

非无菌水性基质药品中洋葱伯克霍尔德菌群控制的一般考虑

张帆, 董武军, 史敬芬, 张耀

国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022

摘要: 洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, BCC) 在营养有限的水性环境中具有较强的生存能力, 对一些治疗用抗菌药和常用抑菌剂具有耐药性, 可引起囊性纤维化、慢性肉芽肿患者或低免疫力易感人群的严重感染。BCC 已被美国食品药品监督管理局 (FDA) 明确归为不可接受微生物, 因此, 非无菌水性基质药品中 BCC 的预防及控制对药品安全至关重要。主要对 BCC 的特性、检测方法、风险评估和控制策略进行阐述, 为非无菌水性基质药品中 BCC 的研究和控制提供参考。

关键词: 洋葱伯克霍尔德菌群; 非无菌水性基质药品; 药品安全; 检测方法; 风险评估

中图分类号: R951 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 07-1261-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.007

Control considerations of *Burkholderia cepacia* complex in non-sterile aqueous drugs

ZHANG Fan, DONG Wujun, SHI Jingfen, ZHANG Yao

Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

Abstract: *Burkholderia cepacia* complex (BCC) have a well-documented ability to utilize nutrient-limited aquatic sources as energy, and it present an inherent resistance to antibiotics and antiseptics effectiveness, which causing a serious threat to susceptible patients, particularly those with cystic fibrosis and chronic granulomatous or who are immunocompromised. BCC were defined as objectionable microorganisms by FDA. This review to provide control strategies and discuss characteristic considerations, analytical method and risk assessments that are relevant to BCC control in non-sterile aqueous drugs.

Key words: *Burkholderia cepacia* complex; non-sterile aqueous drugs; drug safety; analytical method; risk assessment

洋葱伯克霍尔德菌群 (*Burkholderia cepacia* complex, BCC) 是一组表型相似、基因型不同的革兰阴性杆菌, 广泛存在于土壤和水中, 可引起囊性纤维化、慢性肉芽肿患者或低免疫力易感人群的严重感染, 甚至危害生命, 对公众健康构成严重危害。BCC 污染导致的医院爆发性感染事件和药品召回案例频发, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 发布的 2004—2011 年因微生物污染召回事件中, BCC 污染占比达 34%^[1]。FDA 将 BCC 归为不可接受的微生物, 并要求非无菌水性基质药品关注 BCC 的检查和控制^[2]。2021 年 9 月 FDA 发布了《非无菌药品生产中的微生物质量考量》行业指南草案^[3], 阐述了非无菌水性基质药品受 BCC 污染的风险及控制, 同时明确参照美国药典 (USP) <60> 进行 BCC 的检测。

2021 年 11 月国家药品监督管理局药品审评中心发布的《化学药品创新药上市申请前会议药学共性问题相关技术要求》明确要求对于吸入、口服、黏膜、皮肤和鼻腔给药的水溶液非无菌制剂, 一般应参照相关技术要求对洋葱伯克霍尔德菌进行研究, 并制定相应的控制策略^[4]。欧盟和日本药品监管机构尚未对 BCC 的控制提出监管意见。结合笔者近几年对于非无菌水性基质药品审评中发现, 国内研究者对于 BCC 认识尚处于起步阶段, 少有研究者主动基于产品风险开展必要的控制菌筛查和探索, 已提交的非无菌水性基质药品上市申请中普遍存在 BCC 研究不充分的问题。

BCC 在营养有限的水性环境中具有较强的生存能力, 且对治疗用抗菌药和抑菌剂有广泛的耐药

收稿日期: 2022-03-31

第一作者: 张帆, 女, 博士, 主要从事药品审评工作。E-mail: zhangf02@cde.org.cn

性,非无菌水性基质药品中存在BCC的潜在风险较高^[3],因此建立BCC预防及控制策略对药品安全至关重要。本文对BCC的特性、检测及风险评估和控制策略进行阐述,为非无菌水性基质药品中BCC的研究和控制提供参考。

