

Isolation Identification and Risk Assessment of *Acinetobacter baumannii* in Duzhong Zhuanggu Capsules

Biling Cui Jiahui Huang Liubing Lei Donghua He Ran Ma*

Dongguan Institute for Food and Drug Control, Dongguan, Guangdong, 523808, China

Abstract

Objective To study the microbial contamination of Duzhong Zhuanggu Capsules and analyze the potential safety risks associated with their use. **Methods** 30 batches of Duzhong Zhuanggu Capsules were tested for microbial limits in accordance with the Microbial Limit Test in the Chinese Pharmacopoeia. The isolated strains were identified by MALDI-TOF MS technology, with a focus on analyzing the potential unacceptable microorganisms in the samples. The drug resistance of the detected *Acinetobacter baumannii* was evaluated using the VITEK 2 Compact fully automated microbial identification and antimicrobial susceptibility testing system. **Results** Duzhong Zhuanggu Capsules isolated conditional pathogens such as *Acinetobacter baumannii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterococcus faecalis*. Among the 13 *Acinetobacter baumannii* strains collected, 100% exhibited resistance to cefazolin, while some strains showed moderate resistance to ceftriaxone and ciprofloxacin. **Conclusion** Duzhong Zhuanggu Capsules contain raw powder of medicinal materials, and the risk of microbial contamination is relatively high. The production enterprises need to strengthen the control of the production process and list the contamination bacteria such as *Acinetobacter baumannii* as the key focus of quality control, and implement targeted risk management and control.

Keywords

Acinetobacter baumannii; Duzhong Zhuanggu Capsules; microbial contamination; objectionable microorganisms.

杜仲壮骨胶囊中鲍曼不动杆菌的分离鉴定及风险评估

崔碧玲 黄佳慧 雷柳冰 何冬华 马冉*

东莞市食品药品检验所, 中国·广东 东莞 523808

摘要

目的 研究杜仲壮骨胶囊微生物的污染情况, 分析其存在的用药安全性风险。**方法** 依据《中国药典》微生物限度检查法对30批杜仲壮骨胶囊进行检测, 采用MALDI-TOF MS技术对分离菌株进行鉴定, 重点分析样品中潜在的不可接受微生物, 并对检出的鲍曼不动杆菌采用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统进行耐药性评价。**结果** 杜仲壮骨胶囊分离出鲍曼不动杆菌、阴沟肠杆菌与铅黄肠球菌等条件致病菌, 其中收集到13株鲍曼不动杆菌菌株对头孢唑林耐药率为100%, 部分菌株对头孢曲松和环丙沙星表现出中度耐药性。**结论** 杜仲壮骨胶囊含有药材原粉, 微生物污染风险相对较高, 生产企业需加强生产过程控制, 并将鲍曼不动杆菌等污染菌列为质控重点关注, 实施针对性风险管控。

关键词

鲍曼不动杆菌; 杜仲壮骨胶囊; 微生物污染; 不可接受微生物

1 引言

杜仲壮骨胶囊由二十三味药材组成, 主要包括杜仲、人参、三七、细辛、乌梢蛇、金铁锁、川芎、当归等, 具有强健筋骨、益气健脾、养肝壮腰等功效, 适用于治疗风湿痹

痛、筋骨无力和畏寒喜温等症^[1]。在《卫生部药品标准》中药成方制剂第十二册中记载杜仲壮骨胶囊制法含三七和乌梢蛇等药材原粉。中药材原料本身的特质使其具有非常高的微生物载量, 在不适宜的运输和存储过程中微生物容易大量繁殖, 而含药材原粉的中药制剂由于生产工艺需求, 对部分药材原料无法进行有效的灭菌处理, 增加成品药的微生物污染风险^[2,3]。当药品本身不具备抑制微生物生长能力, 若后期无灭菌或防腐工艺, 含药材原粉的制剂被微生物污染后, 微生物可能在药品中长期存活。

鲍曼不动杆菌广泛存在于自然环境中, 是一种需氧非发酵型革兰氏阴性杆菌, 该菌环境适应性强, 对营养需求低, 能通过形成生物被膜提高对恶劣环境的抗逆性^[4,5]。鲍曼不动杆菌属于条件致病菌, 可在人体正常组织中无症状形式定

