

药品无菌快速检测技术的研究进展

洪晓丹, 朱欢敏, 方燕玲

广东省药品检验所, 广东 广州
Email: xd.hong@qq.com

收稿日期: 2020年11月2日; 录用日期: 2020年11月13日; 发布日期: 2020年11月20日

摘要

各国药典现行的无菌检查法存在着耗时长、有部分微生物在常规的培养方法下不生长等问题, 因此建立快速的无菌检查新方法, 以提高检测灵敏度、准确度、自动化程度, 缩短检验时间, 补充或替代现行药典的常规检查方法, 已经成为国内外无菌制剂的研究热点。本文就核酸扩增、流式细胞、三磷酸腺苷生物发光成像及呼吸作用等新技术在无菌快速检测中的研究进展进行了综述。

关键词

无菌快速检测, 核酸扩增, 流式细胞技术, 三磷酸腺苷生物发光成像技术, 呼吸检测

Research Progress of Rapid Sterility Test

Xiaodan Hong, Huanmin Zhu, Yanling Fang

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

Received: Nov. 2nd, 2020; accepted: Nov. 13th, 2020; published: Nov. 20th, 2020

Abstract

For pharmacopeias in domestic and abroad, there are deficiencies in the existing sterility test including long inspection time and some microorganisms unable to grow under routine experimental conditions, etc. It has become a focus of sterile preparation research to establish a new method of sterility test in order to improve its sensitivity, accuracy, automation and also shorten the inspection time. Such research aims to supplement or replace routine examination methods in the current pharmacopeias. This paper reviews the research progress of rapid sterility test by using the advanced technology of nucleic acid amplification, flow cytometry, ATP bioluminescence and respiration in recent years.

Keywords

Rapid Sterility Test, Nucleic Acid Amplification, Flow Cytometry, ATP Bioluminescence, Respiration

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

药品的微生物检查是保证药品质量、降低临床不良反应的必要手段。对于高风险的无菌制剂，无菌检查在其生产、流通和监管环节具有重要意义。目前各国药典对药品的无菌检查均采用培养基浑浊观察法来判断其无菌状况[1][2]。现行的无菌检查法作为法定方法及判定金标准沿用多年，适用范围广，但也存在着一定的局限性。首先，现行检查法耗时长，需要 14 d 的培养时间。对于短效期的无菌制剂，如部分细胞和基因治疗产品、正电子发射层析显像产品(PET)等，现行的无菌检查法无法保证在产品使用前完成检查，不利于产品的快速放行，也不利于企业及早采取纠正措施。而对于无法终端灭菌的产品，也迫切需要补充快速的检查方法实现在线无菌检查。其次，现行的无菌检查法具有一定的主观性，对于不引起培养基浑浊的微生物污染，肉眼观察无法识别，可能产生假阴性判断，影响结果的准确性和可靠性。同时在整个检查过程中需逐日观察，自动化程度低。再者，当药品中的细菌处于活的非可培养状态(viable but nonculturable state, VBNC)时，菌落在常规的培养方法下无法生长繁殖，难以被检出[3]。

鉴于上述问题，探索和创新无菌快速检测技术，弥补药典现行无菌检查法的不足，以缩短检验时间，提高检测灵敏度、准确度、自动化程度，已经成为国内外无菌制剂的研究热点。中国药典 2010 年版首次在指导原则中收录了药品微生物检验替代方法验证的内容。美国药典于 2019 年 12 月新增一章节<1071>《无菌短货架期产品放行的快速微生物检查法：依据风险评估的方法》，为快速微生物检查法的应用提供指导原则。在该章节中，推荐适用于快速微生物检查的技术包括(按字母顺序排列)：三磷酸腺苷生物发光成像技术、流式细胞、等温微量热法技术、核酸扩增、呼吸作用、固相细胞计数。其中需要指出，等温微量热法技术在无菌产品放行试验中的具体应用尚未确定。固相细胞计数需要快速地对可过滤液体中的微生物进行计数，对不可过滤的产品不适用。因此，本文选取了其中的四项技术，核酸扩增、流式细胞、三磷酸腺苷生物发光成像技术、呼吸作用，对国内利用这些新技术进行无菌检查的研究进展进行了综述，以期促进无菌快速检测技术的进一步普及推广，并为无菌制剂的快速检测提供参考。

