

宏基因组测序法在药品污染细菌鉴定与溯源中的应用研究

严卓彦¹, 谭宇翔², 林吉恒¹, 夏瑛瑛¹, 孙瑛¹, 崔洁¹, 黄朱梁¹ (1. 舟山市食品药品检验检测研究院, 国家海洋食品质量检验检测中心, 浙江 舟山 316012; 2. 中国科学院深圳先进技术研究院, 深圳合成生物学创新研究院, 中国科学院定量工程生物学重点实验室, 广东 深圳 518055)

摘要 目的:评价宏基因组测序法在药品污染细菌鉴定和溯源中的应用。**方法** 利用宏基因组测序法和分离培养法同时对两批中成药及检测实验室环境取样中的细菌进行鉴定和分型。宏基因组测序结果通过 MetaPhlan 和 StrainSifter 软件进行菌株水平的分析。**结果** 经宏基因组测序发现,药品与环境中均有大量的蜡样芽孢杆菌污染,且药品 B18 与环境样本 HJ2 中含有相同的蜡样芽孢杆菌菌组。培养法从药品和环境中共分离得到的 5 株蜡样芽孢杆菌,通过蜡样芽孢杆菌特异性聚合酶链式反应(PCR)扩增基因 *gyrA* 和 *panC* 序列构建 NJ 进化树,以及多位点序列分型(MLST),结果均显示药品 B18 中的蜡样芽孢杆菌菌株与环境样本 HJ2 的菌株同组。**结论** 宏基因组测序技术是可靠的,且相比培养法,能够更全面发现具有潜在风险的细菌物种,同时也能准确地进行菌株水平的溯源分析,在药品污染菌鉴定与溯源中具有重要的应用价值。

关键词:宏基因组测序;蜡样芽孢杆菌特异性 PCR;多位点序列分型;药品污染;细菌鉴定;细菌溯源

doi:10.11669/cpj.2024.11.011 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2024)11-1041-06

Evaluation of the Application Value of Metagenomic Sequencing in Identification and Tracing of Bacteria Contaminating Drugs

YAN Zhuoyan¹, TAN Yuxiang², LIN Jiheng¹, XIA Yingying¹, SUN Ying¹, CUI Jie¹, HUANG Zhuliang¹ (1. National Ocean Food Quality Inspection Center, Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316012, China; 2. CAS Key Laboratory of Quantitative Engineering Biology, Shenzhen Institute of Synthetic Biology, Shenzhen Institutes of Advanced Technology, Chinese Academy of Sciences, Shenzhen 518055, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate metagenomic sequencing in the identification and tracing of bacteria contaminating drugs, and evaluate its application value. **METHODS** Both metagenomic sequencing and isolation culturing were employed to identify and type bacteria in two batches of Chinese patent medicines and environmental samples from the testing laboratory. The metagenomic sequencing results were analyzed at the strain level using MetaPhlan and StrainSifter software. **RESULTS** The analysis revealed a substantial contamination of *Bacillus cereus*-like organisms in both medicines and environmental samples, with the presence of the same *B. cereus*-like strain in medicine B18 and environmental sample HJ2. Through isolation culturing, five *B. cereus*-like strains were obtained from the medicines and environment. A phylogenetic tree was constructed based on the *gyrA* and *panC* gene sequences amplified by *B. cereus*-specific PCR, and multilocus sequence typing (MLST) results, all of which demonstrated that the *B. cereus*-like strain in medicine B18 belonged to the same group as one strain from the environment. **CONCLUSION** These findings indicate that metagenomic sequencing technology is reliable and has advantage over isolation culturing in comprehensively detecting potentially hazardous bacterial species and accurately performing strain-level traceability analysis. It holds significant application value in identification and tracing of pharmaceutical contamination.

