基于分子生物学的医疗器械致病菌联合快速鉴定技术研究

李承芝，刘肖帅，马　恒，张小涵，张　静*

（山东省医疗器械和药品包装检验研究院，国家药品监督管理局医用卫生材料及生物防护器械质量评价重点实验室，山东省医疗器械生物学评价重点实验室，山东济南 250101）

摘要：建立了快速鉴定非无菌医疗器械4种致病菌（金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌、沙门菌）的聚合酶链反应（PCR）法，选用微生物限度实验室常见菌种互为试验组的对照菌，通过设计不同菌种的特异性序列引物，将4种致病菌的鉴定在一次试验中完成。通过评价特异性和最低检出限来确定该方法的适用性，并与飞行时间质谱方法及传统鉴定方法进行比对。该方法可通过目的基因是否扩增及扩增产物的熔解温度值判定样本中是否含有上述4种致病菌，为生产和检验提供了一种致病菌的快速检验方法。

关键词：聚合酶链反应；快速检验；鉴定；微生物限度；致病菌；医疗器械

中图分类号：R917；R197.39　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1001-8255(2025)05-0672-08

引用：李承芝，刘肖帅，马　恒，等．基于分子生物学的医疗器械致病菌联合快速鉴定技术研究［J］．中国医药工业杂志，2025, 56(5): 672-679．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.05.015

Research on Rapid Identification of Pathogenic Bacteria on Medical Devices Based on Molecular Biology

LI Chengzhi, LIU Xiaoshuai, MA Heng, ZHANG Xiaohan, ZHANG Jing*

(*Shandong Key Lab. of Biological Evaluation for Medical Devices, NMPA Key Lab. for Quality Evaluation of Medical Materials and Biological Protective Devices, Shandong Institute of Medical Device and Pharmaceutical Packaging Inspection, Jinan 250101*)

ABSTRACT: A polymerase chain reaction (PCR) method was established for four pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Salmonella*) on non-sterile medical devices. Selecting common bacterial strains in the microbial limit laboratory as control bacteria for each other, the identification of four pathogenic bacteria was completed in one experiment by designing specific sequence primers for different strains. The applicability of this method was determined by evaluating its specificity and minimum detection limit, and compared it with time-of-flight mass spectrometry and traditional identification methods. This method can determine the presence of four pathogenic bacteria in a sample based on whether the target gene has been amplified and the melting temperature value of the amplified product, which provide a rapid detection method for pathogenic bacteria in production and testing.

Key Words: polymerase chain reaction; rapid detection; identification; microbial limit; pathogenic bacterium; medical device

微生物鉴定是指通过对未知微生物的特征测定，对其进行细菌、酵母菌和霉菌大类的区分，或属、种及菌株水平确定的过程。ChP 2020年版通则1101、1106和指导原则9205均规定应采用微生物鉴定进行污染调查和溯源。此外，在生产中有时亦需对原料、辅料、工艺用水和中间产品、终产品和环境等中检出的微生物进行适当水平的鉴定。

在对非无菌医疗器械终产品进行微生物限度检查时，金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、梭菌、白

收稿日期：2024-07-12

作者简介：李承芝（1990—），女，硕士，从事微生物诊断试剂及医疗器械微生物控制的研究。

通信作者：张　静（1984—），女，副高级工程师，从事医疗器械质量管理及微生物控制的研究与开发。

E-mail：pluto.kiki1@163.com

念珠菌、大肠埃希菌、沙门菌等是常见的致病菌，这些致病菌的鉴定方法在药典中没有明确规定。目前主要通过观察检出菌的菌落形态、特有的生化反应以及相关染色结果进行鉴定。这些试验需要准备的试剂和耗材种类繁多，需要大量人力物力的支持。

近年来，基于分子生物学的聚合酶链式反应（polymerase chain reaction，PCR）技术在畜牧与动物医学[1—4]、食品检验[5—6]、水产渔业[7]、林业[8]、临床医学[9—11]等行业中使用广泛，但目前在医疗器械行业，尤其是在非无菌医疗器械的微生物限度检查中的使用仍旧是空白。