【基金项目】东莞市社会发展科技项目(项目编号: 20231800902412)。

【作者简介】崔碧玲(1992-), 女, 中国广东广州人, 硕士, 主管药师, 从事药品微生物检验与鉴定研究。

【通讯作者】马冉(1986-), 女, 硕士, 主管药师, 从事药品微生物检验研究。

植,也能长期附着在医疗设备表面,引起多种严重的感染,包括菌血症、脑膜炎、心内膜炎、呼吸道感染、尿路感染和伤口感染等^[6,7]。研究显示,鲍曼不动杆菌具有多重耐药性,常规抗菌药物和化学消毒措施难以将其杀灭,对公共健康构成持续威胁^[8-10]。鲍曼不动杆菌是药品污染中一类常见的不可接受微生物,其污染可能影响药品的安全性与有效性,增加患者感染风险。

本研究对杜仲壮骨胶囊污染的微生物采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术进行鉴定,相较于传统的培养法鉴定更快速准确。采用VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统(VITEK 2 Compact系统)对鲍曼不动杆菌进行精准鉴定和药敏测试,为药源性鲍曼不动杆菌的生化反应和耐药机制研究提供检验依据。通过对杜仲壮骨胶囊的微生物污染状况的调查分析,以期强化药品生产周期不可接受微生物质量监管及风险预警提供参考。

2 材料

2.1 主要培养基和试剂

胰酪大豆胨琼脂培养基(TSA)、胰酪大豆胨液体培养基(TSB)、沙氏葡萄糖琼脂培养基(SDA)、麦康凯液体培养基、麦康凯琼脂培养基(MAC)、RV沙门菌增菌液体培养基、木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂(XLD)、肠道菌增菌液体培养基和紫红胆盐葡萄糖琼脂(VRBGA),培养基均购自北京三药科技开发公司,所用培养基均根据说明书配制,符合培养基适用性检查相关要求。革兰氏阴性鉴定卡和革兰氏阴性细菌药敏卡(AST-N334药敏鉴定卡),均购生物梅里埃美国有限公司。

2.2 仪器

立式自动压力蒸汽灭菌器(致微仪器有限公司);电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司);生物安全柜(苏州安泰空气技术有限公司);生化培养箱(宾德环境试验设备有限公司);VITEK 2 Compact全自动微生物鉴定及药敏分析系统(梅里埃生物制品有限公司);Autof ms 1000全自动微生物质谱鉴定系统(郑州安图生物工程股份有限公司)。

3 方法

3.1 微生物限度检查

按照2020年版《中国药典》微生物限度检查法,对30批杜仲壮骨胶囊样品进行需氧菌总数(TAMC)、霉菌和酵母菌总数(TYMC)、耐胆盐革兰阴性菌、大肠埃希菌和沙门菌等项目进行检验。分别收集TSA、SDA、VRBGA、MAC和XLD平板上生长的菌落,并对各检验项

目中所获得的菌株通过转接至TSA平板中进行分离与纯化。

3.2 MALDI-TOF MS 鉴定

采用原位甲酸提取法,挑取纯化后的待测单菌落均匀涂抹于靶板上,在菌落涂层加入1ul含甲酸的裂解液1,待风干后加入1ul基质液,待基质液晾干后上机检测,采用Autof ms 1000全自动微生物质谱检测系统对各测试菌谱图进行分析,结果得分>9.0为种水平置信。

3.3 生化鉴定

对MALDI-TOF MS鉴定出为鲍曼不动杆菌的菌株,进行革兰氏染色,镜下观察菌株形态。将待测菌制备成0.50McF~0.63 McF菌悬液,选用革兰氏阴性鉴定卡,采用VITEK 2 Compact鉴定系统进行鉴定,同时将待测菌转接到TSA平板上,分别在41℃和44℃中培养24h后观察其生长状态。

3.4 药物敏感性试验

将鲍曼不动杆菌接种至TSA平板中,35℃~37℃培养24h,用0.45%氯化钠溶液配制成适宜浓度的菌悬液,选用AST-N334药敏鉴定卡通过VITEK 2 Compact系统进行药敏检测。

4 结果

4.1 微生物污染情况

杜仲壮骨胶囊的检验结果显示30批样品的微生物限度项目均符合规定,并未检出控制菌。TAMC负载量在大于 $10^3\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 并少于 $10^4\text{cfu}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围的占比约为23%,在微生物检验项目中检出微生物的样品共26批,通过分离纯化共收集56株菌。

