

中国医药工业杂志

Chinese Journal of Pharmaceuticals

- 全国中文核心期刊
- 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
- 华东地区优秀期刊

本期导读：

Negishi 交叉偶联反应在药物化学中的应用

张庆文

生理药代动力学建模在药剂学中的应用

刘宏锐，陈芳，相小强，全应军，金莎莎



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

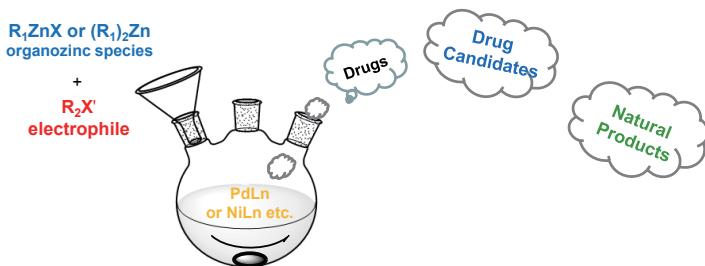
4

2019年4月

第50卷
Vol.50 No.4

· 专论与综述 (Perspectives & Review) ·

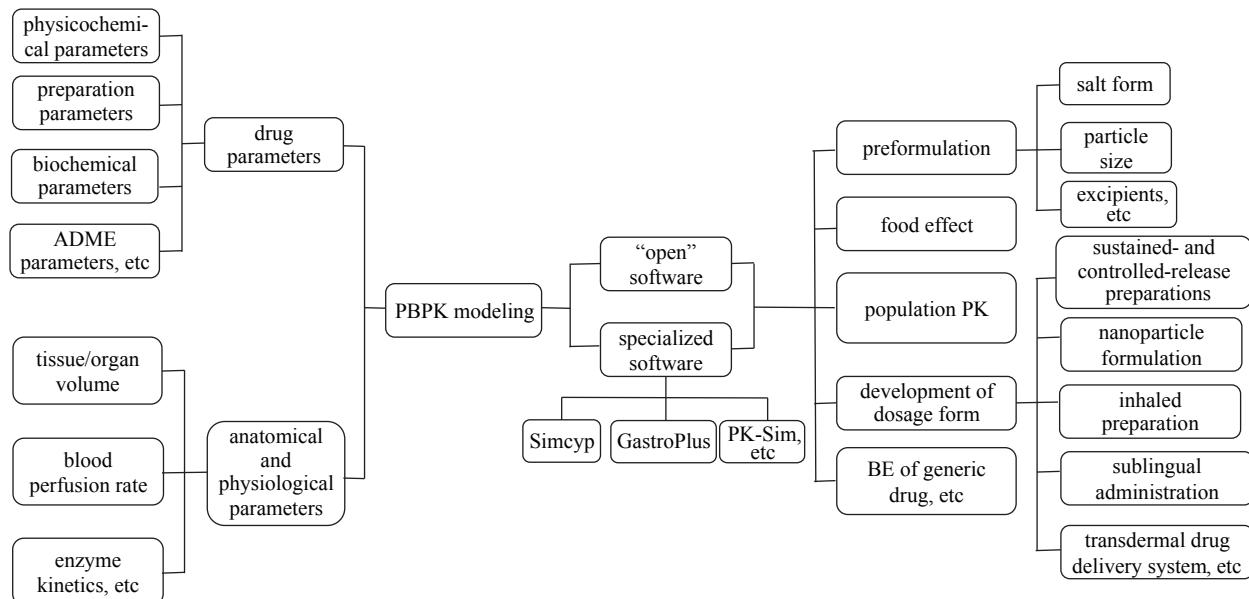
- 359 Negishi 交叉偶联反应在药物化学中的应用 张庆文
 Application of Negishi Cross-coupling in the Synthesis of Bioactive Molecules ZHANG Q W
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.001



I therefore chose with much enthusiasm "Discovery and Development of New Organic Synthetic Reactions Catalyzed by Transition Metals" as the central topic of my life-long research projects.

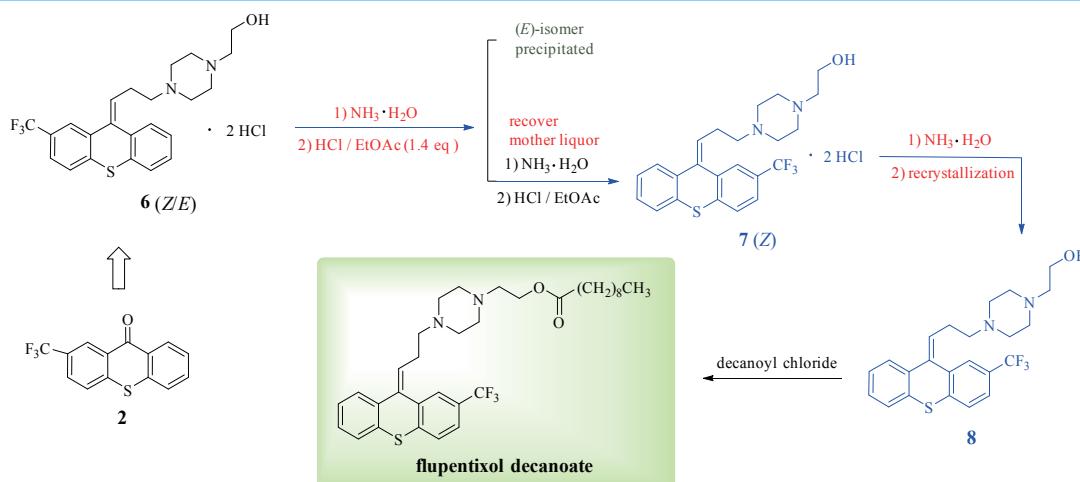
--- Ei-ichi Negishi

- 383 生理药代动力学建模在药剂学中的应用 刘宏锐, 陈 芳*, 相小强, 全应军, 金莎莎
 Application of Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling in Pharmaceutics LIU H R, CHEN F*, XIANG X Q, QUAN Y J, JIN S S
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.002