2. 核酸扩增

实时荧光定量 PCR (Real-time fluorescence quantitative PCR)是在传统 PCR 基础上加入荧光信号系统从而达到实时监测 PCR 扩增的目的。根据信号基团的不同，实时荧光定量 PCR 可以分为染料法和探针法。染料法成本较低，但存在着类似于普通 PCR 非特异性扩增产物干扰的假阳性问题。探针法中使用的探针多是 TaqMan 探针，其特异性有引物和探针双重保证，检测结果以更客观的数据形式呈现，可对样本进行阳性、阴性和可疑的判定，从而确保结果的准确性[4]。与染料法相比，在一定程度上避免了假阳性问题的出现。

细菌的 16S rRNA 基因内部结构由可变区和保守区组成，保守区为所有细菌共有，可变区在不同细菌之间存在不同程度的差异，具有属或种的特异性，选用 16S rRNA 作为分子指标已逐渐成为微生物检

测和分类鉴定的工具。王晓冲[5]等学者针对细菌 16S rRNA 应用实时荧光定量 PCR 技术开展药品无菌快速检测的研究。根据细菌的 16S rRNA 基因保守序列,选择通用引物和特异性荧光探针,进行实时荧光定量 PCR 检测。该研究将样品分别经大肠埃希菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌人工污染,利用实时荧光定量 PCR 方法和现行药典方法进行无菌检查,经比对,两种方法检出结果一致。考虑到样品中可能存在死菌及其基因组,实验中使用叠氮溴化丙锭(PMA)抑制死菌的基因组 DNA 扩增,并通过验证得出:PMA 可有效去除样品中死菌和其 DNA 片段的干扰,确保实时荧光定量 PCR 方法能准确区分出样品中活菌的存在。同时,通过考察得出该方法的最低检测限为 2 cfu/PCR,相当于 20 cfu/ml 的污染量即可被检出。

研究显示,实时荧光定量 PCR 方法具有准确度高和灵敏度高的特点,并且可以将检测时间缩短至 4 小时左右,在无需培养的情况下即可进行无菌检查,接近实时检测,同时解决了不可培养微生物难以被检测的问题,具有明确的可操作性和实际应用价值,可以作为药品无菌检查的快速筛查方法[6]。由于该方法的试剂盒成本高,DNA 抽提过程需要特殊仪器,同时在实验过程中涉及到引物、探针的设计和验证以及标准曲线的制作,所以一般情况并不适用于常规检测。

3. 流式细胞

流式细胞技术(flow cytometry)的检测原理是使用荧光染料标记微生物细胞,当微生物细胞以单细胞形式通过流式细胞柱时,以高能量激光照射高速流动下被染色的单细胞,检测并测量其产生的散射光和发射荧光的强度,经数字化处理和识别软件分析,实现对样品中微生物的检测分析。只要是可进行荧光分子标记的微粒和细胞,均可应用流式细胞仪(flow cytometer)检测。流式细胞技术因其能快速、大量地对细胞(或微粒)进行定性或定量检测,具有自动化和标准化的优点,在国外细菌实验室的常规检测中应用广泛,但在国内的发展和起步较晚。

宋光艳[7]等学者应用流式细胞技术进行药品无菌快速检测的研究。该研究选用荧光染料 SYTO9 对药品中微生物进行荧光标定,SYTO9 具有很强的微生物细胞膜穿透能力,与核酸结合后信号强度能极大地增强,因此能够通过荧光强度的强弱将药品中的微生物和非生物粒子区分开,对微生物具有良好的标定作用[8]。将样品按照不同的污染量,分别人工污染大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、生孢梭菌和以上混合菌液,采用流式细胞方法和药典方法进行无菌检查,比对两种方法的检出结果和检出时间。两种方法的检出结果一致,采用流式细胞仪检测可以大大缩短检出时间,更加快捷。当样品中微生物污染量达 10^5 cfu 或更高水平时,采用流式细胞仪无需增菌即可直接检出,染色标定 15 min,上机检测 30 s 便能够得到检测结果。当污染量在 10 cfu 或以上但未达 10^5 cfu 水平时,流式细胞方法需经一定时间的微生物富集培养后方可检出,但检出时间仍比药典常规检测方法缩短了 40%~70%。通过对溶液型注射液和注射用无菌粉末两种模型药品的考察,采用流式细胞方法的检出限均 <10 cfu。