KEY WORDS: Metagenomic sequencing; *Bacillus cereus* specific PCR; MLST; drug contamination; bacteria identification; bacteria tracing

药品微生物控制是药品质量保证的重要组成部分,药品污染微生物不仅直接影响药品的有效性,更有可能危及用药患者的生命安全。虽然有 GMP 标准和药品召回制度对药品安全进行监管,药品微生物污染事件仍然时有发生。2013—2019 年统计的中国、美国、澳大利亚、日本和新加坡药品召回事件

中,428 次召回涉及微生物污染,占药品召回总数的 3.86%^[1]。传统的微生物限度检查法只能对可以培养的微生物进行检测,而生态环境中可培养的微生物仅占所有微生物种类的约 1%^[2],因此非培养依赖技术如宏基因组技术在分析微生物多样性及其群落结构的研究中得到了广泛应用。

基金项目:浙江省药监局科技计划项目资助(2023010)

作者简介:严卓彦,女,硕士 研究方向:药品微生物检测研究 Tel:(0580)2187150

目前宏基因组研究主要集中在细菌的属、种水平,具体包括研究样本中细菌群落组成、物种丰度以及新物种的发现^[3,4]、基因功能多样性^[5]、细菌与宿主之间的相互作用^[6]等。随着测序技术和分析软件的发展,将宏基因组测序技术应用在细菌的株水平已成为可能^[7]。对样本和环境中相同菌种不同菌株的分析,有助于识别菌株间的亲缘关系及可能的污染途径。宏基因组菌株水平分析已经应用到食品污染^[8]和院内感染爆发^[9]的溯源分析中,但是尚未有药品中污染菌溯源分析的相关研究报道。

宏基因组菌株水平分析,主要可分为无参考基因组(无参)的组装分析和有参考基因组(有参)的比对分析两大类。有参比对的菌株分析方法又分为基于单核苷酸多态性(SNP)进行识别和基于基因组成(genetic constitution)差异进行识别两种分析方法。基于SNP的分析方法是菌株分析算法的主流,利用的是宏基因组数据中单碱基水平的信息,通过使用宏基因组片段序列和参考序列(全基因组或标记基因)的比对结果进行SNP位点的等位基因相对比例分析,最后根据这些比例信息,推算菌株的组成^[10]。其中MetaPhlan^[11]可以标记基因定位到亚种级别。如果样品量足够,可通过StrainPhlan^[12]进一步实现菌株级别溯源。而以StrainSifter^[13]为代表的基于全基因组信息进行深度的宏基因组菌株分析,虽然它1次只能针对1个参考基因组,但它能更全面利用测序数据,主要用于快速并准确地检测样品中是否存在特定菌株及其旁系。利用基因谱组成的判定方法有StrainPanDa^[14]和PanPhlan^[15],其中PanPhlan只能反映每个样品的基因谱以用于判定样品间的相似程度,无法定量和识别共存菌株,而StrainPanDa在其基础上进行了谱系解析,能反馈具体菌株的构成比例和对应基因谱。但这两个方法对具有同类菌株的样品数量要求较高。

本研究对两批中成药样本及两次环境取样进行分析,基于宏基因组测序数据,通过MetaPhlan比较了样本和环境的相似菌种,并再利用StrainSifter确定潜在污染。然后通过传统培养法作为参照进一步确定中成药及环境中的污染细菌高度同源。为药品中污染细菌的鉴定和分型提供新的方法和技术参考。

1 实验材料、主要仪器与试剂

1.1 实验材料

实验选取的两批中成药,分别为乳癖消片(编号B18)和胚宝胶囊(编号B20)。环境样本两次取

样(分别编号HJ1和HJ2)均采集自本院药品微生物限度检查室,包括洁净工作台面、水浴锅、匀浆器、操作人员的无菌手套和无菌服、实验用胰酪胨大豆液体培养基(TSB)和pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液。

1.2 仪器和试剂

水浴锅(DK-S24,上海精宏实验设备有限公司);匀浆器(HTY-761,浙江泰林生命科学有限公司);恒温培养箱(KB240)(德国BRAND公司);PCR扩增仪(MyCycler)、水平电泳仪(Mini-PROTEIN Tetra)、凝胶成像系统(Gel Doc XR)(美国BIO-RAD公司);全自动快速微生物质谱系统(VITEK MS)、全自动微生物鉴定及药敏分析系统(VITEK 2 Compact)、测序仪(NovaSeq 6000 sequencers)(美国Illumina公司);Ezup柱式细菌基因组DNA抽提试剂盒(B518255-0100)(上海生工);胰酪胨大豆液体培养基(TSB,批号20210608)、胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA,批号20220505)、pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液(批号20230807)(青岛海博生物科技股份有限公司);营养琼脂(批号230908,北京陆桥技术股份有限公司)。

