

· 实验研究 ·

甲基纤维素滴眼液使用和存放过程中的微生物监测分析

宫瑞中 张红 王丽 王峻峰 王婧 张琳 冀明

【摘要】 背景 目前大多数滴眼剂为多剂量包装,为保证滴眼液在使用中的安全性,对滴眼液瓶开启后使用过程中的微生物相关研究很有必要。**目的** 研究甲基纤维素(MC)滴眼液开启后在社区常温、社区冷藏及病区常温 3 种环境下使用和存放时微生物污染情况及保持无菌的时间。**方法** 将 MC 滴眼液按照模拟试验的温度、湿度和污染指数等环境的不同分为社区常温组、社区冷藏组和病区常温组,每个环境组取含或不含防腐剂尼泊金乙酯的 MC 滴眼液各 200 支,其中分为启封药物和不启封药物。由专业人员开启滴眼液瓶并标注开启时间,模拟点眼操作每次 1 滴,每日 3 次,每次药液空气中暴露时间为 5~10 s,用后分别在相应环境中存放。分别于药瓶开启后 1、2、3、4、5、6、7、8、9 和 10 d 的 8:00 取样,由同一检验员进行细菌培养和真菌培养,并通过全自动微生物分析系统进行菌种鉴定。**结果** 药瓶开启后社区常温组、社区冷藏组和病区常温组无防腐剂启封药细菌阳性率均在 30% 左右,而未启封药物未见微生物生长。药瓶开启后 10 d,社区常温组、社区冷藏组和病区常温组无防腐剂的启封药细菌培养阳性率分别为 30%、32% 和 36%,而含防腐剂药物的启封药细菌阳性率分别为 15%、19% 和 23%,组内比较差异均有统计学意义($\chi^2 = 6.452, 4.448, 4.063$, 均 $P < 0.05$);根据 Scheffé 法计算社区常温组与社区冷藏组、病区常温组与社区冷藏组以及病区常温组与社区常温组间无防腐剂启封药细菌阳性率差值的 95% 可信区间(CI)分别为 -0.166~0.126、-0.110~0.190 和 -0.088~0.208,而含防腐剂启封药细菌阳性率差值的 95% CI 分别为 -0.159~0.079、-0.089~0.169 和 -0.043~0.203,尚不能认为不同环境间差异有统计学意义。培养的微生物经鉴定分别为藤黄微球菌、鲁氏不动杆菌、枯草芽孢杆菌、抗辐射不动杆菌、香味菌和木糖葡萄球菌。**结论** 防腐剂尼泊金乙酯可以降低 MC 滴眼液使用过程中的微生物污染率;滴眼液的常见使用环境对 MC 滴眼液的微生物污染情况无明显影响。MC 滴眼液污染的菌群均属于大气、土壤等环境菌种,并非眼部常见致病菌。

【关键词】 滴眼液; 药物污染; 药品保存; 细菌/分离和纯化; 甲基纤维素滴眼液; 杀菌防腐剂; 尼泊金乙酯

Microbial monitoring analysis of methylcellulose eye drops during use and storage Gong Ruizhong, Zhang Hong, Wang Li, Wang Junfeng, Wang Jing, Zhang Lin, Ji Ming. Department of Pharmacy, Shanxi Eye Hospital, Taiyuan 030002, China

Corresponding author: Gong Ruizhong, Email: ykyjk@163.com

[Abstract] Background It is imperative for the microbial monitor after opening the bottle of eyedrops in order to ensure the safety during use of ophthalmic solutions with multi-dose packaging. **Objective** This study was to research the microbiological properties and sterile duration of methylcellulose (MC) eye drops in three common environmental conditions, including room temperature condition of community, refrigeration condition of community and room temperature condition of hospital. **Methods** MC eye drops were assigned to the community room temperature group, community refrigeration group and hospital room temperature group, and 200 bottles of MC eye drops with or without ethylparaben were collected in each group, including sealed or unsealed drugs at average. The containers of all the eye drops were opened and the opening times were record. The drugs was administered 1 drop for 3 times per day, with the opening period for 5-10 seconds. Then the drugs were preserved in different environments based on grouping. Microbial isolation and purification were performed by the same lab technician at 8:00 from 1 through 10 days after

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2015.09.010

基金项目: 山西省科技厅基金项目(20120313024-8)