1 BCC的特性

洋葱伯克霍尔德菌最早由美国植物病理学家Walter H. Burkholder首次从洋葱根部分离发现,因引起洋葱根茎腐烂而得名。依据16S-rRNA基因测序等技术,BCC被分为表型相似基因型不同的9个基因型:*B. cepacia* genomovar I、*B. cepacia* genomovar II(*B. multivorans*)、*B. cepacia* genomovar III(*B. cenocepacia*)、*B. cepacia* genomovar IV(*B. stabilis*)、*B. cepacia* genomovar V(*B. vietnamiensis*)、*B. cepacia* genomovar VI(*B. dolosa*)、*B. cepacia* genomovar VII(*B. ambifaria*)、*B. cepacia* genomovar VIII(*B. anthina*)、*B. cepacia* genomovar IX(*B. pyrricinia*),其中洋葱伯克霍尔德菌(*B. cepacia* genomovar I)是自然界分离获得最常见的菌株之一^[5]。

BCC是一类在土壤、水中普遍存在的革兰阴性杆菌,是引起感染的条件致病菌,可造成免疫力低下的易感人群或囊性纤维化和慢性肉芽肿患者严重感染,约1/3的BCC感染患者最终发展为败血症,同时BCC污染引发的包括重症监护室、血液透析室、内窥镜检查室等医院感染事件频发^[6-10]。BCC具有多重固有的抗菌药物耐药性,耐药机制包括降低外膜通透性、诱导产生 β 内酰胺酶和外排泵作用等^[11],对临床常用的 β -内酰胺类、多黏菌素、以及氨基糖苷类抗菌药物都有一定耐药性,这导致BCC感染后抗菌药物选择受到限制,治疗难度大;同时,也提示不能忽视抗菌药品被BCC污染的风险。

BCC在低营养条件水性环境下仍能长时间存活,具有较强的环境适应性。BCC还被证实对药品中常用的抑菌剂,如尼泊金酯类(羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯)、季铵盐类(苯扎氯铵、苯扎溴铵)有一定耐受性。FDA发布的2009—2013年因BCC污染召回的产品中大部分含有抑菌剂^[3],同时FDA国家毒理学研究中心2016—2017年度报告中明确指出BCC对苯扎氯铵具有降解能力和耐药性^[12],BCC可利用自身的外排系统和代谢系统降低苯扎氯铵的抑菌作用^[13]。沈海英等^[14-15]发现在含有尼泊金类抑菌剂的抗真菌乳膏中和含有对羟苯甲酯、羟苯乙酯的凝胶剂中均检出BCC。

2 BCC的检测

2019年美国药典(USP)发布了关于非无菌药品中BCC检查的通则<60> Microbiological examination of nonsterile products—tests for *Burkholderia cepacia* complex^[16],用于在规定的试验条件下检查产品中是否存在BCC,尤其适用于吸入剂或用于口服、口腔黏膜、皮肤和鼻腔的非无菌水溶液剂。USP通则<60>对BCC检查的菌株、培养基适用性检查(包括促生长能力、抑制能力及指示特性检查)、方法适用性试验、供试品检查方法以及培养基的制备等方面作了较详细的规定。需要注意该检测方法应采用*B. cepacia*、*B. cenocepacia*或*B. multivorans*菌株进行培养基促生长能力检查、采用铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌开展抑制能力检查,培养基为洋葱伯克霍尔德菌选择性琼脂(BCSA),BCSA培养基含有多黏菌素B、万古霉素及庆大霉素,用以消除其他控制菌的生长干扰。方法适用性试验和供试品检查中出现的菌落形态特征观察和鉴定:BCC的指示特征为周围黄色的绿棕色菌落或者周围粉红色的白色菌落。若BCC检验程序或供试品发生变化可能影响检验结果时,应重新开展方法适用性试验;对于有抑菌作用的供试品(包括含抑菌剂产品),应参照USP<61> Microbiological examination of nonsterile products: Microbial enumeration tests消除供试品的抑菌作用,并重新进行方法适用性试验^[17]。

《中国药典》(ChP)2020年版未收载BCC检查的技术要求,考虑该菌群潜在的风险,药典委协同相关部门正在推进BCC检查和技术要求制定工作^[15]。现阶段,国内企业和检验机构可参考USP<60>开展非无菌水性基质药品、原辅料、制药用水中的BCC检测;由于BCC具有较强环境适用性并有多种表型,需要关注方法的适用性及菌落的鉴定、分类。

