

# 328 株脑膜炎双球菌鉴定体会

尹祖善

李焱全

(湖北省襄樊市卫生防疫站) (湖北省襄樊市铁路分局卫生防疫站)

解决检查流行性脑脊髓膜炎(下称流脑)的带菌问题,对预测流脑感染的变化有重要意义。但影响检查带菌的因素比较复杂,所以严格的检验技术和方法是个关键问题。近年来,为了提高病菌的检出率,对检验技术进行了不少的研究。我们于1976年12月对旅客进行了流脑病原菌的检查。今将得到的328株菌检验鉴定结果汇报如下:

## 材 料 和 方 法

328株菌全部从带菌者的悬雍垂后鼻咽腔部分离而得。分离时采用卵黄抗菌素培养基(下称EPV)。标本在现场接种于EPV上,经划线分离后,在不保温条件下2—8小时内带回实验室,经37℃CO<sub>2</sub>环境培养18—22小时。从EPV上挑选两个可疑菌落,再点种于卵黄抗菌素复合双糖发酵平板上(下称EPV糖平板),在CO<sub>2</sub>环境下培养24小时,观察其生化反应,同时以玻片凝集法进行血清学分群试验,在凝集试验时作盐水对照,并以此盐水涂片作革兰氏染色,观察其形态,鉴定参照脑膜炎双球菌检验

规程的标准<sup>[1]</sup>。13种分组诊断血清系武汉生物制品研究所供给。

## 结 果

### 一、菌的形态

属革兰氏阳性双球菌。其中多数为典型的双球菌,染色后看不到荚膜,不产生芽孢,菌体呈肾形,排列整齐,大小基本一致。极少数呈单球菌状态,染色不典型。少数菌出现衰退型的特大菌体(约比原菌大5—6倍,着色不匀)和菌体自溶现象。

### 二、生长特征

在EPV上菌落无色,半透明,光滑湿润有光泽,边缘整齐,圆形扁平,少隆起。直径一般在1—2毫米,也有超过2毫米或小于0.4毫米的,不产生色素。

### 三、生化反应

在EPV糖平板上(接种量约为0.4—0.6毫升)一般培养16—24小时;即能分解葡萄糖和

表 1 328 株菌血清学鉴定结果

血清学鉴定结果								
	B	C	1892	1916	1889	319	自凝	未定群
株数	263	8	7	3	4	1	11	6
百分比(%)	80.2	2.5	2.1	0.9	1.2	0.3	3.4	1.8

麦芽糖,产酸不产 $H_2$ ; 不分解蔗糖和乳糖。其中以培养 18 小时观察反应较满意; 16 小时观察发现少数菌对葡萄糖和麦芽糖分解不完全,颜色很浅; 超过 24 小时,部分菌体自溶死亡,影响结果的判断。

#### 四、血清学分群(见表 1)

表 1 说明, 328 株菌中以 B 群最多(占 80.2%), A 群次之(占 7.6%), 其他各群均为少数。另有 11 株(占 3.4%)除血清鉴定时盐水自凝外,其他特征无法与流脑菌区别,暂定为自凝群。另外 6 株(占 1.8%)的血清学鉴定,有多价凝集或不凝集现象,而与每一个分群血清均不发生凝集。因来不及转接观察,故暂定为“未定群”。

#### 五、采样时间和送检时间对检测流脑菌的影响(见表 2、3)

表 2 不同采样时间的检出结果

采样时间	清晨(未洗盥)	晚餐前
采样数(人)	691	109
检出数(人)	277	51
检出率(%)	40.1	46.8

表 3 691 例带菌者标本在不同送检时间的检出结果

送检时间(小时)	2 以内	4—6	8 以上
检查数(人)	160	340	191
检出数(人)	83	135	59
检出率(%)	51.9	39.7	30.9

表 2 指出, 晚餐前采样的检出率和清晨采样几乎一样, 两者之间的差异经统计分析是由于机遇所致( $P=1.31, P>0.01$ )。从表 3 看出, 以两小时内送检较为适宜(51.9%)( $X^2=15.82, df=2, P<0.01$ ), 8 小时以上送检(30.9%)检

