中图分类号：R917　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)13－0079－07
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.13.016

药品微生物限度检查中 CMCC 和 ATCC 菌株差异分析*

马鹏飞[1]，周志云[1,2]，高　翔[1,2]，杨　静[1,2]，李　翠[1,2△]，杨晓莉[1,2]

（1. 陕西省食品药品检验研究院，陕西 西安　710065；2. 国家药品监督管理局药品微生物检测技术重点实验室，陕西 西安　710065）

摘要：目的　探讨药品微生物限度检查中中国医学细菌保藏管理中心（CMCC）和美国菌种保藏中心（ATCC）公布菌株（简称 CMCC 菌株和 ATCC 菌株）的差异。**方法**　采用传统表型形态分析、VITEK 全自动生化分析、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI－TOF/MS）表型分析、16S rRNA 基因测序等方法进行测试，通过计数培养基适用性试验及计数方法适用性试验分析 2 种不同来源菌株的回收结果，并比较其差异。**结果**　不同来源的 CMCC 菌株和 ATCC 菌株的基因测序结果一致，表型试验结果无显著差异（$P>0.05$）；VITEK 全自动生化分析结果略有差异，但差异不显著（$P>0.05$）；MALDI－TOF/MS 表型分析结果有较大差异，但仍呈高度相似；适用性试验回收结果无显著差异（$P>0.05$）。**结论**　在药品微生物限度检查中，不同来源的 CMCC 菌株和 ATCC 菌株略有差异，但无实质性差异。

关键词：药品微生物；限度检查；中国医学细菌保藏管理中心公布菌株；美国菌种保藏中心公布菌株；适用性试验；差异分析

Differential Analysis Between CMCC and ATCC Strains in Microbial Limit Testing of Drugs

MA Pengfei[1], *ZHOU Zhiyun*[1,2], *GAO Xiang*[1,2], *YANG Jing*[1,2], *LI Cui*[1,2], *YANG Xiaoli*[1,2]

(1. Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China　710065; 2. NMPA Key Laboratory for Testing Technology of Pharmaceutical Microbiolgy, Xi'an, Shaanxi, China　710065)

Abstract: Objective　To investigate the differences in the detection of strains published by the Chinese Medical Culture Collection (referred to as CMCC strains) and the strains published by American Type Culture Collection (referred to as ATCC strains) in the microbiological limit testing of drugs. **Methods**　Traditional phenotype morphology analysis, VITEK fully automated microbial biochemical identification system, matrix－assisted laser desorption ionization time－of－flight mass spectrometry (MALDI－TOF/MS) phenotype analysis, 16S rRNA gene sequencing and other methods were used for testing. The recovery results of two different strains from different sources were analyzed through suitability test with counting medium method or counting method, and their

*基金项目：陕西省科学技术厅重点研发计划－社会发展项目[2019SF－133]。

第一作者：马鹏飞，男，大学本科，高级工程师，研究方向为药品、食品及化妆品的微生物检验与控制，（电子信箱）xampf@163.com。

△通信作者：李翠，女，大学本科，主管药师，研究方向为药品、食品及化妆品的微生物检验与控制，（电子信箱）licui0526@163.com。

中国医药科技出版社，2020：87－134.

[2] 徐国钧. 中药粉末显微鉴别[M]. 北京：人民卫生出版社，1986：146－568.

[3] 赵雯玮，达娃卓玛，王珊珊，等. 藏药赞丹杰巴丸质量标准研究[J]. 亚太传统医药，2023，19(10)：38－43.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2020：59－60.

[5] 王亚琼，王颖健，钟水生，等. 檀香及其混淆品的鉴别与数字化研究[J]. 中国药学杂志，2022，57(6)：458－465.

[6] 郝美玲，赵丽娜，籍学伟，等. HPLC 法测定蒙成药小儿清肺八味丸中羟基红花黄色素 A 的含量[J]. 中国药品标准，2020，21(1)：76－80.

[7] 刘学良，刘海青，韩达斌，等. 蒙药清热八味胶囊质量标准的建立[J]. 中国药师，2020，23(5)：987－989.

[8] 张玲艳，雷勇胜，葛　强，HPLC－DAD 法同时测定精制冠心片中 7 种指标成分[J]. 中草药，2015，46(14)：85－88.

[9] 俞　凡，王一清，戴国梁，等. HPLC 法测定糖痹通络颗粒中原儿茶酸、羟基红花黄色素 A、对香豆酸、阿魏酸、β－蜕皮激素和络石苷[J]. 现代药物与临床，2023，38(12)：2980－2983.

[10] 高海珣，杨秀芬. 羟基红花黄色素 A 药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药，2015，11(19)：41－44.