作者单位: 030002 太原, 山西省眼科医院药剂科

通信作者: 宫瑞中, Email: ykyjk@163.com

opening of drugs with automatic microbial analyzer. **Results** In the unsealed MC eye drops without ethylparaben, the bacterial positive rates were about 30% in the community room temperature group, community refrigeration group and hospital room temperature group, but no microbial colony was seen in the sealed eye drops. Ten days after opening of containers, the bacterial cultured rates were 30%, 32% and 36% in the eye drops without ethylparaben in the community room temperature group, community refrigeration group and hospital room temperature group, and those in the eye drops with ethylparaben were 15%, 19% and 23%, respectively, showing significant differences between the eye drops with and without ethylparaben ($\chi^2 = 6.452, 4.448, 4.063$, all at $P < 0.05$). The 95% confidence interval (CI) of difference values of intergroup bacterial rates were $-0.166-0.126$, $-0.110-0.190$ and $-0.088-0.208$ between the community room temperature group and the community refrigeration group, between the hospital room temperature group and the community refrigeration group, between the hospital room temperature group and the community room temperature group respectively in the unsealed eye drops without ethylparaben, and those in the unsealed eye drops with ethylparaben were $-0.159-0.079$, $-0.089-0.169$ and $-0.043-0.203$ respectively, indicating insignificant differences among the groups. Cultured bacteria were identified as *Micrococcus luteus*, *Acinetobacter lwoffii*, *Bacillus subtilis*, *Acinetobacter radioresistens*, *Myroides* and *Staptococcus xylosus*. **Conclusions** Ethylparaben can reduce the contamination rate of microorganisms after opening of MC eye drops. Three environmental conditions do not play an influence on microbial contamination of MC eye drops after opening. The bacteria of contaminated eye drops appear to be common microorganisms in atmosphere and soil, rather than eye common pathogens.

[Key words] Ophthalmic solutions; Drug contamination; Preservatives, pharmaceutical; Bacteria/isolation & purification; Methylcellulose eye drops; Antibacterial preservative; Ethylparaben

眼科常用药物剂型为滴眼剂,其安全性一直受到关注^[1]。滴眼剂的有效期指药品未开启状态下的有效保存期限,而容器开启后药物的合理使用期限却鲜有研究。绝大多数药物的滴眼液为多剂量包装,容器开启后容易被空气中的微生物污染,成为眼部感染的潜在原因^[2-3]。为保证滴眼液在使用中的安全性,对滴眼液瓶开启后使用过程中的微生物相关研究很有必要。本研究中采用微生物直接接种培养法观察含或不含防腐剂尼泊金乙酯的甲基纤维素(methyl cellulose, MC)滴眼液在病区常温、社区常温和社区冷藏等3种环境中进行细菌和真菌检查并进行菌种鉴定。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

金黄色葡萄球菌[CMCC(B)26003]、大肠埃希菌[CMCC(B)44102]、枯草芽孢杆菌[CMCC(B)63501]、生孢梭菌[CMCC(B)64941]、白色念珠菌[CMCC(F)98001]、黑曲霉[CMCC(F)98003]及铜绿假单胞菌[CMCC(B)10104](以上菌种均由中国食品药品检定所提供,均为第3代)。营养琼脂培养基(批号:12330)、营养肉汤培养基(批号:1203122)、硫乙醇酸盐培养基(批号:1304102)、玫瑰红钠琼脂培养基(批号:120410)、改良马丁培养基(批号:120515)、改良马丁琼脂培养基(批号:120113)(中国食品药品检定所);规格10 ml的含尼泊金乙酯MC滴眼液(批号:20130603)、规格10 ml的无尼泊金乙酯MC滴眼液