2 实验方法

2.1 样本采集

参照2020年版《中国药典》四部1105非无菌产品微生物限度检查法,在洁净区域无菌条件下称取样品10g于封口无菌袋中,加入TSB制成100mL供试液,然后按照以下方法混匀样品:胶囊类样品在45℃水浴锅中进行溶解,片剂类样品置于匀浆器中9000r·min⁻¹混匀1min。取1mL供试液用pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液进行10倍稀释,取原液和稀释液1mL分别加入到无菌培养皿中,倾注胰酪胨大豆琼脂培养基(TSA)在(32.5±0.5)℃进行5d需氧菌培养。剩下的供试液(编号B18和B20)在32.5℃培养箱中培养18~24h,然后送往上海生工生物工程有限公司进行基因组抽提和宏基因组测序分析。同时用无菌棉签擦拭检测人员无菌手套、无菌服、水浴锅、匀浆器、TSB培养基、pH 7.0氯化钠蛋白胨缓冲液等检测环境样本到不同的TSA平板上进行传统培养,然后将所有采样过的无菌棉签放入同一袋TSB培养液(编号HJ1和HJ2),在32.5℃培养18~24h后送往上海生工进行宏基因组测序。

2.2 宏基因组测序及菌株水平分析

宏基因组测序法采用二代高通量测序法(NovaSeq 6000, Illumina),具体步骤包括基因组

DNA 片段化、文库构建、文库质控和测序。测序数据分析应用 MetaPhlan (MetaPhlan-4.0.2) 和 StrainSifter 软件。MetaPhlan(使用默认参数)是利用快速比对工具 bowtie2 与参比基因集(marker)数据库(mpa_vOct22_CHOCOPhlanSGB_202212)进行比对,对宏基因组测序数据进行每个样品菌群定性和定量分析。具体步骤为参比基因组的确定、reads 与 marker 的比对和含量的计算。StrainSifter (<https://github.com/bhattlab/strainsifter>) 使用其 snakemake 流程(default 参数),用 GCF_002220285 作为参考基因组进行全基因组的 SNP 分析。

2.3 单菌落分离、纯化和鉴定

按 2020 年版《中国药典》四部非无菌产品微生物限度检查法,需氧菌用 TSA 培养基在 32.5 °C 培养 5 d。每天观察平板并挑取单菌落到营养琼脂上进行分离纯化。将纯化的细菌单菌落通过生物质谱(VITEK MS)和微生物自动鉴定系统(VITEK 2 Compact)进行鉴定,同时用上海生工的柱式细菌基因组抽提试剂盒提取基因组,通过 16srRNA 全长 PCR 扩增测序,蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)特异性 PCR 反应进行分子鉴定。蜡样芽孢杆菌特异性 PCR 采用扩增基因和引物见表 1。PCR 扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行双向测序,将双向测序拼接结果序列通过 NCBI 的 BLAST 比对算法得到相似度最高的菌种,并利用 MEGA 11 软件采用 K2P 算法和 Bootstrap = 1 000 参数构建 Neighbor-Joining 进化树。

表 1 蜡样芽孢杆菌群特异性 PCR 扩增基因及引物

Tab. 1 Specific PCR primer pairs for *Bacillus cereus*

| Gene | Primer sequences | PCR products/bp | Reference |
|-------------|---|-----------------|---------------------------|
| <i>gyrA</i> | F:CGCTCTGCAACGTTTAACTGG R:TGTCGCTACCTCTGTGCTCATC | 1 084 | [14] |
| <i>panC</i> | F:TGGCCCAAATGAAGAT R:TAACCTGCAATAGCTAAAATGAT | 600 | Designed by this research |
| <i>cry</i> | F:AGGACCAGGATTACAGGAGG R:GCTGTGACCAAGGATATAGCCAC | 1 600 ~ 1 700 | [15] |

2.4 蜡样芽孢杆菌菌株分型

根据 PubMLST Databases 中蜡样芽孢杆菌多位点序列分型(MLST)方案(<http://pubmlst.org/organisms/bacillus-cereus/primers>)选择 7 个管家基因(表 2)进行 PCR 扩增,将正反双向引物扩增产物的测序结果进行拼接并上传至 PubMLST Database 进行基因序列比对,得到相应的 Aelle ID,将比对过的 7 个等位基因序列号上传后得到相应的序列类型 MLST

profiles。对于有基因变异和多态性位点变异的序列,向数据库提交新序列分离株的信息并申请新的分离株号(ID)和序列类型(ST)。采用在线 BURST (n-4)算法进行分离株聚类分析。