[11] 李雪莹，武永刚. 红花药材黄色素类成分的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药房，2011，22(39)：3707－3709.

[12] 张　林，杜守颖，陆　洋，等. 红花注射制剂有效成分含量测定与 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中华中医药杂志，2016，31(9)：3528－3533.

[13] 冯丹萍，段宝忠，夏从龙，等. 红花化学成分的研究[J]. 中成药，2021，43(8)：2253－2255.

[14] 颜仁梁，林　励. 檀香的研究进展[J]. 中药新药与临床药理，2003，14(3)：218－220.

[15] 何天竺，辛　宇，宋　岩，等. 药用植物檀香的药理活性研究进展[J]. 科学技术与工程，2019，19(8)：6－12.

[16] 张　薇，刘洋洋，邹宇琛，等. 中药檀香化学成分及药理活性研究进展[J]. 世界科学技术－中医药现代化，2020，22(20)：4300－4306.

（收稿日期：2024－02－26；修回日期：2025－03－21）

differences were compared. **Results** The gene sequencing results of CMCC and ATCC strains from different sources were consistent, and there was no significant difference in phenotype test results ($P > 0.05$). The results of VITEK fully automated microbial biochemical identification system showed slight differences, but the differences were not significant ($P > 0.05$). The MALDI - TOF / MS phenotype analysis result showed significant differences, but still exhibited high similarity. There was no significant difference in the recovery results of the suitability tests ($P > 0.05$). **Conclusion** In the microbial limit testing of drugs, there are slight differences between CMCC strains and ATCC strains from different sources, but there is no substantial difference.

Key words: pharmaceutical microbiology; microbial limit; CMCC strains; ATCC strains; suitability test; differential analysis

药品在生产、销售、使用过程中有污染微生物的风险[1]，故药品微生物控制是药品安全性保障的重要措施[2]，药品微生物分析是质量控制的重要环节[3]。药品微生物检验中，标准菌株为分类学明确、具有特定生物学性能、遗传学稳定的特殊标准品[4]，其在检测方法确认、培养基和试剂、仪器设备、能力验证等方面对确保检测结果的准确性具有不可替代的作用[5]，是药品微生物检验重要的质量控制工具[6]，故正确配备与使用标准菌株极其重要[7-8]，实验室必须保存能满足试验需要的标准菌株[9]。《中国药典》指定使用中国医学细菌保藏管理中心（CMCC）公布的菌株（简称CMCC菌株）[10]，《美国药典》（USP）则推荐使用美国菌种保藏中心（ATCC）或英国食品工业与海洋细菌保藏中心（NCIMB）、法国巴斯德研究所菌种保藏中心（CIP）等机构公布的菌株（简称ATCC菌株、NCIMB菌株、CIP菌株）[11]。ATCC，NCIMB，CIP等机构公布菌株的差异已有文献进行了详细叙述[12]，黑曲霉CMCC（F）98003及巴西曲霉ATCC 16404的异同分析也已有报道[13]。故本研究中仅对金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的CMCC和ATCC菌株进行差异性分析，并采用培养基适用性试验及用不同厂家、不同抑菌性药品进行方法适用性试验研究，分析不同来源菌株的具体回收情况，为人用药品注册技术要求国际协调会（ICH）协调提供参考。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂、药品、菌株与菌液

仪器：BS2202S型电子天平（德国Sartorius公司，精度为0.01 g）；HFsafe - 1200LC型生物安全柜（上海力申科学仪器有限公司）；LRH - 250F型生化培养箱（上海一恒科学仪器有限公司）；IPP260型霉菌培养箱（德国Memmert公司）；VITEK2 COMPACT型全自动微生物鉴定系统（法国Merieux公司）；Vortex2型涡旋混合器（德国IKA公司）；FC752型薄膜过滤器（浙江泰林生物技术股份有限公司）。

试剂：胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号为231127），胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号为230617），含5%绵羊血的胰酶大豆琼脂培养基（批号为240628），R2A琼脂培养基（批号为231121），溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基（批号为230520），Baird - Parker培养基（批号为240407），均购自北京陆桥技术有限责任公司；沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA，批号为20231129），沙氏葡萄糖液体培养基（SDB，批号为20220326），甘露醇高盐琼脂培养基（批号为20230224），pH 7.0无菌氯化钠 - 蛋白胨缓冲液（批号为20240115），金黄色葡萄球菌显色培养基（批号为20220608），念珠菌显色培养基（批号为20220129），均购自青岛海博生物技术有限公司。以上培养基均符合2020年版《中国药典》通则1105 非无菌产品微生物限度检查：计数检查法要求。聚山梨酯80（批号为20230109），大豆卵磷脂（批号为20210104），十四酸异丙酯（批号为20180628），均购自国药集团化学试剂有限公司，使用时按《中国药典》要求配置并灭菌。

