微生物洁净室环境菌库建立方法探讨

杨玲玲，李小燕，朱毅忠*（新疆维吾尔自治区药品检验研究院，乌鲁木齐 830000）

摘要　目的：本研究通过对洁净实验室环境菌的收集及鉴定，为超标结果调查分析、药品检出菌溯源分析及洁净环境菌数据库的建立与分析提供数据支持。**方法：**在洁净实验室、操作人员等监控点采集沉降菌、浮游菌及表面微生物，采用VITEK2 compact鉴定系统进行鉴定分型。**结果：**经过对不同洁净级别和微生物种类的分析，共收集获得环境菌53株，其中芽孢杆菌属、库克氏菌属和葡萄球菌属细菌分别占全部分离株的17.0%、15.1%和13.2%。**结论：**基本了解洁净室环境微生物构成，初步建立洁净室环境微生物数据库。建议洁净实验室规范人员更衣进场程序和洁净区行为，制定有效的清洁消毒程序，加强环境监控，定期分析监控数据，研究数据变化趋势，出现异常数据，应及时采取措施，使洁净区处于良好的受控状态。

关键词： 洁净室；环境菌；VITEK2 compact鉴定系统

中图分类号： R917　**文献标识码：**A　**文章编号：**1002-7777(2021)07-0763-05
doi:10.16153/j.1002-7777.2021.07.006

Discussion on the Method of Establishing Environmental Bacteria Bank in Microbial Clean Rooms

Yang Lingling, Li Xiaoyan, Zhu Yizhong* (Xinjiang Institute and Research for Drug Control, Urumqi 830004, China)

Abstract　Objective: To collect and identify the environmental bacteria in clean rooms, and to provide data for the investigation and analysis of the results of exceeding the standard, traceability analysis of drug-detecting bacteria and establishment and analysis of clean environmental bacteria database. **Methods:** Settling bacteria, plankton bacteria and surface microorganisms were collected in clean laboratories, operators and other monitoring points, and the identification and clarification were carried out by using the VITEK2 compact identification system. **Results:** A total of 53 bacterial isolations were identified from the controlled environment. The isolation ratios of Bacillus spp., Kocuria spp. and Staphylococcus spp. in total isolations were 17.0%, 15.1% and 13.2%, respectively after analysis of different cleanness levels and microbial species. **Conclusion:** Basic knowledge about the environmental microorganism composition in clean rooms was gained, and the database of environmental microbiology in clean rooms was preliminarily established. It is suggested that pharmaceutical enterprises should control the number of personnel in the clean areas, standardize the personnel's dressing procedures and clean area behavior, formulate effective cleaning and disinfection procedures, strengthen environmental monitoring, regularly analyze monitoring data, study datum trends and take measures in time to deal with abnormal data so as to keep the clean areas in a good state of control.

Keywords: clean rooms; environmental bacteria; VITEK2 compact identification system

作者简介：杨玲玲，硕士，高级实验师；研究方向：从事药品、医疗器械微生物检验；Tel：（0991）4335081；E-mail：464462705@qq.com
通信作者：朱毅忠，本科，高级实验师；研究方向：从事药品、医疗器械微生物药理检验；Tel：（0991）4335081；E-mail：976458825@qq.com

药品、医疗器械无菌检查和微生物限度检查应在严格控制微生物污染的环境下进行，为了保证药品质量安全及检测结果的准确性，应按2020年版《中华人民共和国药典》四部通则9205对洁净实验室进行微生物监测和控制，以维持洁净实验室操作环境的稳定性[1]。目前微生物洁净实验室都会定期对洁净室的尘埃粒子数、浮游菌、沉降菌及表面微生物进行采集作为日常监控。但由于技术缺乏等方面的原因，对微生物的监测，往往只进行了数量的统计，并未对微生物进行鉴定及溯源，即没有建立实验室的微生物数据库[2]。环境微生物的鉴别、统计、分析可以为偏差调查以及污染溯源提供非常有价值的信息，同时可为实验室洁净环境及表面消毒与清洁方案的制定提供指导[3]。因此，检测实验室建立环境微生物数据库是检出菌溯源体系构建的重要部分，对提供准确客观的检验结果、为监督管理部门依法行政和风险评估具有十分重要的意义。