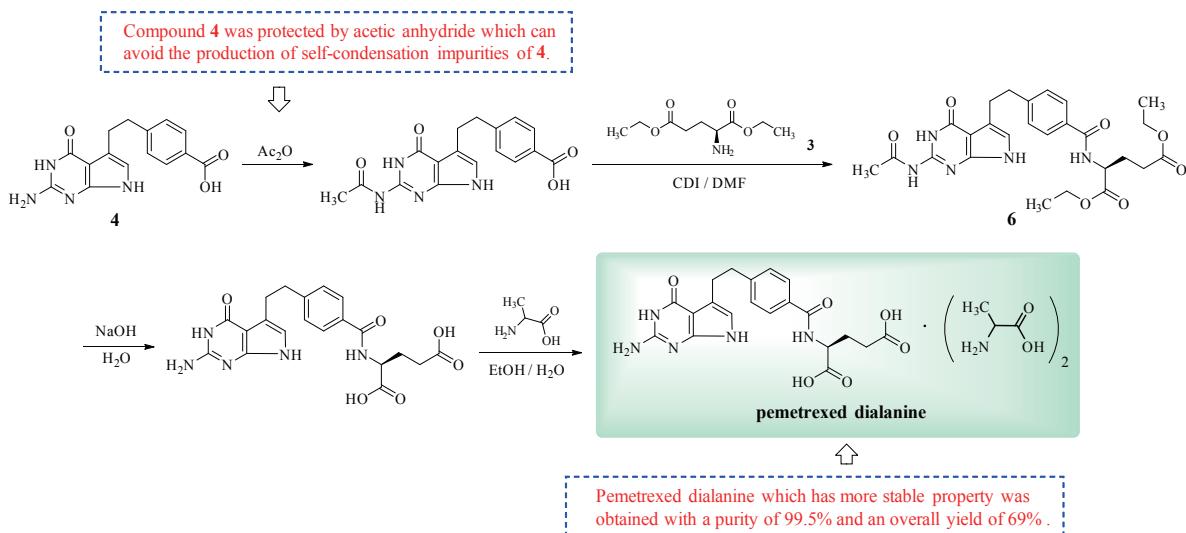
· 研究论文(Paper) ·

392 氟哌噻吨癸酸酯的合成.....陈道鹏, 王圣庆, 杨相平, 马彦琴, 张桂森
 Synthesis of Flupentixol Decanoate.....CHEN D P, WANG S Q, YANG X P, MA Y Q, ZHANG G S
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.003

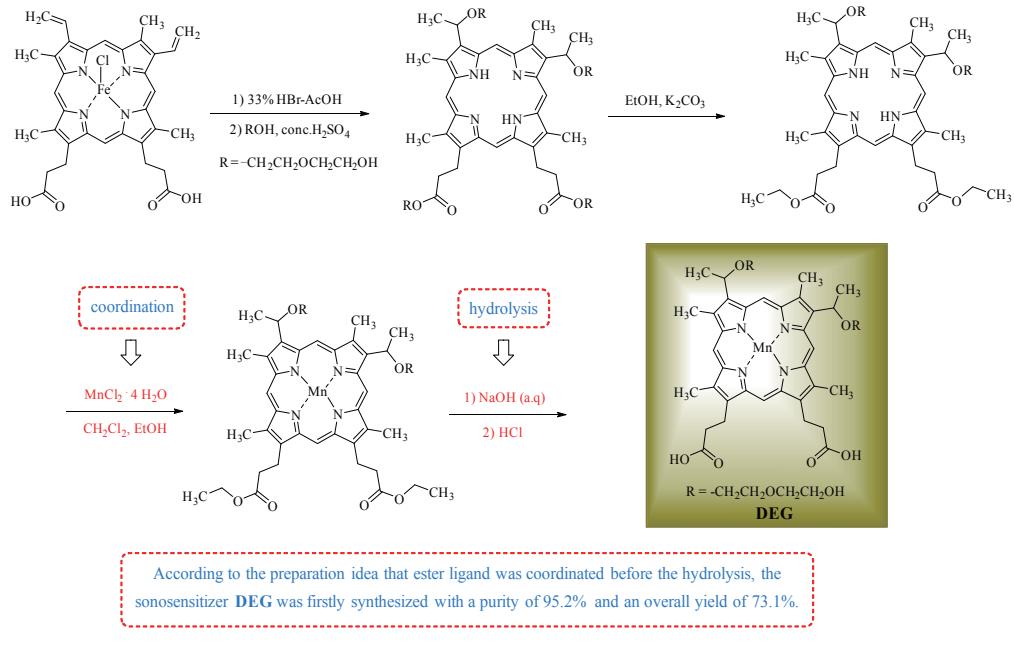


(Z)-Flupentixol (8) was separated via a new method with a purity of 99.9% and a yield of 29.6%, and the separation method has been patented and authorized in 2009.

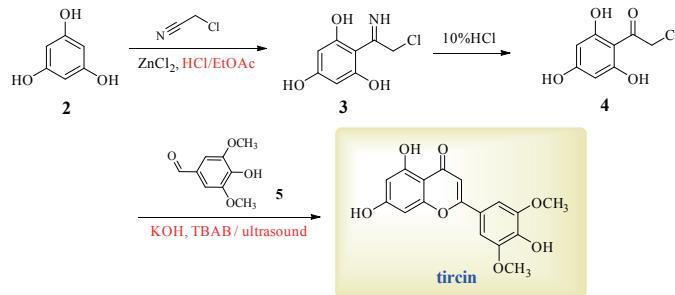
396 培美曲塞二丙氨酸盐的合成.....高 纪, 许建国, 臧 超, 唐云峰, 张贵民*
 Synthesis of Pemetrexed Dialanine.....GAO J, XU J G, ZANG C, TANG Y F, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.004



399 声敏剂DEG的合成.....陈俊磊, 赵明*, 时志春, 李军, 张树军
 Synthesis of Sonosensitizer DEG.....CHEN J L, ZHAO M*, SHI Z C, LI J, ZHANG S J
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.005

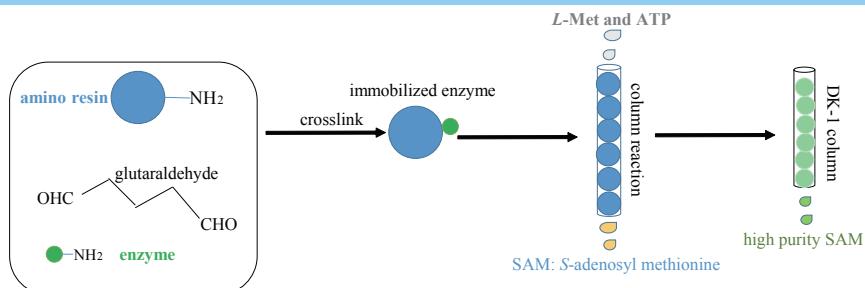


403 超声波相转移催化合成苜蓿素.....褚朝森, 王晓丽, 胡玉涛, 李天雪, 王政
 Synthesis of Tricin by Ultrasonic Phase Transfer Catalysis.....CHU C S, WANG X L, HU Y T, LI T X, WANG Z
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.006

