

药品中金黄色葡萄球菌检验能力验证结果及分析

田喜梅, 潘爽*

(济宁市食品药品检验检测研究院, 济宁 272073)

摘要: 目的 通过能力验证提升药品中金黄色葡萄球菌检验能力, 加强药品微生物检测质量控制, 确保检测结果的准确性和可靠性。**方法** 依据《NIFDC-PT-504 药品中金黄色葡萄球菌检验能力验证作业指导书》和《中华人民共和国药典》2020年版四部进行药品中金黄色葡萄球菌的检验, 并在后续鉴定试验中分别采用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统、金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因(nuc)PCR扩增进行确认。**结果** 样品 A5040147A 检出金黄色葡萄球菌, 而样品 A5040147B 未检出金黄色葡萄球菌, 能力验证结果为满意。**结论** 此次能力验证结果表明本实验室在检测药品中金黄色葡萄球菌时具备药典法和 PCR 法两种能力, 能满足日常对药品中金黄色葡萄球菌的检测需求。

关键词: 金黄色葡萄球菌; 能力验证; 聚合酶链式反应; 耐热核酸酶基因

0 引言

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)广泛分布于自然界及人和动物的皮肤表面, 是一种致病性革兰氏阳性球菌, 也是药品中常见的污染微生物之一^[1-3]。它会分泌多种肠毒素及细胞外酶等毒性物质^[4-5], 这些毒性物质能引起局部及全身化脓性炎症, 严重时可发展成为败血症和脓毒血症, 对人类健康存在重大威胁^[6]。对药品中金黄色葡萄球菌的检测不仅可反映出药品在生产过程中受环境和人员等的污染程度^[7], 也是保障药品质量控制以及人类安全用药的重要方式。

耐热核酸酶是金黄色葡萄球菌中一种性质稳定的蛋白质, 由 nuc 基因编码, 直接影响着金黄色葡萄球菌的毒性和侵袭能力^[8]。同时, 耐热核酸酶也是检测金黄色葡萄球菌污染的主要标志^[9]。本次能力验证依据 NIFDC-PT-504 药品中金黄色葡萄球菌检验能力验证计划作业指导书^[10]和《中华人民共和国药典(2020年版)》四部^[11]进行金黄色葡萄球菌的检验, 同时采用 PCR 法对金黄色葡萄球菌中的耐热核酸酶基因进行检验, 并用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统对分离出的菌株进行检验, 验证了上述两种方法的检验结果, 以证明本实验室具备以上两种方法检验药品中金黄色葡萄球菌的能力, 为今后的药品检测工作提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品

由黑龙江省药品检验研究院提供能力验证样品两份, 每份样品包含 1 瓶菌球和一袋药物颗粒; 其中菌球采用西林瓶包装,

编号分别为: A5040147A 和 A5040147B。药物颗粒, 每袋装量按 10 g 计。

1.1.2 培养基和试剂

胰酪大豆胨液体培养基(批号: 211210)购自北京三药科技开发公司; 胰酪大豆胨琼脂培养基(批号: 20220527)、甘露醇氯化钠琼脂培养基(批号: 20231220)、pH 7.0 无菌氯化钠-蛋白胨缓冲液(批号: 20240408)、革兰氏染色试剂盒(批号: 20231013)购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司; Baird Parker 培养基基础(批号: 220803)、血琼脂平板(批号: 240424)、冻干血浆(批号: 231007)购自北京陆桥技术股份有限公司; 革兰氏阳性细菌鉴定卡(批号: 21342)购自梅里埃公司; 微生物快速裂解液(批号: 9164)、Premix Taq(批号: RR004A)、DL1000 DNA Marker(批号: 3591A)购自宝日医生物技术有限公司; 6×DNA 上样缓冲液(批号: D1010)、5×TBE 缓冲液(批号: T1050)、10000×SafeRed 核酸染料(批号: G5590)购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3 标准菌株

金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*), 菌株编号: [CMCC(B) 26003], 购自中国食品药品检定研究院; 表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*), 菌株编号: [CMCC(B) 26069], 购自济南历城慧捷实验仪器中心。

1.1.4 仪器与设备

BHC-1300IIB 型生物安全柜(金净净化公司), HPX-9162MBE 型电热恒温培养箱(博迅实业公司), Leica DM1000 生物显微镜(徕卡公司), VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统(梅里埃公司), T100 型 PCR 仪(Bio-Rad 公司), GelDoc EZ 凝胶成像分析系统(Bio-Rad 公司)。

