

药品中绿脓杆菌的快速检验

刘庆增

王金兰

(河北省衡水地区药品检验所) (衡水卫生学校微生物教研室)

绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)是假单胞菌属的代表菌种,为革兰氏阴性杆菌。在自然界分布很广,空气、水、土壤、正常人的皮肤以及肠道、呼吸道都有存在。绿脓杆菌对人体有致病性,外伤、烧伤和眼科疾病常因绿脓杆菌的感染而病情加重。它是目前革兰氏阴性感染中最常见的菌种之一,严重时可导致败血症。药品卫生标准规定,滴眼剂及外伤用药不得含有绿脓杆菌。

绿脓杆菌在生长代谢过程中,能产生两种水溶性色素。一种是绿脓菌素(Pyocyanin),是一种蓝绿色的色素,有特殊的生姜味。它能溶于水和氯仿中,酸性时变为粉红色。绿脓菌素是绿脓杆菌的特异性产物,对于该菌的鉴别特别重要,国外亦将其列为必检项目。从自然界分离的绿脓杆菌中,99%的菌株产生色素。但也有产色迟缓或不产色的菌株。另一种为非特异性的荧光素(Fluorescin),为绿色荧光色素,可溶于水而不溶于氯仿。以氯仿作溶剂可将绿脓菌素和荧光素分离、鉴别^[1-3]。

绿脓杆菌的另一个特性,是在42℃时能正常生长;在硝酸盐胨水培养基内,能将硝酸盐还原为亚硝酸盐,并使后者分解而产生氮气。

氧化酶实验是绿脓杆菌的一个重要生化反应。所有绿脓杆菌,不论是否产生绿脓菌素,氧化酶试验均呈阳性。这是因为绿脓杆菌内含有丰富的氧化酶,在游离氧存在的情况下,能使试剂很快脱氢而氧化成有色的醌类化合物^[1,4]。

在目前发现的细菌中,奈氏菌属^[1]、产碱杆菌属、莫拉氏菌属以及黄色杆菌属^[3],氧化酶实验亦呈阳性。但这些菌属中的细菌很少,除奈

氏球菌外,正常人体及周围环境中极少见。这些细菌都不可能产生绿脓菌素,有的在42℃不能生长,有的不能分解亚硝酸盐,很易与绿脓杆菌区别。

根据以上绿脓杆菌的生化反应的分析,以下的结论是可以成立的。

1. 所有绿脓杆菌氧化酶试验均呈阳性,而绝大多数绿脓杆菌可以产生特异性的绿脓菌素,所以氧化酶及绿脓菌素均呈阳性的细菌可以判定为绿脓杆菌。

2. 对于极少数不产生绿脓菌素的绿脓杆菌,可用氧化酶试验及42℃培养的硝酸盐产气试验均呈阳性而得到证实^[3,4]。

材料与方法

(一) 原料^[1]

1. 胆盐乳糖(B·L)增菌液: 蛋白胨20g,氯化钠5g,磷酸氢二钾4g,磷酸二氢钾1.3g,牛胆盐1.3g,乳糖5g,蒸馏水1000ml。除乳糖、胆盐外,将上述其它成分混合加热溶解。调pH为7.2—7.4,过滤。加入乳糖、胆盐待溶后摇匀。试管分装,每管30ml。10磅20分钟灭菌。

2. 硝酸盐胨水培养基: 蛋白胨10g,酵母膏3g,硝酸钾2g,亚硝酸钠0.5g,蒸馏水1000ml。称取蛋白胨和酵母膏,加在蒸馏水中微温使溶。用5N氢氧化钠调节pH至7.0(最终pH应为6.8—7.0),煮沸滤清后补足液量,趁热加入硝酸钾和亚硝酸钠溶解混匀。分装在加有倒管的试管内,每管6—8ml,10磅20分钟灭菌。

3. 氧化酶试剂: 取1g二甲基对苯二胺盐酸盐,用100ml蒸馏水溶解。冰箱保存,变紫时

不宜再用,最好新鲜配制。

(二) 方法

1. 含菌药液的制备^[6]:

(1) 液体药物: 取其 1:10 无菌生理盐水 3ml 备检。

(2) 固体药物: 加无菌生理盐水使溶, 取其 1:10 的稀释液 10ml 于离心管中, 按无菌操作于 500 转/分离心 15 分钟。药渣沉于底层, 药中所污染菌均匀分布于上清液中, 取 3ml 上清液备检。

(3) 含抑菌成分的药物: 取 1:10 无菌生理盐水稀释液 10ml, 如(2)法操作, 使药渣沉于底层。吸取上清液, 移至另一离心管中, 3000 转/分离心 30 分钟, 则细菌沉于底层 1—2ml 内。弃去含有抑菌成分的上清液, 留底层 3ml 备检。抗生素等按药典中该药条款规定的方法处理后备检。

2. 对照菌液^[9]: 绿脓杆菌 10104, 取其 37℃ 18—20 小时新鲜肉汤培养物, 10 倍递增稀释至 10⁻⁶, 取 0.1ml 按琼脂平板表面涂抹法 (或取

10⁻⁷ 稀释液 1ml 按浇碟法) 进行活菌数测定。按每 ml 菌液内所含的活菌量, 取 50—100 个混入供试药中, 制取含菌药液, 进行对照检验。

3. 实验操作: 菌液培养: 取二管胆盐乳糖增菌液及一管硝酸盐胨水培养液, 分别加入用上述方法制备的含菌药液 3ml。前者 37℃ 培养 24 小时, 后者 42℃ 培养 24—48 小时。

