

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

ZYGZEA

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

● 中国中文核心期刊

● 中国生物医学核心期刊

● 中国期刊方阵入选期刊

● 中国科技核心期刊

● 中国科学引文数据库来源期刊

● 中国药学会系列期刊

本期导读：

罗沙司他的合成研究进展

张其伟，周嘉第，陈永健，李坚军

非甾体抗炎药上市外用剂型概况及新载体研究进展

林国锁，罗华菲



微信号：cjph-cjph



主 办

上海医药工业研究院

中国药学会

中国化学制药工业协会

11

2019年11月

第50卷

Vol.50 No.11

ISSN 1001-8255

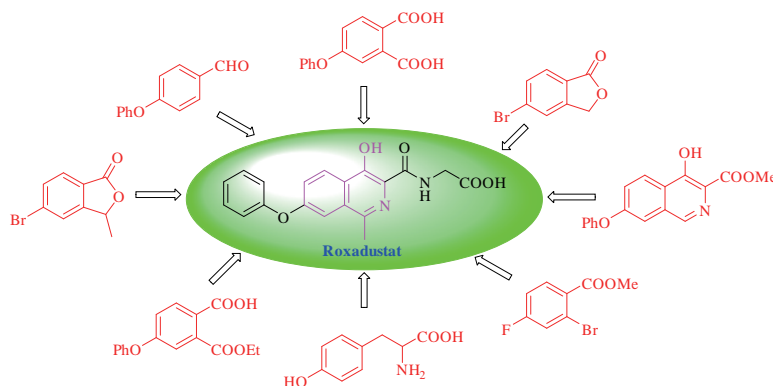


9 771001 825190

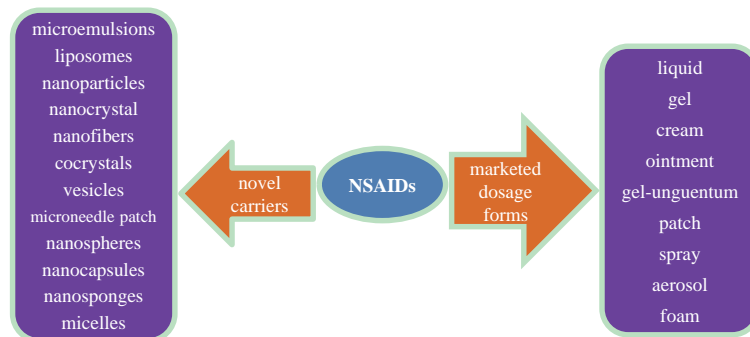
1.1>

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

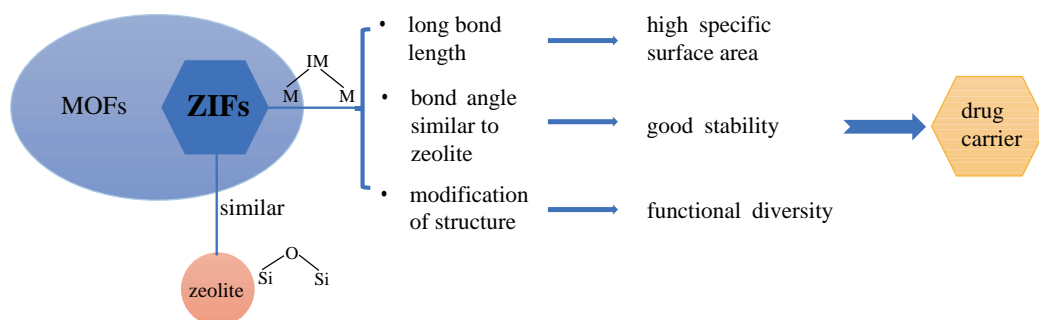
- 1237** 罗沙司他的合成研究进展.....张其伟, 周嘉第, 陈永健, 李坚军*
Progress in the Synthesis of Roxadustat.....ZHANG Q W, ZHOU J D, CHEN Y J, LI J J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.001



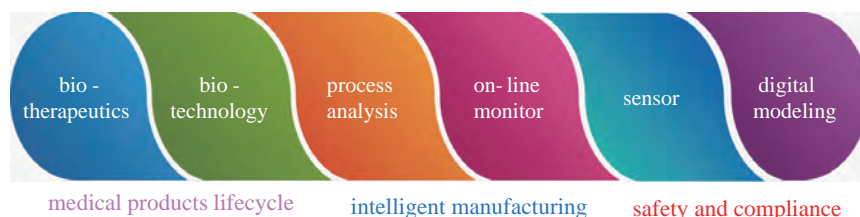
- 1246** 非甾体抗炎药上市外用剂型概况及新载体研究进展·····林国钊, 罗华菲*
Progress of Approval Topical Dosage Forms of Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs and
Their Novel Carriers·····LIN G B, LUO H F*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.002



- 1256** 类沸石咪唑酯骨架 (ZIFs) 及其复合物在药物递送系统中的应用.....赵悦竹, 张薇薇, 付庆辉, 杨亚妮, 何 军*
Application of Zeolitic Imidazolate Frameworks (ZIFs) and Their Complexes in Drug Delivery Systems.....ZHAO Y Z, ZHANG W W, FU Q H, YANG Y N, HE J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.003

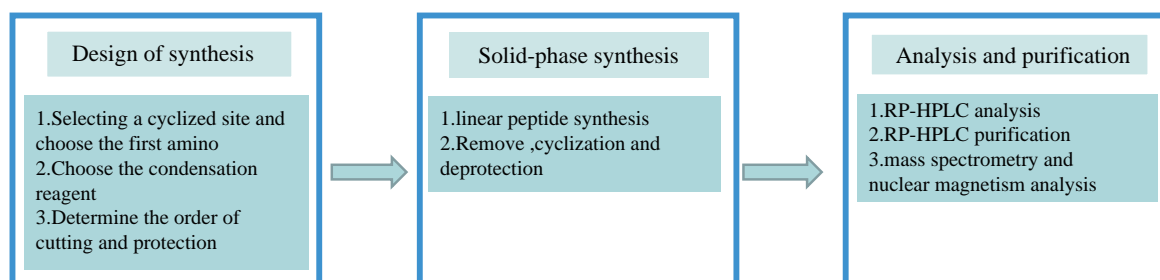


- 1262** 信息技术在生物制药工业中的应用.....董正龙, 曹 萌*
Application of Information Technology in Biopharmaceutical Industry.....DONG Z L, CAO M*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.004