表 2 蜡样芽孢杆菌 7 个管家基因 PCR 扩增引物及条件

Tab. 2 Primer pairs and PCR conditions for seven alleles of *Bacillus cereus*

| Gene | Primer sequences | Annealing temperature/°C |
|-------------|---|--------------------------|
| <i>glpF</i> | F:CGC TTT GTG CTG GTG TAA GT R:CTG CAA TCG GAA GGA AGA AG | 59 |
| <i>gmk</i> | F:ATT TAA GTG AGG AAG GGT AGG R:GCA ATG TTC ACC AAC CAC AA | 56 |
| <i>ibbD</i> | F:CGG GGC AAA CAT TAA GAG AA R:GGT TCT GGT CGT TTC CAT TC | 58 |
| <i>pta</i> | F:GCA GAG CGT TTA GCA AAA GAA R:TGC AAT GCG AGT TGC TTC TA | 56 |
| <i>pycA</i> | F:CGC TTA GGT GGA AAC GAA AG R:CGC GTC CAA GTT TAT GGA AT | 57 |
| <i>tpi</i> | F:GCC CAG TAG CAC TTA GCG AC R:CCG AAA CCG TCA AGA ATG AT | 58 |
| <i>pur</i> | F:CTG CTG CGA AAA ATC ACA AA R:CTC ACG ATT CGC TGC AAT AA | 56 |

3 结果

3.1 宏基因组测序菌株水平分析结果

经过测序数据质控、拼接及聚类分析得到物种信息见表 3,芽孢杆菌属(*Bacillus*)蜡样芽孢杆菌种在两个药品样本和环境样本 HJ2 中都是含量最高的属种,也是唯一在样品和检测环境中都出现的菌种。不动杆菌属(*Acinetobacter*)在检测环境样本 HJ1 和 HJ2 中的含量分别占第一和第二,但是在样品中没有出现,排除了其污染的可能性。MetaPhlan 结果(表 3)显示 B18 和 HJ2 中含有相同的蜡样芽孢杆菌组 SGB7697,可推测存在检测环境对样品的污染。而使用信息更全面的 StrainSifter 方法验证结果(表 4),显示 B18 与 HJ2 的基因组 SNP 差异在 3 个样本的两两比较中最小,进一步佐证了 MetaPhlan 结果的推测。综上所述,两种宏基因组分析方法的结果均证明 B18 与 HJ2 最接近,暗示了样品的污染源。

3.2 培养法菌株鉴定及分型

基于宏基因组测序结果,我们重点关注在样品和检测环境中存在的蜡样芽孢杆菌群。从样品 B18、B20 中各分离得到 1 株细菌(分别编号为 B18 和 B20),从检测环境样本中分离得到 3 株细菌(分别编号为 HJ-1、HJ-2、HJ-3)。以上 5 株菌的 16srRNA 测序、生物质谱与 VITEK2 compact 鉴定系统的结果均为蜡样芽孢杆菌群,无法鉴定到种。结合 *gyrA*、*panC* 和 *cry* 基因的 PCR 扩增结果,特异性

表 3 4 个样本宏基因组测序菌株水平分析的 MetaPhlan 结果

Tab. 3 The strain-level analysis results of four samples by MetaPhlan

| Sample | Genus (%) | Species (%) | SGB (%) |
|--------|-----------------------------|---|---|
| B18 | <i>Bacillus</i> (98.9) | <i>Bacillus cereus</i> (98.5) | <i>Bacillus cereus</i> SGB7697 (98.3) |
| | <i>Priestia</i> (1.0) | <i>Priestia megaterium</i> (1.0) | <i>Priestia megaterium</i> SGB7678 (1.0) |
| B20 | <i>Bacillus</i> (99.4) | <i>Bacillus cereus</i> (99.4) | <i>Bacillus cereus</i> SGB7703 (94.4) <i>Bacillus cereus</i> SGB7697 (4.9) |
| HJ1 | <i>Acinetobacter</i> (100) | <i>Acinetobacter radioresistens</i> (100) | <i>Acinetobacter radioresistens</i> SGB10375 (100) |
| HJ2 | <i>Bacillus</i> (56.9) | <i>Bacillus cereus</i> (56.9) | <i>Bacillus cereus</i> SGB7697 (56.9) |
| | <i>Acinetobacter</i> (38.6) | <i>Acinetobacter johnsonii</i> (38.6) | <i>Acinetobacter johnsonii</i> SGB10398 (38.6) |
| | <i>Pseudomonas</i> (2.9) | <i>Pseudomonas oryzaehabitans</i> (2.9) | <i>Pseudomonas oryzaehabitans</i> SGB12309 (2.9) |
| | <i>Niallia</i> (1.6) | <i>Niallia taxi</i> (1.6) | <i>Niallia taxi</i> SGB30277 (1.6) |