4.2 MALDI-TOF MS 鉴定结果

对收集的菌株通过全自动微生物质谱检测系统进行鉴定,鉴定结果得分在9分以上的菌株共42株。其中有13株菌鉴定为鲍曼不动杆菌,样品检出率为43.33%,有4株菌鉴定为藤黄微球菌,样品检出率为13.33%,结果如图1a所示;将污染菌按照菌属分类,检出不动杆菌属数量最多,占总量30.95%,其次为芽孢杆菌属,占总量28.57%,结果如图1b所示。

4.3 鲍曼不动杆菌的菌种形态

鲍曼不动杆菌的典型菌落形态如图2所示:在TSA平板上呈圆形、光滑、湿润的淡黄色菌落(见图2a);在Mac平板上为圆形、边缘齐整的橙黄色菌落(见图2b);在XLD平板上则为圆形、光滑、有光泽的橙红色菌落(见图2c)。经革兰染色镜检,鲍曼不动杆菌为革兰氏阴性菌,呈短棒状形(见图2d)。

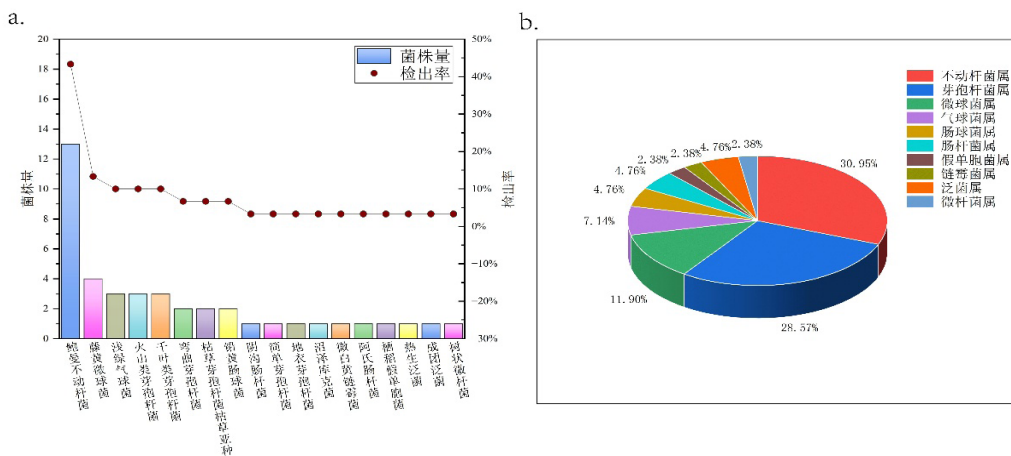


图 1 菌株鉴定结果分析图

注: a. 各类菌株的数量和检出率; b. 菌株按菌属的占比

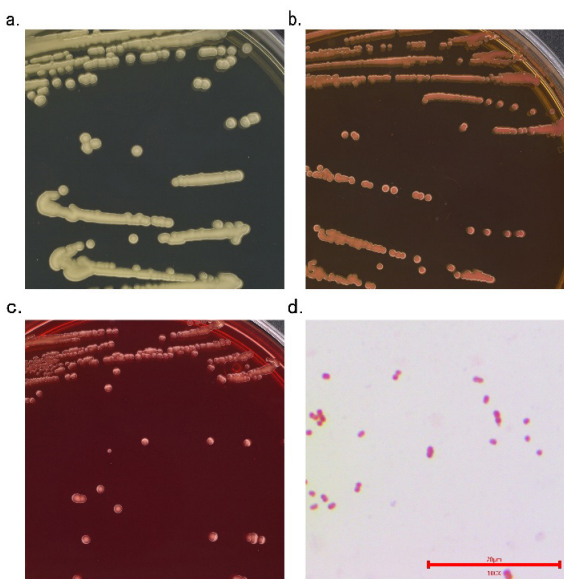


图 2. 鲍曼不动杆菌的形态图

注: a. TSA 平板的菌落形态图; b. Mac 平板的菌落形态图; c. XLD 平板的菌落形态图; d. 革兰氏染色镜检图

4.4 生化鉴定结果

对质谱鉴定为鲍曼不动杆菌的 13 株菌采用 VITEK 2 Compact 鉴定系统进行生化鉴定, 鉴定结果均为鲍曼不动杆菌复合菌。同时, 将 13 株菌分别在在 41℃和 44℃中培养 24h, 均能良好生长, 通过温度补充试验推断鉴定结果均为鲍曼不动杆菌。13 株测试菌的生化试验项目中谷氨酰芳胺酶 pNA (阳性率为 15%)、L- 脯氨酸芳胺酶 (阳性率为 23%)、丙二酸盐 (阳性率为 54%)、甘氨酸芳胺酶 (阳性率为 7%)、L- 组氨酸同化 (阳性率为 77%)、L- 苹果酸盐同化 (阳性率为 46%) 和 L- 乳酸盐同化 (阳性率为 85%) 的结果有所不同, 其他生化试验项目结果均一致。

4.5 药物敏感性试验结果

药敏试验结果显示 13 株鲍曼不动杆菌均对头孢唑林具

有耐药性, 其中有 9 株鲍曼不动杆菌对头孢曲松表现出中度耐药性, 有 1 株菌对环丙沙星表现出中度耐药性, 对其它测试抗生素均敏感, 具体结果见表 1。

表 1. 敏感性试验结果分析表

抗生素	MIC	解析
氨苄西林 / 舒巴坦	< = 2	S
头孢唑林	> = 64	R
头孢他啶	4	S
头孢曲松	16	I
	8	S
头孢吡肟	2	S
亚胺培南	< = 1	S
庆大霉素	< = 1	S
妥布霉素	< = 1	S
环丙沙星	2	I
	< = 0.25	S
左氧氟沙星	< = 0.25	S
甲氧苄啶 / 磺胺异噁唑	< = 20	S