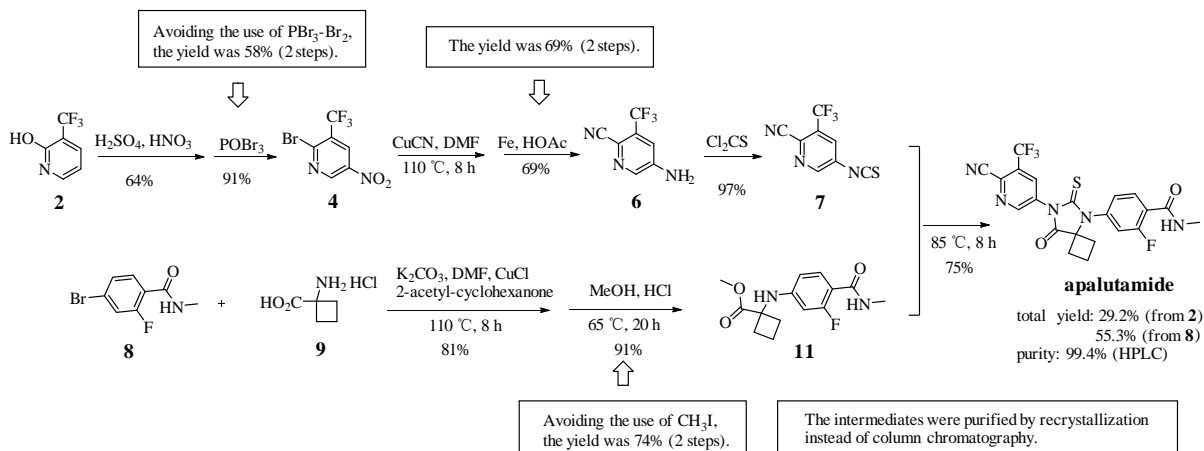
· 研究论文(Paper) ·

- 1268** 抗肿瘤环八肽 Reniochalistatin E 的固相合成....刘泰容, 莫金秋, 李长兵, 姜 和, 廖洪利*
Solid-phase Synthesis of Antitumor Cyclic Octapeptide Reniochalistatin E.....
.....LIU T R, MO J Q, LI C B, JIANG H, LIAO H L*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.005

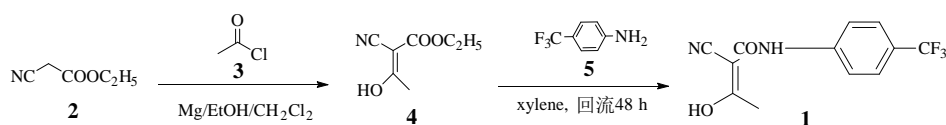


This process technology has several advantages such as cheap material and high yield in the industrial production.

- 1273** 阿帕鲁胺的合成方法改进.....林 楠, 马骥驰, 范松华
Improved Synthesis of Apalutamide.....LIN N, MA J C, FAN S H
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.006



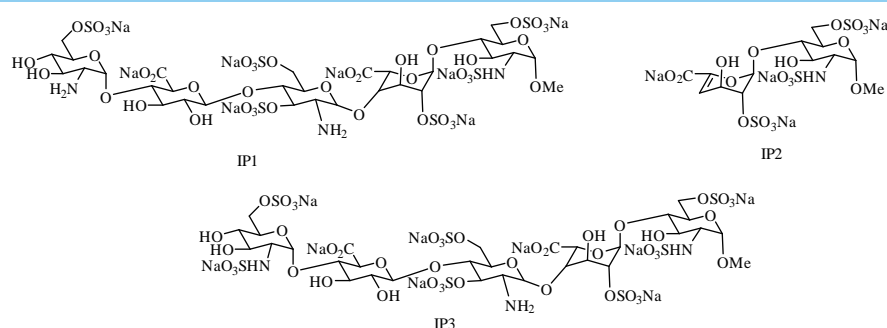
- 1278** 特立氟胺的新合成方法.....邱 月
A New Method for the Synthesis of Teriflunomide.....QIU Y
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.007



A new synthetic route of teriflunomide was reported, and the total yield was 63.9%.

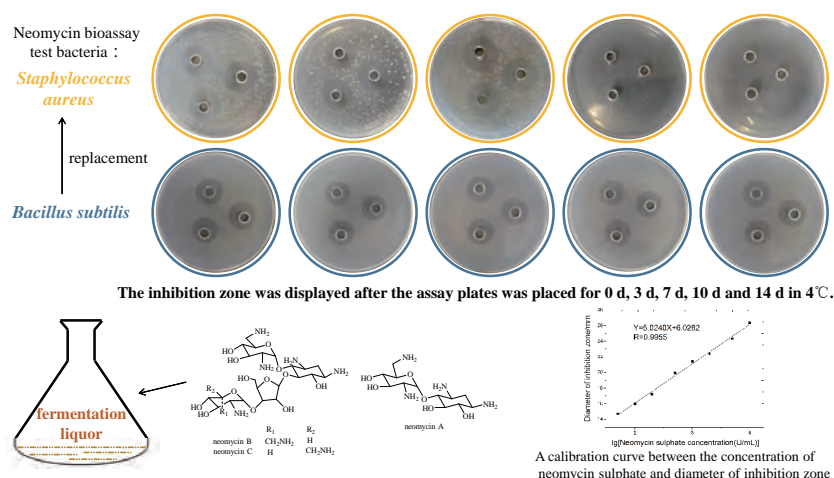
It provided a better choice for industrial production.

- 1280** 磺达肝癸钠注射液有关物质的合成.....干 浩, 徐珊珊, 周喜泽, 李振重
 Synthesis of the Related Substances of Fondaparinux Sodium Injection.....
GAN H, XU S S, ZHOU X Z, LI Z Z
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.008