本试验根据金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌、沙门菌的保守序列设计 PCR 引物，通过优化反应体系，建立了一种快速的微生物致病菌鉴定方法，以期为生产和检验提供一种致病菌的快速检验方法。

1 仪器与试药

LC480 Ⅱ型荧光定量 PCR 仪（罗氏诊断有限公司）；VITEK MS Plus 型飞行时间质谱（法国生物梅里埃公司）；MS1602TS 型电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

表皮葡萄球菌（ATCC12228）、金黄色葡萄球菌（ATCC6538）、铜绿假单胞菌（ATCC15442）、白念珠菌（ATCC10231）、鼠伤寒沙门菌（ATCC19430）、阪崎肠杆菌（ATCC29544）、荧光假单胞菌（ATCC17561）、大肠埃希菌（ATCC8739）均购自美国菌种保藏中心；乙型副伤寒沙门菌［CMCC(B)20094，中国食品药品检定研究院］。

胰酪大豆胨琼脂培养基（TSA，批号 L0779Y）、胰酪大豆胨液体培养基（TSB，批号 L0821Y）、沙氏葡萄糖琼脂培养基（SDA，批号 L0064Y）、甘露醇氯化钠琼脂培养基（批号为 L0811Y）均购自广东环凯微生物科技有限公司；沙氏葡萄糖液体培养基（SDB，批号 9213074）、溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基（批号 9010685）均购自美国 BD 公司；甘露醇发酵培养基（批号 180811）、念珠菌显色培养基（批号 200713）、冻干血浆（批号 200716）、绿脓杆菌生化鉴定盒（批号 200721）均购自北京陆桥技术股份有限公司；*N*,*N*- 二甲基对苯二胺二盐酸盐（南京化学试剂股份有限公司，含量≥ 99%，批号 201113488Z）；RV 沙门菌增菌液体培养基（批号 1806112）、三糖铁琼脂培养基（批号 180629）、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基（批号 2102022）均购自北京三药科技开发公司；引物（购自深圳华大基因股份有限公司）；SYBR® Green Realtime PCR Master Mix Plus 试剂盒［东洋纺（上海）生物技术有限公司］。

2 方法的建立

2.1 PCR 方法的建立

2.1.1 方法构建

增菌液制备：将菌种冻干粉按照说明书复溶后，根据表 1 所示将 4 种致病菌接种至相应的培养基，并在合适的温度下进行增菌培养。

表 1 不同菌种的培养条件

Tab.1 Culture Conditions of the Pathogenic Bacteria

菌种	温度/℃	培养时间 /h	培养基（增菌）	培养基（单菌落）
阪崎肠杆菌	32	24	TSB	TSA
荧光假单胞菌	26	48	TSB	TSA
鼠伤寒沙门菌	32	24	TSB	TSA
表皮葡萄球菌	32	48	TSB	TSA
金黄色葡萄球菌	32	24	TSB	TSA
铜绿假单胞菌	32	24	TSB	TSA
白念珠菌	24	48	SDB	SDA
乙型副伤寒沙门菌	32	24	TSB	TSA
大肠埃希菌	32	24	TSB	TSA

DNA 模板制备：取增菌液 1 mL，涂布接种至 TBA/SDA 中，按表 1 中的温度、时间进行培养，获得不同菌株的单菌落。用接种环挑取单菌落至去离子水中，振荡、混匀，作为模板使用。

引物序列及扩增程序：在 NCBI 数据库（https://www.ncbi.nlm.nih.gov）中查找致病菌特有基因的保守序列，通过 Primer-Blast 设计相关引物，引物序列如表 2 所示；引物经深圳华大基因股份有限公司合成后按说明书中的比例加入去离子水，使用 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix Plus 试剂盒进行扩增。经优化后，引物的使用浓度为 0.5 μmol/L，扩增体系和扩增程序分别如表 3 和表 4 所示。

结果显示，经 PCR 扩增后，*oprI* 基因可以使铜绿假单胞菌扩增，熔解温度（melting temperature，T_m 值）为 84.91 ℃；*hilA* 基因可以使沙门菌中的乙型副伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌出现扩增，T_m 值分别为 85.21 和 85.22 ℃；*ebps* 基因可以使金黄色葡萄