表 4 4 个样本宏基因组测序菌株水平分析的 StrainSifter 结果

Tab. 4 The strain-level analysis results of four samples by StrainSifter

| Samples compared | SNVs | Bases compared | Diversity ratio/% |
|------------------|--------|----------------|-------------------|
| B18 to HJ2 | 48 772 | 4 546 132 | 1.07 |
| B20 to HJ2 | 65 139 | 4 066 579 | 1.60 |
| B18 to B20 | 77 754 | 4 141 063 | 1.88 |

PCR 鉴定结果为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 或太平洋芽孢杆菌 (*Bacillus pacificus*) (仅 B20) (表 5)。

将 5 株菌的 *panC* 和 *gyrA* 基因序列 (已上传至 NCBI 数据库并得到 Genbank 序列号) 与 NCBI 下载的蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*)、蕈状芽孢杆菌 (*Bacillus mycooides*)、太平洋芽孢杆菌 (*Bacillus pacificus*)、魏德曼芽孢杆菌 (*Bacillus wiedmannii*) 的 *panC* 和 *gyrA* 基因序列一起构建 NJ 进化树 (见图 1~2), 结果均显示 HJ-3 与蜡样芽孢杆菌最接近, B20 与太平洋芽孢杆菌最接近, B18 与 HJ-2 最接近, 其次为 HJ-1。

表 5 培养法分离得到 5 株细菌的 16srRNA 全长测序、芽孢杆菌特异性 PCR 鉴定结果

Tab. 5 Sequencing results of 16srRNA and specific PCR products for the five cultured strains

| Sample | The BLAST result of 16srDNA (identity/%) | The BLAST result of specific PCR product (identity/%) | | |
|--------|---|---|--|----------------|
| | | <i>gyrA</i> | <i>PanC</i> | <i>cry</i> |
| B18 | <i>Bacillus proteolyticus/sanguinis</i> (99.93) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | <i>Bacillus cereus</i> (>99.5) | No PCR product |
| B20 | <i>Bacillus tropicus/nitratireducens/huti/albus/paramycooides</i> (99.66) | <i>Bacillus cereus</i> (99.81) | <i>Bacillus cereus/pacificus</i> (>99) | No PCR product |
| HJ-1 | <i>Bacillus cereus</i> (99.86) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99) | No PCR product |
| HJ-2 | <i>Bacillus proteolyticus/sanguinis/wiedmannii/cereus</i> (>99.7) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | No PCR product |
| HJ-3 | <i>Bacillus toyonensis/thuringiensis</i> (99.47) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | <i>Bacillus cereus/thuringiensis</i> (>99.5) | No PCR product |

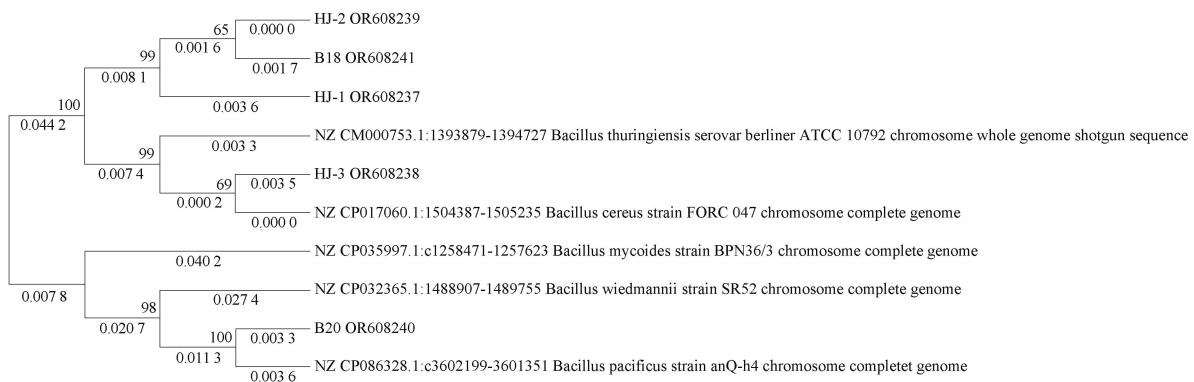


图 1 基于 5 个菌株和 NCBI 的蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、太平洋芽孢杆菌、魏德曼芽孢杆菌的 *panC* 基因序列的 NJ 进化树

