related substances by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(10): 1104-1107.
[5] SATÍNSKÝ D, HUCLOVÁ J, FERREIRA R L, et al. Determination of ambroxol hydrochloride methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column [J]. J Pharm Biomed Anal, 2006, 40(2): 287-293.
[6] HEINÄNEN M, BARBAS C. Validation of an HPLC method for the quantification of ambroxol hydrochloride and benzoic acid in a syrup as pharmaceutical form stress test for stability evaluation [J]. J Pharm Biomed Anal, 2001, 24(5/6): 1005-1010.
[7] LAN J P, NING L F, ZHANG Y W, et al. Determination of benzoic acid in drugs of oral liquid by HPLC [J]. Chin J Health Lab Tech(中国卫生检验杂志), 2009, 19(1): 4-6.
[8] ZHANG Y J, GU D Z, TIAN S J. HPLC determination of content of ambroxol hydrochloride in oral solution of losolven [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2004, 24(6): 629-631.
[9] LI X A, WU S P, LIU H J, et al. Determination of sodium benzoatein ambroxol hydrochloride oral solution [J]. Anhui Med Pharm J(安徽医药), 2011, 15(1): 40-42.
[10] ZENG J P, YAN H, WANG C G, et al. Dertermine the content of impurity 4-isobutylbenzoic acid in ibuprofen with the correction factor [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2012, 29(3): 254-257.

收稿日期：2014-12-15

药品微生物检测实验室环境菌库的建立

郑小玲，王征南，王知坚，李珏(浙江省食品药品检验研究院，杭州 310004)

摘要：目的 建立药品微生物检测实验室环境菌库。**方法** 从药品微生物检测实验室环境中不同部位、设备材料及活动人员进行连续 7 个月采样收集获得 248 株细菌和 6 株霉菌，对收集的细菌采用全自动微生物生化鉴定仪(Vitek2 Compact)进行鉴定，对生化鉴定无确切结果的 90 株细菌及 6 株霉菌均采用 3500 MicroSeq 基因测序分析系统进行细菌 16S rDNA 和霉菌 LSU rDNA 测序鉴定，同时也对某次采样收集的 6 株金黄色葡萄球菌采用 Diversilab 系统进行同源性分析。**结果** 通过整理和分析收集获得的 254 株菌的鉴定结果，初步建立了药品微生物检测实验室环境菌库。**结论** 为今后开展污染水平的风险评估和不良事件调查提供技术平台，同时也为制药企业开展建立环境微生物信息库和微生物污染溯源提供技术指导。

关键词：环境菌库；溯源分析；微生物污染
中图分类号：R963　　**文献标志码：**B　　**文章编号：**1007-7693(2015)07-0847-04
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.019

Establishment of the Environmentally Microbial Library in the Drug Sterility Testing Laboratory

ZHENG Xiaoling, WANG Zhengnan, WANG Zhijian, LI Jue(*Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the environmental bacteria library of pharmaceutical microbial testing laboratory. **METHODS** 248 strains of bacteria and 6 strains of fungi were collected from the pharmaceutical microbiology testing laboratory from different parts, equipments and materials and the activities of personnel through 7 months working, and those bacteria were identified by biochemical identification method with Vitek2 Compact. Those 90 strains of bacteria without exact results of biochemical identification and 6 strains of fungi were identified by 3500 MicroSeq Gene Sequencing Analysis System for bacterial 16S rDNA and fungal LSU rDNA sequencing, and 6 strains of *Staphylococcus aureus* of a sampling collection were analyzed of homology with Diversilab system. **RESULTS** The environmental bacteria library was initially established by sorting and analyzing of the identification results of the collected 254 strains of microorganisms. **CONCLUSION** A technology platform is provided to evaluate the risk of pollution and to investigate the adverse events in the future. Technical guidance is also provided to the pharmaceutical companies which are establishing the data base of environmental microorganisms and tracing of microbial contamination.

KEY WORDS: environmental bacteria library; characterization analysis; microbial contamination