表 2　引物序列

Tab.2　Primer Sequences

菌种名称	基因名称	引物	引物序列（5′→3′）
铜绿假单胞菌	*oprI*	F	GGGAGATTGCTGTTATGGAAATG
		R	GCTTCGGTTTCTTTGGAGTG
沙门菌	*hilA*	F	CAACCTACGACTCATACA
		R	GCGTAATTGATCCATGAG
金黄色葡萄球菌	*ebps*	F	CCACATGCCTCTAATAATG
		R	GCGATTTTATTTTCTTTTGTAC
白念珠菌	*TS1-5.8s-TS2*	F	GAAAGACGGTAGTGGTAAGGC
		R	CTTAAGTTCAGCGGGTAGTCC

表 3　扩增体系的组成

Tab.3　Composion of the Reaction System

扩增体系	体积 /μL
SYBR® Green Realtime PCR Master Mix-Plus	7.5
Plus Solution	1.5
引物 F	0.5
引物 R	0.5
样本	5.0

表 4　扩增程序

Tab.4　Amplification Protocol

	步骤	温度 /℃	时间	循环数
	预变性	95	10 min	1
扩增	变性	95	10 s	40
扩增	退火	62	15 s	40
扩增	延伸及检测荧光	70	10 s	40
	熔解曲线	45	30 s	1
	熔解曲线	95	保持	1

球菌出现扩增，T_m 值为 81.27 ℃；*TS1-5.8s-TS2* 基因可以使白念珠菌出现扩增，T_m 值为 83.80 ℃。扩增曲线及熔解曲线如图 1 所示。经多次试验确定的阳性判定依据如表 5 所示。

2.1.2　方法评价

2.1.2.1　特异性

在平板上挑取单菌落，加至纯化水 200 μL 中作为样本。对受试菌种进行扩增，除目标基因对应的菌种为试验菌种以外，其他均为干扰菌种。分组详情如表 6 所示。照“**2.1.1**”项下方法进行扩增。

结果显示，经 PCR 扩增后，*oprI* 基因仅在铜绿假单胞菌中出现特异性扩增且 T_m 值为（84.9±0.05）℃；*hilA* 基因仅在沙门菌中的乙型副伤寒沙门菌和鼠伤寒沙门菌中出现特异性扩增且 T_m 值为（85.2±0.05）℃；*ebps* 基因仅在金黄色葡萄球菌中出现特异性扩增且 T_m 值为（81.3±0.05）℃；*TS1-5.8s-*

表 5　4 种致病菌阳性的判定依据

Tab.5　Judgment Criterion of Positivity of 4 Pathogenic Bacteria

致病菌	靶基因	是否扩增	T_m 值 /℃
铜绿假单胞菌	*oprI*	是	84.90±0.05
沙门菌	*hilA*	是	85.20±0.05
金黄色葡萄球菌	*ebps*	是	81.30±0.05
白念珠菌	*TS1-5.8s-TS2*	是	83.80±0.05