(批号:20130607)(山西省眼科医院制剂室)。HTY-2000A型智能集菌仪、一次性全封闭集菌器(杭州高得医疗器械有限公司);SPX-250B-Z型生物化学培养箱、MJX-205B-Z型霉菌培养箱(上海博迅实业有限公司);MLS-3780高压蒸汽灭菌器(日本三洋电机株式会社);CX21 FX1型光学显微镜(日本Olympus公司)、VITEK2-compact全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组及取样 根据药物使用环境不同分为病区常温组、社区常温组和社区冷藏组,3种环境的室温分别为 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 、 $26 \sim 28^\circ\text{C}$ 和 $5 \sim 8^\circ\text{C}$,相对湿度分别为65%~68%、62%~66%和60%~65%,实验期间空气污染指数为45~129。每组无防腐剂MC滴眼液和含防腐剂MC滴眼液各200支,每组均设不启封的药物作为对照(表1)。MC滴眼液容器开启后标注开启时间,模拟使用药物每次1滴,每日3次,每次使用后旋紧瓶盖,在相应环境中存放。模拟点眼操作均由专业技术人员完成,按无菌要求均做到用药前洗手、滴眼液容器与眼不接触、用药后拧紧瓶盖、空气中暴露时间控制在 $5 \sim 10\text{ s}$ (从开盖到闭盖)等。分别于药瓶开启后1、2、3、4、5、6、7、8、9和10 d的8:00取样,每次取启封和未启封滴眼液各10支,共取10次,取样后细菌培养和真菌培养均由同一检验员进行。

1.2.2 微生物的监测 精密量取样品溶液2 ml接种于硫乙醇盐流体培养基和改良马丁培养基,分别置于

35 ℃ 和 25 ℃ 恒温箱中培养,连续 14 d 观察有无细菌和真菌菌落。用无菌接种环取培养物,在相应的培养基平板上划线分离单克隆进行培养,观察是否具有典型的菌落形态,然后选取单克隆,革兰染色后光学显微镜下观察其染色特性及菌落形态,并通过全自动微生物分析系统进一步鉴定。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行统计分析。本研究中测量指标的计数资料用率进行表达,不同组间细菌培养阳性率的差异比较采用 χ^2 检验。根据 Scheffé 法计算阳性率之差的 95% 可信区间 (confidence interval, CI)。采用双尾检测法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同处理组滴眼液样本微生物阳性率的比较

社区常温组、社区冷藏组和病区常温组无防腐剂的启封药物细菌阳性率均在 30% 左右,而未启封药物未见细菌生长。随着药瓶开启时间的延长,MC 滴眼液中细菌阳性率逐渐升高,而未启封 MC 滴眼液在培养 14 d 内均未检出细菌或真菌(表 1)。启封的药瓶开启后 10 d 滴眼液样本细菌培养结果为阳性,真菌培养结果为阴性。社区常温组无防腐剂的启封药中有 1 支滴眼液在药瓶开启后 3 d 取样,培养 2 d 时显示细菌培养结果阳性,含防腐剂药在开启使用后 5 d 取样,培养 8 d 时显示细菌阳性。社区常温组无防腐剂药物启封后 10 d 内细菌培养阳性率高于含防腐剂启封药,差异有统计学意义($\chi^2=6.452, P<0.05$);社区冷藏组无防腐剂启封药物细菌培养阳性率高于含防腐剂启封药,差异有统计学意义($\chi^2=4.448, P<0.05$);病区常温组无防腐剂启封药物细菌培养阳性率高于含防腐剂启封药,差异有统计学意义($\chi^2=4.063, P<0.05$)(表 2)。

药物开启后 10 d 内,不同组及采用不同处理的药物间细菌阳性率进行多重比较,根据 Scheffé 法计算得到的 95% CI 均包含 0,表明社区常温组、社区冷藏组及病区常温组无防腐剂滴眼液开启后的细菌培养阳性率差异无统计学意义,而含防腐剂滴眼液细菌培养阳性率尚不能认为差异有统计学意义(表 3,4)。

表 1 药瓶开启后 10 d 各组微生物阳性率的比较 (%)

组别	样本量 (支)	无防腐剂		含防腐剂	
		启封药	未启封药	启封药	未启封药
社区常温组	100	30	0	15	0
社区冷藏组	100	32	0	19	0
病区常温组	100	36	0	23	0

表 2 无或有防腐剂启封药开启后 10 d 细菌培养阳性率的比较 (%)

药物	样本量(支)	社区常温组	社区冷藏组	病区常温组
无防腐剂	100	30	32	36
有防腐剂	100	15	19	23
χ^2		6.452	4.448	4.063
P		<0.05	<0.05	<0.05
(χ^2 检验)				