注: R 表示耐药; I 表示中度耐药; S 表示敏感

5 讨论

杜仲壮骨胶囊的总体微生物负载量相对较高, 部分样品 TAMC 结果的大于 $10^3 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 虽未超出中国药典微生物限度标准规定的 $10^4 \text{cfu} \cdot \text{g}^{-1}$, 但在适应环境下微生物仍可能继续滋长, 生产企业需重视药品生产周期全流程的微生物污染防控。本研究, 通过 MALDI-TOF MS 鉴定出 42 株菌, 其中有 13 批样品检出鲍曼不动杆菌。药敏试验结果显示鲍曼不动杆菌对头孢唑林均表现出耐药性, 耐药率达到 100%, 与报道的鲍曼不动杆菌对第一代头孢菌素的头孢唑林具有天然耐药性的结论相符^[1], 可能源于携带的耐药基因在遗传过程中一直稳定存在。部分菌株对第三代头孢菌素的头孢曲松及第三代喹诺酮类抗生素的环丙沙星亦表现出

中度耐药性,可能与相关基因突变导致药物作用靶点改变有关,提示这些菌株具有发展为复杂耐药性的潜在风险。

此外,杜仲壮骨胶囊中还检出的阴沟肠杆菌与铅黄肠球菌等条件致病菌,该类菌普遍存在于人和动物的肠道中,易形成生物膜,可引发脑膜炎、败血症、腹腔感染和尿道感染等疾病,具备潜在的致病性与耐药性^[12,13]。同时,杜仲壮骨胶囊还检出多种芽孢杆菌属菌株(如火山类芽孢杆菌、枯草芽孢杆菌、弯曲芽孢杆菌等)。研究表明,芽孢杆菌属主要来源于土壤及环境,对外界抵抗力强,部分菌在煮沸的条件下仍可存活数小时^[14]。芽孢杆菌的检出提示生产环节可能存在中药材清洗不彻底或处理不规范等问题。综合检出菌种多样性分析,污染可能来源于原料、生产环境及人员操作等多种途径,反映了生产流程中的微生物控制措施仍有不足,企业需加强环境监控与流程管理。

随着微生物鉴定技术的迅猛发展,传统依赖培养为基础的检验技术虽能满足特定控制菌的检测需求,但其局限性日益明显,难以应对生产过程中污染微生物的快速准确鉴定。近年来,多种先进技术(如生化鉴定系统、脂肪酸鉴定系统、傅里叶变换红外光谱技术、MALDI-TOF MS技术以及高通量测序技术等)已被广泛应用于微生物群落多样性研究及快速鉴定领域,显著提升了微生物鉴定效率与准确性^[15-17]。本研究采用两种不同原理的微生物方法对鲍曼不动杆菌进行鉴定,VITEK 2 Compact 鉴定系统与质谱鉴定系统的鉴定结果一致。VITEK 2 Compact 鉴定系统可通过40多项生化反应自动完成鉴定,但耗时较长且常需辅以补充试验;而MALDI-TOF MS技术是基于细菌蛋白质特征谱峰进行分析,质谱鉴定系统可在数分钟内完成种属鉴定,具有准确、快速和低成本等优势,适用于微生物污染的药品对大批量菌株进行初步鉴定。