第一作者: 田喜梅, 硕士, 主管药师, 研究方向为药品检验与质量控制。

* 通信作者: 潘爽, 博士, 副主任药师, 研究方向为药品微生物质量控制。E-mail: sdpsxzy@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 样品前处理及培养

检测前, 将菌球平衡至室温。在生物安全柜内以无菌操作打开一袋药物颗粒包装, 加至 100 mL pH 7.0 氯化钠-蛋白胍缓冲液中, 混匀, 得到 1:10 供试液。打开编号为 A5040147A 的西林瓶, 将瓶内菌球加至 1:10 供试液中, 溶解混匀后, 取 10 mL, 加至 100 mL 胰酪大豆胍液体培养基中。以同样的方法处理样品 A5040147B, 得到两份增菌液, 将两份增菌液置于 33°C 培养箱中, 静置培养 24 h。

本次实验共设置 2 个对照: 阳性对照为金黄色葡萄球菌 [CMCC(B) 26003], 阴性对照为表皮葡萄球菌 [CMCC(B) 26069]。分别取对照组菌种接种于胰酪大豆胍液体培养基中, 置于 33°C 培养箱中培养 24 h, 与试验组样品同步进行后续实验。

1.2.2 分离培养及纯化

取 1.2.1 中两份增菌培养液和 2 个对照样本划线接种到甘露醇氯化钠琼脂平板上, 置于 33°C 培养箱中培养 24 h。根据培养结果对疑似金黄色葡萄球菌进行进一步鉴别, 将平板上的疑似菌落划线至胰酪大豆胍琼脂平板、Baird Parker 平板和血琼脂平板。

1.2.3 革兰氏染色、镜检

挑取 1.2.2 中胰酪大豆胍琼脂平板上分离菌落进行革兰氏染色和镜检。

1.2.4 血浆凝固酶试验

将 1.2.2 中胰酪大豆胍琼脂平板上的分离菌落接种于胰酪大豆胍液体培养基中, 33°C 培养 24 h, 取其培养物和 2 个对照样本同时进行血浆凝固酶试验。

1.2.5 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统鉴定

为确保结果的准确性, 对分离纯化的菌株, 通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统进行鉴定。取 1.2.2 中胰酪大豆胍琼脂培养基上分离得到的单菌落, 用 0.45% 的无菌盐水制成浊度值为 0.5~0.63 的菌悬液, 选用革兰氏阳性细菌鉴定卡, 按照标准化操作流程, 利用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统进行鉴定。

1.2.6 PCR 鉴定

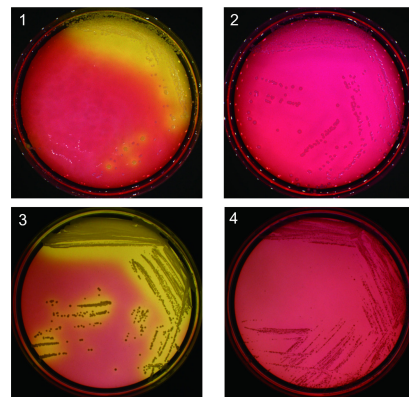
参考郭瑞军^[12]等方法, 采用金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因 *nuc* 设计引物, 以细菌基因组 DNA 为模版, 进行 PCR 扩增。取 50 μ L 微生物快速裂解液于灭菌的 1.5 mL 离心管中, 用接种针挑取 1.2.2 中胰酪大豆胍琼脂平板上的分离菌落于离心管中搅动几下, 将离心管置于 80°C 水浴中热变性 15 分钟后, 低速离心, 取上清液作为 PCR 反应模板。PCR 扩增体系为 25 μ L, 包含 Premix Taq 试剂 12.5 μ L, 10 μ mol/L 上游引物 0.5 μ L, 10 μ mol/L 下游引物 0.5 μ L (上游引物 *nuc*-F-GGATGGCTATCAGTAATGTTTCG, 下游引物 *nuc*-R-ATTTACGCCGTTATCTGTTTGT, 购自苏州金唯智生物科技有限公司), DNA 模板 2 μ L, ddH₂O 补齐至 25 μ L。PCR 反应程序为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 共 35 个循环; 72°C 延伸 5 min。扩增产物使用