药品：选用不同厂家、不同剂型、不同抑菌性的药品。养阴清肺糖浆（G1，同仁堂制药厂，批号为23155001）；小儿咽扁颗粒（G2，陕西天地人和药业有限公司，批号为240102）；藿香清胃胶囊（G3，陕西孙思邈高新制药有限公司，批号为230202）；酒石酸美托洛尔片（G4，陕西步长高新制药有限公司，批号为240512）；克拉霉素片（G5，西安利君制药有限责任公司，批号为2303030040）；克霉唑阴道片（G6，黑龙江诺捷制药有限责任公司，批号为2404021）；利君沙（G7，西安利君制药有限责任公司，批号为240203103）；托吡酯片（J1，批号为NGJ7909），多潘立酮片（J2，批号为NAJ4195），利培酮口服液（J4，批号为2400114400），酮康唑乳膏（J5，批号为MLJ5281），均购于西安杨森制药有限公司；紫杉醇（J3，Phyton Biotech，LLC，批号为FP2A23034）。

菌株：1）CMCC菌株。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）［CMCC（B）26003］，铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）［CMCC（B）10104］，枯草芽孢杆菌（*Bacillus subtilis*）［CMCC（B）63501］，白色念珠菌（*Candida albicans*）［CMCC（F）98001］，黑曲霉（*Aspergillus niger*）［CMCC（F）98003］。2）ATCC菌株。金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）［ATCC 6538］，铜绿假单胞菌（*Pseudomonas aeruginosa*）［ATCC 9027］，枯草芽孢杆菌（Bacillus subtilis）［ATCC 6633］，白色念珠菌（Candida albicans）［ATCC 10231］，巴西曲霉（Aspergillus niger）［ATCC 16404］。

菌液：按2020年版《中国药典》通则1105 非无菌产品微生物限度检查：计数检查法的要求，将CMCC和ATCC的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌分别接种于TSB上，33 ℃培养24 h；将白色念珠菌接

种于SDB上，23 ℃培养3 d；上述培养物用0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的菌悬液。将黑曲霉或巴西曲霉接种于SDA上，23 ℃培养7 d，加入5 mL含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液，洗脱孢子，收集孢子悬液，用含0.05%聚山梨酯80的0.9%无菌氯化钠溶液制成适宜浓度的孢子悬液。

1.2 方法

1.2.1 传统表型形态分析

非选择性培养：将不同来源的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌新鲜菌液接种于TSA上培养，将不同来源的白色念珠菌新鲜菌液接种于SDA上培养，计数并观察菌落生成的速度与形态。

不同营养环境培养：将不同来源的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌新鲜菌液接种于含5%绵羊血的胰酶大豆琼脂培养基上，将不同来源的铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌新鲜菌液分别接种于R2A琼脂培养基、金黄色葡萄球菌显色培养基、念珠菌显色培养基上，计数并观察菌落生成的速度与形态。

选择性培养：将不同来源金黄色葡萄球菌的新鲜菌液接种于甘露醇高盐琼脂培养基、Baird－Parker培养基上，将不同来源的铜绿假单胞菌新鲜菌液接种于溴化十六烷基三甲胺琼脂培养基上，计数并观察菌落生成的速度与形态。

1.2.2 VITEK全自动生化分析

用TSA分别培养不同来源的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌，分别用VITEK GP，VITEK GN，VITEK GNVITEK BCL卡片对新鲜菌株进行鉴定；用SDA培养白色念珠菌，用VITEK YST卡片对新鲜菌株进行鉴定。

1.2.3 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI－TOF/MS)表型分析

取不同来源的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌和白色念珠菌菌株，用含5%绵羊血的胰酪大豆胨琼脂培养基进行培养，将细菌置35 ℃培养箱中培养16～24 h，将真菌置30 ℃培养箱中培养48 h。观察各培养基，以确保在第四区得到新鲜的单菌落，用Pick－me采样笔挑选合适大小的菌落，平行涂布于一次性靶板测试点上。在两组不同来源的白色念珠菌的测试点位上分别滴加0.5 μL甲酸(FA)裂解液，自然风干后再在所有测试点位上再滴加1 μL α－氰基－4－羟基－肉桂酸(CHCA)基质液，自然风干后上机鉴定。确认预期鉴定结果准确后，将所得结果导入RUO 4.17软件进行图谱比对分析，委托梅里埃上海园区实验室测试。分别将每对不同来源菌株的图谱导入超级图谱库，用图谱比对分析功能进行配对分析，记录并统计共性峰峰值与差异峰峰值。