作者简介：郑小玲，女，硕士生，主管药师　Tel: (0571)86459427　E-mail: 88920169@qq.com

微生物污染是药品质量评估的重要指标[1-2]，目前各国药典收录的药品无菌检查和微生物限度检查方法只对药品终产品质量进行评价，且对无菌检查不合格的药品要求不得进行复验。药品微生物检测实验室如缺少对实验环境的监督和控制，则无法评估微生物阳性结果的污染来源。而药品检测过程中的微生物阳性结果可能源于实验过程中环境的污染，因此判断检出菌与环境菌的相关性，是排除实验过程污染、减少假阳性结果、提高检验结果准确性的必不可少的环节[3]。同时现阶段药品安全管理仍存在监管漏洞，当药品受到致病微生物污染时，往往出现定溯源难、应变慢等问题。若建立微生物检测实验室日常的环境微生物菌库，则可较好地解决上述问题。目前国外通过分子生物学手段对病原微生物建库的研究较多，如 RIDOM website 提供根据 16S DNA 序列的差异建立的病原微生物库[4]。国内对制药环境建立环境微生物菌库相关方面的研究也有报道，如 PEI 等[5]曾采用 FTIR 法构建洁净室环境菌的 FTIR 谱库，但该方法对微生物的培养条件及预处理要求严格，随机误差也较大。目前在药品微生物检测实验室建立环境微生物菌库方面的研究仍较少。

本研究从笔者工作的药品微生物检测实验室环境中不同部位、设备材料及活动人员进行连续 7 个月采样收集微生物，共获得 248 株细菌和 6 株霉菌，对收集的细菌采用全自动微生物生化鉴定仪(Vitek2 Compact)进行鉴定，对生化鉴定无确切结果的 90 株细菌及 6 株霉菌均采用 3500 MicroSeq 基因测序分析系统进行细菌 16S rDNA 和霉菌 LSU rDNA 测序鉴定，并对某次采样收集获得的 6 株金黄色葡萄球菌采用 Diversilab 进行同源性分析。通过对鉴定结果的整理和分析，初步建立了药品微生物检测实验室环境微生物库，为今后本实验室微生物检测结果污染溯源调查提供了信息保障，同时也为制药企业开展建立环境微生物信息库和微生物污染溯源提供了技术指导。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

光学显微镜(日本奥林巴斯)；VITEK 2 Compact 全自动微生物生化仪、全自动革兰氏染色仪、Diversilab 同源性分析系统(法国梅里埃)；梯度 96 孔 Verti PCR 仪(美国 ABI 公司)；Powerpac Basic 电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)；3500 MicroSeq 全自动微生物基因分析鉴定系统(美国 ABI 公司)。

1.2 环境微生物的收集

连续 7 个月对微生物实验室环境中不同部位、活动人员及设备材料采用胰蛋白胨大豆琼脂(广东环凯)平板，分别通过接触碟法(人员身上取样)、浮游菌采样器(环境浮游微生物取样)、空气沉降法(环境沉降微生物取样)及棉签擦拭法(设备和材料表面取样)进行微生物样本采集，分离纯化后共获得 248 株细菌和 6 株霉菌，采用甘油冻存管置 −70 ℃冰箱保存。

1.3 生化鉴定

采用 VITEK 2 Compact 对获得的 248 株细菌的新鲜培养物根据革兰染色镜检结果选取 GN、GP、BCL 不同鉴定试剂卡进行生化鉴定。

1.4 细菌 16S rDNA 及霉菌 LSU rDNA 测序鉴定

对 VITEK 鉴定无确切鉴定结果的 90 株细菌及 6 株霉菌分别采用 3500 MicroSeq 全自动微生物基因分析鉴定系统进行细菌 16S rDNA 和霉菌 LSU rDNA 测序鉴定。采用 3500 MicroSeq 系统配套试剂对 90 株细菌和 6 株霉菌的 TSA 平板培养物分别进行 DNA 抽提、PCR 扩增和纯化、标记反应及标记反应纯化，最后进行毛细管电泳测序。

1.5 6 株金黄色葡萄球菌的 Diversilab 同源性分析

某次采样收集到 6 株菌，采用 VITEK 生化鉴定和 16S rDNA 测序鉴定结果均为金黄色葡萄球菌，且在所测 16S rDNA 基因片段中序列完全相同。为进一步获得 6 株菌的分型信息，采用基于重复序列扩增技术的 Diversilab 同源性分析系统进行实验。对 6 株菌分别采用 DiversiLab 仪器配套的金黄色葡萄球菌的 rep-PCR 扩增试剂盒先进行扩增，后吸取 1 μL PCR 产物加入芯片的标本孔，进行电泳分离扩增的 DNA 片段，采用仪器自带软件绘制基因分型同源性关系图。

2 结果

2.1 菌株来源统计

本次建库收集到环境微生物分离菌株共计 254 株，包括 248 株细菌和 6 株霉菌，所有的霉菌均来源于沉降菌收集。大部分菌株均来源于在微生物实验室活动的人员(137 株)，占全部分离菌株的 53.9%。其余环境沉降微生物(30 株)、环境浮游微生物(47 株)及来源于设备和材料表面的微生物(40 株)占全部分离菌株比例相差不大，分别为 11.8%，18.5%和 15.7%。