1% 琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结束后将凝胶放入凝胶成像仪中拍照观察。

2 结果与分析

2.1 甘露醇氯化钠琼脂平板上的生长结果

典型致病性葡萄球菌(凝固酶阳性)发酵 D-甘露醇产酸而产生黄色带有黄晕的菌落, 非致病性葡萄球菌不发酵 D-甘露醇而形成红色菌落^[13]。各组样品在甘露醇氯化钠琼脂平板上的形态如图 1 所示, 样品 A5040147A 在甘露醇氯化钠琼脂平板上, 菌落呈金黄色, 圆形凸起, 边缘整齐, 光滑湿润, 外周培养基变黄(图 1-1), 与阳性对照菌落形态一致(图 1-3)。样品 A5040147B 在甘露醇氯化钠琼脂平板上, 菌落呈红色, 圆形凸起, 形态较小, 外周培养基不变色(图 1-2), 与阴性对照菌落形态一致(图 1-4)。因此根据药典描述, 对样品 A5040147A 上疑似金黄色葡萄球菌的菌落进行后续分离、纯化及鉴定, 同时也对样品 A5040147B 上的菌落进行进一步鉴定。

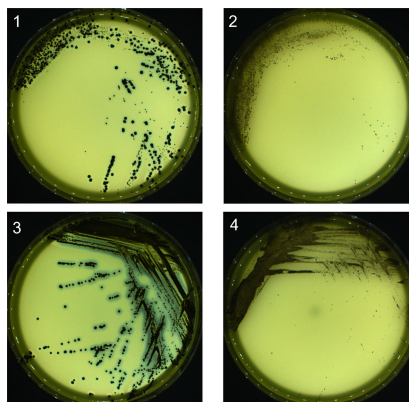


注: 1号为 A5040147A; 2号为 A5040147B; 3号为阳性对照; 4号为阴性对照

图 1 甘露醇氯化钠琼脂平板上的生长结果

2.2 Baird Parker 平板上的生长结果

各组样品在 Baird Parker 平板上的形态如图 2 所示, 样品 A5040147A 菌落较大, 圆形, 光滑, 黑色, 凸起, 周围为一浑浊带, 在其外层有一透明圈(图 2-1), 与阳性对照菌落形态一致(图 2-3)。样品 A5040147B 则为黑色菌落, 形态较小, 生长较慢, 无浑浊带和透明圈(图 2-2), 与阴性对照菌落形态一致(图 2-4)。



注: 1号为 A5040147A; 2号为 A5040147B; 3号为阳性对照; 4号为阴性对照

图 2 Baird Parker 平板上的生长结果

2.3 血琼脂平板上的生长结果

各组样品在血琼脂平板上的形态如图 3, 样品 A5040147A 菌落呈白色, 密集处金黄色, 圆形凸起, 光滑湿润, 菌落周围可见完全透明溶血圈(图 3-1), 其阳性对照菌落较大, 圆形、光滑凸起、金黄色, 菌落周围可见完全透明溶血圈(图 3-3)。样品 A5040147B 则为白色、圆形菌落, 光滑凸起, 无溶血圈(图 3-2), 与阴性对照菌落形态一致(图 3-4)。