3 BCC控制的考虑要点

3.1 BCC与水分活度

水分活度(water activity, a_w)是产品中水分的能量状态的表征,可作为微生物风险控制的关键参数,比水分含量更有意义^[18]。2018年USP增加了关于 a_w 的通则<922>water activity,用于指导 a_w 值的测定和应用。 a_w 指在相同温度下,产品中的水蒸气压与纯水蒸气压之比^[19],数值介于0~1。 a_w 可用于快速有效评估微生物的繁殖能力,在高 a_w 值条件下,微生物生长良好;在低 a_w 值条件下,微生物生长则

受到抑制,微生物低于最低生长 a_w 值将不能繁殖^[20]。

USP<1112>Application of water activity determination to nonsterile pharmaceutical products, 对 a_w 在非无菌药品中微生物控制的应用提供了指导,收载了微生物生长需要的 a_w 参考值。革兰阴性菌如铜绿假单胞菌、大肠埃希菌和沙门氏菌在 $a_w < 0.91$ 的产品中不易增殖,而革兰阳性菌如金黄色葡萄球菌等在 $a_w < 0.86$ 时不易增殖,黑曲霉在 $a_w < 0.77$ 时不易增殖, $a_w < 0.60$ 时所有微生物均不会增殖^[21]。文献报道 BCC 生长所需最低的 a_w 为 0.95^[22],不同剂型和处方中 BCC 最低生长 a_w 值略有差异,研究报道某凝胶剂中 BCC 最低生长 a_w 值为 0.97,与 BCC 生长所需最低 a_w 值接近,表明该凝胶剂中的 BCC 有进一步繁殖的可能。另有研究报道在以氯化钠为调节介质的液体制剂中 BCC 生长所需的最低 a_w 值约为 0.98,同时还发现 a_w 值与 BCC 生长速率密切相关,BCC 在高 a_w 值的液体制剂中生长良好,而在低 a_w 值的液体制剂中 BCC 的生长则受到抑制^[15,23-24]。因此,在非无菌水性基质药品早期处方开发和筛选阶段,可结合 a_w 值考察不同处方组成与 a_w 的相关性,并通过调整可影响 a_w 值的介质(氯化钠、葡萄糖、乙醇、丙醇、甘油)浓度,优化制剂 a_w 值以降低 BCC 潜在的繁殖风险^[21]。

3.2 BCC 与抑菌剂抑菌浓度

BCC 对非无菌水性基质药品中使用的一些抑菌剂具有耐药性,应关注相关抑菌剂对 BCC 的抑菌效力,必要时应增加 BCC 菌种作为抑菌效力评估试验测试菌株。抑菌剂用量低于最低抑菌浓度则 BCC 有进一步繁殖的可能,反之可降低 BCC 对抑菌剂耐受的潜在风险。有研究报道苯扎氯铵、苯扎溴铵、羟苯甲酯、羟苯乙酯对洋葱伯克霍尔德菌的最低抑菌浓度分别为 32、64、512、2 048 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ^[15], Kim 等^[25]发现苯扎氯铵对洋葱伯克霍尔德菌的最低抑菌浓度为 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3.3 风险评估及控制

水性液体制剂、半固体制剂(悬浮液、洗剂、乳膏、软膏)比固体制剂具有更高的水分活度,水性基质的非无菌药品被 BCC 污染的风险较高。鉴于 BCC 具有抑菌剂耐药性,即使含有抑菌剂的非无菌药品,仍有可能在使用时存在不安全水平。ChP 2020 年版四部通则 1107《非无菌药物微生物限度标准》中明确要求根据原辅料及其制剂的特性和用途、制剂生产工艺等因素,对其他可能存在的具有

潜在危害的微生物进行检查^[26]。因此,产品生产过程、货架期甚至使用时(尤其是多剂量包装产品)都应基于风险识别、分析和评价,建立 BCC 控制措施和程序。

《非无菌药品生产中的微生物质量考量》指出生产过程所使用的制药用水和天然组分是 BCC 最有可能的来源,并明确为确保产品质量和患者用药安全,非无菌水性药品生产中应执行完善的药品生产质量管理规范(cGMP)管理,包括建立基于 BCC 风险管理的设计和控制、稳健的水系统管理、恰当的生产组分微生物负荷、经清洁和消毒的设备、经验证的 BCC 过程控制和成品检查规程等^[3]。