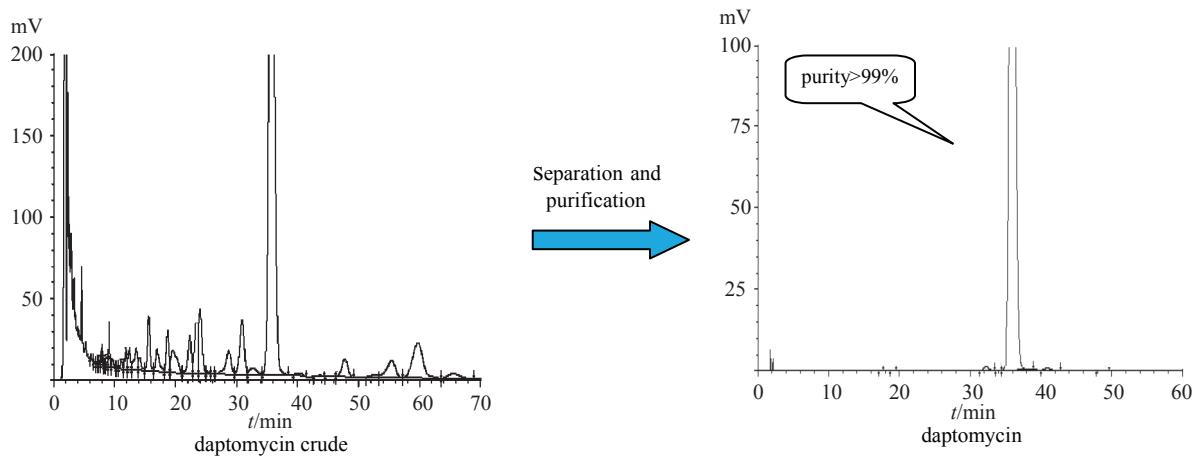


Tricin was prepared by a new method with a total yield of 74.1%, and the method for preparing tricin from 4 has not yet been reported in literature.

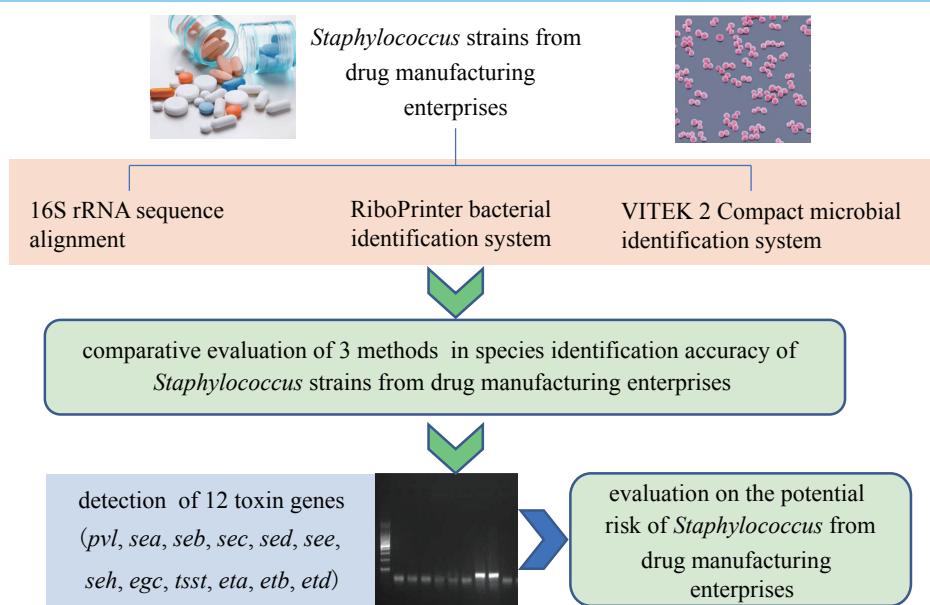
406 嗜热S-腺苷甲硫氨酸合成酶的固定化及S-腺苷甲硫氨酸的制备.....化浩举, 吴勇, 黄宗庆, 张喜全, 冯军*
 Immobilization of Thermophilic S-Adenosylmethionine Synthetase and Preparation of S-Adenosyl methionine.....HUA H J, WU Y, HUANG Z Q, ZHANG X Q, FENG J*

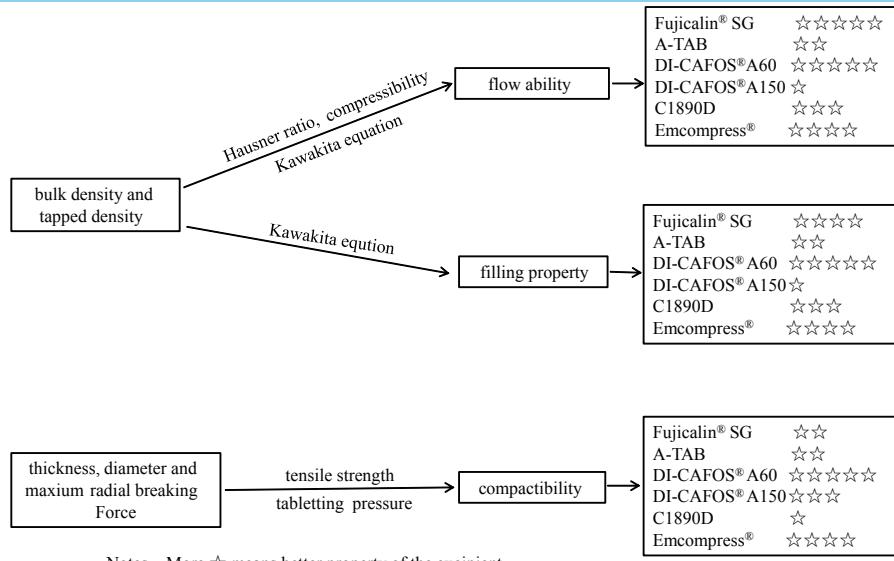
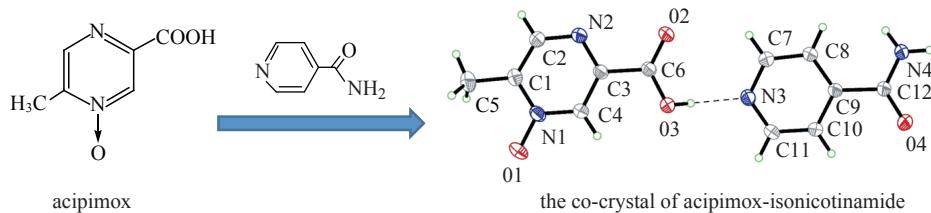
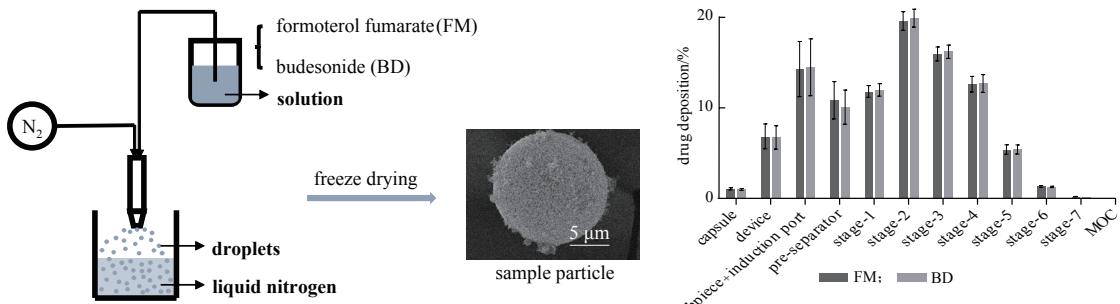


- 411 达托霉素的分离纯化工艺.....郭朝江, 王蒙, 刘忠, 李春利, 张贵民*
 Separation and Purification Process of Daptomycin.....GUO C J, WANG M, LIU Z, LI C L, ZHANG G M*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.008