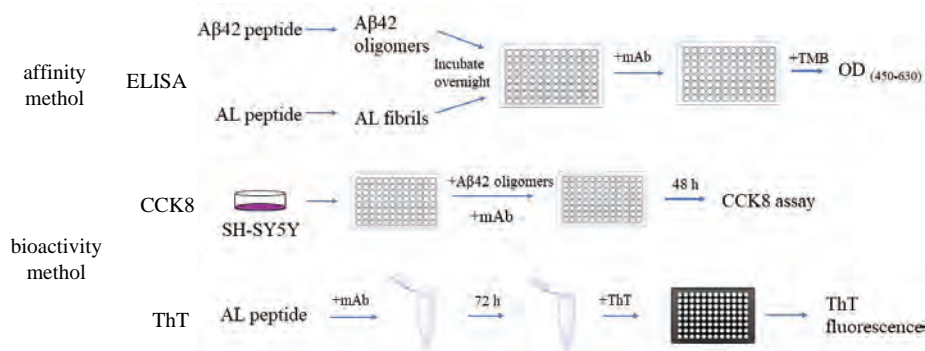


Chemical Structures of the Related Substances of Fondaparinux Sodium

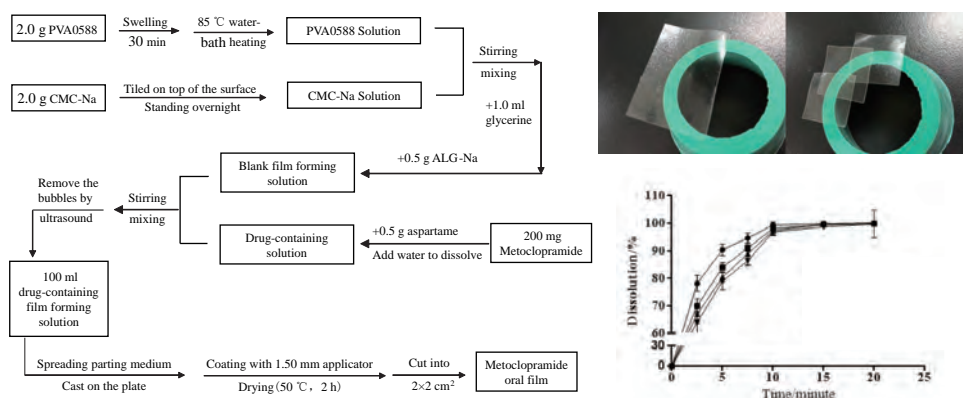
- 1285** 新霉素微生物检定法的改进.....张 晶, 岳 荣, 关 莹, 程绍国, 张会图*
 Improved Microbial Assay of Neomycin.....
ZHANG J, YUE R, GUAN Y, CHENG S G, ZHANG H T*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.009



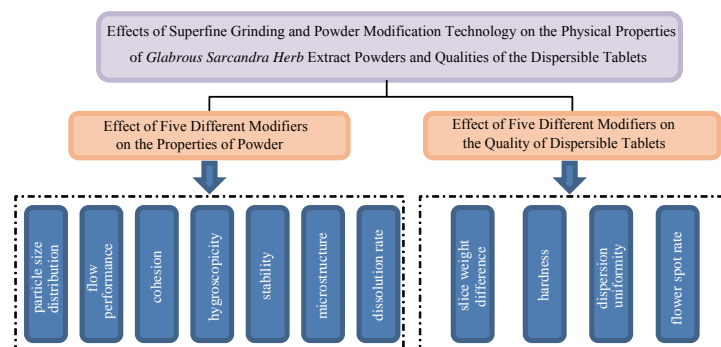
- 1290** 抗 A β 和 AL 双抗原的单克隆抗体亲和力与活性检测方法的建立.....
白婧怡, 边延林, 马步勇, 张宝红, 朱建伟*
 Establishment of Affinity and Bioactivity Analysis Methods for Monoclonal Antibody Targeting A β and AL.....
BAI J Y, BIAN Y L, MA B Y, ZHANG B H, ZHU J W*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.010



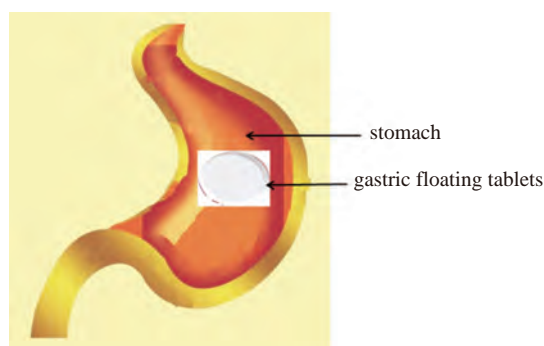
- 1296** 甲氧氯普胺口腔速溶膜剂的制备与体外评价···尚 悦, 赵 炯, 李昊天, 周建平*, 丁 杨
Preparation and *in vitro* Evaluation of Metoclopramide Oral Fast Dissolving Films·····
·····SHANG Y, ZHAO J, LI H T, ZHOU J P*, DING Y
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.011



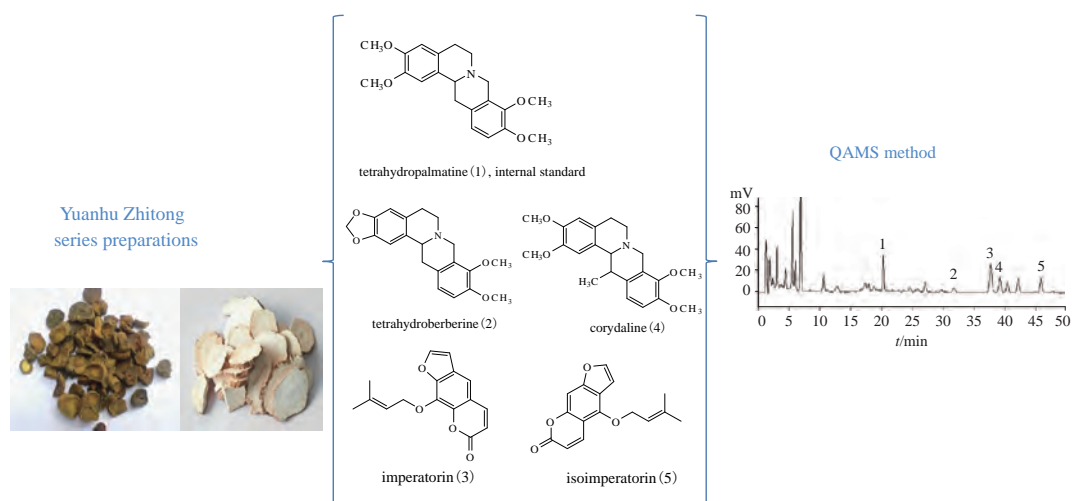
- 1304** 超微粉碎粉体改性技术对肿节风浸膏粉物性及其分散片质量的影响·····李 菁, 钟 钰, 胡鹏翼*, 戴德雄, 杨 明
Effects of Ultrafine Grinding and Powder Modification Technology on the Physical Properties of
Glabrous Sarcandra Herb Extract Powders and Qualities of the Dispersible Tablets·····
·····LI J, ZHONG Y, HU P Y*, DAI D X, YANG M
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.012



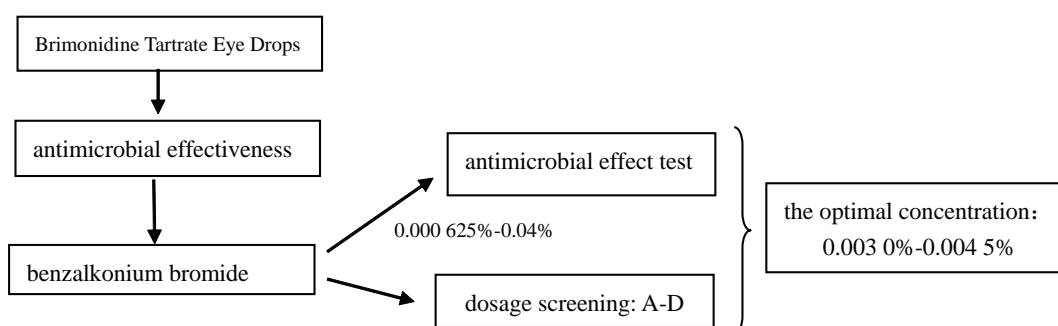
- 1312** 桦褐孔菌三萜胃滞留片的研制·····李 鑫, 陈 旭, 李钰璐, 汤茗瑞, 王柳婷
Preparation of Gastric Floating Tablets Loaded with Triterpenoids from *Inonotus obliquus*
·····LI X, CHEN X, LI Y L, TANG M R, WANG L T
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.013