表 3 不同组间无防腐剂启封药物的细菌阳性率差值

组别	样本量(支)	差值	95% CI
社区常温组与社区冷藏组	100	-0.02	-0.166-0.126
病区常温组与社区冷藏组	100	0.04	-0.110-0.190
病区常温组与社区常温组	100	0.06	-0.088-0.208
注:CI:可信区间			

表 4 不同组间含防腐剂启封药物的细菌阳性率差值

组别	样本量(支)	差值	95% CI
社区常温组与社区冷藏组	100	-0.04	-0.159-0.079
病区常温组与社区冷藏组	100	0.04	-0.089-0.169
病区常温组与社区常温组	100	0.08	-0.043-0.203
注:CI:可信区间			

2.2 细菌种类的鉴定

培养的细菌经分离鉴定为藤黄微球菌、鲁氏不动杆菌、枯草芽孢杆菌、抗辐射不动杆菌、香味菌和木糖葡萄球菌等,均属于在大气、土壤等环境中生长繁殖的菌种,部分是条件致病菌。

3 讨论

3.1 本研究采用的方法学依据

依据《中国药典》2010 年版二部附录 XIH 无菌检查法,目前常采用直接接种法和薄膜过滤法对 MC 滴眼液进行无菌检查^[4-5]。MC 滴眼液为无色、微黏稠、澄明的液体,薄膜过滤法不易操作,而直接接种法操作方便,且可定量计算微生物阳性率,因此本研究中采用直接接种法对 MC 滴眼液样本进行微生物培养。

3.2 药物分组的设置

MC 滴眼液防腐剂是尼泊金乙酯,无防腐剂滴眼液易受到外界空气中的微生物污染^[6-7],而长期使用含防腐剂的滴眼液会对角膜造成一定程度的损伤^[8],因此若确保滴眼液在开启后能无菌保存,则应谨慎添加尼泊金乙酯。MC 滴眼液主要用于治疗干眼,而目前干眼患者的发生率呈逐渐增多的趋势,炎症、高热、过敏、风湿病和手术等因素均可导致干眼,而使用污染的滴眼液易引起眼部感染^[9],因此滴眼液的适宜保存

环境至关重要。本研究中设置了 3 种常见的使用环境,包括社区常温、社区冷藏和病区常温环境,以寻求能够减少滴眼液污染的最适宜环境。

3.3 模拟实验中滴眼液的用法和用量

一般的滴眼液每滴约为 25 ~ 30 μl ,而结膜囊的泪液容量最多为 10 μl ,实际上只有较少的滴眼液保留在眼结膜囊内,因此常规治疗每次只需 1 滴滴眼液即可^[10],多余的药物可能溢出或沿鼻泪管流向鼻腔,对患者产生药物刺激,影响眼表的有效药物浓度。因此本研究模拟滴眼液的常规用法和用量,即每次 1 滴,每日 3 次。整个实验持续 10 d,滴眼液药瓶共打开 30 次。

3.4 MC 滴眼液开启后保持无菌状态的时间

本研究中未启封的对照药 10 d 内均未检出细菌或真菌,有或无防腐剂滴眼液在开启后保持无菌的时间分别为 4 d 和 48 h。

3.5 尼泊金乙酯对 MC 滴眼液微生物污染的影响

在社区常温组、社区冷藏组和病区常温组 3 种环境下,含防腐剂 MC 滴眼液微生物污染的阳性率均明显低于无防腐剂 MC 滴眼液,提示防腐剂可抑制 MC 滴眼液中微生物的生长,从而减少污染。因此,MC 滴眼液配制中有必要加入适量尼泊金乙酯。

3.6 环境对 MC 滴眼液使用过程中微生物污染的影响

在社区常温组、社区冷藏组和病区常温组 3 种环境中,含防腐剂的启封药微生物的阳性率与无防腐剂的启封药比较差异均无统计学意义,因此尚不能认为 3 种环境对 MC 滴眼液开启后的微生物污染有影响。本研究中所采用的滴眼液瓶材质为低密度聚乙烯,密封性良好,可排除冰箱存放时空气污染的可能性。社区冷藏组滴眼液在使用过程中温度控制在 5 ~ 8 $^{\circ}\text{C}$,不适宜微生物的生长和繁殖,理论上微生物培养阳性率应该最低,但由于 MC 滴眼液的主要成分为甲基纤维素,属于高分子化合物,冷藏保存后可能由于滴眼液瓶中空气热胀冷缩,在瓶口产生泡沫,反而使滴眼液与空气的接触面积增大,从而增加了滴眼液微生物污染的可能性。医院环境中空气中病原微生物多于其他公共场所,微生物污染的可能性大^[11]。本研究中选取的社区常温环境平均温度比病区约高 2 $^{\circ}\text{C}$,温度较高,也会增加感染的可能性,因此病区常温组与社区常温组的微生物阳性率比较差异无统计学意义。