正常运行的洁净区主要污染来源有四种途径：人、空气、表面及水系统[4]。其中空气途径污染是重点，其污染范围大，污染过程复杂。接触污染还应包括清洁用水中微生物的部分。因此本文结合洁净室日常监测，采用多种技术手段对洁净室污染情况进行分析和比较，初步探讨了环境中微生物污染鉴定和溯源分析的过程和方法，为微生物污染追踪溯源提供技术支持。

本研究通过采集新疆维吾尔自治区药品检验研究院（以下简称我院）微生物限度检验室、无菌检验室、微生物鉴定室的环境微生物进行分离纯化后，采用VITEK2 compact鉴定仪与微生物形态学相结合的鉴定方法，初步建立了我院洁净室的微生物数据库，为后续微生物污染溯源分析提供了数据基础，对污染控制及风险评估有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

VITEK2 compact型全自动微生物鉴定系统（法国生物梅里埃公司）；IPP750型半导体低温培养箱（美墨尔特）；LDZF-50L型压力灭菌器（上海申安医疗器械厂）；CX31型显微镜（日本奥林巴斯）；168M2-MS型两头过滤组合集菌仪（赛多利斯）；MAS-100ECO浮游菌微生物采样器（默克）；胰酪胨大豆琼脂培养基（Tryptic Soy Agar，BD）；酪蛋白胨大豆卵磷脂吐温20培养基（Casein Digest SoyLecithin Polysorbate 20 Mediu，青岛海博）；R2A琼脂培养基（R2A Agar Medium，青岛海博）。

1.2 试验方法

1.2.1 采样与培养

对微生物洁净室（包括无菌检验室、微生物限度检验室、微生物鉴定室、洁净走廊等）环境进行采样，采用空气撞击法、平板沉降法和涂布法采集浮游微生物、沉降微生物和表面微生物（含设备和人员）。采集分别使用胰酪胨大豆琼脂培养基平板及酪蛋白胨大豆卵磷脂吐温20培养基平板进行对比[5]，采集完成后于33℃培养箱中倒置培养48 h。挑取平板中菌落，分别进行2次以上TSA或SDA平板划线分离纯化菌落，用于微生物鉴定并保存。对纯化水系统按《中华人民共和国药典》2020年版二部纯化水项下要求采用薄膜过滤法采集微生物，用R2A琼脂培养基于33℃培养箱中倒置培养5~7天[6]。

1.2.2 菌种保存

用一次性使用棉拭子沾取分离纯化的菌落置含25%甘油的灭菌水溶液冻存管中，沿壁打散，涡旋至均匀的菌悬液，置于-80℃冰箱冻存。

1.2.3 微生物鉴定

分离的微生物经革兰氏染色镜检涂片，初步判断所得菌株类型，采用VITEK2 compact系统对应的试剂进行微生物生化反应鉴定。获得相应菌株分类信息，并进行统计。

2 结果与分析

2.1 环境菌分离

本研究共采集样品43份，分离得到53株菌，详见表1。分析上表中的数据发现，微生物鉴定室（C级背景下的生物安全柜）共分离到16株菌，占比30%；无菌检验室（A/B级）共分离到2株菌，占比4%；无菌检验隔离系统室（C级）分离到5株菌，占比9%；微生物限度检验室（B/C级）共分离到5株菌，占比9%；洁净走廊（C级）共分离到5株菌，占比9%；操作人员洁净服及手指上共分离到5株菌，占比6%；其他非受控区域（传递窗、风淋缓冲间等）共分离到8株菌，占比15%；纯化水系统中共分离到7株菌，占比13%，而纯化水在日常清洁消毒中必不可少，水系统中的微生物也是增

加洁净实验室微生物负载的重要因素。

2.2 菌株鉴定结果

通过微生物形态学观察结果、革兰氏染色结果以及VITEK2 compact系统鉴定，将所得菌株按采集地点和形态生化反应鉴定分析分为14个属，并汇总于表2（生化反应详细结果未列出）。其中，芽孢杆菌、库克氏菌和葡萄球菌属分别占全部分离菌的17.0%、15.1%和13.2%，其他菌属占比见图1。

表 1 各区域分离菌株数

序号	采集区域	洁净度级别	分离菌数	百分比 /%
1	微生物鉴定室	生物安全柜 /C 级	16	30.2
2	无菌检验室	A/B 级	2	3.8
3	无菌检验隔离系统室	C 级	5	9.4
4	微生物限度检验室	B/C 级	5	9.4
5	洁净走廊	C 级	5	9.4
6	人员	/	5	9.4
7	非受控区域	/	8	15.1
8	水系统	/	7	13.2