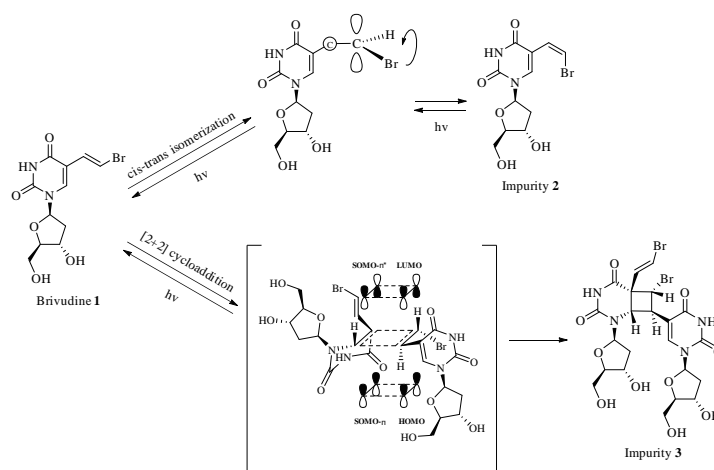
- 1318** 一测多评法测定元胡止痛系列制剂中5种成分的含量……刘瑞洁, 张雪, 叶晓霞, 乐健*
Simultaneous Determination of Five Components in *Yuanhu Zhitong* Series Preparations by QAMS
……LIU R J, ZHANG X, YE X X, LE J*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.014



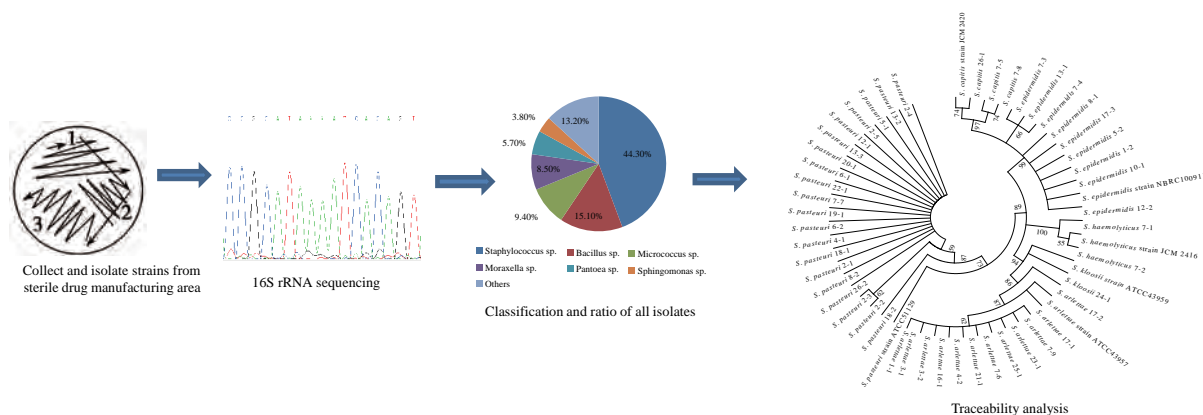
- 1324** 酒石酸溴莫尼定滴眼液抑菌剂苯扎溴铵剂量筛选研究……李伟栋, 苑艳飞, 王维欣, 王兰兰
Dosage Screening of Benzalkonium Bromide in Brimonidine Tartrate Eye Drops……
……LI W D, YUAN Y F, WANG W X, WANG L L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.015



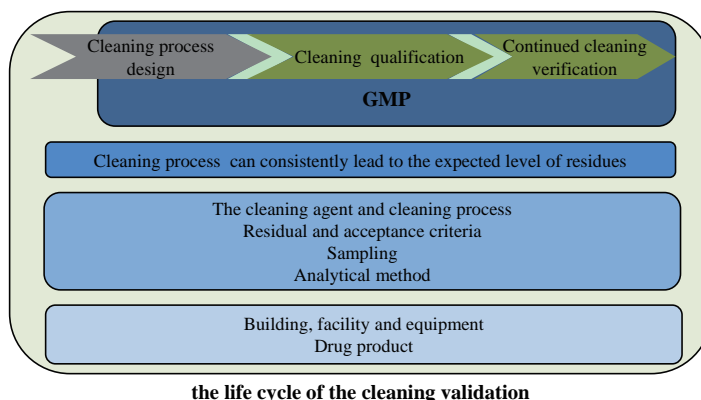
- 1329** 溴夫定光降解杂质的结构鉴定与机理分析……吴旭锋, 钱秀萍*, 刘涿
Structure Identification and Mechanism Analysis of Photodegradation Impurities from Brivudine
……WU X F, QIAN X P*, LIU L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.016



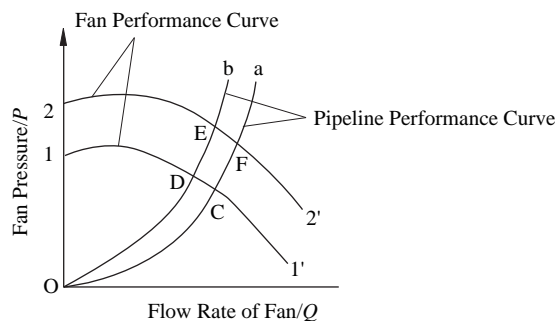
- 1335** 无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析.....刘卫德, 刘绪平*, 熊 骏, 李彦霖, 章 瑛
Identification and Traceability Analysis of Environmental Bacteria in Clean Room of Sterile Drug Manufacturing.....LIU W D, LIU X P*, XIONG J, LI Y L, ZHANG Y
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.017



- 1341** 药品生产中清洁验证的生命周期探讨.....翟铁伟
Comment to the Life Cycle of Cleaning Validation.....ZHAI T W
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.018



- 1348** 抖袋过程对流化床稳定运行影响的研究与分析.....马少栋, 孙 健, 方 策, 吴国桥
Research and Analysis on Effect of Shaking Bag System on Stable Operation of Fluid BedMA S D, SUN J, FANG C, WU G Q
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.019



- 1352** 无菌药品包装完整性研究.....封二飞
Research of Sterile Products Packaging Integrity.....FENG E F
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.020

- 1358** 关于推动互联网+药品监管的思考.....袁 林
Perspective on Facilitating Internet + Drug Post-marketing Regulation.....YUAN L
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.021