1.2.4 16S rRNA基因测序

基因序列扩增：采用通用引物序列扩增。其中细菌采用27F：5′－AGAGTTTGATCCTGGCTCAG－3′，1492R：5′－GGTTACCTTGTTACGACTT－3′通用引物扩增16S rDNA区域序列；酵母采用NL1：5′－GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG－3′，NL4：5′－GGTCCGTGTTTCAAGACGG－3′扩增28 S rDNA D1/D2区域序列。

聚合酶链式反应(PCR)体系：设置条件如下。10×Ex Taq buffer：2.0 μL；5U Ex Taq：0.2 μL；2.5 mmol/L dNTP Mix：1.6 μL；27F/ITS1/NL1：1 μL；1492R/ITS4/NL4：1 μL；DNA：0.5 μL；ddH_2O：13.7 μL；Total Volume：20 μL。

PCR反应条件：95℃，5 min；95 ℃，30 s；56 ℃，30 s；72 ℃，90 s；72 ℃，10 min；35 circles。委托江西师范大学生命科学学院进行DNA提取及PCR扩增，委托上海生工公司采用Sanger测序仪测序。

1.2.5 计数培养基适用性试验

接种1.1项下不大于100 cfu的1 mL菌液至45 ℃熔化的TSA或SDA(约20 mL)中，摇匀，凝固，置20～25 ℃(培养5 d)或30～55 ℃(培养3 d)培养箱中培养并计数，每种菌平行制备2皿，计算平均值作为最终菌落数；同时用相对应的对照培养基替代被检培养基重复进行上述试验。两者的比值即为培养基回收结果[10]。

1.2.6 计数方法适用性试验

1)供试液制备。(1)平皿倾注法：取G1，G2，J1，J2各10 g，分别用TSA稀释至100 mL，恒温水浴振摇使其分散均匀，制成1∶10(*m*/*V*)的供试液。(2)平皿稀释法：取G3和G4各10 g，同法制成1∶10(*m*/*V*)的供试液。取50 mL，用TSA稀释至100 mL，混匀，制成1∶20(*m*/*V*)的供试液。取20 mL，再用TSA稀释至100 mL(*m*/*V*)，制成1∶50(*m*/*V*)的供试液。需氧菌测定G3用1∶20(*m*/*V*)、G4用1∶50(*m*/*V*)的供试液，霉菌酵母菌测定全部用1∶10(*m*/*V*)的供试液。J3和J4按以上方法，以pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液为稀释液替换TSA，制备1∶10(*m*/*V*)、1∶20(*m*/*V*)、1∶50(*m*/*V*)的供试液。J3需氧菌、霉菌酵母菌测定用1∶20(*m*/*V*)的供试液，J4需氧菌测定用1∶50(*m*/*V*)的供试液。(3)薄膜过滤法：J4，霉菌酵母菌测定按以上方法制备1∶10(*m*/*V*)的供试液。J5，取J5 10 g，加无菌十四酸异丙酯10 mL，再加pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液至100 mL，摇匀，制成1∶10(*m*/*V*)的供试液。G5，取G5 10 g，用含5%聚山梨酯80和含0.5%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液稀释至100 mL，制成1∶10(*m*/*V*)的供试液。G6，取G6 10 g，用pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液稀释至100 mL，制成1∶10(*m*/*V*)的供试液。G7，取G7 10 g，加含15%无菌甲醇的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液至100 mL，40 ℃水浴振摇，使分散均匀，制成1∶10(*m*/*V*)的供试液，取10 mL，加含15%无菌甲醇的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液至100 mL，制成1∶100(*V*/*V*)的供试液，取50 mL，再

加含15%无菌甲醇的pH7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液至100 mL，制成1∶200（V/V）的供试液。