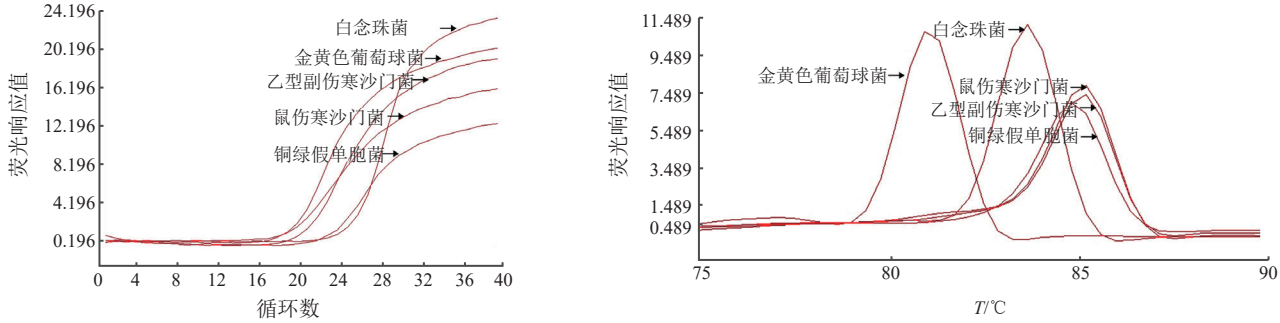


图 1　致病菌的扩增曲线（A）及熔解曲线（B）

Fig.1　Amplification Curves (A) and Melting Curves (B) of the Pathogenic Bacteria

TS2 基因仅在白念珠菌中出现特异性扩增且 T_m 值为(83.8±0.05)℃。扩增曲线及熔解曲线如图 2 所示。

2.1.2.2 最低检出限

①样本制备。单菌落样本 1：分别用接种环挑取 4 种致病菌的单菌落，加至纯化水 400 μL 中，制得稀释度为 0 的菌悬液，再用纯化水进行 10 倍稀释，得到稀释倍数分别为 1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} 的菌悬液（总体积为 1 mL）。单菌落样本 2：用接种环挑取铜绿假单胞菌单菌落，加至纯化水 400 μL 中，制得稀释度为 0 的菌悬液，再用生理盐水进行 10 倍稀释，得到稀释倍数为 1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6} 的菌悬液（总体积为 1 mL）。增菌液样本：取增菌液 400 μL 作为稀释度为 0 的菌悬液，用纯化水进行 10 倍稀释，得到稀释倍数为 1×10^{-1}、1×10^{-2}、1×10^{-3}、1×10^{-4}、1×10^{-5}、1×10^{-6}、1×10^{-7}、1×10^{-8} 的菌悬液（总体积为 1 mL）。

②计数。取上述不同浓度的菌液样本 200 μL，加至 TSA/SDA 平板中，均匀涂布。按表 1 中的温度要求培养 24 h，然后计数。

③ PCR 扩增。按“**2.1.1**”项下方法进行扩增。

结果显示，经纯化水稀释的不同稀释度菌液样本在扩增后，经换算得到铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌和白念珠菌的最低检出限分别为 1.6×10^4、2.0×10^4、1.1×10^3、3.5×10^3 和 4.0×10^3 CFU/mL。不同稀释度检测结果的扩增曲线及熔解曲线如图 3 所示（结果已经换算为检测样本的浓度）。

采用生理盐水稀释得到的不同稀释度铜绿假单胞菌菌液样本经扩增后的结果显示，只有原浓度样本（即纯化水稀释的单菌落样本）有扩增，而使用生理盐水稀释的样本均没有扩增，显示阴性结果。

用纯化水稀释增菌液得到的不同稀释度菌种样本经扩增、显微镜计数，再经换算得到铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门菌、乙型副伤寒沙门菌和白念珠菌的最低检出限分别为 3.3×10^4、2.2×10^4、6.8×10^3、5.0×10^3 和 2.1×10^3 CFU/mL。

2.2 方法比对

2.2.1 样本制备

人工污染样本制备：取 9 种标准菌株进行平板培养，分别挑取单菌落涂抹至一次性使用外科口罩（无菌）上，作为本试验的人工污染样本。

供试液制备：根据《一次性使用卫生用品卫生标准：GB 15979—2002》中附录 B 的方法进行样品采集与样品处理，称取人工污染的一次性使用外科口罩（无菌）10 g，剪碎后加至灭菌生理盐水 200 mL 中，充分混匀，作为供试液备用。