- 1361** 欧盟地区生物类似药可互换性政策与管理实践研究.....
.....里扎·阿德列提别克, 蒋 蓉, 邵 蓉*
Interchangeability Policy and Management Practice of Biosimilars in the EU.....
.....LIZHA A, JIANG R, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.022

- 1367** 我国体外诊断试剂产业发展现状、问题及对策.....徐芳萍, 黄慧媛, 褚淑贞*
Development Status and Problems of IVD Reagent Industry in China.....
.....XU F P, HUANG H Y, CHU S Z*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.023

- 1374** 2019 年上半年我国医药工业经济运行情况分析.....郭 文, 钟一鸣, 周 斌*
Economic Operation of Chinese Pharmaceutical Industry from January to June 2019.....
.....GUO W, ZHONG Y M, ZHOU B*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.024

中国医药工业杂志

ZHONGGUO YIYAO GONGYE ZAZHI

(月刊, 1970年11月创刊)

2019年第50卷 第11期 11月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.11 November 10, 2019

©All Rights Reserved

主 管	上海医药工业研究院	Director	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry
主 办	上海医药工业研究院 中国药学会 中国化学制药工业协会	Sponsor	Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Chinese Pharmaceutical Association China Pharmaceutical Industry Association
协 办	浙江海正集团有限公司 上海数图健康医药科技有限公司 山东罗欣药业集团股份有限公司 楚天科技股份有限公司 鲁南制药集团股份有限公司 广东东阳光药业有限公司	Assist Sponsor	Zhejiang Hisun Group Co., Ltd. China Pharmadl (Shanghai) Co., Ltd. Shandong Luoxin Pharmaceutical Group Stock Co., Ltd. Truking Technology Limited Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd. Sunshine Lake Pharma Co., Ltd., HEC Pharma Group
总 编 辑	周伟澄	Managing Editor	ZHOU Weicheng
副 总 编 辑	黄志红, 刘玲玲	Associate Managing Editor	HUANG Zhihong, LIU Lingling
责 任 编 辑	刘玲玲	Executive Editor	LIU Lingling
出 版 单 位	《中国医药工业杂志》编辑部	Editor by	Editorial Board of <i>Chinese Journal of Pharmaceuticals</i>
编 辑 部 地 址	上海市北京西路1320号 (200040)	Address for Foreign Subscriber	1320 Beijing Road (W), Shanghai 200040, China
电 话	021-62793151	Tel	0 086-21-62793151
传 真	021-62473200	Fax	0 086-21-62473200
电 子 邮 件	cjph@pharmadl.com	E-mail	cjph@pharmadl.com
网 址	www.cjph.com.cn www.pharmadl.com	Web Site	http://www.cjph.com.cn http://www.pharmadl.com
广告发行联系			
电 话	021-62126987, 62473200	Tel	021-62126987, 62473200
传 真	021-62473200	Fax	021-62473200
电 子 邮 件	ouyy@pharmadl.com	E-mail	ouyy@pharmadl.com
印 刷	上海欧阳印刷厂有限公司	Printed by	Shanghai Ouyang Printing Co., Ltd.
发 行 范 围	公开发行		
国 内 发 行	上海市报刊发行局	Domestic Distributed by	Local Post Office
国 外 发 行	中国国际图书贸易集团有限公司 (北京399信箱, 100044)	Abroad Distributed by	China International Book Trading Corporation (P.O.Box 399, Beijing 100044, China)
国 内 订 阅	全国各地邮政局		

* 通信联系人; 如为第一作者则不加“*”号。征稿简则刊登于当年第1期 *To whom correspondence should be addressed

[期刊基本参数] CN 31-1243/R *1970*m*A4*146*zh*P*20.00* *24*2019-11

2019年版权归《中国医药工业杂志》编辑部所有, 除非特别声明, 本刊刊出的所有文章不代表本刊编委会的观点。

ISSN 1001-8255

CN 31-1243/R

国内邮发代号 4-205

国外邮发代号 M6070

CODEN: ZYGZEA

国内定价: 每册 20.00 元



微信号: cjph-cjph



微博: weibo.com/cjph

无菌药品生产洁净车间环境菌鉴定与溯源分析

刘卫德¹, 刘绪平^{1*}, 熊 骏¹, 李彦霖², 章 瑛¹

(1. 江西省药品检验检测研究院 江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心, 江西南昌 330029;

2. 南昌大学医学院, 江西南昌 330031)

摘要: 为研究无菌药品洁净生产车间微生物种类、分布与数量, 开展环境微生物控制与溯源分析。本研究共采集分离到 106 株环境菌, 采用 16S rRNA 测序分析法对分离的菌株进行了鉴定分类, 初步建立了该无菌药品生产车间微生物数据库。结果表明所有菌株分属 18 个属, 革兰阳性菌占 76.4%, 革兰阴性菌占 23.6%, 主要优势菌群为葡萄球菌属, 占比 44.3%。同时, 研究发现人员是增加环境微生物的主要风险因素。

关键词: 药品; 洁净车间; 环境菌; 鉴定; 溯源; 16S rRNA

中图分类号: TQ460.8⁺2 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)11-1335-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.11.017

Identification and Traceability Analysis of Environmental Bacteria in Clean Room of Sterile Drug Manufacturing

LIU Weide¹, LIU Xuping^{1*}, XIONG Jun¹, LI Yanlin², ZHANG Ying¹

(1. Jiangxi Institute for Drug Control, Jiangxi Province Engineering Research Center of Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029;

2. Medical College, Nanchang University, Nanchang 330031)

ABSTRACT: In order to find the species, distribution and quantity of microorganisms in the clean room of sterile drug manufacturing, environmental microorganism control and traceability analysis were carried out. A total of 106 strains of environmental bacteria were collected and isolated in this study. These strains were identified through 16S rRNA sequencing, and a preliminarily microbial database of this room was established. It turns out that all strains belong to 18 genera, with 76.4% of which were Gram-positive bacteria and 23.6% for gram-negative, and the dominant bacteria were *Staphylococcus*, accounting for 44.3%. At the same time, the study found that people are the main risk factors of increasing environmental microorganisms.

