

Application of Commercially Derived Strains in Pharmaceutical Microbiological Testing

Fan Zhang

Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou Guangdong
Email: 10373018@qq.com

Received: Feb. 6th, 2020; accepted: Feb. 21st, 2020; published: Feb. 28th, 2020

Abstract

Commercially derived strains are strains derived from standard strains. They are traceable and equivalent to working strains when used. This paper introduces the application of commercially derived strains in the field of pharmaceutical microbiological testing, such as sterility test, microbial limit test, bacteriostatic efficacy check, and inspection quality control. The advantages and disadvantages of using commercial derived strains are analyzed.

Keywords

Microbiological Testing, Commercially Derived Strain, Standard Strain, Strain Management

商业派生菌株在药品微生物检验中的应用

张 帆

广东省药品检验所, 广东 广州
Email: 10373018@qq.com

收稿日期: 2020年2月6日; 录用日期: 2020年2月21日; 发布日期: 2020年2月28日

摘 要

商业派生菌株是由标准菌株派生出的菌株, 具有可溯源性, 使用时与工作菌株等效, 本文介绍了商业派生菌株在药品微生物检验领域的无菌检查、微生物限度检查、抑菌效力检查、和检验质量控制等方面的应用, 并分析了使用商业派生菌株的优缺点。

关键词

微生物检验, 商业派生菌株, 标准菌株, 菌种管理

Copyright © 2020 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

《中国药典》2015 版及 2020 版征求意见稿中指出, 药品微生物检验用的试验菌应为有明确来源的标准菌株, 或使用与标准菌株所有相关特性等效的可以溯源的商业派生菌株[1] [2]。商业派生菌株是指由标准菌株派生出的菌株, 具有可溯源性, 分为定性商业派生菌株和定量商业派生菌株。定性商业派生菌株是已准确分类鉴定的菌株, 方便在定性试验中作为对照菌使用; 而定量商业派生菌株除了要准确分类鉴定以外, 还需明确单支含菌量的范围。商业派生菌株使用时与工作菌株等效, 传代次数应严格控制, GMP、CNAS CL01 和《中国药典》都有“传代不超过 5 代”这一规定。

商业派生菌株使用起来比较方便, 大多数商业派生菌株是用无菌水复溶带菌的小球, 震荡后即可在其允许的存放条件及时间内使用。近年来, 因其“既得即用”的特性, 在微生物检验工作中已广泛使用。

在药品微生物检验领域, 商业派生菌株可用于无菌检查、微生物限度检查、抑菌效力检查和检验质量控制等方面。

2. 商业派生菌株用于无菌检查

根据《中国药典》2020 版征求意见稿, 无菌检查需要用到的菌液浓度均为 ≤ 100 cfu [3]。含菌量为 < 100 cfu 或 < 1000 cfu (用 1.1 ml 复溶液溶解后, 可提供 $100 \mu\text{l} \times 10$ 份的菌液, 每份含菌量 < 100 cfu) 的定量商业派生菌株可以满足药典的规定(见表 1)。

Table 1. Strains used in sterility tests

表 1. 无菌检查法中使用到的菌株

试验名称	接种的培养基/供试品特性	菌种名称
培养基灵敏度检查	硫乙醇酸盐流体培养基	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、生孢梭菌
	胰酪大豆胨液体培养基	枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉
方法适用性检查	硫乙醇酸盐流体培养基	金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、生孢梭菌
	胰酪大豆胨液体培养基	枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉
供试品的无菌检查	无抑菌作用及抗革兰氏阳性菌	金黄色葡萄球菌
	抗革兰氏阴性菌	大肠埃希菌
	抗厌氧菌	生孢梭菌
	抗真菌	白色念珠菌

3. 商业派生菌株用于微生物限度检查

《中国药典》2020 版征求意见稿 1105 和 2015 版 1106 中提到药品微生物限度检查需要用到的菌液

浓度为 ≤ 100 cfu 和 ≥ 100 cfu [1] [4]。根据生产厂家提供的菌种证明(Certificate of Analysis, 简称 COA)中给出的平均回收菌落数,用适量的复溶液溶解含菌量 < 1000 cfu 的定量小球,使每次加菌量控制在 < 100 cfu 或 > 100 cfu,满足药典要求。控制菌检查方法适用性试验,需根据各品种项下微生物限度标准中规定检查的控制菌选择相应菌株。除此之外,在微生物限度检查法中使用到的菌株见表 2。