杜仲壮骨胶囊的用药人群包括老年人和免疫功能低下者,这类人群属于易感人群,而该药品以酒或温开水送服,无需煎煮,不具备杀灭微生物的过程。虽然鲍曼不动杆菌经口服给药从而直接致病风险相对较低,但仍不能完全排除。考虑到鲍曼不动杆菌自身的致病性与耐药性,而药品本身抑菌能力有限,存在一定的用药安全风险。因此,建议杜仲壮骨胶囊生产企业将鲍曼不动杆菌列为不可接受微生物实施重点监测,进一步提升微生物检验技术,逐步建立微生物污染数据库,加强全流程微生物污染控制,推动质量控制模式从事后检验向过程监控与风险预警的转变,更有效地提

高药品质量管理。

参考文献

- [1] 袁步娟,仇其原. HPLC法同时测定杜仲壮骨胶囊中3种皂苷的含量[J]. 药学研究, 2016,35(03):148-150.
- [2] 吴宏扬. 探讨中成药微生物污染的影响因素及监测[J]. 中国卫生产业, 2018,15(30):151-152.
- [3] 江伟伶,姜丽君,何绍萍,等. 中成药微生物污染状况检测分析[J]. 实验室检测, 2025,3(04):104-106.
- [4] 顾琳,高艳,赵剑虹,等. 鲍曼不动杆菌耐药基因与耐药表型的一致性分析[J]. 中国人兽共患病学报, 2025,41(06):617-622.
- [5] 王以琴,李杰,陈伶俐. 鲍曼不动杆菌生物被膜形成与耐药机制研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2024,19(08):985-989.
- [6] 侯昊,李家吉,朱辉煌,等. 鲍曼不动杆菌生物膜相关蛋白单克隆抗体的制备及初步应用[J]. 中国生物制品学杂志, 2024,37(04):441-446.
- [7] 兰珍珠,杨媛媛,林燕青,等. 2019—2023年闽西地区某三甲医院鲍曼不动杆菌分布及耐药性变迁[J]. 福建医药杂志, 2025,47(04):34-38.
- [8] 史欣玥,张定宇. 鲍曼不动杆菌相关耐药机制及新型治疗手段[J]. 西南医科大学学报, 2025,48(01):97-104.
- [9] 董爱民. 2020—2022年鲍曼不动杆菌院内感染分布情况及耐药性分析[J]. 中国医药指南, 2023,21(26):108-111.
- [10] 李婷,陈婷. 2021—2023年某院鲍曼不动杆菌对常用抗菌药物的耐药检测结果[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2024,30(12):2208-2209.
- [11] 章越琪,王红萍,徐利威,等. 2018—2022年鲍曼不动杆菌感染情况及耐药性分析[J]. 浙江临床医学, 2024,26(05):735-737.
- [12] 张党馨,王岩,王海涛. 1例铅黄肠球菌尿路感染的用药分析[J]. 药物流行病学杂志, 2023,32(09):1076-1080.
- [13] 王莉,何哲,何福聪,等. 阴沟肠杆菌临床分布及耐药性分析[J]. 医药前沿, 2025,15(33):139-142.
- [14] 严卓彦. 特异性PCR及MLST法对中成药常见污染芽孢杆菌的鉴定及溯源研究[J]. 现代中药研究与实践, 2024,38(05):7-13.
- [15] 李辉,余萌,刘立科,等. 现代微生物鉴定技术在药品质量控制中的应用研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2021,52(03):312-319.
- [16] 洪亮,潘映秋,卢启寰,等. 基于多种微生物鉴定技术的制药企业环境微生物鉴定结果分析和应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2023,40(21):3019-3026.
- [17] 吴宏扬. 探讨中成药微生物污染的影响因素及监测[J]. 中国卫生产业, 2018,15(30):151-152.