境下的野生菌株对抑菌剂的耐受性有可能会高于实验室培养基菌株,在进行防腐剂或抑菌剂效力评价时,应考虑加入环境或样品中的常见分离菌作为挑战菌^[9]。

3 培养基适用性(促生长试验)

各国药典都要求对微生物检验用培养基进行适用性试验(或称为促生长试验),其目的是确认培养基能够使目标微生物生长,从而保证在检验时能够检出实际可能污染的微生物。各国药典的检查法中一般都只要求使用标准菌株进行培养基促生长试验,但是在药典指导原则和行业指南中都提出了可以加入环境分离菌。此处的环境分离菌可解释为检验对象及环境可能存在的微生物,例如基于历史数据的环境菌库中的常见菌、样品常见污染菌等。

美国FDA于1993年发布《药品质量控制微生物实验室检查指南》^[10],用于指导检查员对微生物分析实验室的检查。指南中提出,应定期用低水平的微生物对所制备的培养基进行挑战,包括使用美国药典规定的指示微生物以及日常环境菌。

我国国家药品监督管理局发布的《无菌工艺模拟试验指南(无菌制剂)》^[11]、FDA2004年无菌生产工艺指南^[6]、PDA第22号技术报告^[12]均要求,在无菌工艺模拟试验(培养基模拟灌装)的培养基促生长试验中,使用药典规定的标准菌株的同时,也应考虑使用环境监控和无菌检查中分离的污染菌。

美国药典43版《1116无菌生产环境的微生物控制和监控》^[2]中提出,在进行环境监控用培养基的促生长试验时,所使用的菌株应包括环境监控分离菌。

《中国药典》2020年版四部通则《9203药品微生物实验室质量管理指导原则》^[1]和美国药典43版《1117微生物实验室良好操作规范》^[2]对培养基具有质量控制的要求,在选择药典规定的菌株同时也可以增加环境分离菌和产品中常见的污染菌株。

国际药品检查组织(Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme, PIC/S)2011年发布的《无菌工艺验证的建议》^[13]对培养基的要求中提出,选择的

培养基应能够支持广泛的微生物生长,这些微生物可能会存在于生产环境中,应基于企业的环境菌库(例如来自环境监控的微生物)来选择。

本研究团队曾经在胰酪大豆胨琼脂培养基(Trypticase Soy Agar, TSA)的质控过程中使用人参土芽孢杆菌^[14]。在日常微生物检测过程中发现不同厂家的TSA对某药用辅料污染微生物的检出能力经常出现较大的差异,通过对污染微生物进行分离和鉴定,确定该微生物为人参土芽孢杆菌。进一步研究发现,该菌的生长受TSA的影响显著。与药典规定的标准菌株相比,该菌具有更好的筛分能力,在培养基适用性试验中增加使用人参土芽孢杆菌,可以提高现行培养基适用性试验结果的可靠性。

4 检验方法的适用性

目前,各国药典在微生物检验的方法适用性中均未要求使用环境或样品分离菌。但是,样品本身的污染菌在检验条件下能否生长受到多种因素影响,本研究团队曾经研究屎肠球菌对复方胰酶散微生物计数方法适用性试验中试验菌生长的影响,结果表明,使用倾注法时试验细菌的回收率偏低,其原因是样品本身所含屎肠球菌的生长导致琼脂培养基pH值下降,从而抑制了加入的试验细菌的生长^[15]。本研究团队在某中药颗粒剂的微生物限度检验时发现,使用平皿法($1\text{mL}\cdot\text{皿}^{-1}$)按照《中国药典》规定的几株标准菌株进行方法适用性均能够达到对回收率(50%~200%)的要求,但是样品污染菌的检出情况各稀释级间不能达到10倍数量关系,怀疑该方法不能有效检出污染菌,进一步使用薄膜过滤法($1\text{mL}\cdot\text{膜}^{-1}$, $100\text{mL}\cdot\text{次}^{-1}$, 冲洗2次)才能使检验结果更能反映样品的污染情况。最终选择使用薄膜过滤法对该中药颗粒剂进行微生物限度检查。因此,在检验方法的适用性试验和方法转移确认时,应注意检验方法对实际污染微生物的检出能力和回收率。

在检验方法的适用性试验方面,可以根据样品本身特点和容易污染菌的种类,考虑增加环境分离菌作为方法适用性研究的试验菌。例如某重组生物制品原液,企业在原液生物负载检验方法的适用性试验中,除了使用药典规定的标准菌株外,还增加了环境菌株,包括表皮葡萄球菌(人员分离菌),皮氏罗尔斯通氏菌(水系统分离菌)和苏云金芽孢杆菌(环境分离菌),这样建立的方法更有