滴眼液在使用过程中受到污染时会增加患者发生严重眼部感染的风险,目前已有滴眼液被微生物污染

后导致角膜感染,甚至溃疡和穿孔的报道^[12]。尼泊金乙酯的添加可降低 MC 滴眼液中微生物培养的阳性率,临床上使用 MC 滴眼液的环境温度为 5 ~ 28 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 60% ~ 68% 时存放 4 d 内无菌生长,但后期可有细菌生长。临床使用多剂量包装的滴眼液,如 MC 滴眼液时,即使每次使用时滴眼液瓶口与眼部严格不接触,患者局部点眼也有感染的可能,感染菌群属于大气和土壤等环境中的常见菌种,而并非是眼部的常见致病菌。由于本实验旨在排除滴眼液使用过程中眼对药物造成污染的前提下来研究不同环境对滴眼液保存的安全性,因此检测出的菌种与眼部常见致病菌存在一定差异。对于某些物理化学性质不稳定并易受空气、光线、温度和湿度等外界因素影响的滴眼液,建议使用单剂量包装。

参考文献

- [1] 陈祖基. 滴眼液中防腐剂的利弊及其使用对策[J]. 中华实验眼科杂志, 2013, 31 (11): 1003-1005. doi:10.3760/cma.j.issn.2095-0160.2013.11.002.
- [2] 吴伟, 何梅凤, 马淑媚. 滴眼液的潜在风险及合理使用探讨[J]. 中国实用医药杂志, 2010, 5 (26): 50-51. doi:10.3969/j.issn.1673-7555.2010.26.029.
- [3] 孙旭光, 高时运, 王智群. 滴眼瓶颈口微生物污染可能性的临床观察[J]. 眼科, 1999, 8 (4): 238.
- [4] 梁丽娟, 姜起栋, 黄薇, 等. 瑞格列奈微生物限度检查方法的建立[J]. 中国医院药学杂志, 2012, 32 (16): 1314-1318. doi:10.13286/j.cnki.chinpharm.2012.16.028.
- [5] Kodym A, Zawisza T, Taberska J, et al. Physicochemical and microbiological properties of eye drops containing cefuroxime[J]. Acta Pol Pharm, 2006, 63 (4): 293-299.
- [6] Chédru-Legros V, Fines-Guyon M, Chérel A, et al. In vitro stability of fortified ophthalmic antibiotics stored at -20 degrees C for 6 months[J]. Cornea, 2010, 29 (7): 807-811. doi:10.1097/ICO.0b013e3181c32573.
- [7] Rojanarata T, Tankul J, Woranaipinich C, et al. Stability of fortified cefazolin ophthalmic solutions prepared in artificial tears containing surfactant-based versus oxidant-based preservatives[J]. J Ocul Pharmacol Ther, 2010, 26 (5): 485-490. doi:10.1089/jop.2010.0036.
- [8] 林文中, 何伟, 黎华, 等. 抗青光眼滴眼液中防腐剂对眼部影响[J]. 中国实用眼科杂志, 2013, 31 (6): 664-667. doi:10.3760/cma.j.issn.1006-4443.2013.06.004.
- [9] 陆文. 80 例门诊干眼病病因调查分析[J]. 中国伤残医学, 2013, 21 (10): 417-418. doi:10.3969/j.issn.1673-6567.2013.10.368.
- [10] 赵堪兴, 杨培增. 眼科学[M]. 8 版. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 30.
- [11] 杨汝文. 医院门诊部空气微生物监测分析[J]. 检验医学与临床, 2006, 3 (5): 225-226.
- [12] Rahman MQ, Tejwani D, Wilson JA, et al. Microbial contamination of preservative free eye drops in multiple application containers[J]. Br J Ophthalmol, 2006, 90 (2): 139-141.

(收稿日期: 2015-03-19)

(本文编辑: 尹卫靖 杜娟)