研究者可结合产品特有要素(剂型、水分活度、产品用途、包装、产品组成和比例等)和生产要素(生产过程、制水系统、生产环境、过程控制等)进行全面的 BCC 风险评估,对 BCC 进行研究和检查,制定合理的控制策略^[3]。从源头、过程控制上降低或避免 BCC 污染风险,建立有针对性的检查和控制方案,建立制药用水和制剂中 BCC 的控制策略。目前,ChP 尚未制定 BCC 的检查方法,研究者在菌种选择、检查方法及验证方面均可能存在困难。在 ChP 公布法定方法之前,建议研究者对代表商业化生产批样品进行风险评估和检测分析,结合评估结果将 BCC 检查方法订入产品的放行标准。待国内法定方法公布后,建议结合研究情况将 BCC 作为控制菌的常规检查方法,订入药品注册标准,研究者可以根据产品批次数据的积累,参考 ICH Q6A 微生物限度决策树的要求,适时调整 BCC 的控制策略。

4 结语

非无菌水性基质药品中不可接受微生物-BCC 污染存在较高的风险,应引起国内制药行业的关注。研究者应根据产品特有要素、生产要素,开展非无菌水性基质药品中 BCC 污染的风险评估,制定全面有效的控制策略,建立经验证的控制菌检查方法,进行制药用水和制剂中 BCC 的分析和控制,确保非无菌水性基质药品微生物质量,保障公众用药安全。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Sutton S, Jimenez L. A review of reported recalls involving microbiological control 2004 - 2011 with emphasis on FDA considerations of "objectionable organisms" [J]. Am Pharm Rev, 2012, 15: 42-57.