Fig. 1 NJ trees based on *panC* sequences of five strains and *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycooides*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus wiedmannii* from NCBI

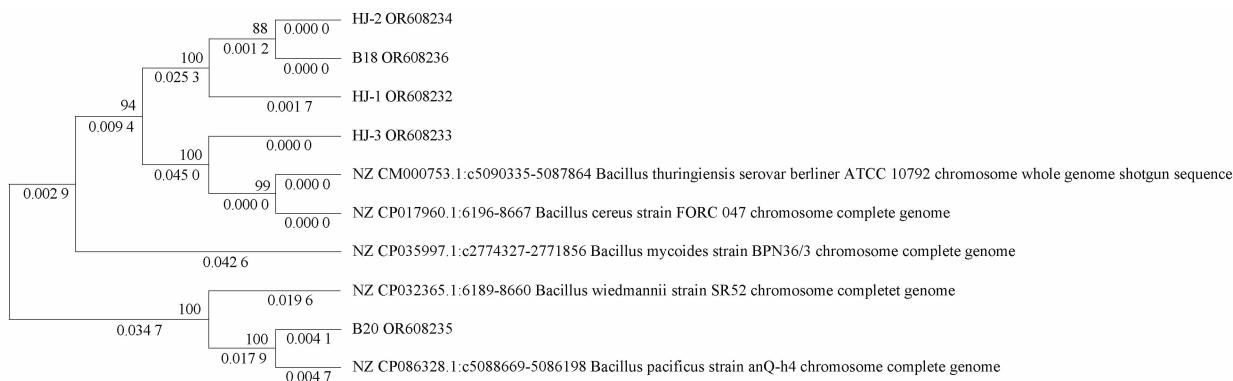


图2 基于5个菌株和NCBI的蜡样芽孢杆菌、苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、太平洋芽孢杆菌、魏德曼芽孢杆菌的gyrA基因序列的NJ进化树

Fig. 2 NJ trees based on gyrA sequences of five strains and Bacillus cereus, Bacillus thuringiensis, Bacillus mycooides, Bacillus pacificus, Bacillus wiedmannii from NCBI

将5株菌的7个管家基因序列在pubMLST网站上进行在线比对,结果显示3个菌株B18、HJ-2、HJ-3无对应的MLST profile,上传相关信息到pubMLST数据库得到新的ST型号和分离株

号。allele结果显示7个管家基因中有3个B18与HJ-2序列相同,BURST聚类结果显示B18和HJ-2为同一组,其余皆为独立基因型的菌株(表6)。

表6 5个分离菌株的多位点序列分型(MLST)法分型结果

Tab. 6 Multilocus sequence typing(MLST) results of five cultured strains

| Strain | Allele | | | | | | | Allelic profile | BURST |
|--------|--------|------|-----|------|------|-----|------|-----------------|-----------|
| | glpF | ilvD | pta | purH | pycA | gmk | tpiA | | |
| B18 | 14 | 36 | 10 | 2 | 17 | 8 | 10 | 3 178 | Group 1 |
| B20 | 6 | 41 | 5 | 43 | 46 | 4 | 3 | 90 | singleton |
| HJ-1 | 13 | 9 | 11 | 9 | 12 | 8 | 53 | 2 573 | singleton |
| HJ-2 | 33 | 36 | 30 | 219 | 17 | 8 | 53 | 3 179 | Group 1 |
| HJ-3 | 93 | 170 | 8 | 4 | 39 | 67 | 21 | 3 180 | singleton |

4 讨论

蜡样芽孢杆菌(Bacillus cereus)是一种兼性厌氧的杆状革兰阳性细菌,在土壤、水、植物、饲料以及各种食品中大量存在;该菌可以产生内生孢子,对环境具有很强的适应性,能够抵抗高温、紫外线、电磁辐射和有害化学物质等不利条件^[16]。它与苏云金芽孢杆菌、蕈状芽孢杆菌、炭疽芽孢杆菌等同属蜡样芽孢杆菌群。蜡样芽孢杆菌群的16SrRNA基因相似性非常高,只能将他们鉴定为同一个物种,并不能很好地区分蜡样芽孢杆菌群^[17],需要结合芽孢杆菌特异性PCR如gyrA基因^[14]、gyrB基因^[18]、panC基因^[19]等信息进行区分。且蜡样芽孢杆菌群的蛋白质谱也高度相似,生物质谱和VITEK 2 compact鉴定系统都无法将它们进行区分。蜡样芽孢杆菌与苏云金芽孢杆菌的基因组几乎完全相同,唯一的区别是苏云金芽孢杆菌在质粒上有编码蛋白毒素结晶体