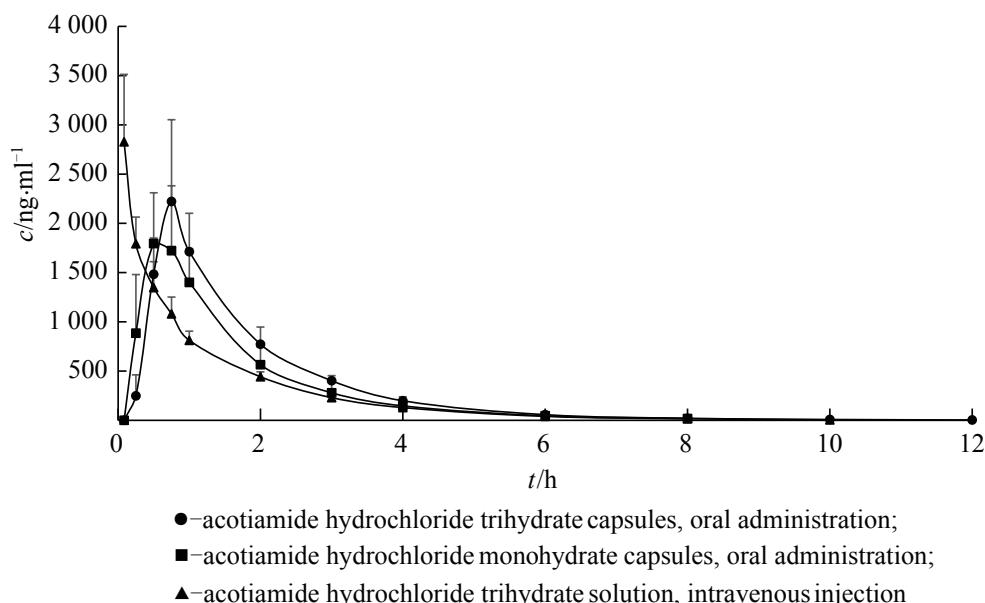
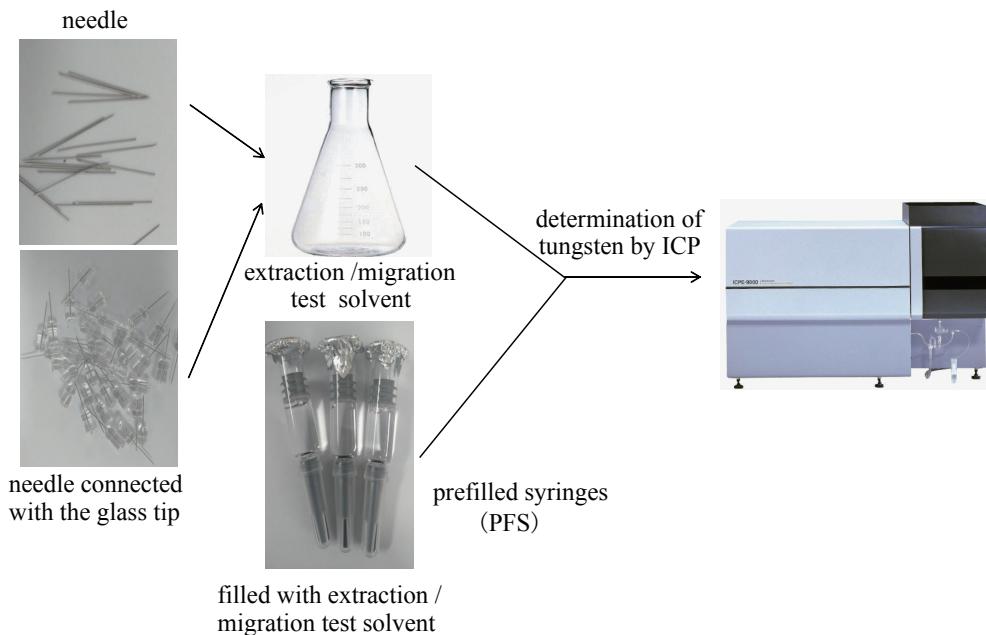


- 416 制药企业生产环境中污染葡萄球菌菌种鉴定方法的比较评价及毒素基因调查分析.....李琼琼, 宋明辉, 秦峰, 刘浩, 杨美成*
 Species Identification Analysis by Different Methods and Toxin Genes Detection of *Staphylococcus* Strains Isolated from Drug Manufacturing Enterprises.....LI Q Q, SONG M H, QIN F, LIU H, YANG M C*
 DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.009





Notes: More ☆ means better property of the excipient



- 450 基于注册申请人视角的药品优先审评制度实施情况调查分析.....陆承坤, 王雨杉, 蒋 蓉, 邵 蓉*
Investigation and Analysis of the Implementation of Drug Priority Review System Based on the Perspective of Registered Applicants.....LU C K, WANG Y S, JIANG R, SHAO R*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.015

- 456 医药工业的计算机化过程中遗留系统的验证策略.....赵晨阳, 朱建伟*
Validation Strategy for Legacy Systems in Computerization of Pharmaceutical Industry.....ZHAO C Y, ZHU J W*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.016

- 464 GMP 背景下的制药企业六西格玛管理应用研究: 以BT 公司为例.....李东昂, 梁 毅*
Application of Six Sigma Management in Pharmaceutical Enterprises Based on GMP: A Case from BT Company.....LID A, LIANG Y*
DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.017

· 其他 ·

广告索引(402)

《中国医药工业杂志》征订(470)

制剂技术文摘 P50-4~6(391) P50-7~8(463) P50-9(469)

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4期 4月10日出版

版权所有



Monthly (Founded in 1970)

Vol.50 No.4 April 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 |
| 编 辑 出 版 | 《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 | 021-62474272 | Tel | 021-62474272 |
| 传 真 | 021-62473200 | Fax | 021-62473200 |
| 电 子 邮 件 | taoxh@pharmadl.com ouyy@pharmadl.com | E-mail | taoxh@pharmadl.com 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*112*zh*P*20.00* *17*2019-04

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

制药企业生产环境中污染葡萄球菌菌种鉴定方法的比较评价 及毒素基因调查分析

李琼琼, 宋明辉, 秦 峰, 刘 浩, 杨美成*

(上海市食品药品检验所, 上海 201203)