2.2.2 PCR 方法

取“**2.2.1**”项下的供试液，按“**2.1.1**”项下方法进行 DNA 模板制备和扩增。

2.2.3 传统生化方法

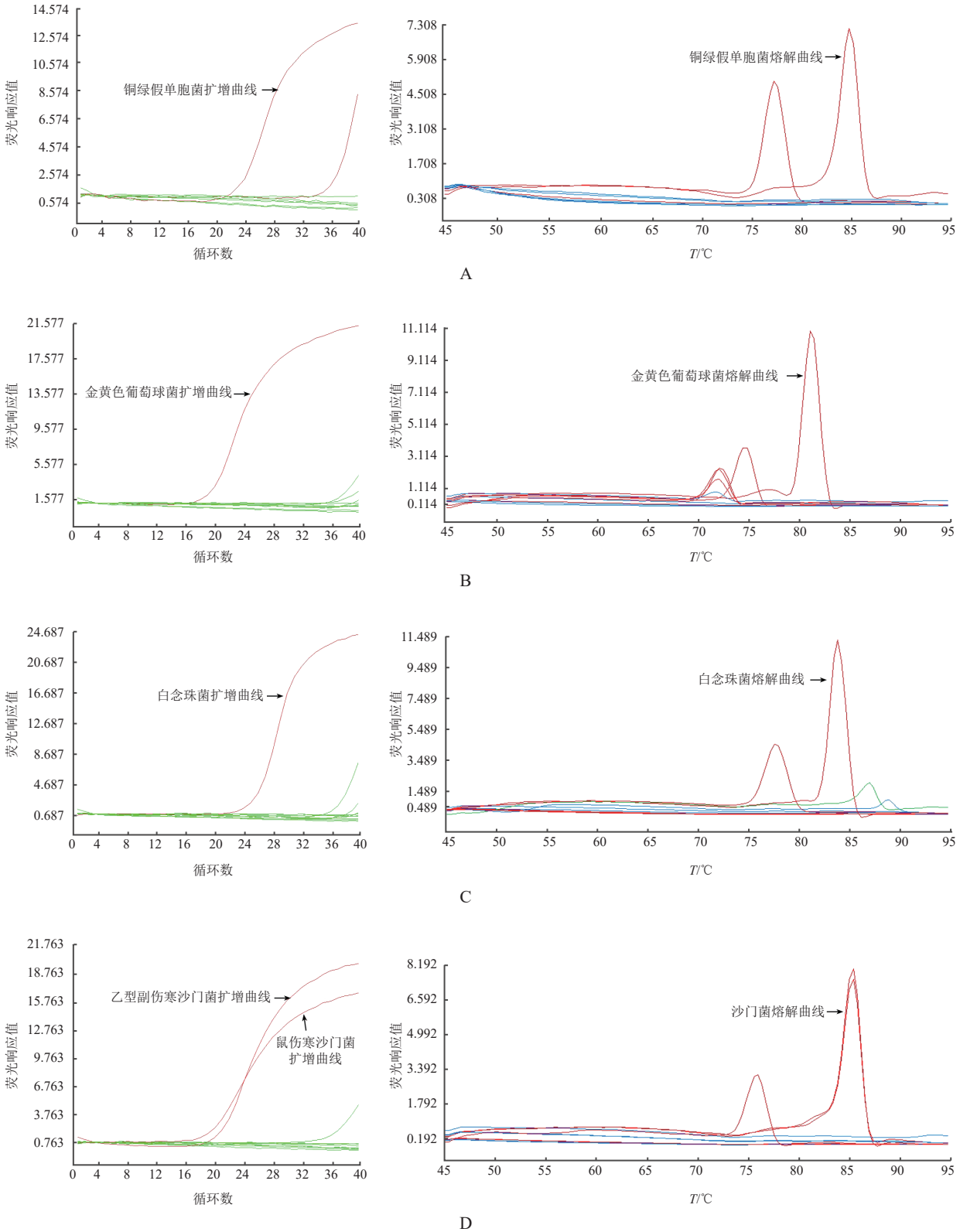
金黄色葡萄球菌：将“**2.2.1**”项下的供试液 1 mL 接种至胰酪大豆蛋白胨液体培养基中，混匀，于 32 ℃培养 24 h。将培养物划线接种至甘露醇氯化钠琼脂培养基平板上，于 32 ℃培养 24 h。观察是否有菌落生长，若有菌落生长，观察菌落形状。若镜检结果符合菌落形态，则进行生化鉴定（血浆凝固酶试验和甘露醇发酵试验）。