Table 2. Strains used in the microbial limit test (except the applicability test of the control bacteria test method)
表 2. 微生物限度检查法中使用到的菌株(除控制菌检查方法适用性试验外)

试验名称	接种的培养基/培养基特性	菌种名称	接种量
计数培养基适用性检查和计数方法适用性检查	胰酪大豆胨琼脂培养基/胰酪大豆胨液体培养基	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉	≤ 100 cfu
	沙氏葡萄糖琼脂培养基/玫瑰红钠琼脂培养基	白色念珠菌、黑曲霉	≤ 100 cfu
控制菌检查用培养基适用性检查	促生长能力	大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、生孢梭菌、白色念珠菌	≤ 100 cfu
	抑制能力	金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌	≥ 100 cfu
	指示特性/能力	大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、乙型副伤寒沙门菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌	≤ 100 cfu

4. 商业派生菌株在抑菌效力检查中的应用

根据《中国药典》2020 版征求意见稿“1121 抑菌效力检查法”,抑菌效力检查需要用到的菌液浓度为 ≤ 100 cfu 和 10^8 cfu [5],使用每颗含菌量 ≤ 100 cfu 或 ≤ 1000 cfu 和含菌量 10^8 cfu 左右的定量小球可以满足药典的规定(见表 3)。

Table 3. Strains used in the bacteriostatic efficacy check
表 3. 抑菌效力检查法中使用到的菌株

试验名称	接种的培养基	菌种名称	接种量
培养基适用性检查	胰酪大豆胨琼脂培养基/胰酪大豆胨液体培养基	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌	≤ 100 cfu
	沙氏葡萄糖琼脂培养基/沙氏葡萄糖液体培养基	白色念珠菌、黑曲霉	≤ 100 cfu
抑菌效力测定	/	金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌、白色念珠菌、鲁氏酵母、黑曲霉等	约 10^8 cfu

5. 检测结果的质量保证

对于开展微生物检测项目的实验室,应定期使用质控样品进行检验质量监控,包括人员比对,设备确认,能力验证和实验室间的比对等,在开展质量监控时,要选取均匀性和稳定性符合要求的质控样品 [6]。商业派生菌株具有较好的均匀性和稳定性,是目前比较理想的质控样品。

5.1. 人员培训考核

微生物检验无法完全依赖全自动鉴定仪器,检验工作中的许多步骤会受到检验人员的操作技能、个人经验和主观分析的影响,因此对于微生物检验而言,检验人员的专业素养和技术能力是影响实验室检验质量的重要因素。实验室可通过内部质量控制、能力验证或使用实验室间比对等方式评估检测人员的

能力和确认其资格[6]。定性和定量商业派生菌株均可作为质控样品来对人员进行考核, 客观评价检验人员的操作技能。

5.2. 微生物自动鉴定系统确认

目前, 微生物鉴定技术已逐步由手工检测走向仪器化和电脑化, VITEK 2 Compact 微生物全自动分析系统等微生物自动鉴定系统因其便利性和准确性, 渐渐成为微生物鉴定的常用手段, 在各个实验室的应用越来越广泛[7]。为了保证鉴定结果的准确性, 在微生物自动鉴定系统使用前和使用期间, 我们需要对其可靠性和稳定性进行确认。在《中国药典》2015 版和 2020 版征求意见稿“9204 微生物鉴定指导原则”中明确了微生物鉴定系统确认试验的 3 种方法[1] [8]。这些方法都需要使用到数十个不同种的多株微生物, 单独购买会遇到价格较高、货期不同导致购买流程较长等问题, 于是生产厂家提供了质控菌株套装这一解决方案, 满足试验要求的前提下简化流程, 节约成本。