摘要: 比较评价 16S rRNA 序列比对、VITEK 2 Compact 微生物鉴定系统和 RiboPrinter 鉴定系统对制药企业生产环境中分离的 92 株葡萄球菌菌种鉴定的准确性, 研究 12 种毒素编码基因在制药企业生产环境污染葡萄球菌中的分布规律。结果表明 92 株葡萄球菌均为凝固酶阴性菌, 可分为 8 个葡萄球菌菌种, 其中表皮葡萄球菌污染率最高 (27.2%)。16S rRNA 序列比对分析不能有效区分头状葡萄球菌和山羊葡萄球菌, RiboPrinter 鉴定系统易把假中间葡萄球菌错误鉴定为中间葡萄球菌, 而 VITEK 2 Compact 鉴定系统对头状葡萄球菌、人葡萄球菌、巴氏葡萄球菌和科氏葡萄球菌中的部分菌株存在不能有效鉴定或鉴定错误。在 92 株凝固酶阴性菌中共检出 7 种毒素基因 (*pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *egc* 和 *eta*), 其中杀白细胞毒素基因 *pvl* 的检出率最高 (8.70%), 其次为肠毒素基因 *sec* (6.52%)。综上所述, 16S rRNA 序列比对分析和 RiboPrinter 鉴定系统对不同种葡萄球菌的鉴定准确性优于 VITEK 2 Compact 鉴定系统。制药企业生产环境中污染的凝固酶阴性葡萄球菌具有一定潜在致病性, 今后在药品微生物检验与生产过程中应加强对凝固酶阴性葡萄球菌的监控。

关键词: 制药企业; 微生物污染; 葡萄球菌; 菌种鉴定; 毒素基因

中图分类号: Q93 文献标志码: A 文章编号: 1001-8255(2019)04-0416-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2019.04.009

Species Identification Analysis by Different Methods and Toxin Genes Detection of *Staphylococcus* Strains Isolated from Drug Manufacturing Enterprises

LI Qiongqiong, SONG Minghui, QIN Feng, LIU Hao, YANG Meicheng*

(Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203)

ABSTRACT: The species identification accuracy of 16S rRNA sequence alignment, VITEK 2 Compact microbial identification system and RiboPrinter bacterial identification system in 92 *Staphylococcus* strains isolated from production environment of drug manufacturing enterprises were compared and evaluated. The distribution of 12 toxin genes in 92 *Staphylococcus* strains was also investigated. It revealed that all the 92 *Staphylococcus* strains were coagulase-negative bacteria, and could be divided into 8 *Staphylococcus* species. Among the 8 species, *S. epidermidis* had the highest isolation rate (27.2%). The 16S rRNA sequence alignment analysis could not distinguish *S. capitis* and *S. caprae*. The RiboPrinter bacterial identification system misidentified all *S. pseudintermedius* strains as *S. intermedius*. The VITEK 2 Compact microbial identification system displayed false or invalid identification results of some strains including *S. capitis*, *S. hominis*, *S. pasteuri*, and *S. cohnii*. 7 toxin genes (*pvl*, *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *egc* and *eta*) were detected in the 92 coagulase-negative strains, in which the leukotoxin gene *pvl* had the highest detection rate (8.70%), followed by enterotoxin gene *sec* (6.52%). In summary, 16S rRNA sequence alignment analysis and RiboPrinter bacterial identification system are superior to the VITEK 2 Compact microbial identification system for the identification of different *Staphylococci* species. Contaminated coagulase-negative *Staphylococci* in the production environment of drug manufacturing enterprises have a certain potential pathogenicity, so the monitoring of coagulase-negative *Staphylococci* should be strengthened in the future.

Key Words: drug manufacturing enterprises; microbial contamination; *Staphylococcus*; species identification; toxin genes

微生物污染是制药企业生产过程控制及药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^[1]。2015~2017年美国FDA公布的药品召回事件中，由微生物污染风险引起的召回事件占到了49%以上^[2]。因此加强药品生产过程微生物监管和风险控制是保障药品质量、降低用药风险的重要途径^[3]。研究表明，葡萄球菌(*Staphylococcus*)特别是凝固酶阴性葡萄球菌是污染药品生产环境的主要微生物，占全部污染微生物的50%以上^[4~5]。研究表明，凝固酶阴性葡萄球菌也极易造成临床感染，且容易获得和传递耐药性^[6~7]，给治疗临幊上相关感染带来极大的困难。因此，在药品生产的微生物质量控制中，实现凝固酶阴性葡萄球菌“种”水平的准确鉴定，对控制药品质量以及保障消费者用药安全具有重要意义。

随着分子生物学技术的快速发展，微生物鉴定技术也得到飞速发展。目前细菌鉴定方法主要分为表型鉴定技术和基因型鉴定技术。基因型鉴定技术相对于表型鉴定技术更稳定可靠，是细菌鉴定技术发展的主要趋势。基因型鉴定技术如16S rRNA序列比对方法和RiboPrinter微生物基因指纹鉴定系统，可以鉴定多数细菌，已得到广泛应用^[8~9]。但有研究表明，16S rRNA序列比对方法和RiboPrinter微生物鉴定系统，对一些近缘菌种有一定的鉴定局限性^[10~11]。此外，近年开发的微生物生化鉴定系统如VITEK 2 Compact，使细菌鉴定过程更加趋向自动化。生化鉴定方法对常见微生物鉴定结果尚可，但对环境污染往往不能有效鉴定或鉴定结果报告为低分辨率^[12]。越来越多的实验数据表明，采用单一细菌鉴定方法往往存在鉴定准确率不足或鉴定菌种范围有限的问题，而将多种细菌鉴定方法及相

关信息整合在一起，可以有效保障检验结果的准确性^[13]。

本研究选择目前主流的细菌鉴定方法16S rRNA序列比对方法、RiboPrinter微生物基因指纹鉴定系统和商品化的VITEK 2 Compact微生物生化鉴定系统，比较3种细菌鉴定方法，评价其对制药企业生产环境中污染葡萄球菌菌种鉴定的准确性，为政府和制药企业建立可靠的葡萄球菌多相分类鉴定方法提供参考。同时，研究12种重要毒素基因在制药企业生产环境污染葡萄球菌分离株中的分布情况，为药品监管和制药企业完善微生物监控体系提供依据。

1 仪器与试药

VITEK 2 Compact型全自动微生物生化鉴定仪及配套革兰阳性细菌鉴定卡（法国Biomerieux公司）；RiboPrinter型全自动微生物基因指纹鉴定系统及配套EcoRI试剂套装（美国DuPont公司）；ABI 9700型PCR扩增仪（美国ABI公司）；琼脂糖凝胶电泳仪及成像系统（美国Bio-Rad公司）；MIR-254型培养箱（日本SANYO公司）；LABGARD型生物安全柜（美国Nuaire公司）。

胰酪胨大豆琼脂平板（TSA，法国Biomerieux公司）；细菌基因组DNA小量纯化试剂盒和Premix TaqTM DNA聚合酶试剂盒（TAKARA，宝生物工程有限公司）；0.45%的无菌盐水（广东环凯生物科技有限公司）。

92株葡萄球菌均系2014~2016年从上海地区制药企业以自主监控方式收集的生产环境污染微生物。本实验室参照中国药典2015年版“9204微生物鉴定指导原则”获取生产环境污染微生物单克隆菌落，分别采用16S rRNA序列比对、VITEK 2 Compact微生物鉴定系统、RiboPrinter微生物基因指纹鉴定系统和血浆凝固酶试验综合分析判断菌株菌种信息。92株葡萄球菌的菌种鉴定结果如表1所示，均为凝固酶阴性菌，包含8个葡萄球菌菌种，其中表皮葡萄球菌分离率最高（27.2%），其次为科氏葡萄球菌（19.6%）和溶血葡萄球菌（16.3%）。