2.2 环境微生物菌库的建立

结合生化鉴定和测序鉴定结果的 254 株微生物的鉴定结果统计见表 1。其中葡萄球菌属细菌最多，占全部分离菌的 34.3%；其次为芽孢杆菌和微球菌，分别占全部分离菌的 32.7%和 12.6%。

表 1 环境微生物鉴定结果统计

Tab. 1 The results of environmental microbial identification

菌 株	计数	百分比/%
葡萄球菌	87	34.3
芽孢杆菌	83	32.7
微球菌	32	12.6
库克氏菌	9	3.5
链球菌	6	2.4
不动杆菌	5	2.0
假单胞菌	5	2.0
棒状杆菌	3	1.2
霉菌	6	2.4
其他	18	7.1
合计	254	100.0

环境沉降菌和空气浮游菌共收集到 77 株微生物，占污染微生物总数的 30.3%。其中，芽孢杆菌、葡萄球菌和藤黄微球菌均为常见环境菌。从设备材料和操作人员共收集分离表面微生物 177 株，占污染微生物总数的 69.7%。污染微生物比例最高的分别为芽孢杆菌属、藤黄微球菌和表皮葡萄球菌，分别占表面微生物总数的 29.9%、15.8%和 14.1%，结果见表 2。

表 2 环境微生物污染结果统计

Tab. 2 The pollution results of environmental microbial

菌 株	沉降菌和浮游菌		表面微生物	
	计数	百分比/%	计数	百分比/%
芽孢杆菌	30	39.0	53	29.9
表皮葡萄球菌	19	24.7	25	14.1
藤黄微球菌	3	3.9	28	15.8
溶血性葡萄球菌	2	2.6	–	–
人葡萄球菌	–	–	11	6.2
其他	23	29.9	60	33.9
合计	77		177	

采用生化鉴定和测序鉴定 2 种方法对微生物实验室环境中收集到的 254 株菌进行鉴定，通过鉴定结果的整理和分析，初步建立了药品微生物检测实验室环境微生物库。

2.3 6 株金黄色葡萄球菌的同源性分析结果

6 株金黄色葡萄球菌采用 Diversilab 系统进行同源性分析，实验结果显示 6 株金黄色葡萄球菌高度同源，最低菌株间的亲缘关系也达到 99%(亲缘关系>95%，即为同源)，所以 6 株菌应该来自同一个污染源。结果见图 1。

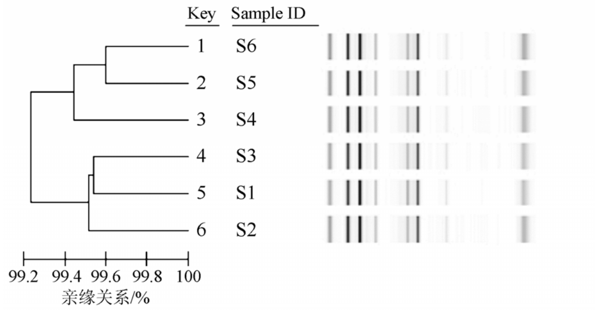

图 1 6 株金黄色葡萄球菌 Diversilab 重复序列基因分型同源性分析图

Fig. 1 The phylogenetic relationship of 6 *Staphylococcus aureus* from Diversilab analysis

3 讨论

从建立的环境微生物库各方面的对比情况分析可知，大部分微生物均来源于微生物实验室中活动的人员。葡萄球菌属和微球菌属细菌为人体易携带污染的微生物，这两类微生物在多个采样点均有发现，所以可能是由于人员活动或表面接触带来的交叉污染，表明操作人员携带的微生物是实验室环境菌的主要来源之一，为了减少污染应严格控制人员的更衣和清洁程序[6]。环境中同样存在着多种芽孢杆菌[7]，在环境中不易被消毒灭菌，可能是由于消毒频次和消毒剂效力问题导致的残留污染，应该增加消毒灭菌频率并有计划地更换消毒剂确保杜绝污染。

本研究通过 7 个月的持续采样收集环境微生物，初步建立了药品微生物检测实验室的环境微生物库，但是环境微生物库的建立是个持续动态的过程，因此需要在日常监测中不断完善。本次建库采用微生物鉴定(生化鉴定和测序鉴定)和分型技术(Diversilab 同源性分析系统)对微生物实验室进行监控，建立和健全了日常监督检查方法，为今后开展污染水平的风险评估和不良事件调查提供技术平台[8]，同时也为高风险药品生产企业建立环境微生物数据库提供技术指导。

REFERENCES

[1] FANG Y L, FANG R. Application of identification and characterization methods for microbial contamination survey in phamlaceutical industIy [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂

