

药品中绿脓杆菌检验法的改进

王光宝 朱启敏 张秋实

(甘肃省药品检验所,兰州市)

药品卫生条例中规定,凡滴眼剂和外伤用药均不得检出绿脓杆菌。但常用的检验方法,不够简便准确,本文对此作了一些研究改进,并试制了一种明胶十六烷三甲基溴化铵琼脂(简称 GCA)平板,用于常规检验。

材料与方法

1. GCA 平板培养基的配制: (1)配方(g): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 氯化镁(无水) 1.4, 硫酸钾(无水) 10, 明胶(BR, 上海产) 75, 琼脂 18—20, 1% 十六烷三甲基溴化铵水溶液 30ml, 甘油 10 ml, 蒸馏水 1000ml, 最终 pH7.0—7.2。(2)制法: 取牛肉膏、蛋白胨和盐类,放蒸馏水中微温使溶。用 NaOH 液调 pH 至 7.4,煮沸滤清补足液量。趁热加入甘油和十六烷三甲基溴化铵混匀。加明胶浸泡 15 分钟,再加琼脂于水浴中加热溶解,充分混匀。经 10 磅 15 分钟高压灭菌,冷至 50℃ 左右制成平板(注意,明胶和琼脂应充分混匀, pH 值不宜过高,不要多次加热,使用时平板要放正)。

2. 绿脓菌素的测试: (1)提取法(即改进法): 利用荧光色素不溶于氯仿,而绿脓菌素可溶,并在酸性时显粉红色的特性^[1],以 GCA 平板接种绿脓菌,经 37℃ 培养 24 小时(或再放室温一天),取一小块(0.5—1.0cm³)溶有蓝绿色素的琼脂,放在小量杯内加氯仿 2—3 ml,振摇 5 分钟。再将氯仿提取液移至另一小管内,滴加 1N 盐酸液约 0.5ml,振摇静置片刻,在白色背光下检视,上层液显粉红色时为阳性。(2)紫外线法: 是目前英、美药典里采用的方法^[2],分别取待检菌 PDP 和 PDF 培养基的平板培养物,置暗箱里在波长约 2500 Å 的紫外线下观测。前

者显蓝色反应的,为绿脓菌素阳性;后者显黄绿色荧光时,为荧光色素阳性。

3. 酶的测定: (1)氧化酶试验,将试剂直接滴加在待检菌落上,或用玻棒将菌苔移在滤纸片上测试,15 秒钟内显粉红色者为阳性;(2)细胞色素氧化酶试验,将待检菌落先移种至肉汤内,37℃ 培养 24 小时再加试剂,显蓝色者为阳性。将上述两法对比。

试剂: 每取 0.1g 二甲基对苯二胺盐酸盐,加在 10ml 蒸馏水内溶解即为氧化酶试剂(冰箱保存,变紫色时不得再用)。另以此液为甲液,再取 0.5g α-萘酚溶于 50ml 的乙醇内为乙液,临用时甲乙二液以 2:3 混合(体积比),此混合液作为细胞色素氧化酶的试剂。

4. 硝酸盐产气试验培养基: 取蛋白胨 10g、酵母膏 3g 加在 1000 ml 蒸馏水中,溶后调 pH 至 7.0。煮沸滤清,再加硝酸钾 2g 及亚硝酸钠 0.5g,溶解混匀装在管内,各加一支收集气体用的小倒管,10 磅 20 分灭菌备用。同时制成不加亚硝酸钠的,供对比试验。凡接种后 42℃ 培养 24h,待检菌生长并产气者为阳性。

试验结果

一、GCA 平板培养基的各项实验

1. 明胶液化反应及其用量的选择(见表1): (1)绿脓菌在加有明胶的琼脂平板上,菌落周围有明胶被液化的晕环,容易识别,当滴加硫酸铵饱和液时,液化环可显浊白色沉淀反应。(2)明胶用量以 6—9% 时较好,平板硬度适宜,在 37℃ 和 42℃ 环境中也不溶化,但明胶用量在 7.5% 时效果最好,绿脓菌的液化环比较清晰。

2. 绿脓菌素测试法的比较实验: (1)用不

表 1 明胶在 GCA 平板中的用量选择

| 明胶用量 试验结果 | | 2%琼脂中的明胶量 (g/100ml) | | | | |
|--------------|-----|---------------------|-----|-----|-----|-----|
| | | 不加 | 3 | 6 | 9 | 12 |
| 平板的软硬度 | 室温 | 正常 | 正常 | 稍软 | 较软 | 过软 |
| | 37℃ | 正常 | 不溶化 | 不溶化 | 不溶化 | 稍溶化 |
| | 42℃ | 正常 | 不溶化 | 不溶化 | 不溶化 | |
| 绿脓菌落状态 | | 正常 | 有晕环 | 有晕环 | 有晕环 | 液状 |
| 菌落的明胶液化环 | | 无 | 不清晰 | 清晰 | 清晰 | 混浊 |
| 硫胺白浊沉淀反应 | | —* | + | ++ | +++ | +++ |