铜绿假单胞菌：将“**2.2.1**”项下的供试液 1 mL

表 6 特异性验证的分组情况

Tab.6 Grouping Situation of the Specificity Validation

菌种名称	基因名称	试验菌种	干扰菌种
铜绿假单胞菌	*oprI*	铜绿假单胞菌	表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、白念珠菌、乙型副伤寒沙门菌、鼠伤寒沙门菌、阪崎肠杆菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌
沙门菌	*hilA*	乙型副伤寒沙门菌、鼠伤寒沙门菌	表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌、阪崎肠杆菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌
金黄色葡萄球菌	*ebps*	金黄色葡萄球菌	表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌、乙型副伤寒沙门菌、鼠伤寒沙门菌、阪崎肠杆菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌
白念珠菌	*TS1-5.8s-TS2*	白念珠菌	表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、乙型副伤寒沙门菌、鼠伤寒沙门菌、阪崎肠杆菌、荧光假单胞菌、大肠埃希菌



A—*oprI* 基因扩增结果；B—*ebps* 基因扩增结果；C—*TS1-5.8s-TS2* 基因扩增结果；D—*hilA* 基因扩增结果。

图 2　4 种致病菌的特异性检测结果

Fig.2　Specificity Test Results for 4 Pathogenic Bacteria

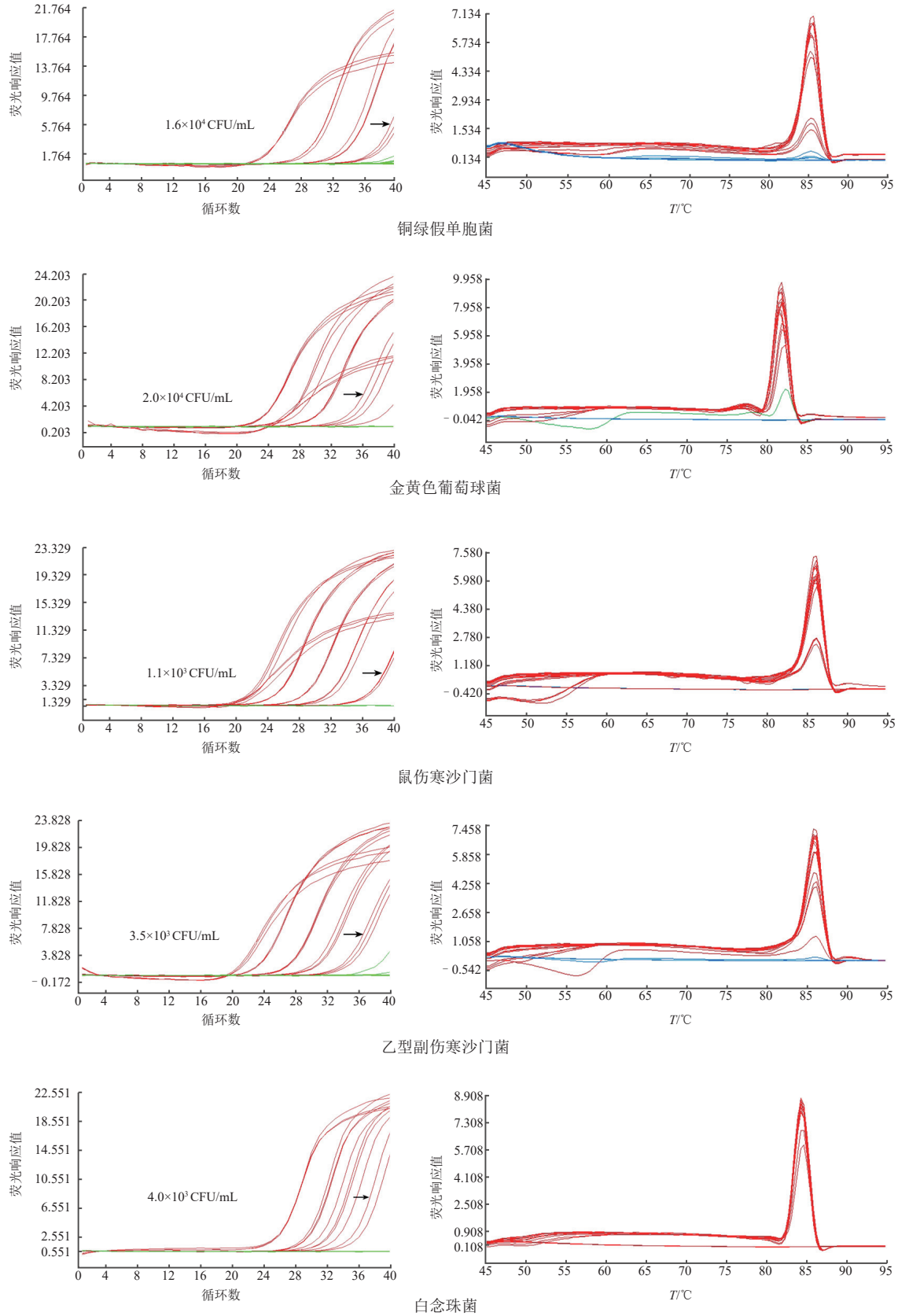


图 3　最低检出限测定时的扩增曲线（左）及熔解曲线（右）

Fig.3　Amplification Curves (Left) and Melting Curves (Right) of Detection Limit Testing

接种至胰酪大豆蛋白胨液体培养基中，混匀，于32 ℃培养24 h。将培养物接种至溴化十六烷基三甲铵琼脂培养基平板上，于32 ℃培养24 h。若镜检结果符合菌落形态，则进行生化鉴定（绿脓菌素试验）。

白念珠菌：将“**2.2.1**”项下的供试液1 mL接种至沙氏葡萄糖液体培养基中，混匀，于32 ℃培养96 h。将培养物划线接种至沙氏葡萄糖琼脂培养基平板上，于32 ℃培养48 h。观察菌落形态，挑取疑似菌落接种至念珠菌显色培养基平板上，培养48 h，观察结果。