4. 结果观察和判断: (1)、取胆盐乳糖增菌管, 观察绿脓菌素的生长及特殊气味。于管中加入 4ml 氯仿, 振摇 5 分钟。分取氯仿层并加入 1N 盐酸 0.5ml, 振摇, 如上层的稀盐酸液显粉红色, 则绿脓杆菌试验结果阳性。

(2) 取另一管胆盐乳糖增菌液, 加入新鲜的氧化酶试剂 2—3 滴。如 30 秒钟内增菌液呈红色, 则氧化酶试验结果阳性。

(3) 取硝酸盐胨水培养管, 有细菌生长, 小倒管中有气体产生者, 则产气试验结果阳性。

如果上述结果(1)、(2)均为阳性, 或虽 (1) 为阴性而(2)、(3)均为阳性时, 可判定药品中含有绿脓杆菌。

表 1 用不同剂型的药物检验绿脓杆菌

药物名称	加入菌数 (个)	处 理 方 法	胆盐乳糖增菌液		42℃ 培养 硝酸盐产气
			绿脓菌素	氧化酶	
绿脓杆菌液	20	直接加入培养基中	+	+	+
绿脓杆菌液	50		+	+	+
无菌生理盐水	3ml		—	—	—
阿托品注射液	60	取 2000 个细菌混入 10ml 药液中, 稀释至 100ml, 取 3ml 检验	+	+	+
氯化钠注射液	60		+	+	+
匹罗卡品眼药水	60		+	+	+
安乃近片	90	取 300 个细菌混入 1g 药粉中, 稀至 10ml, 按 (2) 离心, 取 3ml 上清液检验	+	+	+
巴比妥片	90		+	+	+
A.P.C 片	90		+	+	+
牛黄上清丸	100	取 300 个细菌混入 1g 药丸中, 稀至 10ml, 按 (3) 离心, 从底层液 3ml 中取 1ml 检验	+	+	+
附子理中丸	100		+	+	+
羚壳解毒丸	100		+	+	+

结果与讨论

我们依据上述方法,分别于不同剂型的药物中混入 50—100 个绿脓杆菌,并制备成含菌药液,进行绿脓杆菌的检验。用直接加入标准菌液及无菌空白液,作对照检验,结果见表1(检查药品时用制备的含污染细菌的药液直接培养观察)。

1. 绿脓杆菌是需氧或兼性厌氧菌,营养条件要求不高,在普通培养基上生长良好。将药液接种于胆盐乳糖培养基中,绿脓杆菌可得增菌而革兰氏阳性菌却被抑制。这就为绿脓杆菌的检出提供了保证,并避免了其它菌的干扰。

2. 绝大多数绿脓杆菌能产生绿脓菌素,因而可因(1)、(2)试验结果阳性而被检出。考虑极个别的菌株有可能不产生绿脓菌素,所以当(1)阴性时,要加作 42℃ 培养硝酸盐产气试验。以便和氧化酶试验阳性的荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌(*Ps. putide*)、洋葱假单胞菌 (*Ps. cepacia*)、马鼻疽杆菌 (*Ps. mallei*) 以及产碱杆菌属 (*Alkaligenes*)、莫拉氏菌属 (*Moraxella*) 的细菌区别^[3]。

3. 药品卫生检验方法规定,取样品制成 1:10 的稀释液直接增菌培养。我们认为这种方法对于液体药物是方便可行的。而对于固体药物最好取其稀释液的低速离心(500转/分)的上清液,对于有抑菌成分的药物,则取其上清液的高速离心(3000 转/分)的沉降液。这样能使药物中污染的细菌与药物以及抑菌成分分离,从而

避免了药物本身对菌检的干扰。该法的细菌回收率一般为30—40%,但检出率较高,从加几个菌到上千个菌均能检出^[6]。试验过程中,药液被稀释了若干倍,而绿脓菌素和氧化酶试验的变色又很明显,所以药物本身的颜色不会对检验结果产生影响。必要时可作空白对照或与原药物稀释液对照。

4. 自然界中(1)实验阴性,而(2)、(3)两项实验均呈阳性的细菌还有斯氏假单胞菌 (*Ps. stutzeri*)和类鼻疽杆菌 (*Ps. pseudomallei*)两种。但因这两种细菌在周围环境中存在甚少,污染药品的可能性极小,而绝大多数绿脓杆菌产生绿脓菌素故很易区分,应用上述方法不会造成假阳性结果。如有必要可用 SS 培养基进行鉴定,这两种菌在 SS 培养基上不能生长,而绿脓杆菌则生长良好^[3]。

该方法利用了两种培养基,通过三个实验,对绿脓杆菌作出快速检验,一般 24 小时即可报告结果。

参考文献

- [1] 朱忠勇、陈之航: 临床医学检验: 475、485, 524 页, 上海科学技术出版社, 1978。
- [2] 余滨: 微生物学试验指导, 117 页。人民卫生出版社, 1965。
- [3] 上海第二医学院: 医用微生物学, 246—249 页, 人民卫生出版社, 1979 年。
- [4] 王光宝: 微生物学通报, 9[3]: 120—123, 1982。
- [5] 卫生部药品生物制品检定所: 药品卫生检验方法, 3, 19, 43, 52 页, 1980 年。
- [6] 有抑菌成分中成药菌检方法研究协作组: 药检工作通讯, 6: 320, 1980。