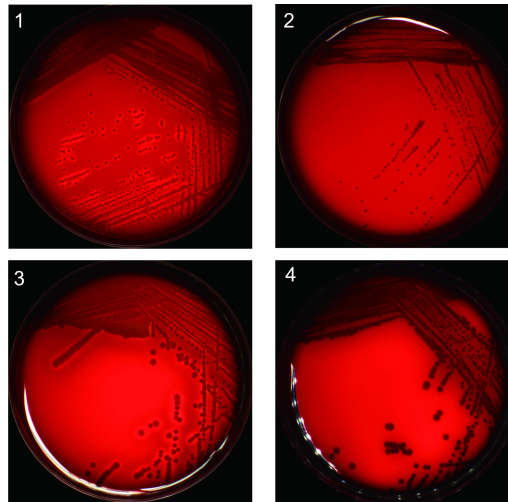
2.4 革兰氏染色和镜检结果

革兰氏染色结果如图 4, 各组样品在 100× 油镜下镜检结

果均呈蓝紫色, 革兰阳性球菌, 排列呈葡萄状, 亦有单个、成双、短链状。

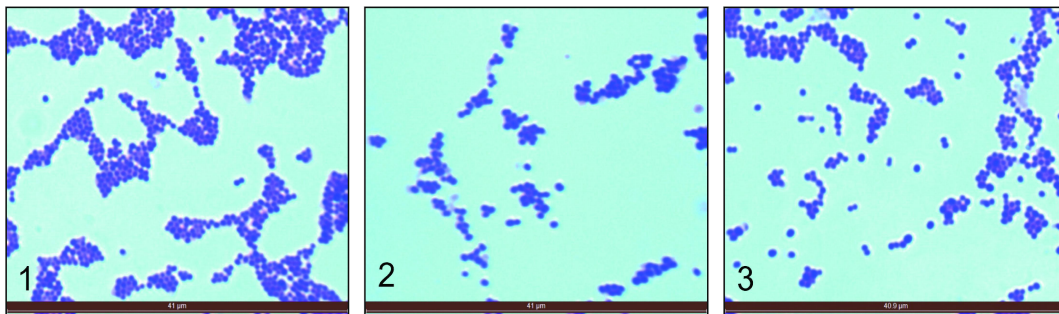
2.5 血浆凝固酶试验

血浆凝固酶试验是确认金黄色葡萄球菌的关键实验, 大多数致病性金黄色葡萄球菌能产生一种血浆凝固酶(游离血浆凝固酶), 能加速人或兔血浆的凝固^[14-15]。各组样品的血浆凝固试验结果如图 5, 样品 A5040147A 能够使血浆呈凝固状(图 5-1), 与阳性对照结果一致(图 5-3)。而样品 A5040147B 中血浆流动自如(图 5-2), 与阴性对照结果一致(图 5-4)。



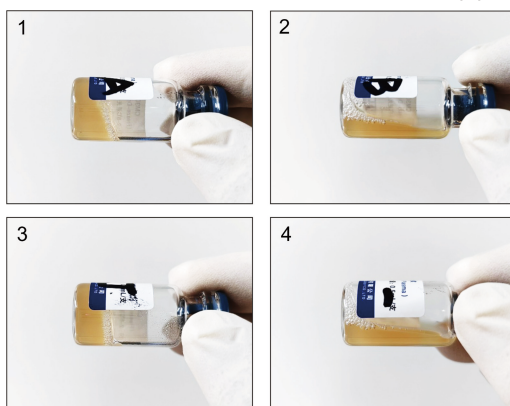
注: 1 号为 A5040147A; 2 号为 A5040147B; 3 号为阳性对照; 4 号为阴性对照

图 3 血琼脂平板上的生长结果



注: 1 号为 A5040147A, 2 号为 A5040147B, 3 号为金黄色葡萄球菌阳性对照(100×, 油镜)

图 4 革兰氏染色和镜检结果



注: 1 号为 A5040147A, 2 号为 A5040147B, 3 号为阳性对照, 4 号为阴性对照

图 5 血浆凝固酶试验结果

根据三种选择性培养基上典型菌落形态、革兰氏染色及血浆凝固酶试验结果, 可判断样品 A5040147A 中检出金黄色葡萄球菌, 而样品 A5040147B 中未检出金黄色葡萄球菌。

2.6 VITEK 2 COMPACT 上机结果

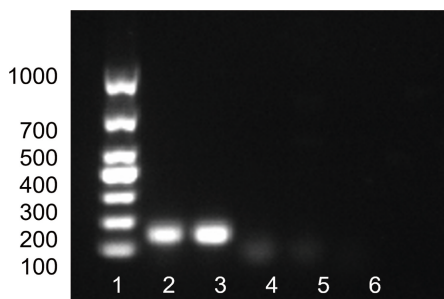
样品 A5040147A 鉴定为金黄色葡萄球菌, 样品 A5040147B 鉴定为表皮葡萄球菌, 均为极好的鉴定, 结果如表 1。

2.7 PCR 鉴定

样品 A5040147A 与阳性对照均在 150 bp 处出现单一清晰条带, 与理论上目的条带大小相符, 可判定样品 A5040147A 检出金黄色葡萄球菌。而样品 A5040147B 与阴性对照一致, 在琼脂糖凝胶电泳结果中无条带, 判定未检出金黄色葡萄球菌, 结果如图 6。

表1 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统结果

样品编号	结果	相似度	置信度
A5040147A	<i>Staphylococcus aureus</i>	99%	极好的鉴定
A5040147B	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	98%	极好的鉴定



注: 1号为DNA marker(bp); 2号为A5040147A; 3号为阳性对照; 4号为A5040147B; 5号为阴性对照; 6号为空白对照

图6 PCR 鉴定结果

VITEK 2 COMPACT 全自动微生物分析系统结果与PCR鉴定结果一致, 均可判断样品A5040147A中检出金黄色葡萄球菌, 而样品A5040147B中未检出金黄色葡萄球菌。与传统分离纯化鉴定结果一致。

