

附件 2

洋葱伯克霍尔德菌群检查法起草说明

一、制定的目的意义

《中国药典》2020 年版四部通则 1107 非无菌药品微生物限度标准中规定除了目前药典中明确的七类控制菌，根据原辅料及其制剂的特性和用途、制剂的生产工艺等因素，可能还需检查其他具有潜在危害的微生物。“潜在危害的微生物”在美国药典中有相似的描述，即“不可接受微生物（Objectionable microorganisms）”。洋葱伯克霍尔德菌群（*Burkholderia cepacia* complex, Bcc），一类隶属于伯克霍尔德菌属（*Burkholderia*），在表型上近似、基因型上存在差异的环境中普遍存在的革兰氏阴性菌，作为典型的不可接受微生物，多年来，一直被 FDA 和制药行业所关注和研究。自上世纪 90 年代起，由于 Bcc 污染而导致的非无菌产品召回事件层出不穷，国内尚无针对药品的 Bcc 检测方法。因此，为推动我国药典相关微生物检查方法标准的完善，规范非无菌药品的质量控制，加强标准化应用等方面的研究，满足药品质量控制的迫切需求，国家药典委员会委托中检院牵头承担完成了“洋葱伯克霍尔德菌群检查法的建立课题”，拟定了洋葱伯克霍尔德菌群检查法。

二、起草过程

洋葱伯克霍尔德菌群检查法的起草依托于 2019 年度国家药典委员会国家药品标准提高课题“洋葱伯克霍尔德菌群检查法的建立”（2019Y18），由中国食品药品检定研究院牵头，天津市药品检验研究院、河北省药品医疗器械检验研究院、辽宁省检验检测认证中心（药品检验检测院）、上海市食品药品检验研究院、山东省食品药品检验研究院、河南省食品药品检验所、广东省药品检验所、苏州市药品检验检测研究中心、四平市食品药品检验所等共同参与。课题组开展了广泛的文献调研和实验研究，并根据药典委员会微生物专业委员审核意见进行多次修改和完善，最终形成了本次公示稿。

三、总体思路

Bcc 检查法为针对一类特定微生物的药典定性检测方法，在起草时总体按照中国药典 2020 年版四部通则 1106 非无菌产品微生物限度检查：控制菌检查法的体例。目前各国药典中只有美国药典收录了 Bcc 检查法章节，即 USP43 <60>

Microbiological Examination of Nonsterile Products---Tests for *Burkholderia cepacia* complex, 此外, 我国还有针对出口化妆品的洋葱伯克霍尔德菌检测标准, 分别为 SN/T4485-2016《进出口口腔清洁类产品中洋葱伯克霍尔德菌检验》, SN/T4684-2016《进出口化妆品中洋葱伯克霍尔德菌检验》。在课题研究过程中, 参考上述标准中的检测流程及各步骤使用的培养条件进行实验方案设计和实施。

四、关于主要内容的说明

本方法用于检查非无菌制剂及其原、辅料等是否含有 Bcc。按照中国药典 2020 年版四部通则 1106 非无菌产品微生物限度检查: 控制菌检查法的体例, 主要内容包括前言、培养基适用性检查和检查方法适用性试验、供试品检查、稀释液、培养基及其制备方法几个部分。检查的流程包括供试液制备和增菌培养、选择和分离培养以及结果判断。

Bcc 由二十几种表型近似、基因型存在差异的菌种组成, 本方法中选择具有代表性的 3 株 Bcc 菌株作为培养基适用性试验和检查方法适用性试验的试验菌株, 3 株菌株均应进行适用性实验; 而在供试品检查时, 根据检查方法适用性结果, 选择 1 株作为阳性对照菌株即可。

本方法中将目前已命名的 Bcc 种成员以附表列出, 旨在结合 Bcc 的分类鉴定特点及考量到实际应用, 便于实验人员在结果判断时, 对选择性琼脂培养基上生长的菌落进行鉴定后, 对照进行是否检出 Bcc 的判断。

五、需重点说明的内容

1、检查法中试验菌株的确定。参考 USP<60>中使用的 3 株 Bcc 临床分离频率较高的代表菌种, 结合课题研究数据、我国药品生产企业水系统污染情况, 筛选出分离自临床、产品及生产用水的 3 株 Bcc 代表菌株 (CMCC(B)23005、CMCC(B)23006、CMCC(B)23010), 对其生长特性、分类学、稳定性和安全性进行了系统考察, 最终确定这 3 株菌株作为检查法 (草案) 中的试验菌株。培养基适用性抑制能力试验菌株则确定为 CMCC(B)26003 和 CMCC(B)10104。

2、检查法中的洋葱伯克霍尔德菌群选择性培养基的确定。参考 USP<60>、进出口检验检疫标准中使用的 Bcc 选择性培养基 (分别为 BCSA 和 BCA), 通过文献查阅及对两种培养基的促生长能力、指示特性、抑制能力考察, 课题组对选择性培养基配方进行调整优化, 形成洋葱伯克霍尔德菌群选择性琼脂培养基 (简称 BCCSA), 通过试验对其促生长能力、指示特性、抑制能力进行系统验证, 最

终确定将其作为检查法中选择和分离培养用培养基。

3、结果判断。Bcc 是一类隶属于伯克霍尔德菌属 (*Burkholderia*)，在表型上近似、基因型上存在差异的环境中普遍存在的革兰氏阴性菌的总称。其中包含若干个种 (Genomovar, 基因型)。截止 2021 年，已被分类命名的 Bcc 成员达到 24 个种，根据目前的分类研究，未来还将继续有新的种被命名。根据文献和课题研究结果，目前有多种鉴定方法可对 Bcc 达到菌群水平的鉴定，但通常鉴定系统给出的鉴定结果为属或种，对于对 Bcc 分类并不熟悉的实验人员，无法判断结果是否检出 Bcc。因此，本方法将目前已命名的 Bcc 成员以附表列出，便于实施时实验人员在结果判断时参考对照。