6. 在微生物检验领域使用商业派生菌株的优缺点

首先, 标准菌株为 0 代菌种, 在使用前需要进行活化、验证、保藏和传代等工作[9], 使用时还需要进行梯度稀释和计数定量; 而商业派生菌株则一般是 3~5 代的菌种, 不需要复活化、保藏和传代, 即得即用, 无需进行梯度稀释即可得到所需数量的菌液, 减少了操作步骤, 节省了时间成本, 也大大降低了对技术人员操作能力和实验经验的要求。

其次, 菌种的培养时间对其细胞的生理状态有很大的影响, 处于对数生长期的微生物活菌数多, 生化特征明显, 菌种的稳定性较好[10]。商业派生菌株一般会选取处于对数生长期的活菌作为原料, 含菌数相对稳定。在做方法适用性试验时, 含菌数稳定的菌悬液可以避免因接种量的差别而对回收率产生影响, 提高方法的可靠性, 更能体现各类样品检验方法的差异, 在控制菌检查方法适用性试验中还可以减少因接种量不同而导致的结果差异。

第三, 《中国药典》中规定, 实验室应建立菌种管理(从标准菌株到工作菌株)的文件和记录, 内容包括菌株的申购、进出、收集、贮藏、确认、转种、使用以及销毁等全过程[2]。而使用商业派生菌株则只需要由生产厂家提供溯源性报告和菌种证明(COA), 保证其溯源性以及标准菌株的等效性。降低了菌种文件管理的复杂程度, 减少了菌种管理员的工作量。

但是, 使用商业派生菌株也应注意到以下几点:

商业派生菌株单支价格较高, 对于使用频繁的工作菌株, 采用 0 代标准菌株来制备多支标准储备菌株更经济实惠; 而一些不常用的菌种, 或者受实验条件所限难以达到目标浓度的菌种, 采用商业派生菌株可以简化实验程序, 节约人力成本。实验室可根据菌种的使用频率来合理选择。其次, 保存在超低温冰箱的 0 代冻干菌种一般可在 5 年内使用[11], 但是商业派生菌株的有效期较短, 多数为 6 至 18 个月, 所以应当根据需求进行采购, 避免过量采购造成浪费。第三, 同样规格但不同的生产厂家, 甚至不同生产批次之间的商业派生菌株可能会有差异, 因此采购时尽量选择同一厂家同一批次的产品, 减少实验误差。另外, 与标准菌株相同的是, 商品派生菌株使用完毕后, 废弃的菌液及菌种的包装瓶和瓶盖等也须按适当的方法灭活后方可丢弃[12]。

7. 结语

对于药品微生物实验室来说, 商业派生菌株的使用是实验室发展的一大进步, 合理使用商业派生菌株可以减少实验步骤及人员管控成本, 降低实验人员操作经验对实验结果的影响, 提高实验成功率, 为药品微生物实验室的检验工作带来便利。

参考文献

- [1] 中国药典 2015 年版四部[S]. 2015: 140-142, 145-146, 390, 395.
- [2] 中国药典 2020 年版第三次征求意见稿 9203 药品微生物实验室质量管理指导原则[S].
- [3] 中国药典 2020 年版第四次征求意见稿 1101 无菌检查法[S].
- [4] 中国药典 2020 年版第三次征求意见稿 1105 非无菌产品微生物限度检查: 微生物计数法[S].
- [5] 中国药典 2020 年版第三次征求意见稿 1121 抑菌效力检查法[S].
- [6] CNAS-CL01-A001 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S]. 2018: 3-4, 7.
- [7] 叶桦秀, 李丽丽, 江莉莉. VITEK2Compact 微生物全自动分析系统的应用及鉴定结果分析[J]. 中国医疗器械信息, 2017, 23(24): 152-153, 156.
- [8] 中国药典 2020 年版第三次征求意见稿 9204 微生物鉴定指导原则[S].
- [9] 黄琴, 李伟, 卢明枝. 浅谈实验室标准菌株的管理[J]. 中国检验检测, 2018, 26(1): 59-60, 14.
- [10] Kell, D.B. and Young, M. (2000) Bacterial Dormancy and Culturability: The Role of Autocrine Growth Factors. *Current Opinion in Microbiology*, **2000**, 238-243.
- [11] 马绪荣, 苏德模. 药品微生物检验手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000:45.
- [12] 汪穗福. 微生物检测验证技术[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2005: 1.