* +、++、+++、—表示白浊沉淀反应的轻重及有无。

同来源的绿脓菌株，在 GCA 平板上接种培养后，挑选出扩散在琼脂里黄绿色及蓝绿色多少不同的各类平板，以肉眼观察、氯仿提取和紫外线法进行测试比较。结果如表 2 所示：凡肉眼可见色素的绿脓菌 GCA 平板，用氯仿提取加酸后，在白色纸片上观察，皆能看到微红或粉红色，比较灵敏，容易判别。但在紫外线下观察，由于平板中的色素多少和深浅不同，以及观察者的敏感情况不一，因而判定的结果常不确切一致，有时差别很大。

表 2 绿脓菌素测试法的比较结果

| 绿脓菌 GCA 平板培养物 | 肉眼直观 (蓝绿色素) | 氯仿提取法 | 紫外线法* |
|---------------|-------------|-------|-------|
| 1 | +++ | + | + |
| 2 | ++ | + | +, - |
| 3 | + | + | -, + |
| 4 | + | + | ± |
| 5 | — | — | — |

* 测试结果，常因色素多少及观察人不同而异，不能确切一致。

(2) 另外证明，在 GCA 培养基内加氯化镁、硫酸钾和甘油等，可促进绿脓菌素的加速产生。培养温度以 37℃ 较好，放室温 1—2 日色素产生的更好。但在 42℃ 产色缓慢，或者不产色。

3. 酶测定法的对比试验：大量对比氧化酶和细胞色素氧化酶的测定表明：前者方法简便、速度快，15 秒钟内出结果，如试剂新鲜、不接触金属，从未发现假阳性反应。但后者速度慢，效果差，时间越久越易出现假阳性。而且两种试剂性能基本相同，无任何特异性，可以通

用。

4. 绿脓菌在 GCA 平板上的菌落特征：用 7.5% 明胶的 GCA 平板，和不加明胶、氯化镁、硫酸钾和甘油的 CA 平板，接种产色能力不同的绿脓杆菌和大肠杆菌作对比。结果如表 3 所示：绿脓杆菌在 GCA 平板上的菌落特征比较显著，呈扁平不规则的蔓延生长，周围有明胶液化环，比原来的 CA 平板容易产生色素，更加容易挑选鉴别，性能明显改善。

表 3 绿脓菌在 GCA 平板上的菌落特征*

| 菌种 菌落特征 | 绿脓菌 1 号 | | 绿脓菌 2 号 | | 大肠杆菌 GCA 对照 |
|------------|---------|------|---------|------|----------------|
| | GCA | CA | GCA | CA | |
| 菌落形态 | 扁平蔓延 | 扁平蔓延 | 扁平蔓延 | 扁平蔓延 | 圆形整齐 |
| 蓝绿色素 | + | — | +++ | ++ | — |
| 明胶液化环 | +++ | — | +++ | — | — |
| 氧化酶试验 | + | + | + | + | — |
| 绿脓菌素测定** | + | — | + | + | — |

* 本表为 37℃24 小时培养结果。

** 绿脓菌素为氯仿法测定。

5. 常见细菌在 GCA 平板上的生长试验：结果如表 4。证明药品里常易污染的细菌如枯草杆菌、金黄色葡萄球菌和八叠球菌等，在 GCA 平板上大量涂抹皆不生长，表明它对这些革兰氏阳性菌抑制力很强。但大肠杆菌仍可少量生长，说明其它变形菌和粪产碱杆菌等也有可能生长，在常规检验中尚须注意，防止误认。

表 4 常见细菌在 GCA 平板上的生长结果*

| 菌种 | 绿脓杆菌 | 大肠杆菌 | 枯草杆菌 | 金黄色葡萄球菌 | 八叠球菌 |
|----------|------|------|------|---------|------|
| 细菌的生长多少 | +++ | ++ | — | — | — |
| 菌落明胶液化环 | ++ | — | — | — | — |
| 水溶性蓝绿色素 | ++ | — | — | — | — |
| 氧化酶测定结果 | + | — | — | — | — |
| 绿脓菌素测试结果 | + | — | — | — | — |

* 本表为 37℃48 小时培养结果。

二、绿脓菌的其它鉴别试验

有少数产色迟缓或不产色的绿脓杆菌，需增加其它鉴别试验才能确认。据国外经验^[1]，凡在加有十六烷三甲基溴化铵的平板上能够生

表 5 绿脓菌硝酸盐产气和 42℃ 生长试验*

| 生长结果 | 培养温度 | 绿脓杆菌 1 号 | | | | 绿脓杆菌 2 号 | | | |
|----------|------|----------|----|-----|----|----------|----|-----|----|
| | | 37℃ | | 42℃ | | 37℃ | | 42℃ | |
| | | 生长 | 色素 | 生长 | 色素 | 生长 | 色素 | 生长 | 色素 |
| 硝酸盐胨水 | | ⊕ | | ⊕ | | ⊕ | | ⊕ | |
| 亚硝酸盐胨水 | | ⊕ | | ⊕ | | ⊕ | | ⊕ | |
| GCA 中管斜面 | | +++ | ++ | ++ | — | +++ | ++ | ++ | + |
| CA 中管斜面 | | +++ | — | ++ | — | +++ | ++ | ++ | — |