的cry基因^[20]。因此,本研究对蜡样芽孢杆菌的鉴定基于gyrA、panC和cry基因的特异性PCR反应结果。基于gyrA和panC基因的NJ进化树显示药品B18中分离的菌株与环境中的菌株HJ-2最接近,其次是HJ-1,药品B20与另外4株菌距离较远,而与蜡样芽孢杆菌群的另一个种太平洋芽孢杆菌(Bacillus pacificus)比较接近。对5株蜡样芽孢杆菌菌株的分型溯源采用国际通用的MLST法,得到蜡样芽孢杆菌7个管家基因序列,采用在线BURST(n-4)算法进行聚类分析,得到B18与HJ-2属于同一组的结果。因此高度怀疑B18中的蜡样芽孢杆菌可能来源于检测环境中的污染。

宏基因组测序法对样品中的全部基因组进行测序、拼接和比对,因此可以检测到无法通过培养法分离得到的细菌,比如环境中含量较高的不动杆菌(Acinetobacter,相对丰度大于38%)及含量较低的假

单胞菌 (*Pseudomonas*, 相对丰度 3%) 和 尼 尔 菌 (*Niallia*, 相对丰度 2%), 以及 药 品 B18 中 少 量 的 巨 大 芽 孢 杆 菌 (*Priestia megaterium*, 相对丰度 1%)。对宏基因组测序结果进行菌株水平的分析可以预测样本之间可能的污染途径, 比如 MetaPhlan 的分析结果显示 B18 和环境样本中含有相同的蜡样芽孢杆菌菌群 SGB7697, 而 B20 以蜡样芽孢杆菌菌群 SGB7703 为主, 该结果与培养法的溯源结果一致, 都显示样本 B18 中的蜡样芽孢杆菌可能来源于检测环境。B20 还含有少量的蜡样芽孢杆菌菌群 SGB7697 (相对丰度 5%), 但是丰度太低, 未能通过培养法进行验证, 也说明了宏基因组测序法能够得到比培养法更多的菌株信息。

药品 B20 中较高含量的蜡样芽孢杆菌与检测环境中的蜡样芽孢杆菌不属于同一型, 可能是药品自身携带的, B18 中还检出少量的巨大芽孢杆菌。芽孢杆菌会在人体基础病变引起机体防卫功能降低时导致各种机会感染^[23]。所以, 虽然上述污染菌株多为环境常见菌, 没有危害性较大的致病菌, 但也属于条件致病菌, 其用药对象若是婴幼儿及衰弱患者, 就会导致使用该药品的患者受到感染, 属于药品中的不可接受微生物^[24-25], 因此应该引起生产厂家的高度重视。

基于株水平的宏基因组学方法不仅能准确识别菌株间亲缘关系, 还能节省样本分离纯培养时间, 同时有助于更全面发现具有潜在风险的细菌物种, 在药品微生物鉴定与溯源分析中具有重要的应用价值。

REFERENCES

[1] WU Y W, WANG Y, CHE Y, *et al.* Review and Analysis of International Microbial Contamination-related Drug recalls from 2013 to 2019[J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2021, 38: 1870-1877.

[2] MARCY Y, OUVERNEY C, BIK E M, *et al.* Dissecting biological “dark matter” with single-cell genetic analysis of rare and uncultivated TM7 microbes from the human mouth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(29):11889-11894.

[3] NAYFACH S, SHI Z J, SESHADRI R, *et al.* New insights from uncultivated genomes of the global human gut microbiome[J]. *Nature*, 2019, 568(7753):505-510.

[4] CYCIL L M, DASSARMA S, PECHER W, *et al.* Metagenomic insights into the diversity of halophilic microorganisms indigenous to the Karak salt mine, Pakistan[J]. *Front Microbiol*, 2020, 11: 1567.