3 讨论与结论

《中华人民共和国药典》2020年版非无菌产品微生物限度检查法中在确证是否为金黄色葡萄球菌中, 只规定应进行分离、纯化及适宜的鉴定试验。《中国药品检验标准操作规范》2019年版^[6]中规定选择性平板上为典型菌落, 血浆凝固酶试验阳性, 且革兰氏染色为阳性球菌, 则可判断检出金黄色葡萄球菌。对于能力验证样品中的菌落特征比较典型, 上述方法可以明显判断出是否检出金黄色葡萄球菌。然而在实际药品微生物检验中, 检品中所含未知菌种受药物基质及储存、运输条件的影响, 生化特征未必完全相同, 比如, 代义闯等^[17]就在牛乳中发现了凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌。对于凝固酶阴性的金黄色葡萄球菌, 在常规金黄色葡萄球菌的检验中就会造成假阴性等不准确结果。因此, 在检验过程中可以采用多种鉴定方法对不确定的情况进行佐证, 以提高检验结果的准确性。耐热核酸酶是金黄色葡萄球菌重要的毒力因子之一, 同时也是分离鉴定金黄色葡萄球菌的重要判定指标^[18]。采用金黄色葡萄球菌耐热核酸酶基因nuc进行PCR鉴定, 不仅方便快捷, 而且准确率高, 作为药典检验方法的补充, 可以更有效的检出药品中的金黄色葡萄球菌。

本次中国食品药品检定研究院组织的NIFDC-PT-504药品中金黄色葡萄球菌检验能力验证, 依据能力验证作业指导书和《中华人民共和国药典》2020年版四部进行金黄色葡萄球菌的检验, 同时以耐热核酸酶基因设计引物, 采用PCR法对金黄色葡萄球菌进行检验以及采用VITEK 2 COMPACT全自动微生物分析系统对分离出的菌株进行鉴定, 检测结果一致, 能力验证

结果满意。

参考文献

- [1] 卜红宇, 葛丽萍, 王昆鹏, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌检验能力验证研究[J]. 质量与安全检验, 2024, (01): 69-72.
- [2] 张鑫, 赵东辉, 李杰, 等. 一例猪源性金黄色葡萄球菌的分离鉴定与药物敏感性试验[J]. 中国农学通报, 2024, (23): 148-152.
- [3] 王家芳, 付霞, 李杰, 等. 化妆品中金黄色葡萄球菌检验能力验证方法及分析[J]. 工业微生物, 2023(04): 72-75.
- [4] 唐俊妮, 史贤明, 张荣, 等. 不同条件对金黄色葡萄球菌耐热核酸酶活性影响的研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2010, (04): 589-592.
- [5] 尹莎莎, 戴月如, 修瑜, 等. 金黄色葡萄球菌毒力和耐药基因分布与耐药相关性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2024, (02): 199-207.
- [6] 徐振波, 刘晓晨, 李琳, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素在食源性微生物中的研究进展[J]. 现代食品科技, 2013, (09): 2317-2324.
- [7] 范一灵, 李芳, 杨燕, 等. 含药品基质的金黄色葡萄球菌能力验证样品的制备与评估[J]. 上海预防医学, 2022, (03): 279-282.
- [8] 魏歆, 林芳明, 雷生妍, 等. 食源性金黄色葡萄球菌相关毒力基因的时序性表达规律研究[J]. 中国兽医杂志, 2020, (08): 73-76.
- [9] 许宇航, 王岩, 毕景然, 等. 硫醚类香料对金黄色葡萄球菌和单增李斯特菌的抑制作用[J]. 中国食品学报, 2022, (05): 62-69.
- [10] NIFDC-PT-504 药品中金黄色葡萄球菌检验能力验证计划作业指导书[M]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2024.
- [11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2020版四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020.
- [12] 郭瑞军, 王超. 金黄色葡萄球菌鉴定方法研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, (15): 5326-5331.
- [13] 马嘉琦, 李艳艳, 刘小燕, 等. 甘露醇氯化钠琼脂培养基成分对鉴定金黄色葡萄球菌的影响[J]. 中国食品卫生杂志, 2024, (04): 369-376.
- [14] 朱战波, 任宪刚, 崔玉东, 等. 金黄色葡萄球菌的分子生物学分型研究进展[C]//中国畜牧兽医学动物微生物生态学分会第四届第九次全国学术研讨会暨饲料和动物源食品安全战略论坛论文集. 2008: 54-58.
- [15] 时威, 卢勉飞, 蔡芷荷, 等. 冻干兔血浆在金黄色葡萄球菌检验中的应用研究[J]. 食品与发酵科技, 2012, (06): 44-47.
- [16] 中国食品药品检定研究院. 中国药品检验标准操作规范[M]. 中国医药科技出版社, 2019.
- [17] 代义闯, 陈娟, 谈永萍, 等. 乳源凝固酶阴性金黄色葡萄球菌挥发性代谢特征分析[J]. 食品研究与开发, 2019, (24): 12-19.
- [18] 胡瑜. 金黄色葡萄球菌耐热核酸酶的功能鉴定及表达调控[D]. 上海: 上海交通大学, 2013.