Key Words: drug; clean room; environmental bacteria; identification; tracing; 16S rRNA

药品质量直接决定用药的安全性和有效性, 其优劣也备受社会各界关注, 而药品生产车间的环境状况又直接影响药品的最终质量, 因此, 生产环境

监测就成为了把关药品质量的重要一环。为避免“欣弗事件”和“刺五加事件”等与微生物污染相关的事件发生, 防止对公众的身体健康造成严重危害和无法挽回的损失。《药品生产质量管理规范(2010年修订)》(以下简称“新版 GMP”)规定企业应保证药品的生产环境符合要求, 无菌药品的生产须满足其质量和预定用途的要求, 应当最大限度降低微生物、各种微粒和热原的污染。产品的无菌或其它质量特性绝不能只依赖于任何形式的最终处理或成品检验(包括无菌检查)。随着新版 GMP 的施行, 国内大多数药品生产企业均已对硬件设施进行

收稿日期: 2019-05-13

基金项目: 江西省重点研发计划(20161BBG70238)、江西省食品药品监督管理局科研项目(2017YX05)、江西省食品药品监督管理局科研项目(2016SP01)

作者简介: 刘卫德(1984—), 男, 硕士, 从事药品微生物与质量控制研究。

E-mail: liuweide84@126.com

通信联系人: 刘绪平(1980—), 副主任药师, 硕士, 从事药品微生物与质量控制研究。

E-mail: sanyezao@yeah.net

改造, 并进行了微生物及微粒等的日常监控。但在微生物监控方面, 由于技术缺乏等方面的原因, 往往只进行了数量的统计, 未对微生物进行鉴定及溯源, 即没有建立企业自身的微生物数据库^[1]。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, 同时可为药品生产企业设计一个有效的洁净环境及表面消毒与清洁方案提供指导^[2]。因此, 建立洁净区微生物数据库, 对药品生产过程污染的有效控制具有重要的指导和现实意义^[3]。

当前对微生物鉴别的技术主要分为2类: 一是生理生化方法, 代表性方法为法国梅里埃公司的API试剂条及基于这类原理的自动微生物鉴定仪, 如VITEK2 Compact; 二是分子生物学方法, 代表性方法是细菌的16S rRNA测序分析和真菌的ITS测序分析。传统的微生物生化鉴定操作繁琐, 且有赖于微生物的纯培养, 其在一些难培养、生长缓慢或需要特殊营养的微生物鉴定方面有明显的局限性。相比传统生化鉴定试验, 微生物全自动鉴定系统尽管能够快速实现大部分细菌的种属鉴定, 但细菌表型特征的不稳定性及参比数据库菌种数量、来源的局限性, 严重影响着细菌最终鉴定结果的准确性^[4]。基于遗传物质的分子生物学鉴定技术为微生物的准确鉴定及分型提供了新的思路。16S rRNA / ITS遗传信息具有相对稳定性和易变异的双重特点, 不依赖于微生物的营养及生长状态, 在微生物的鉴定、分型中得到广泛应用^[5]。

本研究通过采集无菌药品生产车间的环境微生物进行分离纯化后, 采用16S rRNA测序分析技术对获得的菌株进行鉴定分析, 初步建立了该无菌药品生产车间的微生物数据库, 为该车间后续微生物污染溯源分析提供了数据基础, 对企业环境的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

DM3000B 荧光显微镜 (德国 Leica 公司); 全自动革兰染色仪 (法国生物梅里埃公司); C1000 PCR 仪、基础电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 5424R 冷冻离心机 (德国

Eppendorf 公司)。

1.2 培养基与试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基 (平板与接触皿)、营养肉汤培养基及革兰染色试剂盒均购自北京陆桥技术股份有限公司; Es Taq DNA Polymerase (5 U/ μ l)、100 bp DNA ladder 购自康为世纪生物科技有限公司。

1.3 引物

细菌 16S rRNA 基因扩增通用引物: 上游引物 27F (5'-AGTTTGATCMTGGCTCAG3'); 下游引物 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT3') 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.3 实验方法

1.3.1 环境菌的采集、分离及纯化

沉降菌及浮游菌的采样分别按照 GB/T 16294-2010 及 GB/T 16293-2010 进行; 人员及表面微生物采集采用接触碟法, 取样面积为 25 cm², 取样时打开碟盖, 无菌培养基表面与取样面直接接触, 均匀按压接触碟底板 10 s, 确保培养基表面与取样点表面均匀充分接触, 再盖上碟盖。所有采集样品倒置于 32.5 °C 恒温培养箱中培养 3 ~ 5 d 进行菌落计数。采集到的菌落经多次划线分离纯化后, 进行革兰染色鉴定, 最后以 10% 甘油重悬保存于 -80 °C 冰箱中。

1.3.2 细菌 DNA 的提取 (热裂解法)

取 -80 °C 冰箱保藏菌种, 于胰酪大豆胨琼脂培养基平板上划线分离, 挑取单菌落接种至 10 ml 营养肉汤液体培养基中, 于 35 °C 恒温培养箱中培养 24 ~ 72 h。取 1 ml 增菌液, 离心 (12 000 r/min) 2 min, 弃上清, 重复上述步骤 1 次, 菌体沉淀以 200 μ l 无菌水重悬, 于 95 °C 水浴锅加热 10 min, 离心 (12 000 r/min) 2 min, 取上清作为 PCR 模板 DNA。

1.3.3 16S rRNA 扩增与测序

PCR 反应体系 / μ l: 模板 DNA 2, Taq 酶 0.2, 10 \times Buffer 2.5, dNTPs (各 2.5 μ mol/L) 2, 上下游引物 (10 μ mol/L) 各 1, dd H₂O 补足至 25 μ l。

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 10 min; 94 °C 变性 30 s、58 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 45 s, 30 次循环; 72 °C 再延伸 5 min; 4 °C 保存。

PCR 扩增产物以 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 选择条带单一清晰, 大小正确 (约 1 500 bp) 的样品, 由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行纯化、测序。

1.3.4 测序结果分析

将测序获得的 16s rRNA 序列校准拼接后, 于 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 中进行 Blast 比对分析, 获得相应菌株分类信息, 并进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 环境菌分离

本研究共采集分离到 106 株菌, 详见表 1。

分析上表中的数据发现, D 级区共分离到 17 株菌, 占比 16.0%; C 级区共分离到 77 株菌, 占比 72.6%; A 级区共分离到 6 株菌, 占比 5.7%; 操作人员洁净服及手指上共分离到 6 株菌, 占比 5.7%。值得注意的是, 在人员进出洁净车间的前 7 个区域 (含更衣、手消毒及洁净走廊) 共分离到 59 株菌, 占比高达 55.7%, 提示人员的进出是增加洁净车间微生物负载的重要因素。

2.2 菌株鉴定结果

经 16s rRNA 序列测定后, 获得所有 106 株菌的种属信息, 详见表 2。分析发现, 所有菌株分属 18 个属, 革兰阳性菌占 76.4%, 革兰阴性菌占 23.6%。其中葡萄球菌属无论是分离率还是区域

分布率均为最高, 占有所有分离菌株的 44.3%; 其他分离率较高的菌属依次为芽孢杆菌属、微球菌属、莫拉菌属、泛菌属及鞘氨醇单胞菌属, 分别占 15.1%、9.4%、8.5%、5.7% 及 3.8%, 剩余 12 个菌属共占比 13.2%, 见图 1。