[5] LOMBARDINO J, BIJLANI S, SINGH N K, *et al.* Genomic characterization of potential plant growth-promoting features of Sphingomonas strains isolated from the international space station [J]. *Microbiol Spectr*, 2022, 10(1): e0199421. DOI: 10.1128/spectrum.01994-21.

[6] KARLSSON FH, FAK F, NOOKAEW I, *et al.* Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome[J]. *Nat Com-*

mun, 2012, 3(1):1245. DOI: 10.1038/ncomms2266.

[7] QIAN X W, WU Y R, HAO T Y, *et al.* Strain-level bacterial analysis from shotgun metagenomics: a review[J]. *Dis Surveill* (疾病监测), 2022, 37: 1408-1412.

[8] BUYTAERS F E, SALTYSKOVA A, MATTHEUS W, *et al.* Application of a strain-level shotgun metagenomics approach on food samples: resolution of the source of a *Salmonella* food-borne outbreak[J]. *Microb Genom*, 2021, 7(4):000547. DOI: 10.1099/mgen.0.000547.

[9] MU A, KWONG J C, ISLES N S, *et al.* Reconstruction of the genomes of drug-resistant pathogens for outbreak investigation through metagenomic sequencing[J]. *mSphere*, 2019, 4(1): e00529-18. DOI: 10.1128/mSphere.00529-18.

[10] TAN Y X, HU H, LI C H, *et al.* Research progress and applications of strain analysis based on metagenomic data[J]. *Chin J Biotech*(生物工程学报), 2020, 36(12):2610-2621.

[11] TRUONG D T, FRANZOSA E A, TICKLE T L, *et al.* MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(10):902-903.

[12] TRUONG D T, TETT A, PASOLLI E, *et al.* Microbial strain-level population structure and genetic diversity from metagenomes[J]. *Genome Res*, 2017, 27(4):626-638.

[13] TAMBURINI F B, ANDERMANN T M, TKACHENKO E, *et al.* Precision identification of diverse bloodstream pathogens in the gut microbiome[J]. *Nat Med*, 2018, 24(12):1809-1814.

[14] HU H, TAN Y X, LI C H, *et al.* StrainPanDA: linked reconstruction of strain composition and gene content profiles via pan-genome-based decomposition of metagenomic data[J]. *iMeta*, 2022. <https://doi.org/10.1002/imt.41>.

[15] SCHOLZ M, WARD D V, PASOLLI E, *et al.* Strain-level microbial epidemiology and population genomics from shotgun metagenomics[J]. *Nat Methods*, 2016, 13(5):435-438.

[16] YAN J T, QIAO K, CAI Y F. Application of rpoB, gyrA and cheA genes in identifying *Bacillus* genus[J]. *Acta Agric Zhejiangensis*(浙江农业学报), 2022, 34(1):128-140

[17] KUO W S, CHAK K F. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* stains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1996, 62(4): 1369-1377.

[18] ZHANG L Y, SONG L L, JIA W J, *et al.* Research process on detection methods of *Bacillus cereus* [J]. *Microbiol China*(微生物学通报), 2021, 48(4):1360-1372.

[19] HUANG J J, LUO J, HE H X. Research progress on detection methods for *Bacillus cereus*[J]. *China Anim Husb Vet Med*(中国畜牧兽医), 2018, 45(3):635-642.

[20] LU J Q, LI S C, WANG D H, *et al.* Combined 16S rDNA and *gyrB* gene sequence to identify a strain of *Bacillus cereus*[J]. *J Henan Univ Sci Technol Nat Sci*(河南科技大学学报 自然科学版), 2018, 39(1):74-83.

[21] VERA A, PABLO S F, MARIA R C, *et al.* Development of a high-resolution melting-based approach for efficient differentiation among *Bacillus cereus* group isolates[J]. *Foodborne Pathog Dis*, 2012, 9(9):777-785.

[22] CHEN M L, TSEN H Y. Discrimination of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* with 16S rRNA and *gyrB* gene based PCR primers and sequencing of their annealing sites[J]. *J Appl Microbiol*, 2002, 92: 912-919.

[23] MEI L. Condition the etiology of diarrhea caused by pathogenic bacteria[J]. *Clin Med*(临床医学), 2004, 24(10):49.

[24] SUTLON S. What is an “objectionable organism”? [J]. *Am Pharm Rev*, 2012, 15(6):1-13.

[25] ROESTI D, GOVERDE M. *Pharmaceutical Microbiological Quality Assurance and Control* [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2019: 371-400.

(收稿日期:2023-12-11)