2 方法与结果

2.1 16S rRNA序列比对微生物鉴定与分型

采用细菌基因组纯化试剂盒提取92株葡萄球菌基因组。利用通用引物27F和1492R扩增16S

收稿日期：2018-11-28

作者简介：李琼琼（1986—），女，硕士，主管药师，从事食品药品质量控制及微生物快速检测。

Tel：13816792669

E-mail：lqq1986228@126.com

通信联系人：杨美成（1972—），女，博士，主任药师，从事食品药品微生物检验与实验室质量管理。

Tel：021-50610592

E-mail：yangmeicheng@vip.sina.com

表 1 制药企业生产环境中主要污染葡萄球菌的菌种分布比例

Tab.1 Species Distribution of *Staphylococcus* Strains Isolated from Drug Manufacturing Enterprises

| 菌种 | 菌株数量 | 百分比/% |
|--|------|-------|
| 表皮葡萄球菌 (<i>S. epidermidis</i>) | 25 | 27.2 |
| 头状葡萄球菌 (<i>S. capitis</i>) | 10 | 10.9 |
| 溶血葡萄球菌 (<i>S. haemolyticus</i>) | 15 | 16.3 |
| 科氏葡萄球菌 (<i>S. cohnii</i>) | 18 | 19.5 |
| 人葡萄球菌 (<i>S. hominis</i>) | 12 | 13.0 |
| 沃氏葡萄球菌 (<i>S. warneri</i>) | 8 | 8.7 |
| 巴氏葡萄球菌 (<i>S. pasteuri</i>) | 2 | 2.2 |
| 假中间葡萄球菌 (<i>S. pseudintermedius</i>) | 2 | 2.2 |

rRNA 基因核酸序列，委托上海生物工程有限公司进行双向测序。使用软件 Lasergene 7.0 进行核酸序列的校正和拼接，然后进行 NCBI Blast 比对分析，依据比对结果对 92 株葡萄球菌菌种进行判定^[14]。结果如表 2 所示，头状葡萄球菌和山羊葡萄球菌的 16S rRNA 核酸序列同源性为 100%，因此，基于 16S rRNA 序列比对无法有效区分头状葡萄球菌和山羊葡萄球菌。其余不同菌种葡萄球菌的 16S rRNA 序列具有明显差异，可通过 16S rRNA 基因序列比对分析进行有效的菌种鉴定。

2.2 VITEK 2 Compact 微生物鉴定与分型

挑取待测菌株单克隆菌落划线接种于 TSA 平板，37 °C 过夜培养后，利用 0.45% 的无菌盐水制备浓度合适的菌悬液（比浊度 0.8 ~ 1.0）。选取革兰阳性细菌鉴定卡，按照 VITEK 2 Compact 微生物鉴

定系统（简称 VITEK）操作要求进行试验。鉴定结果如表 2 所示，其中 VITEK 可准确鉴定表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和假中间葡萄球菌 4 种葡萄球菌；对另外 4 种葡萄球菌则存在鉴定不准确的问题，如 3 株头状葡萄球菌被错误鉴定为山羊葡萄球菌，2 株人葡萄球菌被错误鉴定为表皮葡萄球菌，2 株巴氏葡萄球菌被错误鉴定为沃氏葡萄球菌；此外 4 株科氏葡萄球菌通过 VITEK 无法明确其菌种鉴定信息。

2.3 RiboPrinter 微生物鉴定与分型

采用 RiboPrinter 基因指纹鉴定系统，对 92 株葡萄球菌进行菌种鉴定和分型。限制性内切酶选用 *EcoR* I，参照仪器标准化操作规程进行试验，获得待测菌株 RiboPrinter 基因指纹图谱后，与 Dupont ID 数据库进行比对，进而获得待测菌株的鉴定信息。RiboPrinter 基因指纹系统的菌种鉴定结果如表 2 所示，除 2 株假中间葡萄球菌被错误的鉴定为中间葡萄球菌外，其余 7 种葡萄球菌通过 RiboPrinter 系统都能获得准确的鉴定结果。导出 92 株葡萄球菌的 RiboPrinter 基因指纹图谱信息，采用 BioNumerics 软件进行聚类分析。结果如图 1 所示，除 1 株沃氏葡萄球菌外，其他属于同一菌种的菌株都能聚在一起。进一步分析 RiboPrinter 细菌鉴定系统对不同葡萄球菌的分型能力，结果如表 3 所示，92 株葡萄球菌可分为 41 个核糖体型，其中 25 株表

表 2 16S rRNA 序列比对、VITEK 2 生化鉴定和 RiboPrinter 基因指纹图谱鉴定结果的比较

Tab.2 Comparisons of 16S rRNA Sequence Alignment, VITEK 2 Compact System and RiboPrinter System on Species Identification Results

| 菌种(n) | 16S rRNA 序列比对 | | VITEK 2 生化鉴定 | | RiboPrinter 指纹图谱鉴定 | |
|------------|---------------|-------|------------------------|------|--------------------|-------|
| | 鉴定结果(n) | 准确率/% | 鉴定结果(n) | 准确率 | 鉴定结果(n) | 准确率/% |
| 表皮葡萄球菌(25) | 表皮葡萄球菌(25) | 100 | 表皮葡萄球菌(25) | 100 | 表皮葡萄球菌(25) | 100 |
| 头状葡萄球菌(10) | 头状或山羊葡萄球菌(10) | 0 | 头状葡萄球菌(7) 山羊葡萄球菌(3) | 70 | 头状葡萄球菌(10) | 100 |
| 溶血葡萄球菌(15) | 溶血葡萄球菌(15) | 100 | 溶血葡萄球菌(15) | 100 | 溶血葡萄球菌(15) | 100 |
| 科氏葡萄球菌(18) | 科氏葡萄球菌(18) | 100 | 科氏葡萄球菌(14) 未鉴定(4) | 77.8 | 科氏葡萄球菌(18) | 100 |
| 人葡萄球菌(12) | 人葡萄球菌(12) | 100 | 人葡萄球菌(10) 表皮葡萄球菌(2) | 83.3 | 人葡萄球菌(12) | 100 |
| 沃氏葡萄球菌(8) | 沃氏葡萄球菌(8) | 100 | 沃氏葡萄球菌(8) | 100 | 沃氏葡萄球菌(8) | 100 |
| 巴氏葡萄球菌(2) | 巴氏葡萄球菌(2) | 100 | 沃氏葡萄球菌(2) | 0 | 巴氏葡萄球菌(2) | 100 |
| 假中间葡萄球菌(2) | 假中间葡萄球菌(2) | 100 | 假中间葡萄球菌(2) | 100 | 中间葡萄球菌(2) | 0 |