2）适用性试验。（1）平皿法：G1，G2，J1，J2，G3，G4，J3需氧菌、霉菌酵母菌及J4需氧菌测定采用平皿法。试验组取以上制备好的供试液各9.9 mL，分别加入不大于10^4 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌和黑曲霉或巴西曲霉试验菌菌悬液0.1 mL，混匀，制得样品溶液。取样品溶液1 mL，置直径为90 mm的无菌平皿中，注入温度不超过45 ℃熔化的TSA或SDA约20 mL，摇匀，待凝固后按规定温度和时间培养并计数，每种菌平行制备2皿，计算平均值作为试验组的菌落数。供试品对照组以等量稀释液替代菌液，方法同试验组；菌液对照组以等量稀释液替代供试液，方法同试验组。（2）薄膜过滤法：J4霉菌酵母菌测定和G5，G6，J5，G7需氧菌测定采用薄膜过滤法。J4霉菌酵母菌，取J4供试液10 mL，加入含pH7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液100 mL的滤器中，薄膜滤过，再用pH 7.0无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液冲洗滤膜3次，每次100 mL，最后1次冲洗液中分别加入不大于100 cfu/mL的白色念珠菌、黑曲霉或巴西曲霉试验菌液1 mL。G5试验组，取G5供试液1 mL，置含5%聚山梨酯80和0.5%卵磷脂的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液500 mL的无菌容器中，混匀，薄膜滤过，用含0.1%聚山梨酯80的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液作为冲洗液冲洗滤膜8次，每次100 mL，最后1次冲洗液中分别加入不大于100 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉或巴西曲霉试验菌液1 mL。霉菌酵母菌测定使用1∶10（m/V）的供试液平皿进行。G6试验组，取G6供试液1 mL，置含pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液1 000 mL的无菌容器中，混匀，薄膜滤过，用pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液作为冲洗液冲洗滤膜10次，每次100 mL，最后1次冲洗液中分别加入不大于100 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉或巴西曲霉试验菌液1 mL。同法测试霉菌酵母菌。J5试验组，取1∶10（m/V）供试液1 mL，置含pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液200 mL的冲洗液中，薄膜滤过，用pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液冲洗3次，每次100 mL，最后1次冲洗液中分别加入不大于100 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲霉或巴西曲霉试验菌液1 mL。同法测试霉菌酵母菌。G7实验组，取1∶200（V/V）供试液1 mL，按平均每膜0.2 mL接种至5个含15%无菌甲醇的pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液100 mL的集菌器中，混匀，薄膜滤过，用pH 7.0无菌氯化钠－蛋白胨缓冲液冲洗滤膜5次，每次100 mL，最后1次冲洗液中分别加入不大于100 cfu/mL的金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌、黑曲酶或巴西曲酶试验菌液1 mL。霉菌酵母菌测定采用1∶10（m/V）供试液平皿进行。供试液对照组取相同量，不加试验菌，同试验组方法，薄膜滤过。菌液对照组不加供试液，同试验组方法，薄膜滤过。预试验确认中和剂符合《中国药典》要求，本试验未进行中和剂对照组统计。以上接种试验中，取出滤膜，正面朝上，贴于TSA或SDA上，按规定条件倒置培养、计数，计算各组的回收率。另做TSA或SDA阴性对照。

2 结果

2.1 传统表型形态分析

每菌重复试验3次，采用涂布培养再目测观察的方式进行，不同来源菌株在非选择性培养基、不同营养环境及选择性培养基中培养的菌落数量、形态、质地、颜色、光泽、透明程度均无显著差异（$P>0.05$）；生长速度稍有差异，但无显著差异（$P>0.05$），估计跟菌株的活性有关，其差异不会影响适用性试验。详见图1。