表 2 采集菌的菌属分布及数量

菌属名称	数量	采集区域
葡萄球菌（Staphylococcus spp）	7	1/2/3/4/5/6/7
芽孢杆菌（Bacillus spp）	9	1/2/3/4/5/6/7/8
微球菌（Micrococcus spp）	4	1/4/5
差异球菌属（Alloiococcus sp）	2	1
沙雷菌属（Serratia）	1	1
鞘氨醇单胞菌属（Sphingomonas）	3	1/5/8
莫拉氏菌属（Moraxella sp）	1	3
嗜单胞菌属（Ameromonas）	2	1/3
巴斯德菌属（Pasteurella）	3	2/4/8
不动杆菌属（Acinetobacter sp）	1	4
罗尔斯顿菌属（Ralstonia）	2	8
肠杆菌属（Enterobacteriaceae）	1	8
短波单胞菌（Brevundimonas）	1	8
库克氏菌（Kocuria）	8	1/7
其他	8	1/3/4/5/6/7

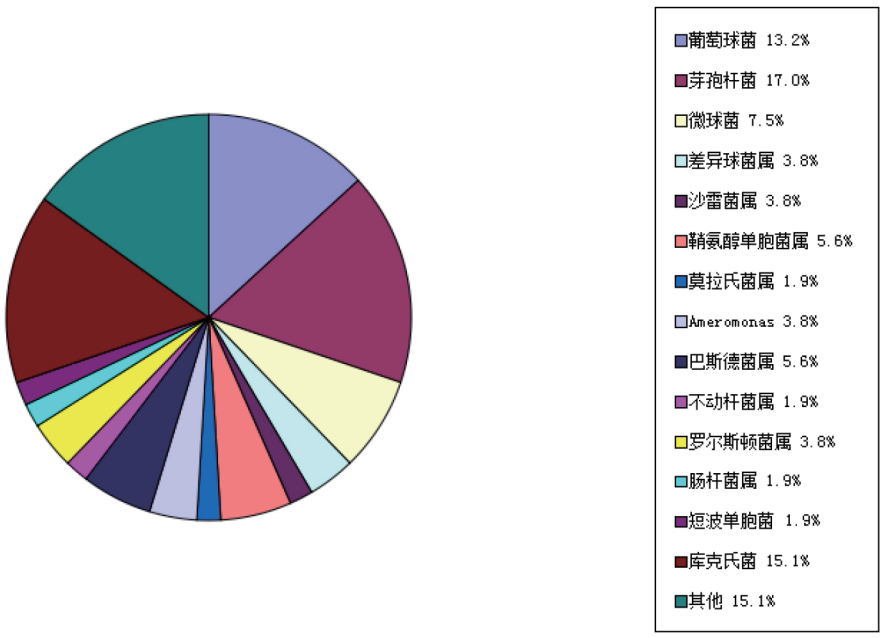

图 1 洁净室微生物群落组成图

3 讨论

3.1 研究样本的代表性

影响洁净区微生物群落分析的重要因素包括两个方面。一是洁净区的类型，二是样品采集的方法[7]。洁净室的温湿度不同，使用人员不同，使用的水系统都将对搜集的微生物的种类和数量产生重要影响。本次研究分两次对洁净实验室进行微生物采集，洁净实验室因使用要求不同洁净分区明确，且均符合《中华人民共和国药典》A、B、C、D洁净等级区域的相应要求。本次试验两次采集时间分别为2月及12月，室内温度为27℃~28℃，湿度为20%RH~30%RH之间，环境条件差异较小。两次采集微生物均为沉降菌、浮游菌及表面微生物。第一次使用的培养基为胰酪胨大豆琼脂培养基，第二次使用酪蛋白胨大豆卵磷脂吐温20培养基，从两次采集结果可以看出：在其他条件差异不大的情况下，使用酪蛋白胨大豆卵磷脂吐温20培养基所采集到的微生物无论是数量还是种类都高于胰酪胨大豆琼脂培养基，由此可见实验室日常消毒会对采样有一定的抑制作用，提醒我们在制定消毒规范及环境微生物采集时要全面考虑。