注：n 指该项下葡萄球菌所对应的菌株数目

皮葡萄球菌可分为 13 个核糖体型，15 株溶血葡萄球菌可分为 9 个核糖体型，8 株沃氏葡萄球菌可分

为 5 个核糖体型，表明采用 RiboPrinter 基因指纹鉴定系统可对不同葡萄球菌菌株进行有效分型。

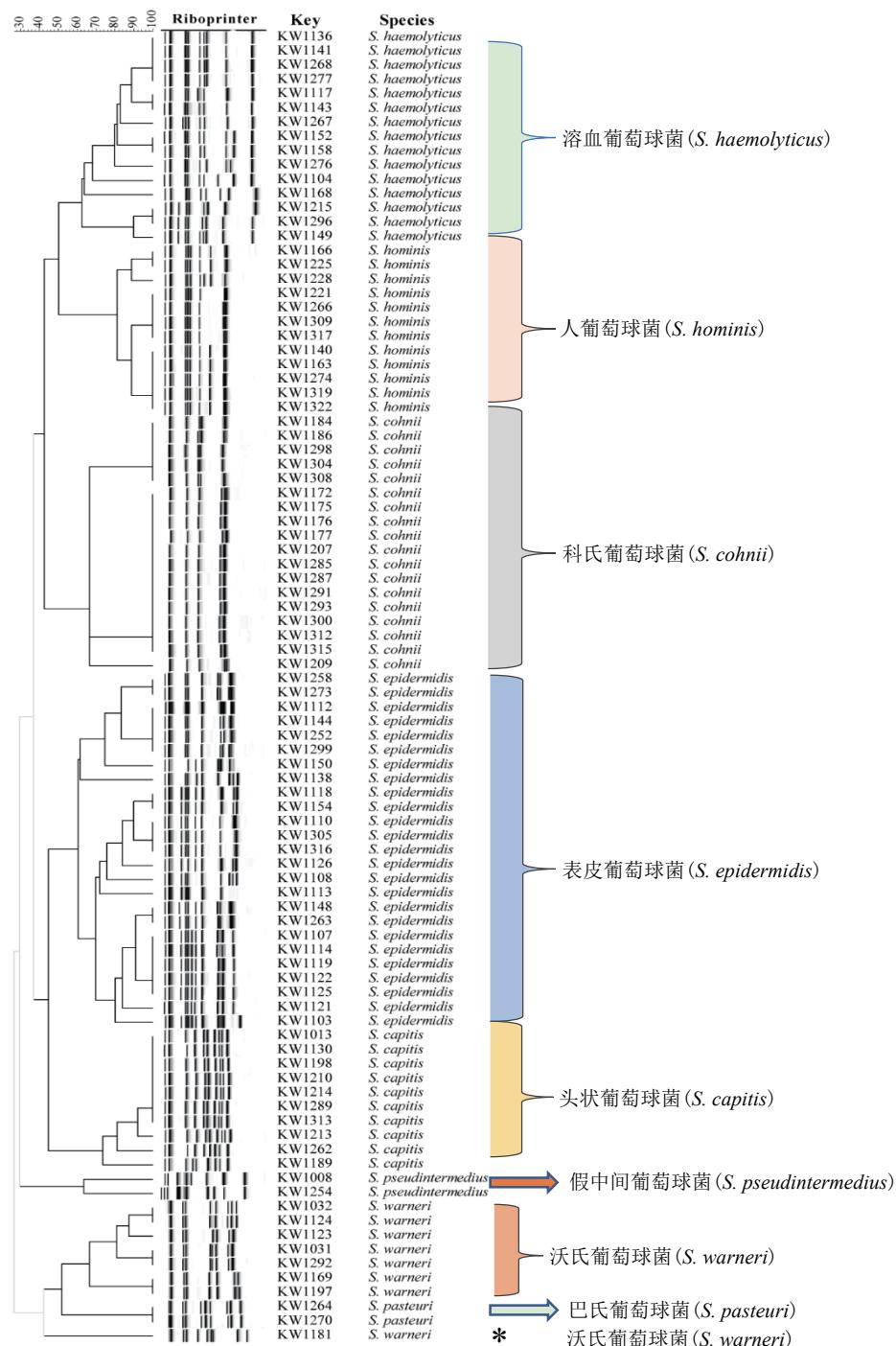


图 1 RiboPrinter 基因指纹特征图谱聚类分析结果

Fig.1 Cluster Analysis Results of RiboPrinter System

表3 RiboPrinter 基因指纹图谱分型结果
Tab.3 Genotyping Results of RiboPrinter System

| 菌种 | 菌株数 | 核糖体型 |
|---------|-----|------|
| 表皮葡萄球菌 | 25 | 13 |
| 头状葡萄球菌 | 10 | 4 |
| 溶血葡萄球菌 | 15 | 9 |
| 科氏葡萄球菌 | 18 | 3 |
| 人葡萄球菌 | 12 | 4 |
| 沃氏葡萄球菌 | 8 | 5 |
| 巴氏葡萄球菌 | 2 | 1 |
| 假中间葡萄球菌 | 2 | 2 |
| 全部 | 92 | 41 |

2.4 葡萄球菌常见毒素基因的检测

利用特异 PCR 方法检测 12 种常见毒素编码基因在制药企业生产环境中分离的凝固酶阴性葡萄球菌菌株中的分布情况。12 种毒素编码基因包括 7 种肠毒素基因 (*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*see*、*seh* 和 *egc*)、3 种表皮剥脱毒素基因 (*eta*、*etb* 和 *etd*)、毒素休克综合征毒素基因 (*tsst-1*) 和杀白细胞毒素编码基因 (*pvl*)。毒素基因检测结果中, 7 种毒素基因 (*pvl*、*sea*、*seb*、*sec*、*sed*、*egc* 和 *eta*) 在 92 株葡萄球菌中检出阳性菌株, 其中杀白细胞毒素基因 *pvl* 的检出率最高 (8.70%), 其次为肠毒素基因 *sec* (6.52%)、肠毒素基因 *sea* (3.26%) 和 *seb* (3.26%)、肠毒素基因 *sed* (2.17%)、肠毒素基因 *egc* (1.09%) 和表皮剥脱毒素基因 *eta* (1.09%)。92 株葡萄球菌中共检出 17 株毒素基因阳性菌, 在 8 种葡萄球菌中均有分布, 其中表皮葡萄球菌 (5 株) 和溶血葡萄球菌 (4 株) 中携带的毒素基因阳性菌株最多。17 株毒素基因阳性葡萄球菌中共有 8 种毒素基因型 (表 4), 其中 1 株溶血葡萄球菌 (*sea*、*seb*、*sed* 和 *pvl*) 和 1 株表皮葡萄球菌 (*sea*、*sed*、

egc 和 *pvl*) 分别携带 4 个毒素基因。

3 讨论

中国药典 2020 年版编制纲要突出强调了药品生产全过程中微生物控制的重要性, 实现药品生产过程中污染微生物的准确鉴定是药品质量控制的重要组成部分。本研究以上海地区制药企业主要环境污染微生物葡萄球菌为对象, 通过多种细菌鉴定方法的比较评价, 以期建立制药企业环境污染葡萄球菌的多相分类鉴定方法。