2.2 VITEK全自动生化分析

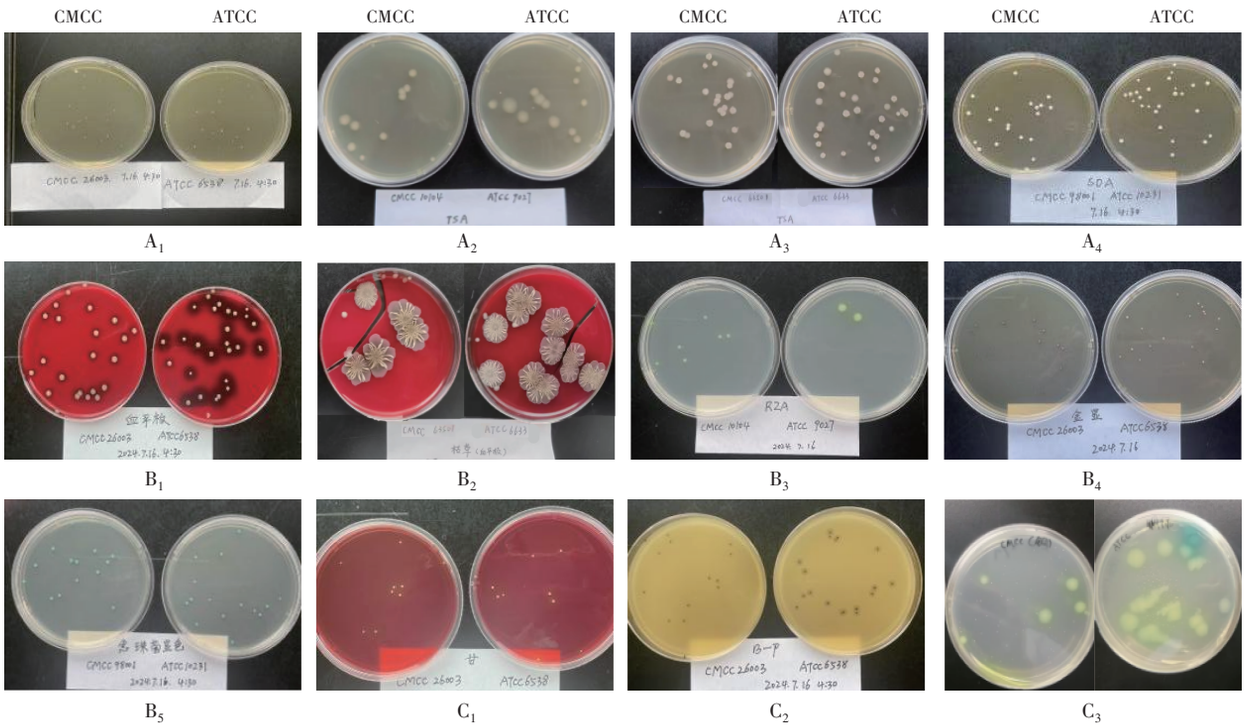
不同来源的菌株均可鉴定出预期的结果，其中生化指标略有差异，但菌株的关键生化代谢属性稳定，差异只占GP卡43个、GN卡47个、YST卡46个检测指标的4.0%，8.5%，17.0%；枯草芽孢杆菌BCL卡48个检测指标差异稍多，可能跟枯草芽孢杆菌不易溶于水，制备的菌悬液不均匀，重复性不好有关；同一菌株重复鉴定，其检测指标也有不同。鉴定结果与预期结果一致，不同来源的菌株均被正确鉴定，并未发现基于分离物来源的差异。详见表1。

2.3 MALDI－TOF MS表型分析

对不同来源菌株的图谱进行比对分析，利用Diagram功能得到两者的峰值重叠比对峰，采用Excel软件对共性峰和差异峰进行统计与分析，记录相应结果。详见表2。由每对不同来源菌株的比对结果可见，在所有组别的平行数据中，共性峰数目均占绝对优势，CMCC和ATCC来源的菌株表型呈高度相似。结合不同峰的强度值，采用检测仪器自带软件进行聚类分析，相比超级图谱库中的其他菌株，CMCC和ATCC来源菌的图谱最近似。从微生物限度检查的具体应用层面来看，二者具有实际操作层面的等效性。

2.4 16S rRNA基因测序

16S rRNA基因序列分析是在分子水平对细菌进行分类鉴定的基础上进行的[14]。不同来源的菌株DNA经PCR扩增、电泳检测、测序后，用Contigexpress软件拼接。将细菌的16S rDNA、酵母28S rDNA D1/D2区基因序列上下游两端测序峰图质量不好的序列剪切掉，形成大小约为1 500 bp和600 bp的片段，作为每株标准菌的16S rDNA、28S rDNA D1/D2区基因序列的标准序列。结果显示，金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、枯草芽孢杆菌、白色念珠菌的CMCC与ATCC菌种序列一致



A_1 – A_4. 非选择性培养　B_1 – B_5. 不同培养环境培养　C_1 – C_3. 选择性培养

图 1　不同培养条件下培养基上菌落形态

A_1 – A_4. Non – selective cultivation　B_1 – B_5. Cultivation under different nutritional conditions　C_1 – C_3. Selective cultivation

Fig. 1　Colony morphology on culture media under different cultivation conditions

表 1　VITEK 自动鉴定仪生化指标差异

Tab. 1　Differences in biochemical indexes identified by the VITEK automatic identification instrument

菌株来源	金黄色葡萄球菌	铜绿假单胞菌	枯草芽孢杆菌	白色念珠菌
CMCC	AGLU + ; BACL –	APPA – ; AGL – Tp + ; IHISa +	LeuA – ; PheA + ; ELLM – ; GLYA(+); AGLU(+); INU + ; OLD – ; TTZ –	GLYLa – ; ARBa –
ATCC	AGLU – ; BACL +	APPA + ; AGL – Tp – ; IHISa –	LeuA(+); PheA – ; ELLM + ; GLYA – ; AGLU(–); NU – ; OLD + ; TTZ +	GLYLa + ; ARBa +