研究显示,流式细胞技术具有自动化及标准化的优点,并可将检测时间大大缩短,在无需培养或只需较短时间富集培养即可提高检测限的情况下进行无菌检查,具有明确的可操作性和实际应用价值,可考虑作为法定检查法的有效补充。

4. 三磷酸腺苷生物发光成像技术

所有活细胞的能量都以 ATP (Adenosine triphosphate)形式储存,当 ATP 和虫荧光素在荧光素酶和氧气的催化氧化下,释放能量,产生光信号。通过检测 ATP 在反应过程中产生的荧光强度,可以间接测定样品中的微生物含量。

魏树源[9]等学者研究应用 ATP 生物发光技术进行疫苗中间产品的无菌检查。该研究对 59 批麻疹减

毒活疫苗单次收获液分别用 ATP 生物发光法和药典无菌检查法进行检测, 比较两者结果的一致性。采用前培养法进行增菌培养 72 h 后, 通过 ATP 荧光检测仪测量相对荧光值(Relative Light Units, RLU), 无污染样品获得低 RLU 结果, 而污染样品的 RLU 值比无污染样品高出 2 倍以上。通过增菌培养, 游离的 ATP (如有些培养基成分本身含有的 ATP) 基本降解殆尽, 而哺乳动物细胞由于培养环境改变很快死亡, 从而可以有效区分微生物与非微生物的 ATP。研究结果显示, 两种方法检测结果的阳性符合率为 80%, 阴性符合率为 98.15%, 两种方法各有 1 个样品另外一种方法未检测出。经分析, 出现这种情况的原因可能为抽样误差所致。另外, 样品本身、ATP 提取剂等含有的离子或者疫苗原液残留的抗生素等因素, 都有可能对 ATP 的测定产生干扰, 需待进一步研究探讨。

ATP 生物发光技术是一项成熟的技术, 因其操作快速简便、重现性好等特点, 被惠氏制药、葛兰素史克等多家国外制药企业采用作为疫苗的微生物检测。由于其检测限约为 10^3 cfu/ml, 灵敏度不高, 所以一般需经过富集培养 24~72 h 后方可检测。但较之现行无菌检查法的 14 d 培养周期, ATP 生物发光法仍然可以有效地缩短检验时间, 减少无菌产品的库存周期, 实现无菌制剂的快速检查, 为无菌检查提供一种新的参数放行模式。

5. 呼吸作用

微生物液体培养时产生 CO_2 , 可以通过监测密闭容器中 CO_2 含量的变化来监测微生物的生长, BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统正是基于这一原理进行检测。如果检测样品中有微生物存在, 当微生物代谢培养基中的底物时, 产生 CO_2 , CO_2 信号被该系统的 LES 感应器捕获, 并经过信号转换和放大, 系统发现阳性后立即报警。在适当条件下经过一定天数培养后, 如果 CO_2 水平无显著改变, 则判定样品为阴性。

李珏[10]等学者考察研究 BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统在特定注射剂产品中替代无菌检查法的可行性。该研究选取门冬氨酸钾镁注射液、丹参注射液和鸦胆子油乳注射液三种不同类型的无菌制剂, 分别从专属性、检测限、重复性及耐用性这四个方面, 比较采用 BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统及药典无菌检查法两者检测结果的异同。研究结果显示, 对于门冬氨酸钾镁注射液, BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统与药典无菌检查法的检测结果基本相当, 并且可以极大缩短培养时间, 细菌 48 h, 真菌 72 h 内可以测定并得到可靠检测结果。但专属性试验结果显示, BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统不适用于丹参注射液和鸦胆子油乳注射液的无菌检查, 存在假阴性或假阳性的情况。由此可见, 样品本身的特性对于 BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统的影响是明显的, 有其局限性, 并非适用于所有样品。因此, 在考察替代方法的可行性时, 需要逐一样品进行验证。国内外药典对采用替代方法时均有进行方法验证的规定。中国药典在药品微生物检验替代方法验证指导原则中规定, 采用非药典规定的检验方法(即替代方法)时, 应进行替代方法的验证, 确认其应用效果优于或等同于药典的方法。美国药典在新增章节<1071>《无菌短货架期产品放行的快速微生物检查法》中要求每个专属产品均有方法适用性评估。