出率会受到影响。

## 问题和讨论

用 EPV 检测流脑菌的方法, 仍在摸索之中, 通过对 328 株流脑菌的鉴定, 初步提出一些问题和体会。

1. 采样时间对检出率的影响: 过去通常认为标本最好在早晨未洗盥前采集, 否则会影响检出率。但通过实验(表 2)证明, 早晨和晚餐前的检出率一样。只要保证做到采样用的棉拭子直接涂抹口腔内悬雍垂后的鼻咽孔后壁粘膜, 并做到饭前采样, 则采样时间对流脑菌检出率的影响不大。

2. 送检时间对检出率的影响: 流脑菌对干燥特别敏感, 对低温环境较不敏感。通过实验观察到, 流脑菌标本在  $0^\circ\text{C}$  以下保存 6 小时, 检出率并不低于保温标本。在不保温条件下, 以 2 小时内送检较为适宜, 8 小时以后便影响阳性检出率(表 3)。

3. 使用 EPV 培养基提高了流脑菌的检出率, 本次试验平均为 41%。其原因估计可能由于 EPV 中所含的万古霉素对革兰氏阳性球菌有杀菌作用, 和所含的多粘菌素 B 对革兰氏阴性杆菌有抑菌或杀菌作用的缘故<sup>[2]</sup>。因而对口腔中的葡萄球菌、溶血性链球菌、肺炎双球菌以及从外界污染的大肠杆菌、绿脓杆菌、产气杆菌等杂菌, 起到暂时性的抑制和杀灭作用。从而使流脑菌得到充分的发育, 甚至获得极易辨认的纯培养。由此可见, 借助氧化酶试剂判定初代平板上的流脑菌落, 已无必要。但在观察中, 培养时间一定要掌握在 22 小时以内, 否则抗菌素遇热逐渐失效, 杂菌随之丛生, 菌落混杂。

4.  $\text{CO}_2$  培养问题: 流脑菌是好氧菌, 从人体分离到时, 该菌需在 10%  $\text{CO}_2$  及一定湿度的

环境中生长。当以点烛法供应  $\text{CO}_2$  时,培养容器里所置平板不要占去容器空间的一半,以保持 10%  $\text{CO}_2$  的环境;同时,在置 EPV 的容器中放入适量的湿棉球,可保持一定的湿度。

5. 生化反应是鉴别流脑菌的重要一环。就糖发酵培养基论,有的认为应具备反应灵敏,制备简便,不需要血清,不易污染和适用于基层进行生化筛选等优点。我们用葡萄糖、麦芽糖和乳糖、蔗糖两种 EPV 糖平板法做生化反应,观察时间可从 72 小时缩短至 16—24 小时,其中以 18 小时进行检测,结果较满意。由于该菌有较活泼的自溶酶(是一种不耐热物质), $60^\circ\text{C}$  加热 30 分钟即被破坏,因此,接种在 EPV 糖平板上,应于  $37^\circ\text{C}$  培养 18—22 小时为宜。培养时间和在室温放置时间均不宜过久,否则菌体容易自溶死亡。另外从 EPV 上挑取菌苔接种于 EPV 糖平板时,注意接种量要稍大些,否则影响

观察结果。

6. 血清学分析结果(中未发现 D 群。新群中未发现 1846、1911、18'

6. 血清学分析结果(中未发现 D 群。新群中未发现 1846、1911、18'	文 献
	[2,6,7]
7. 关于诊断血清问题,组诊断血清鉴定 328 株,在血清中保持一定比例,新群血清性能良好,玻片分离菌一般均能在 1 分钟左右凝于分群血清,定出群别。328 株菌中仅 1.8% 不能定群,其原因尚待进一步探讨。	[8]

## 参 考 文 献

- [1] 上海市卫生防疫站: 卫生防疫检验, p. 97—103, 上海科学技术出版社, 1964。
- [2] 上海第一医学院儿科医院革委会: 实用药物手册, p. 223—224, 上海人民出版社, 1971。