表 2　不同来源菌株的共性峰与差异峰

Tab. 2　Common peaks and differential peaks of strains from different sources

菌株	第 1 次试验结果			第 2 次试验结果		
	1	2	3	1	2	3
金黄色葡萄球菌	CMCC, ATCC 共性峰共 96 组, 占比 41.4%	CMCC(B)26003 差异峰共 47 个, 占比 20.3%	ATCC 6538 差异峰共 89 个, 占比 38.4%	CMCC, ATCC 共性峰共 101 组, 占比 55.2%	CMCC(B)26003 差异峰共 39 个, 占比 21.3%	ATCC 6538 差异峰共 43 个, 占比 23.5%
铜绿假单胞菌	CMCC, ATCC 共性峰共 98 组, 占比 54.4%	CMCC(B)10104 差异峰共 39 个, 占比 21.7%	ATCC 9027 差异峰共 43 个, 占比 23.9%	CMCC, ATCC 共性峰共 94 组, 占比 44.5%	CMCC(B)10104 差异峰共 61 个, 占比 28.9%	ATCC 9027 差异峰共 56 个, 占比 26.5%
枯草芽孢杆菌	CMCC, ATCC 共性峰共 117 组, 占比 67.6%	CMCC(B)63501 差异峰共 25 个, 占比 14.5%	ATCC 6633 差异峰 共 31 个, 占比 17.9%	CMCC, ATCC 共性峰 共 102 组, 占比 51.8%	CMCC(B)63501 差异峰共 47 个, 占比 23.9%	ATCC 6633 差异峰共 48 个, 占比 24.4%
白色念珠菌	CMCC, ATCC 共性峰共 136 组, 占比 43.6%	CMCC(F)98001 差异峰共 75 个, 占比 24.0%	ATCC 10231 差异峰共 101 个, 占比 32.4%	CMCC, ATCC 共性峰共 146 组, 占比 47.1%	CMCC(F)98001 差异峰共 79 个, 占比 25.5%	ATCC 10231 差异峰共 85 个, 占比 27.4%

(100%)。分析认为, 16S rDNA 和 28S rDNA D1 / D2 区基因是微生物的关键端点, 本质上应是一致的, 全基因片段应有不同的点。

2.5　计数培养基适用性试验

计数培养基适用性试验中, 使用不同来源菌株在被检培养基或对照培养基上培养的菌落形态、大小基本无差异, 且被检培养基菌落数与对照培养基菌落数的比值也在 0.5 ~ 2.0 范围内, 无显著差异, 基本一致且符合各国药典要求[10-11]。详见表 3。

2.6　计数方法适用性试验

G1, G2, J1, J2 基本无抑菌性, G3, G4, J3, J4 有弱抑菌性, G5, G6, J5, G7 具有较强抑菌性; G1 和 J4 为口服液体制剂。根据预试验结果, 按平皿法、薄膜过滤法进行试验, 每菌平行制备 2 皿, 计算平均菌落数作为回收

表3 计数培养基适用性试验回收结果

Tab. 3 Recovery results of the suitability test with the counting medium method

菌株来源	被检培养基菌落数与对照培养基菌落数的比值				
	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/巴西曲霉
CMCC	1.1	1.1	1.0	1.0	1.4
ATCC	1.0	0.8	1.2	1.0	1.2

结果；需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数的回收比值按如下公式计算。试验菌回收比值 =（试验组菌落数 - 供试液对照组菌落数）/ 菌液对照组菌落数。结果回收比值均在0.5～2.0范围内，无显著差异（$P>0.05$）。详见表4。采用Excel软件对以上数值进行配对t检验，结果不同来源的金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌和黑曲霉或巴西曲霉在方法适用性试验中的平均值无显著差异（$P>0.05$）。将不同来源标准菌株的2种菌液分别作为需氧菌总数、霉菌和酵母菌总数计数方法适用性试验的回收结果进行配对t检验，结果2种菌液所得