沙门菌：将“**2.2.1**”项下的供试液10 mL接种至RV沙门菌增菌液体培养基中，混匀，于32 ℃培养18 h。将培养物划线接种至木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基平板上，于32 ℃培养18 h。将生长良好、形态符合在木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂培养基生长情况的沙门菌，用接种针挑选疑似菌落于三糖铁琼脂培养基高层斜面上进行斜面和高层穿刺接种，培养18 h，观察结果。

2.2.4 飞行时间质谱方法

采用大肠埃希菌（ATCC8739）作为质控菌株，检测通过后，取不同样本获得的单菌落样本均匀涂抹在靶板上，上机检测。

结果显示，采用荧光PCR法进行鉴定时能分别选用增菌液和单菌落作为样本进行扩增，飞行时间质谱只能选择单菌落进行验证，3种试验的结论一致，结果如表7所示。

3 讨论

荧光PCR法是以微生物核酸作为模板进行扩增，在检测过程中尚不能区分该模板是否来源于经杀灭的微生物，因此受方法学限制，不能区分活菌与死菌。另一方面，医疗器械中常用的灭菌方式都会使微生物的核酸受到高温或其他化学成分的影响，导致核酸分子降解或空间结构发生变化，能否进行正确的扩增或扩增效率如何尚不可知，该思路也是未来研究的主要方向之一。

单菌落样本和增菌液样本的最低检出限略有差别，但均在同一数量级，这种差别只是由2种样本的初始菌浓度和稀释比例造成。对比使用生理盐水和纯化水稀释的铜绿假单胞菌单菌落样本结果：相同浓度的情况下：纯化水稀释样本的检测结果为阳性，而使用生理盐水稀释的样本检测结果为阴性。因此，若检测过程中菌浓度过高，需要进行稀释，稀释液不能选用生理盐水，否则会出现假阴性的结果。

本试验建立了一种非无菌医疗器械致病菌联合快速鉴定技术，可以同时鉴定金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、白念珠菌、沙门菌。通过不断优化试验体系，确定了4种致病菌的阳性判定依据。从试验周期来看，人工污染样本的鉴定中金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和沙门菌的鉴定耗时均为3 d，白念珠菌的鉴定耗时最长，达9 d。飞行时间质谱法需在获得单菌落后才能上机检测，最长的试验周期需要5 d。荧光PCR法可以选择增菌液作为样本，试验周期可以控制在2 d内，耗时大幅缩短。从试验操作来看，传统的生化鉴定方法需要在不同的培养基上进行培养，观察菌落形态，多个试验并行以佐