志), 2010, 41(11): 810-822.
[2] LI J, WANG Z J, ZHENG X L. Discussion of rationality of pharmaceutical water microbiological testing methods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2014, 31(6): 735-738.
[3] PEI L, HU C Q, MA S H, et al. Correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmental microbes in the clean room for pharmaceuticalmicrobial test investigated by FTIR [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2007, 42(11): 1189-1194.
[4] HARMSEN D, ROTHGANGER J, FROSCH M, et al. RIDOM: ribosomal differentiation of medical micro-organisms database [J]. Nucleic Acids Res, 2002(30): 416-417.
[5] PEI L, HU C Q, MA S H, et al. Correlation of bacteria in the contaminated drug and the environmentalmicrobes in the clean room for pharmaceuticalmicrobial test investigated by FTIR [J]. Acta Pharm Sin(药学学报), 2007, 42(11): 1189-1194.
[6] FANG Y L, FENG Z, ZHONG W, et al. Investigation and analysis of microbiological contamination in core area of sterile drug manufacturing enterprises [J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2014, 28(6): 586-590.
[7] CHI W Z, SONG T, ZHOU F F, et al. Application of microbe technology in the industry of sterile medicine [J]. Chin J Med Guide(中国医药导刊), 2012, 14(1): 169-172.
[8] FANG Y L, JIANG B, FANG R, et al. Identification and characterization of bacterial contaminations isolated from drug sterility test [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2011, 31(6): 1067-1072.

收稿日期：2015-03-10

碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌耐药基因型研究

厉世笑，周鹏，余素飞，彭敏飞，王静(台州医院，浙江 临海 317000)

摘要：目的 研究碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌的耐药情况及产碳青霉烯酶基因型。**方法** 对临床分离到非重复的 36 株耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌，应用改良 Hodge 试验进行产碳青霉烯酶的表型确证，PCR 扩增技术分析产碳青霉烯酶基因型。**结果** 药敏试验显示 36 株碳青霉烯类耐药肠杆菌科细菌具有对第 3，4 代头孢菌素、碳青霉烯类、氟喹诺酮类和酶抑制剂复合制剂等多重耐药。36 株菌株中有 16 株改良 Hodge 试验阳性；PCR 结果 10 株细菌携带 bla_{KPC}，未检出 bla_{IMP}、bla_{VIM}、bla_{GIM}、bla_{SIM}、$bla_{\mathrm{NDM\text{-}1}}$ 基因条带。**结论** 产 KPC 酶是台州医院碳青霉烯类抗菌药物敏感性下降肠杆菌科细菌的主要耐药机制，其中 KPC 是主要基因型。

关键词：肠杆菌科细菌；碳青霉烯酶；耐药基因
中图分类号：R978.1 **文献标志码：**B **文章编号：**1007-7693(2015)07-0850-04
DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.07.020

Analysis of Carbapenemase Genotypes in *Enterobacteriaceae* Species with Reduced Susceptibility to Carbapenems

LI Shixiao, ZHOU Peng, YU Sufei, PENG Minfei, WANG Jing(*Taizhou Hospital of Zhejiang Province, Linhai 317000, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the drug resistance and carbapenemase genetypes of the *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems. **METHODS** Carbapenemases-producing phenotype of 36 strains was analyzed by modified Hodge test, PCR amplification was used to analyze carbapenemase genotypes. **RESULTS** The susceptibility test showed that the 36 clinical isolates were multi-resistant strains, resistant to third-generation and forth-generation of cephalosporin, carbapenems, fluoroquinolones and β-lactamases inhibitor compounds. Modified Hodge test showed that 16 of all strains produced carbapenemase. PCR amplification indicated that 10 strains carried the carbapenemase genetype of bla_{KPC}. Genes of bla_{IMP}, bla_{VIM}, bla_{GIM}, bla_{SIM}, $bla_{\mathrm{NDM\text{-}1}}$ were not detected in all strains. **CONCLUSION** The mainly carbapenem-resistant mechanism of *Enterobacteriaceae* is producing KPC enzyme in Taizhou Hospital. KPC genes are the most popular carbapenemnases coding genes.

KEY WORDS: *Enterobacteriaceae* species; carbapenemases; resistance gene

肠杆菌科细菌是医院感染主要的条件致病菌，可引起肺炎、心内膜炎、皮肤软组织感染、腹腔感染、关节炎、骨髓炎、尿路感染和菌血症等[1]。碳青霉烯类药物，如亚胺培南、美罗培南、

作者简介：厉世笑，女，主管技师 Tel: 15157289076 E-mail: lsx0992@126.com