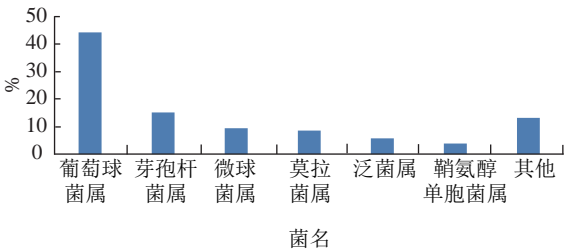


图 1 各属菌株数占总菌株数的比例

Fig.1 Proportion of the Number of Bacteria in Each Genus to the Total Number of Bacteria

2.3 菌株溯源分析

以本研究中分离到的优势菌属葡萄球菌属采用 MEGA7 构建系统进化树, 见图 2 (菌株名后的序号代表分离区域, 含义同表 1, “-” 后数字代表同一区域分离到的葡萄球菌菌株的序号)。47 株菌分属巴氏葡萄球菌 (*Staphylococcus pasteurii*)、阿尔莱特葡萄球菌 (*Staphylococcus arlettae*)、克鲁西葡萄球菌 (*Staphylococcus kloosii*)、溶血性葡萄球菌 (*Staphylococcus haemolyticus*)、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermidis*) 及头状葡萄球菌

表 1 各区域分离菌株数

Tab.1 Number of Strains Isolated in Each Region

序号	采集区域	洁净度级别	分离株数	序号	采集区域	洁净度级别	分离株数
1	女更	D	7	14	瓶精洗室	C	1
2	男更	D	10	15	胶塞清洗室	C	1
3	女穿洁净服室	C	9	16	灌装室	C	3
4	男穿洁净服室	C	9	17	器具清洗室	C	5
5	女洗手消毒室	C	4	18	气闸室1	C	2
6	男洗手消毒室	C	3	19	人流气闸室	C	2
7	洁净走廊	C	17	20	物料气闸室(一)	C	1
8	洁净服清洗室	C	4	21	轧盖室	C	2
9	洁净服整理存放室	C	2	22	消毒剂存放室	C	3
10	洁具洗存室	C	2	23	灌装室A级区	A	4
11	稀配室	C	1	24	胶塞清洗室(A级区)	A	1
12	浓配气闸室	C	2	25	瓶精洗室(A级区)	A	1
13	浓配室	C	4	26	人员		6

表 2 采集菌的菌属分布及数量
Tab.2 Distribution and Quantity of Collected Bacteria

菌属名称	英文名称	革兰染色	株数	采集区域 ^a
葡萄球菌属	<i>Staphylococcus sp.</i>	G ⁺	47	除9/11/14/15外的所有区域
芽孢杆菌属	<i>Bacillus sp.</i>	G ⁺	16	1/3/7/8/10/13/14/17/21/22/26
微球菌属	<i>Micrococcus sp.</i>	G ⁺	10	1/3/4/7/11/17
莫拉氏菌属	<i>Moraxella sp.</i>	G ⁻	9	1/2/3/4/5/7/9
泛菌属	<i>Pantoea sp.</i>	G ⁻	6	4/6/16/19/26
鞘氨醇单胞菌属	<i>Sphingomonas sp.</i>	G ⁻	4	4/16/23
考克菌属	<i>Kocuria sp.</i>	G ⁺	2	4/15
短波单胞菌属	<i>Brevundimonas sp.</i>	G ⁻	2	2/9
贪铜菌属	<i>Cupriavidus sp.</i>	G ⁻	1	8
土地杆菌属	<i>Pedobacter sp.</i>	G ⁻	1	2
赖氨酸杆菌属	<i>Lysinibacillus sp.</i>	G ⁺	1	26
假单胞菌属	<i>Pseudomonas sp.</i>	G ⁻	1	4
谷氨酸杆菌属	<i>Glutamicibacter sp.</i>	G ⁺	1	1
戈登菌属	<i>Gordonia sp.</i>	G ⁺	1	3
不动杆菌属	<i>Acinetobacter sp.</i>	G ⁻	1	23
棒状杆菌属	<i>Corynebacterium sp.</i>	G ⁺	1	4
皮生球菌属	<i>Dermacoccus sp.</i>	G ⁺	1	7
罗斯菌属	<i>Rothia sp.</i>	G ⁺	1	7

注：^a表中序号代表的区域与表1一致

(*Staphylococcus capitis*) 6 个种, Blast 比对分析发现, 这些菌株的 16s rRNA 序列与 NCBI 中 6 株已知菌参考序列 (Genbank 登录号分别是: NR_024669.1、NR_024664.1、NR_024667.1、NR_113345.1、NR_113957.1、NR_113348.1) 的一致性均大于 98%。这 6 种菌中的优势菌为巴氏葡萄球菌、阿尔莱特葡萄球菌及表皮葡萄球菌, 这 3 种菌在人员进出的前 7 个区域均有高比率的分布, 且不同区域的各个菌株之间均有高度的同源性; 另外, 溶血性葡萄球菌及头状葡萄球菌均源自洁净走廊或人员表面, 这都进一步说明人员是增加洁净生产车间微生物负载的高风险因素。而克鲁西葡萄球菌仅分离到 1 株, 且来自胶塞清洗室 (A 级区), 推断其可能是胶塞表面携带菌株。

3 讨论

本研究从无菌药品洁净生产车间共分离鉴定到 18 属共 106 株菌, 其中革兰阳性菌 81 株, 占比 76.4%, 革兰阴性菌 25 株, 占 23.6%, 与其他相关研究的结果相近^[3,6]。主要的优势菌群为葡萄球菌属 (44.3%)、芽孢杆菌属 (15.1%)、微球菌属 (9.4%), 与范一灵等的研究结果一致^[1]。葡萄球菌属和微球菌属为常见的环境菌, 极易引入到生产

环境当中, 因此在生产厂房的设计上就应合理布局, 如保障生产区与外界的合理压差范围, 增加风淋等, 从根本上降低污染。芽孢杆菌属主要存在于土壤中, 由于芽孢具有很强的抗逆性, 一般常用的消毒剂很难杀灭, 因此会在生产环境中不断的富集, 建议企业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。

研究还发现, 在人员进出洁净生产车间的前 7 个区域共分离到 77 株菌, 占比 72.6%; 同时, 对优势菌属葡萄球菌的进化分析发现, 同一个种的葡萄球菌在此 7 个区域的分布率均在 44% 以上, 且不同区域的同种菌均具有高度的同源性, 这说明人员进出生产车间是增加环境微生物负载的主要因素。人可以说是最大的一个污染源, 每分钟都散发着大量的微生物。企业应严格控制人员更衣和清洁消毒程序, 规范进入核心无菌操作区域工作人员的无菌操作步骤, 增加消毒灭菌频率并有计划地更换消毒剂, 并对上述方法及规程进行验证。针对无菌药品的从业人员, 尤其是质量管理人员和直接从事生产操作的人员应加强无菌生产和风险管理的理念。同时还应定期检查药品生产人员的健康状况, 建立健康档案培养药品生产人员的个人卫生习惯,

