

无培养基增菌法分离牛乳中凝固酶阳性葡萄球菌

阎 倬 云

(开封市卫生防疫站,河南)

在由葡萄球菌感染并患乳腺炎病牛所分泌的牛乳中,是否能检出凝固酶阳性葡萄球菌,这与牛乳中含菌数的多少、采用的诊断方法以及乳样用量等都有一定关系。用常规法检验,乳样用量太少,对乳中含菌稀少的早期诊断不易获阳性分离,甚至延误诊断。若用量较大,则需用更多培养基,造成了人力、物力的浪费。

鉴于上述情况,我们用无培养基增菌法分离乳样中的凝固酶阳性葡萄球菌,并用此法诊断患乳腺炎病牛。试验证明,这一方法效果显著。

材 料 与 方 法

一、乳样

送检的乳样有两种。一种是供应市场饮用前未经加热的生乳,包括纯牛乳及牛、羊二者的混合乳,共检验 21 份。另一种是用以确定诊断牛乳腺炎的乳样,它是根据牛乳房出现的各种症状,如硬结、红肿,乳量减少,乳汁酸臭,乳色变黄,乳中含有不同程度的凝块或颗粒状物,以及牛的饮食量逐渐减少等采集的乳样用作受检对象。据此共查受检牛 37 头,取样 37 份。取样时先将乳房清洁、消毒,而后分别自“病态”和“正常”乳房各挤乳约 200 毫升于无菌瓶中。取样后于 2 小时内送检。

二、培养基

1. 对照用的常规增菌培养基: 用对葡萄球菌有高分离率的氯化锂高盐肉汤^[1]。

2. 氯化锂食盐瓶的准备: 称量氯化锂 0.6 克及氯化钠 10 克,倾入容量 150 毫升三角烧瓶中,加塞,包扎。蒸汽灭菌 15 分钟,取出后放烤

箱 40—50℃ 烤干,贮存备用。

三、常规增菌法

按一般程序检验。

四、无培养基增菌法

在无菌操作下,量取与对照同一乳样 100 毫升,倾入氯化锂食盐瓶中,振荡约 3 分钟后,置 37℃ 培养箱内,30 分钟后再振荡一次,使其中氯化锂及食盐完全溶解于牛乳中,其浓度分别为 0.6% 和 10%。

上述两种方法所接种的乳样在 37℃ 培养 24 及 48 小时后,于盐蛋琼脂平板^[2]上各划线分离一次。若第一次分离已获阳性结果时,可不再分离第二次。将生长物移种在羊血琼脂中,于 37℃ 培养 24 小时,观察溶血情况,并以此培养物作以下各项鉴定,视其生化反应。

1. 甘露醇发酵: 在 37℃ 培养一周。

2. 明胶液化: 在 37℃ 培养一周。

3. 凝固酶试验: 用兔血浆作试管法鉴定。

4. 卵磷脂酶试验: 由盐蛋琼脂上的生长物确定之。培养时间延长至 48 小时,以获得更清晰的结果。

5. 抗汞试验^[3]: 将混悬于肉汤中的受检菌株(约相当于生长 24 小时浓度),划线接种在新制备的含氯化汞(最终浓度为 1:27500)的蛋白胨琼脂培养基上,在 37℃ 培养 24—48 小时,观察是否有黑色菌落生长。

结 果 及 讨 论

一、两种增菌法分离乳样中含凝固酶阳性葡萄球菌的比较

用常规增菌法及无培养基增菌法分离牛乳

及牛、羊混合乳乳样共 21 份。用无培养基增菌法分离出含凝固酶阳性葡萄球菌的有 8 份,在此 8 份牛乳中用常规法分离时,显阳性者只有 1 份,分离率为前者的 12.5%。其结果表明,无培养基增菌法比常规增菌法效果显著 ($X^2=6.92$, $P<0.01$)。

二、无培养基增菌法分离时间的比较

在受检的 37 份乳样中,用无培养基增菌法检出含凝固酶阳性葡萄球菌的有 16 份(亦即 16 头患牛)。接种乳样后,每经 24 小时分离一次,连续分离三次,结果见表 1。

表 1 无培养基增菌法分离乳样中凝固酶阳性葡萄球菌的时间比较

乳 样 (份)	分离阳性数 (份)	分离阳性率(%)	
		24 小时	48 小时
37	16	13(81.3)	3(18.7)

表 1 说明,乳样接种后 24 小时分离率较高(81.3%)。若第一次分离为阴性时,必须延长培养时间至 48 小时,再次进行分离,否则会减少阳性分离率,这是值得注意的。若在 48 小时仍未能分离出葡萄球菌,则说明为阴性结果,虽然延长至 72 小时,均未分离出葡萄球菌。

由以上结果可以看出,无培养基增菌法对分离乳样中凝固酶阳性葡萄球菌及诊断由葡萄球菌引起的牛乳腺炎,都显示较好的效果。

三、无培养基增菌法对牛乳腺炎早期诊断的作用

在检出葡萄球菌的 16 头患牛中,有一头是产犊后至乳检之间一个月内,发现厌食、消瘦及乳量减少,但乳房及乳汁均正常。曾多次用常规法检验乳样,均未能分离出凝固酶阳性葡萄球菌,在用无培养基增菌法先后两次乳检中,都获得了阳性而被确诊。此患牛经治疗全愈,泌

乳正常,再次乳检未发现葡萄球菌生长。由此也可说明,无培养基增菌法是分离葡萄球菌、诊断牛乳腺炎的一种较好方法。

四、无培养基增菌法的优点和使用中应注意的事项

无培养基增菌法不仅显著提高了乳样中葡萄球菌的分离率,而且乳样中不需添加任何培养基,既节省了人力、物力和时间,又可随需要增大受检乳样,使阳性分离率更高。此法中的氯化锂还可抑制多种杂菌生长。

此法主要依赖乳样中固有的营养物增殖葡萄球菌。所以乳样的迅速接种、培养及两种氯化物的迅速分解对分离葡萄球菌都很重要。尤其在炎热季节更不能忽视,否则会使乳中可能存在的杆菌优先增殖,而抑制了葡萄球菌的生长^[4,5]。

乳样接种后,在培养期间,应隔一定时间将瓶轻微振荡一次,使形成的乳脂膜破裂,破坏乳内厌氧环境,以利于葡萄球菌的增殖。分离时也应先振荡再取培养物划线接种。

五、凝固酶阳性葡萄球菌的生化特性

乳样中分离出的 16 株凝固酶阳性葡萄球菌的生化特性是:明胶液化阳性者 4 株(25%),抗汞试验均为阴性。甘露醇发酵、凝固酶、卵磷脂酶及溶血等 4 种试验均为阳性。由此说明,引起牛乳腺炎的葡萄球菌与引起人体化脓的葡萄球菌对汞的抗力有所不同。

参 考 文 献

[1] 阎倬云: 卫生研究,第 5 期, 336 页, 1977。
[2] Garantonis, L. M. et al.: *J. Path. Bacteriol.*, 86(1): 217, 1963.
[3] Smith, P. B.: *J. Bacteriol.*, 84(5): 1016, 1962.
[4] Trollor, J. A. et al.: *Appl. Microbiol.*, 11(1): 11, 1963.
[5] Trollor, J. A. et al.: *Appl. Microbiol.*, 11(2): 163, 1963.