3.2 洁净室微生物菌落及来源分析

本研究从洁净实验室共分离鉴定得到14属共53株菌。主要的优势菌群为芽孢杆菌属（17.0%）、库克氏菌属（15.1%）和葡萄球菌属（13.2%），与国内外研究结果一致。其中，葡萄球菌属和微球菌属（包括库克氏菌属）细菌为人体易携带污染的微生物。这两类微生物在多个采样点均有发现，提示实验人员在操作和移动过程中或在实验用品流转过程中的人为污染较为严重。因此在设计上就应注重布局的合理性，如保障检验区与外界的合理压差范围，增加风淋等，从根本上降低污染。在我院实验室中还发现了9株芽孢杆菌属，芽胞杆菌属主要存在于土壤中，由于芽胞具有很强的抗逆性，一般常用的消毒剂很难杀灭，因此会在环境中不断地富集，建议实验室定期以杀孢子剂等强效消毒剂对污染严重及关键区域进行强力消杀[8]。巴斯德菌属、假单胞菌属等，在洁净室及纯化水中均有检出，可能是通过使用纯化水进行日常清洁的过程中引入。

从各区域微生物分离数量看，不同洁净级别区域之间的空气微生物污染程度由低洁净级别向高洁净级别递减，符合区域隔离和空气净化的规律，但表面微生物污染程度在各洁净级别之间的差异不大。究其原因，一方面可能是由于人员表面接触带来的交叉污染；另一方面则可能是由于消毒剂效力及配制用水问题导致的残留污染。因此，应该重视不同洁净级别之间的表面微生物，特别是一些非受控区域（传递窗、风淋缓冲间等）隔离效果和消毒

保障，以防止污染物轻易地从污染区流入洁净区域。另一方面制药用水是满足实验需要和人员、设备清洁所必须的物质。要密切监控纯化水或注射用水的微生物负载水平，且注意在清洁或配制消毒剂时，应使用与洁净等级相适应的水。虽然两次对实验室进行环境采样分析产生的数据代表性有限，但实验室若能长期有效地监控检验环境，绘制微生物分布图和变迁图，分析微生物污染来源[9]，将有效地提高洁净室环境保障。

3.3 微生物鉴定方法

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。VITEK2 compact系统所包含的生化反应近60种，鉴定精细度满足生化鉴定需要。但针对复杂的环境微生物种类和普遍存在的变异，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[9-10]。随着生物信息技术的发展，近年来基因序列分析方法为微生物的鉴定和分型提供了新的思路。微生物鉴定可以借助多种鉴定与分型方法，如 FTIR、16SrRNA测序、PFGE、Ribo Printing、重复序列PCR（Rep-PCR）分型等方法，并结合微生物多方面的信息才能有效地解决实际中遇到的微生物污染及溯源问题[11]。本研究基于我院现有条件初步建立了洁净实验室的微生物数据库，随着研究的进一步深入，将利用更多元化的鉴定手段建立更加全面的微生物数据库，为实验室的环境微生物负载控制及微生物污染溯源分析提供有力支撑。

参考文献：

[1] 周爽，钱文静. FTIR法用于药品微生物洁净室环境菌库的建立[J]. 中国卫生产业，2018，1：15-127.

[2] 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.

[3] 池王胄，宋庭，周芳芳，等. 微生物鉴定技术在无菌药品生产企业中的应用[J]. 中国医药导刊，2012，14（1）：169-170.

[4] Sandle T. A Review of Cleanroom Microflora：Types, Trends，and Patterns[J]. PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology，2011，65（4）：392-403.

[5] 美国药典委员会. 美国药典[S]. 35版. 华盛顿：美国药典委员会，2012：886.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典：二部[S]. 北京：中国医药科技出版社，2019：411.

[7] 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，2019，7（33）：796-802.

[8] 刘卫德，刘绪平，熊骏，等. 无菌药品生产企业核心区微生物污染调查与分析[J]. 中国医药工业杂志，2019，50（11）：1335-1340.

[9] 范一灵，房蕊，蒋波，等. 微生物鉴定分型技术应用于医药企业微生物污染调查[J]. 中国医药工业杂志，2010，41（11）：810-818.

[10] Clarridge JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases[J]. Clin Microbiol Rev，2004，17（4）：840-862.

[11] Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls[J]. J Clin Microbiol，2007，45（9）：2761-2764.

（收稿日期 2021年4月13日 编辑 李亚徽）