表4 计数方法适用性试验回收结果

Tab. 4 Recovery results of the suitability test with the counting method

样品	菌株来源	需氧菌总数的回收比值					霉菌和酵母菌总数的回收比值	
		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/巴西曲霉	白色念珠菌	黑曲霉/巴西曲霉
G1	CMCC	0.86	0.89	0.87	1.04	1.20	0.92	1.17
	ATCC	1.04	0.76	0.80	0.84	1.12	0.97	1.07
G2	CMCC	0.82	1.13	0.99	1.03	1.16	0.95	1.06
	ATCC	1.13	1.06	1.13	1.06	0.96	1.11	1.10
J1	CMCC	1.16	1.14	1.07	0.87	0.96	0.88	1.13
	ATCC	1.11	1.02	1.11	1.14	0.94	0.98	1.10
J2	CMCC	0.80	0.71	0.81	0.80	0.80	0.61	0.83
	ATCC	0.74	0.76	0.81	0.87	0.91	0.71	0.85
G3	CMCC	0.80	0.86	0.70	1.12	1.10	0.93	0.95
	ATCC	0.95	0.72	0.68	1.10	1.06	1.08	1.03
G4	CMCC	1.00	0.91	0.84	1.08	0.98	0.99	0.87
	ATCC	1.05	0.78	0.96	1.03	0.81	0.85	0.98
J3	CMCC	0.86	0.88	0.87	0.69	1.24	0.94	0.98
	ATCC	0.95	0.78	1.16	0.92	1.17	1.09	0.75
J4	CMCC	1.01	1.07	1.07	0.94	1.14	0.98	0.91
	ATCC	1.03	1.00	1.03	0.68	1.11	0.99	0.82
G5	CMCC	0.79	0.73	0.85	0.91	1.02	0.83	0.76
	ATCC	0.68	0.72	0.81	0.72	0.93	0.76	0.82
G6	CMCC	0.94	0.96	0.73	0.82	0.92	1.01	0.86
	ATCC	1.13	1.24	1.07	1.05	0.96	1.04	0.98
J5	CMCC	1.03	0.90	0.60	0.93	0.85	0.90	1.05
	ATCC	0.97	0.90	0.62	1.16	0.97	0.96	1.08
G7	CMCC	0.97	0.96	0.91	0.95	0.63	1.06	0.97
	ATCC	0.93	1.02	1.08	0.97	0.94	1.10	1.02

表5 计数方法适用性试验回收结果配对t检验结果

Tab. 5 Results of the paired t - test for recovery results of the suitability test with the counting methods

项目	需氧菌总数					霉菌和酵母菌总数	
	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/巴西曲霉	白色念珠菌	黑曲霉/巴西曲霉
平均值	0.920	0.928	0.859	0.932	0.917	1.000	0.962
方差	0.014	0.019	0.020	0.016	0.013	0.033	0.015
自由度	11	11	11	11	11	11	11
t值	-1.495	0.909	-2.045	-0.564	-2.046	0.248	-0.171
P值	0.163	0.383	0.066	0.584	0.065	0.809	0.868

试验结果无显著差异（$P>0.05$），表明不同来源的菌株进行方法适用性试验对回收结果无显著影响。详见表5。

3 讨论

本研究中分别使用不同来源的CMCC和ATCC试验菌株在特定培养基上培养进行表型分析，并进行了MALDI-TOF质谱分析、VITEK全自动生化分析、16S rRNA基因测序等试验，结果发现，不同来源的菌株有差异，但无显著差异（$P>0.05$）；采用不同来源菌株进行了培养基生长适用性试验，采用不同抑菌特性的药品进行了方法适用性试验，结果发现，回收结果有差异，但根据2020年版《中国药典》的标准进行判断，结果一致，配对t检验无显著差异（$P>0.05$）。由于设备分析种类的局限性及本试验样本量极有限，故建议开展大样本量试验进行不同来源菌株的应用等效性研究，推动互认；条件成熟时，启动与ICH协调，达成CMCC与ATCC互认；以利于药品安全性、有效性和质量方面的交流，避免国际技术贸易中制药科研、检验、人力、物力的浪费，促进人类医药事业的发展。

参考文献

[1] 胡立荣，欧阳波，文晓柯. 中药制剂生产中的微生物污染途径及控制[J]. 中国药事，2015，29(6)：613-617.
[2] 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.
[3] 安春艳，井良义，陈 卓，等. 药品微生物经典分析方法的验证探讨[J]. 中国药品标准，2023，24(2)：109-116..
[4] 程 池，李金霞，都海渤，等. 食品微生物学检测标准菌株的研究与开发[C]// 中国微生物学会微生物资源专业委员会，第五届全国微生物资源学术暨国家微生物资源平台运行服务研讨会论文摘要集(广州)，2013：128-131.
[5] 石继春，陈 驰，梁 丽，等. 铅黄肠球菌CMCC(B)32220的鉴定和全基因组分析[J]. 临床检验杂志，2022，40(2)：116-119.
[6] 罗丽珠，陈婉娃. 标准菌株在微生物检测中的作用[J]. 食品安全质量检测学报，2021，12(8)：3281-3286.
[7] 曹 蕊，余 萌，马仕洪.《中国药典》拟收载洋葱伯克霍尔德菌群(Bcc)检查法中标准菌株的稳定性研究[J]. 中国药事，2022，36(7)：724-735.
[8] 李趣嫦，张 帆，李文靖，等. 商业定量菌株用于药品微生