- [2] Lynn T, Diane R, Dennis E, et al. *Burkholderia cepacia*: This decision is overdue [J]. PDA J Pharm Sci Tech, 2011, 65(50): 535-543.
- [3] FDA. Microbiological Quality Considerations in Non-sterile Drug Manufacturing [EB/OL]. (2021-09-29)[2022-02-20]. <https://www.fda.gov/media/152527/download>.
- [4] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药品创新药上市申请前会议药学共性问题相关技术要求 [EB/OL]. (2021-11-26)[2022-02-20]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/9706a7a9df0842dfe6219890a9ace657>.
Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration. Technical requirements for common issues in the pre-marketing application meeting for new chemical drugs [EB/OL]. (2021-11-26) [2022-02-20]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/9706a7a9df0842dfe6219890a9ace657>.
- [5] Mahenrhalingam E, Urban T A, Goldberg J B, et al. The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex [J]. Nat Rev Microbiol, 2005, 3(6): 144-156.
- [6] Coutinho C P, Dossantos S C, Maderia, et al. Long-term colonization of the cystic fibrosis lung by *Burkholderia cepacia* complex bacteria: Epidemiology, clonal variation, and genome-wide expression alterations [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2011, 1(12): 1-11.
- [7] Lee S, Han S W, Kim G, et al. An outbreak of *Burkholderia cenocepacia* associated with contaminated chlorhexidine solutions prepared in the hospital [J]. Am J Infect Control, 2013, 41(9): e93-e96.
- [8] Montano R C, Marquez C M, Hidalgo G P, et al. An outbreak of *Burkholderia cepacia* complex in a hemodialysis unit [J]. Enferm Infect Microbiol Clin, 2015, 33(10): 646-450.
- [9] Guo L, Li G, Wang J, et al. Suspicious outbreak of ventilator associated pneumonia caused by *Burkholderia cenocepacia* in a surgical intensive care unit [J]. Am J Infect Control, 2017, 45(6): 660-666.
- [10] Greengerg D E, Goldberg J B, Stock F R, et al. Current *Burkholderia* infection in patients with chronic granulomatous disease: 11-year experience at a large referral center [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48: 1577-1579.
- [11] 方 幸, 刘雪琳, 丁培丽. 洋葱伯克霍尔德菌耐药机制的研究进展 [J]. 中国医学创新, 2021, 18(32): 185-187.
Fang X, Liu X L, Ding P L. Research on drug resistance mechanism of *Burkholderia cepacia* [J]. Med Innov China, 2021, 18(32): 185-188.
- [12] FDA. National Center for Toxicological Research Annual Report (FY2016-FY2017) [EB/OL]. (2017)[2022-02-20]. <https://www.fda.gov/media/109449/download>.
- [13] Ahn Y, Kim J M, Kweon K, et al. Intrinsic resistance of *Burkholderia cepacia* complex to benzalkonium chloride [J]. mBio, 2016, 7(6): e01716-16.
- [14] 沈海英, 王星月, 徐铠琳, 等. 两批次抗真菌乳膏中洋葱伯克霍尔德菌群的检测结果及其耐药性考察 [J]. 抗感染药学, 2020, 17(11): 1565-1568.
Shen H Y, Wang X Y, Xu K L, et al. Study on monitoring results and drug resistance of *Burkholderia cepacia* complex in 2 batches of anti-fungal cream [J]. Anti Infect Pharm, 2020, 17(11): 1565-1568.
- [15] 王似锦, 余 萌, 杨美琴, 等. 凝胶剂中1株洋葱伯克霍尔德菌的分离、鉴定与生长特性研究 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1617-1624.
Wang S J, Yu M, Yang M Q, et al. Isolation, identification and growth characterization of a *Burkholderia cepacia* in gel [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(9): 1617-1624.
- [16] The U. S. Pharmacopeia 2021 General Chapter 60. Microbiological examination of nonsterile products - tests for *Burkholderia cepacia* complex [EB/OL]. (2021-12-01) [2022-02-20]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-4C3D84A8-B940-42F0-ABC3-AE9128AA8D95_2_en-US?source=Search%20Results&highlight=BURKHOLDERIA%20CEPACIA.
- [17] The U. S. Pharmacopeia 2021 General Chapter 61. Microbiological examination of nonsterile products: Microbial enumeration tests [EB/OL]. (2021-12-01) [2022-02-20]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-0392F79D-1F8A-4B8D-BEC8-C6FD7B39966F_1_en-US?source=Search%20Results&highlight=MICROBIOLOGICAL%20EXAMINATION%20.
- [18] 绳金房, 李 辉, 马仕洪, 等. 浅析水分活度测定在非无菌制剂微生物控制中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1837-1841.
Sheng J F, Li H, Ma S H, et al. Application of water activity determination of microbial control in nonsterile pharmaceutical products [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1837-1841.
- [19] The U. S. Pharmacopeia 2021 General Chapter 922. Water activity [EB/OL]. (2021-05-01)[2022-02-20]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-B5DDDC52-0DC8-4603-B81B-03EA4FB025B8_2_en-S?source=Search%20Results&highlight=WATER%20ACTIVITY.
- [20] Scottw J. Water relations of food spoilage microorganisms [J]. Adv Food Res, 1957(7): 83-127.
- [21] The US Pharmacopeia 2021 General Chapter 1122. Application of water activity determination to nonsterile pharmaceutical products [EB/OL]. (2006) [2022-02-20]. https://online.uspnf.com/uspnf/document/1_GUID-088FEEB1-8BD8-4120-AC2A-106AAE5E8E4E_1_en-

- S? source=Search% 20Results&highlight=WATER% 20ACTIVITY.
- [22] 鲍方名, 沈海英. 水分活度与非无菌药品微生物控制 [J]. 中国药事, 2018, 32(7): 913-918.
- Bao F M, Shen H Y. Water activity and microbial control of non-sterile drugs [J]. Chin Pharm Aff, 2018, 32(7): 913-918.
- [23] 李文靖, 林铁豪. 基于水活度的2种中药制剂洋葱伯克霍尔德氏菌的控制研究 [J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(23): 2859-2862.
- Li W J, Lin T H. Study on the control of *Burkholderia cepacia* in two traditional Chinese medicine preparations based on water activity [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2020, 37(23): 2859-2862.
- [24] 王杠杠, 王似锦, 马仕洪. 水分活度对洋葱伯克霍尔德菌群生长的影响 [J]. 微生物学杂志, 2021, 41(3): 85-90.
- Wang G G, Wang S J, Ma S H, et al. Effect of water activity on growth of *Burkholderia cepacia* complex [J]. J Microbiol, 2021, 41(3): 85-90.
- [25] Kim J M, Ann Y, Lipuma J J, et al. Survival and susceptibility of *Burkholderia cepacia* complex in chlorhexidine gluconate and benzalkonium chloride [J]. J Ind Microbiol Biotechnol, 2015, 42(6): 905-913.
- [26] 中国药典 [S]. 四部. 2020.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020.

[责任编辑 李红珠]