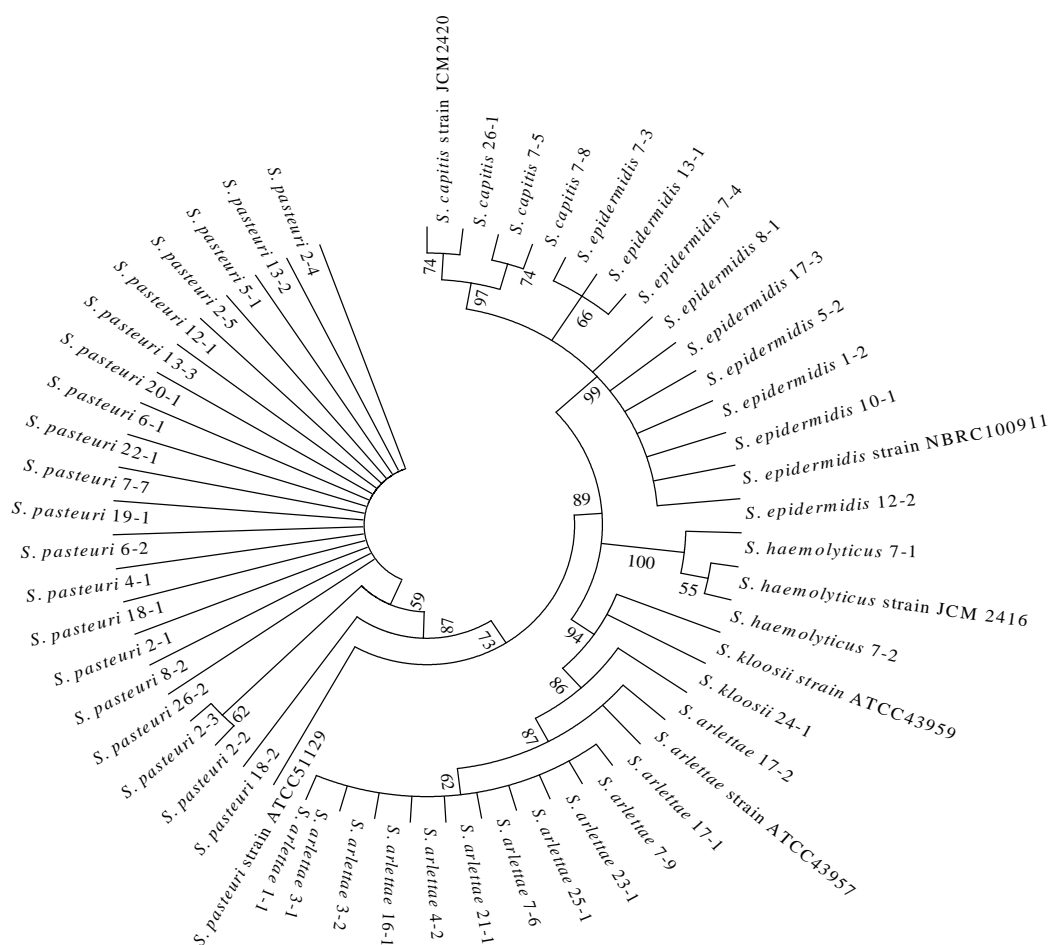


图2 47株菌16s rRNA构建的系统发育树

Fig.2 Phylogenetic Tree Constructed by 16S rRNA of 47 Strains of Bacteria

为药品的安全生产提供必要保障^[1]。

本研究在A级区分离到6株菌,其中4株源自灌装室A级区,分别为2株鞘氨醇单胞菌属,1株不动杆菌属,1株阿尔莱特葡萄球菌;另外还有1株克鲁西葡萄球菌分离自胶塞清洗室A级区;1株阿尔莱特葡萄球菌分离自瓶精洗室A级区。本研究共分离到4株鞘氨醇单胞菌属菌株,其中3株来自灌装室(该3株菌非同一菌株,16s rRNA序列相似性小于99%),1株来自男穿洁净服室(与灌装室A级区分离株的16s rRNA序列相似性100%);而不动杆菌属菌株及克鲁西葡萄球菌均为本研究分离到的唯一1株该菌株,说明这些菌可能不是生产环境引入,而是来自A级区本身,包括原辅料、

生产用水、包装材料中携带进入,提示企业应加强包材及原料的微生物负载监测,定期验证罐装前包材清洗程序,将微生物负载降到最低。同时,企业应该启动偏差调查,检查A级区空气高效过滤器的使用期限及效果。另外2株阿尔莱特葡萄球菌在该生产车间多个区域均有分离(见图2),说明可能是由人员及生产环境带入。

微生物污染是药品生产过程控制及终产品质量评估的重要指标,也是影响消费者用药安全的关键因素^[4,7]。在现代GMP生产条件下,药品中的微生物污染属于小概率事件,具有高度的随机性。为保证产品的安全性,各国药典均要求对无菌检查不合格的药品不得再进行复验,即实行“一次检验报告”

制度^[8]。因此,实现药品生产工艺和生产环境中污染微生物“种”水平的准确鉴定是加强药品生产过程控制,提升产品质量,降低用药风险的有效手段,也是药品微生物污染溯源性分析的必要要求^[9]。本研究建立了该无菌药品洁净生产车间的初级微生物数据库,随着研究的进一步深入,将建立更加全面的微生物数据库,为企业的生产环境微生物负载控制及药品微生物污染溯源分析提供有力支撑。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 户美玲,陈佩,严东珍,等. 建立洁净区微生物数据库与无菌药品GMP生产过程控制的探讨[J]. 微生物学免疫学进展, 2013, **41**(3): 33-36.
- [4] 宋明辉,李琼琼,冯震,等. 葡萄球菌属不同靶基因序列种水平鉴定能力的比较评价研究[J]. 药物分析杂志, 2018, **38**(4): 672-679.
- [5] 张国林,苏远科,沈海英,等. 16S rRNA/ITS基因序列分析与微生物分类鉴定及其在药品微生物质量控制中的应用[J]. 中国现代应用药学, 2017, **34**(10): 1489-1495.
- [6] 房世娣,赵小洁,刘晓凡,等. VITEK 2 Compact微生物检测系统在生物制剂无菌环境监测中的应用[J]. 微生物学免疫学进展, 2015, **43**(3): 9-14.
- [7] LÄNGE R, DIETRICH D. Environmental risk assessment of pharmaceutical drug substances—conceptual considerations [J]. *Toxicol Lett*, 2002, **131**(1-2): 97-104.
- [8] 胡昌勤. 药品微生物控制现状与展望[J]. 中国药学杂志, 2015, **50**(20): 1747-1751.
- [9] 范一灵,蒋波,房蕊,等. 药品无菌检查中微生物污染的鉴定和污染溯源分析[J]. 药物分析杂志, 2011, **31**(6): 1067-1072.