越来越多的研究结果证明细菌基因型鉴定方法比生化鉴定方法更加稳定可靠, 已逐渐成为细菌鉴定的主要技术手段^[15]。本研究结果表明基于基因型鉴定的 16S rRNA 基因序列比对和 RiboPrinter 基因指纹鉴定系统对不同葡萄球菌菌种的鉴定准确性明显优于基于生化分析的 VITEK 2 Compact 微生物鉴定方法。16S rRNA 基因序列比对可将除头状葡萄球菌和山羊葡萄球菌外的其他葡萄球菌准确鉴定到“种”。RiboPrinter 基因指纹鉴定系统也可对除假中间葡萄球菌外的其他葡萄球菌给出准确到“种”的鉴定结果, 同时对同一菌种的菌株也显示出了较强的分型能力, 可用于制药企业污染葡萄球菌的鉴定及溯源调查分析。而 VITEK 2 Compact 细菌鉴定系统, 对多达 4 种葡萄球菌 (头状葡萄球菌、人葡萄球菌、巴氏葡萄球菌和科氏葡萄球菌) 的部分菌株存在不能有效鉴定或鉴定错误的结果。

研究表明制药企业生产环境中污染微生物大部分都是由人员带入, 药品生产环境中污染的葡萄球菌以人源性凝固酶阴性葡萄球菌为主, 如表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌和人葡萄球菌等^[16]。因此

表4 17 株毒素基因阳性葡萄球菌分离株的毒素基因型
Tab.4 Toxin Genotypes of 17 Toxin Gene-positive *Staphylococcus* Strains

| 毒素基因型 | 阳性菌株 (n) |
|---|---|
| <i>sea</i> 、 <i>seb</i> 、 <i>sed</i> 和 <i>pvl</i> | 溶血葡萄球菌 (1) |
| <i>sea</i> 、 <i>sed</i> 、 <i>egc</i> 和 <i>pvl</i> | 表皮葡萄球菌 (1) |
| <i>seb</i> 和 <i>pvl</i> | 溶血葡萄球菌 (1) |
| <i>sea</i> | 表皮葡萄球菌 (1) |
| <i>seb</i> | 人葡萄球菌 (1) |
| <i>sec</i> | 溶血葡萄球菌 (1)、表皮葡萄球菌 (2)、假中间葡萄球菌 (1)、沃氏葡萄球菌 (1) 和 头状葡萄球菌 (1) |
| <i>pvl</i> | 溶血葡萄球菌 (1)、表皮葡萄球菌 (1)、人葡萄球菌 (2) 和 巴氏葡萄球菌 (1) |
| <i>eta</i> | 科氏葡萄球菌 (1) |

药品生产企业应加强生产人员的无菌操作意识，加强生产环境消毒，从源头杜绝微生物污染。本研究毒素基因调查结果显示，7种毒素基因在凝固酶阴性葡萄球菌中均有分布，其中与人体皮肤软组织化脓感染相关的杀白细胞毒素编码基因 *pvl* 的检出率最高，多种能够导致肠炎的肠毒素编码基因 (*sea*、*seb*、*sec*、*sed* 和 *egc*) 也在凝固酶阴性菌株中有所检出^[17-18]，表明药品企业生产环境中污染的凝固酶阴性葡萄球菌具有一定的潜在致病性。此外，毒素基因多样性分析结果显示，表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌中的毒素基因阳性菌株明显多于其他葡萄球菌，且存在同时携带多种毒素基因的菌株，表明表皮葡萄球菌和溶血葡萄球菌的潜在致病性强于其他凝固酶阴性葡萄球菌。

综上所述，任何单一细菌鉴定方法都不能实现所有葡萄球菌的准确鉴定，多种细菌鉴定方法相结合更能获得准确可靠的结果，保证检验结果的准确性。毒素基因调查结果表明制药企业环境污染凝固酶阴性葡萄球菌具有一定潜在的致病性，未来应加强对药品生产环境中污染凝固酶阴性葡萄球菌的监控。

参考文献：

- [1] EISSA M E. Quantitative microbial risk assessment of pharmaceutical products [J]. *PDA J Pharm Sci Tech*, 2017, **71**(3): 245-251.
- [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] 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.
- [4] 郑小玲, 王征南, 王知坚, 等. 药品微生物检测实验室环境菌库的建立 [J]. 中国现代应用药学, 2015, **32**(7): 847-850.
- [5] 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.
- [6] ASAAD A M, ANSAR Q M, MUJEEB H S. Clinical significance of coagulase-negative staphylococci isolates from nosocomial bloodstream infections [J]. *Infect Dis*, 2016, **48**(5): 356-360.
- [7] 王锦萍, 蔡常辉, 梁连辉, 等. 肺结核并发肺部感染凝固酶阴性葡萄球菌的耐药性及耐药基因 *mecA* 分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2018, **39**(5): 623-625.
- [8] 朱诗应, 戚中田. 16S rDNA 扩增及测序在细菌鉴定与分类中的应用 [J]. 微生物与感染, 2013, **8**(2): 104-109.
- [9] 杨燕, 冯震, 鲍英, 等. 全自动基因指纹分析仪 Riboprinter 在药品中大肠埃希菌的鉴定分析中的应用 (英文) [J]. 中国抗生素杂志, 2013, **38**(7): 536-539.
- [10] 叶乃芳, 王中新. 16S rRNA 及相关技术用于临床细菌鉴定的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2015, **36**(4): 520-522.
- [11] 刘继超, 姜铁民, 姜阿赤, 等. 应用全自动核糖体 RNA 基因指纹技术快速鉴定细菌菌种 [J]. 食品工业科技, 2013, **34**(13): 170-172.
- [12] 杨晶, 王伟欢. VITEK 2 Compact 系统的应用及鉴定结果分析 [J]. 中国卫生检验杂志, 2016, **26**(18): 2643-2645.
- [13] VANDAMME P, POT B, GILLIS M, et al. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics [J]. *Microbiol Rev*, 1996, **60**(2): 407-438.
- [14] KIM M, OH H S, PARK S C, et al. Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes [J]. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2014, **64**(2): 346-351.
- [15] HEIKENS E, FLEER A, PAAUW A, et al. Comparison of genotypic and phenotypic methods for species-level identification of clinical isolates of coagulase-negative staphylococci [J]. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**(5): 2286-2290.
- [16] 陈西勇, 于淑渤, 梁宏. 无菌药品生产发生微生物污染的因素分析 (上) [J]. 首都食品与医药, 2009, **16**(6): 23-25.
- [17] 冯言言, 田伟. 金黄色葡萄球菌杀白细胞毒素的研究 [J]. 农家之友, 2010, **10**: 122-123.
- [18] 李琼琼, 范一灵, 宋明辉, 等. 食源性金黄色葡萄球菌肠毒素及其检测方法 [J]. 食品安全质量检测学报, 2016, **7**(2): 555-560.