* 本表为 24 小时培养结果，⊕、⊕ 表示细菌生长并产气。

长的无色菌落，经氧化酶试验阳性的革兰氏阴性杆菌，如果 42℃ 培养和液化明胶及硝酸盐产气等项鉴别试验皆为阳性时，可判为绿脓菌。为此，本试验又重点作了硝酸盐产气和 42℃ 培养试验。结果如表 5：（1）用硝酸钾或再加少量亚硝酸钠的胨水，接种绿脓菌在 37℃ 和 42℃ 培养，均在 24 小时内生长并产气。因此如将硝酸盐胨水接种待检菌，放在 42℃ 培养，两项鉴别试验可合并为一项进行，既简化又节约。（2）用

GCA 和 CA 斜面接种绿脓菌，在 $41 \pm 1^\circ\text{C}$ 培养 24 小时生长良好，但色素产生不良。

三、改进的检验法用于药品检验的结果

为考察实用效果，用 20 批种眼药水及中药蜜丸，取样稀释后各加入约 50 个绿脓活菌，按新的程序和方法作检测，结果如表 6。在 20 批种药品中，除两批抗菌消炎的药物外，18 批皆能顺利检出绿脓菌，证明效果尚好，一般 48 小时即出结果。

表 6 眼药水和中药蜜丸的绿脓菌检验结果

| 试验结果 药品名称 | GCA 平板分离培养(37℃, 24 小时) | | | | | |
|--------------|------------------------|---------------------|-------|---------|------|-----------|
| | 绿脓菌落 | 染色镜检 | 明胶液化环 | 氧化酶 | 绿脓菌素 | 42℃ 硝酸盐产气 |
| 地卡因眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 10" | + | + |
| 硫酸锌眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 12" | + | + |
| 利福平眼药水 | — | | | | | |
| 地奥宁眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 6" | + | + |
| 地奥宁眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 匹罗卡品眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 3" | + | + |
| 匹罗卡品眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 8" | + | + |
| 磺胺醋酰胺眼药水 | — | | | | | |
| 阿托品眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 3" | + | + |
| 阿托品眼药水 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 10" | + | + |
| 逍遥丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 归脾丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 归芪丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 八珍丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 清瘟解毒丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 补中益气丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 7" | + | + |
| 知柏地黄丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 6" | + | + |
| 香砂养胃丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 独活寄生丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 5" | + | + |
| 槟榔四消丸 | + | G ⁻ , 杆状 | + | + / 12" | + | + |

注：“+，—”表示有无或阳、阴性反应；+ / 5" 表示 5 秒钟显阳性反应。

讨 论

1. 绿脓菌素是绿脓菌的特有产物,可溶于水 and 氯仿,在培养基的琼脂中呈蓝绿色,酸性时变为粉红色,置紫外线下呈蓝色反应,在鉴别诊断上甚为重要,国外已将其列为必检项目^[2]。但绿脓菌也同时产生非特异的荧光色素,大多呈黄绿色,只溶于水,不溶于氯仿,在紫外线下显黄绿色荧光。由于这两种色素经常并存,须加鉴别。但后者肉眼可判清,前者则需理化检查。目前国内外使用的紫外线法检查绿脓菌素,需要贵重设备,不易推广。本文介绍的方法,利用两种色素的不同特性,研究了氯仿提取加酸测定法进行鉴别,证明比较简便准确,适宜推广。

2. 我们试制的 GCA 平板,由于内含适量明胶甘油和盐类,可使绿脓菌落周围直径显示明胶液化环,促进产生绿脓菌素,因而结合其它检查,大多数菌株在 24 小时内即可确诊。

3. 在 GCA 平板上,少数不产绿脓菌素的

可疑菌种,仍难和荧光假单胞菌(*P. fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*P. putida*)及洋葱假单胞菌(*P. cepacia*)及粪产碱杆菌(*A. faecalis*)等互相区别。因此,凡绿脓菌素阴性而氧化酶阳性的革兰氏阴性杆菌,至少应增加 42℃ 培养的硝酸盐产气试验,阳性者方可确诊,以免遗漏或误诊。

4. 建议绿脓杆菌的常规检查程序改为:取供检药品增菌液,用 GCA 平板分离培养后,挑选扁平不规则、有明胶液化环及蓝绿色素扩散的菌落,涂片镜检为 G⁻杆菌者,立即测氧化酶和绿脓菌素,皆呈阳性时即可判为绿脓菌。如有不产绿脓菌素和荧光色素的上述可疑菌落,可接种硝酸盐胨水在 42℃ 培养 24 小时,能生长并产气者,也可判为绿脓菌。

参 考 文 献

- [1] 桑原章吾、高桥昭三: 临床细菌学アトラス, 文光堂刊, 1977, p.112—131。
- [2] The Pharmacopeia of the United States of America, 19th. Rev. p.588—592, 1975.