表7 不同方法试验结果的对比

Tab.7 Comparison of Experimental Results of Different Methods

样品	加入菌种	质谱鉴定结果	PCR鉴定结果（增菌液）	PCR鉴定结果（单菌落）	生化鉴定
1	表皮葡萄球菌	表皮葡萄球菌	—	—	—
2	大肠埃希菌	大肠埃希菌	—	—	—
3	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌	金黄色葡萄球菌阳性	金黄色葡萄球菌阳性	金黄色葡萄球菌阳性
4	乙型副伤寒沙门菌	沙门菌	沙门菌阳性	沙门菌阳性	沙门菌阳性
5	白念珠菌	白念珠菌	白念珠菌阳性	白念珠菌阳性	白念珠菌阳性
6	阪崎肠杆菌	阪崎肠杆菌	—	—	—
7	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌	铜绿假单胞菌阳性	铜绿假单胞菌阳性	铜绿假单胞菌阳性
8	鼠伤寒沙门菌	沙门菌	沙门菌阳性	沙门菌阳性	沙门菌阳性
9	荧光假单胞菌	荧光假单胞菌	—	—	—

注：“—”表示未检出4种致病菌。

证致病菌的存在，试验操作烦琐。飞行时间质谱法是通过分析特异性表达的蛋白进行鉴定，需要将单菌落均匀涂抹在特定的靶板上。荧光 PCR 法则可以在增菌结束后配制扩增体系并进行检测，试验操作少，能减少差错。从试验成本来看，传统生化鉴定需要的培养基、耗材、试剂等种类多，有效期较短，这都增加了试验成本。飞行时间质谱法则是一次性耗材靶板的成本较高。荧光 PCR 法需要的试剂在规定的贮存条件下能长时间储存，降低了使用成本。

综上所述，本研究建立的荧光 PCR 法可以为医疗器械制造商对产品进行过程控制和出厂检验提供一种快速、低成本的解决方案。

参考文献：

[1] 李碧凤 , 赵 敏 , 张绍卫 , 等. 文山州兽医实验室 PCR 检测问题及对策 [J]. 中国畜禽种业 , 2020, **16**(10): 7-9.

[2] 石远菊. 猪呼吸道类和繁殖障碍类病毒性疫病多重 PCR 方法的建立及应用 [D]. 贵阳 : 贵州大学硕士学位论文 , 2019.

[3] 李振锋. 鹅白色念珠菌的分离鉴定及 PCR 检测方法的建立 [D]. 泰安 : 山东农业大学硕士学位论文 , 2018.

[4] 孟 丽. 猪腹泻病原多重 PCR 检测方法的建立及主要病毒进化分析 [D]. 上海 : 上海海洋大学硕士学位论文 , 2017.

[5] 李宏铎 , 李亚楠 , 沙 淼 , 等. 实时荧光 PCR 法检测食品中红枣成分 [J]. 食品安全导刊 , 2022, (3): 93-96.

[6] 崔 婧. 核酸探针和 PCR 技术在食品检验中的应用效果分析 [J]. 中国食品 , 2021, (5): 108.

[7] 黄津伟 , 张天喆 , 高 燕 , 等. 基于种特异性 PCR 及线粒体基因标记的天津沿海牡蛎物种多样性研究 [J]. 海洋科学 , 2019, **43**(12): 89-96.

[8] 陈鑫源 , 戚大伟 , 孙 婧. 基于 PCR 技术的香栓菌和毛栓菌快速检测 [J]. 森林工程 , 2019, **35**(5): 63-67.

[9] 杨高峰. PCR 及其在分子生物学与心血管疾病诊断上的应用 [J]. 世界最新医学信息文摘 , 2017, **17**(72): 23.

[10] 庄文华 , 高振玲 , 冯智慧 , 等. 血清学弱 D 表型的分子生物学鉴定分析 2 例 [J]. 中国输血杂志 , 2022, **35**(4): 459-461.

[11] 陈 瑶. 临床不同部位分离须癣毛癣菌的形态学、分子生物学鉴定及药敏分析 [D]. 武汉 : 湖北中医药大学硕士学位论文 , 2019.

广告索引

封二：《中国医药工业杂志》征订信息

封底：中国医药工业信息中心

封三：鲁南厚普制药有限公司

592、693、701 页：公益广告