利于实际污染菌的检出。

5 快速微生物检验方法和微生物检验替代方法验证

FDA2008年发布的《细胞和基因治疗产品基于快速微生物方法的无菌检查方法验证指南》^[16]中对快速微生物检验方法(Rapid Microbiological Method, RMM)验证用菌株进行明确要求:应根据RMM在产品和工艺中的性能表现建立一组微生物,应包括革兰氏阴性菌、革兰氏阳性菌、需氧菌、厌氧菌、酵母、霉菌、原辅料分离微生物、中间产品分离微生物、环境监控分离微生物、生产区域分离代表低营养高应激环境的微生物、生长缓慢微生物(例如痤疮丙酸杆菌)、对于RMM需要复杂营养的微生物和文献报道特定产品类型中常见分离菌等。

PDA技术报告第33号《新的微生物检验方法的评估、验证和实施》^[17]提到,应根据每一种验证参数的评估选择有代表性的菌株进行试验。用户应考虑使用应激状态的微生物。应激状态的微生物可以根据实际情况,将菌株的培养物暴露于一定环境条件(例如紫外线、热、冷、高渗等条件)、抑菌作用(消毒剂、药物作用)或亚致死灭菌条件下得到。在专属性试验中应使用实验室的标准菌株以及环境分离菌株,中间产品和无菌检查阳性分离菌株,以及生长缓慢、苛养、厌氧和临床分离菌株。在将替代方法或快速微生物检测方法应用到本地实验室时,在性能确认(PQ)环节应注意使用本实验室或本企业的有代表性的环境分离菌。

《中国药典》2020年版四部通则《9201药品微生物检验替代方法验证指导原则》^[1]中提到,在微生物定性检验方法的专属性试验中,当进行控制菌的检验时,还应选择与控制菌有类似特性的菌株作为验证对象。美国药典43版1223《微生物替代检验方法的验证》^[2]中也提到,在专属性试验时,使用包括一定数量的能够代表患者或产品风险的微生物,包括生产环境分离微生物、产品污染微生物。

6 环境分离菌的选择和使用原则

做好环境菌在药品微生物检验中的应用,一是应建立科学合理的环境菌收集、鉴定和保存方法规程,建立有代表性的环境菌数据库,并且定期做好数据分析和回顾工作。药品生产过程中的污染微生物可能来源于从原辅料到终产品的整个过程,

环境分离菌的选择应充分理解药品生产工艺以及相关因素,药品生产过程中可能污染微生物的来源分析见图1^[18]。本研究团队在之前发表过若干研究论文,包括环境菌库在制药行业的应用^[19]、无菌药品生产企业的环境菌分离和鉴定情况^[20]、制药环境用消毒剂对环境分离菌杀灭效应的比较研究^[21]等内容。PDA第13号技术报告^[7]详述了环境监控策略和环境菌的收集鉴定和分析策略。当然,此处的“环境菌”并不只是生产环境分离菌,还包括原辅料、中间产品、终产品的生物负载监控或微生物检验分离的微生物、终产品无菌检查阳性和培养基模拟灌装阳性分离微生物等。

二是应根据检验项目、药品的生产工艺和产品本身的特点,在风险评估的基础上选择适当的环境分离菌应用于适当的检验过程中^[18]。有的检验项目用于分析高负载条件下微生物数量下降的情况,例如抑菌效力试验、消毒剂效能验证试验等;有的检验项目是分析低负载水平条件下的微生物的数量,例如生物负载监测、环境监控、微生物限度检查等。在药品生产工艺和质量控制的不同环节,对

分离微生物有不同的应用。例如,某企业在环境菌年度分析中发现,在每年的春夏季在洁净区的环境监控之中会出现霉菌的检出,而在别的季节则没有发现霉菌。那么,在对分离的霉菌进行分离和鉴定之后,可以将霉菌应用于目前使用的消毒剂的效能验证,以研究目前的消毒剂使用和清洁消毒规程是否对这种霉菌仍然有效。当然,该霉菌亦可用于环境监控的培养基的促生长试验,以证明目前的环境监控方法能够在低负载水平情况下检出这种霉菌。

三是根据微生物数据偏差(Microbial Data Deviation, MDD)调查结果,将分离微生物应用于相应的检验之中^[18]。例如,某非无菌药品的终产品微生物限度检出过程中分离出一株不可接受微生物阴沟肠杆菌。如果经过调查该株微生物是来源于某辅料,则应将该菌应用于辅料检验的培养基适用性试验之中。如果经过调查发现该株微生物来源于生产过程中的人员,则应将该菌应用于人员的表面微生物监控培养基的适用性试验之中。