基于呼吸作用原理的微生物检测技术都需要检测微生物的生长和代谢活动, 因此通常需要 2~7 d 培养才能得到结果, 但与现行的无菌检查法相比, 仍然可以有效地缩短培养和检测时间。此外, BacTALERT[®] 3D 微生物检测系统的优点在于转接简单, 采用通过传感器检测颜色信号变化的技术, 免去了传统无菌检查法中的繁琐操作和人为的浊度判读法。

6. 展望

近年来, 生物技术的快速发展为制药行业带来了新的活力和新的挑战, 基因治疗药物、细胞治疗药物等创新药物的出现为患者带来新的希望, 对无菌检查也是一个严峻的考验, 单一依靠传统的无菌检查

法将不能适应新的局面。为满足产品质量控制和快速放行的要求,迫切需要改进与创新无菌检查法。

与现行的无菌检查法相比,新的无菌快速检测技术自动化程度和灵敏度更高,提高了检测通量,重现性好,可有效缩短检测时间,从 14 d 的检验周期缩短到几天或几小时,部分技术还实现了实时检测。检查结果的快速和实时获得,使得实验室从被动模式变为主动模式,不仅可以实现无菌制剂的快速放行,还可以进行在线过程控制,对无菌生产工艺过程作出及时的微生物质量评价。

各类无菌快速检测技术平台的发展和运用,包括基于微生物培养的快速发现和鉴定技术、活细胞识别鉴定技术和基因及芯片识别鉴定技术,能够快速发现并鉴定出多种微生物及变异微生物;能明确样品中微生物的数目;识别微生物的属、种和亚种,为制药过程中的环境监测、污染事件的调查分析和评估提供了强有力的技术支持。不仅可以应对创新药物的无菌检查,还可以加强目前已批准产品无菌检查的保证水平,提高患者的用药安全性。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 附录 1101: 156-160.
- [2] USP (2017) 40th Edition. Volume 1: 136-143.
- [3] 赵黎黎, 包秋华, 赵国芬. 细菌 VBNC 态检测技术的研究进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(4): 96-101.
- [4] 姜文灿, 岳素文, 江洪, 等. 探针法实时荧光定量 PCR 的应用和研究进展[J]. 临床检验杂志, 2015, 4(1): 797-805.
- [5] 王晓冲, 周继昌, 李军, 等. 实时荧光定量 PCR 方法应用于药品无菌快速检测的研究[J]. 中国现代应用药学, 2013, 30(12): 1333-1337.
- [6] 周朝东, 黄哲甦, 等. 荧光定量 PCR 技术在药品检验领域中的应用[J]. 天津药学, 2018, 30(2): 65-71.
- [7] 宋光艳, 冯震, 潘盈盈, 等. 流式细胞技术在药品无菌检查中的应用研究[J]. 中国药师, 2018, 21(2): 342-345.
- [8] Stiefel, P., Schmidt-Emrich, S., Maniura-Weber, K., et al. (2015) Critical Aspects of Using Bacterial Cell Viability Assays with the Fluorophores SYTO9 and Propidium Iodide. *BMC Microbiology*, **15**, Article Number: 36. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0376-x>
- [9] 魏树源, 杨京生, 陈晓琦, 等. 三磷酸腺苷生物发光快速微生物检测法在疫苗中间品无菌试验中的应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(10): 1120-1124.
- [10] 李珏, 王知坚, 郑小玲, 等. BacTALERT® 3D 微生物检测系统作为无菌检查替代方法可行性的探讨[J]. 中国现代应用药学, 2015, 32(4): 474-478.