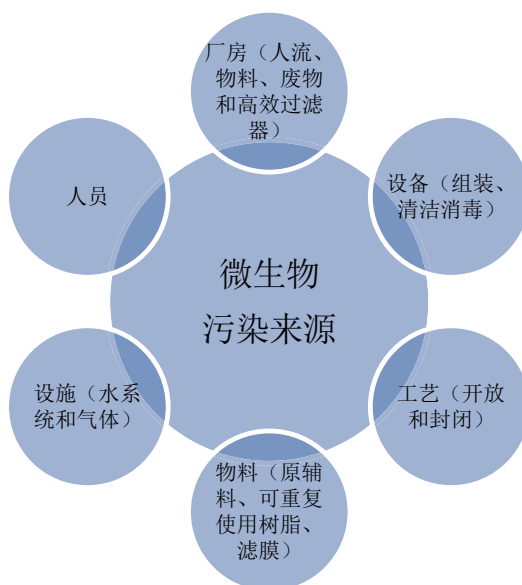


图1 药品生产过程中微生物污染的来源

7 结论

一般来说,各国药典要求在药品微生物检验中使用标准菌株来进行方法验证或结果判断。但是,药典指导原则和行业指南中又要求或建议在微生物检验中增加使用环境分离菌(包括生产检验过

程中人员、环境以及样品中分离菌)。与标准菌株相比,环境分离菌更能够反映样品或环境实际存在微生物的情况,使检验结果能够对产品质量或环境做出更客观和科学的评价。本文就环境菌在消毒剂效能验证、抑菌效力检查、培养基方法适用性(培

培养基生长试验)、检验方法的适用性、快速微生物检验方法和微生物检验替代方法验证等方面的应用进行了各国药典和指南的综述,并提出了环境分离菌的选择和使用原则。希望本文能够引起药品研发、检验、监管和质量控制人员的对环境分离菌作用和应用的思考,在风险评估的基础上考虑环境分离菌的应用,使药品微生物检验结果更具针对性、能够反映实际污染情况、能够反映生物负载的实际下降情况,使药品微生物检验更好的服务于药品的质量控制。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国药典:四部[S]. 2020: 498-503, 156-170.
- [2] USP43 [S]. 2021: 1-15.
- [3] EP10.0 [S]. 2019: 627-628.
- [4] JP17 [S]. 2016: 121-130.
- [5] 冯丹阳,肖璜,丁勃,等. 制药生产环境用消毒剂国内外标准对比[J]. 中国药品标准, 2020, 21(5): 403-406.
- [6] FDA. FDA Guidance for Industry Sterile Drug Products Produced by Aseptic Processing-Current Good Manufacturing Practice[S/OL]. (2004-09-01) [2022-02-02]. <https://www.fda.gov/media/71026/download>.
- [7] PDA T.R.13 Fundamentals of an Environmental Monitoring Program [R]. 2014: 10-20.
- [8] American Society of Testing Materials International. ASTM E2614-15 (2020) e1 Standard Guide for Evaluation of Cleanroom Disinfectants[S]. 2020: 1-5.
- [9] 周发友,王似锦,马韦钰,等. 一株药品分离菌-洋葱伯克霍尔德菌对抑菌效力评价体系的启示[J]. 中国药事, 2019, 33(12): 1449-1455.
- [10] FDA. Guide to Inspections of Microbiological Pharmaceutical Quality Control laboratories[R]. 1993: 1-15.
- [11] 国家药品监督管理局. 无菌工艺模拟试验指南(无菌制剂)[S/OL]. (2018-09-11) [2022-01-15]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxgggtg/ylqxqtgg/20180911170301439.html>.
- [12] PDA T.R.22 Process Simulation for Aseptically Filled Products[R]. 2011: 26-27.
- [13] Pharmaceutical Inspection Convention and Pharmaceutical Inspection Co-operation Scheme. PIC/S Recommendation on the Validation of Aseptic Process[R]. 2011: 1-16.
- [14] 武永秀,马仕洪,杨美琴,等. 人参土芽孢杆菌用于胰酪大豆胨琼脂培养基的质量控制研究[J]. 中国药事, 2019(2): 166-171.
- [15] 王似锦,蔡春燕,余萌,等. 屎肠球菌对复方胰酶散微生物计数中试验菌生长的影响[J]. 中国药事, 2020, 34(10): 1186-1190.
- [16] FDA Guidance for Industry: Validation of Growth-Based Rapid Microbiological Methods for Sterility Testing of Cellular and Gene Therapy Products (Draft) [R]. 2008: 1-15.
- [17] PDA T.R.33 Evaluation, Validation and Implementation of Alternative and Rapid Microbiological Methods[R]. 2013: 33-49.
- [18] Madden RE, Moldenhauer J. Contamination Control in Healthcare Product Manufacturing (Volume 1) [M]. River Grove: DHL Publishing, 2013: 488-498.
- [19] 王似锦,余萌,王杠杠,等. 制药企业洁净区环境监控与环境菌库的建设[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(10): 1334-1340.
- [20] 刘亚茹,余萌,肖璜,等. 五家制药企业洁净区微生物群落分析[J]. 中国药事, 2019, 33(7): 796-802.
- [21] 刘亚茹,肖璜,马仕洪. 制药环境用消毒剂对环境分离菌杀灭效应的比较研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(9): 1674-1683.

(收稿日期 2022年4月18日 编辑 李亚微)