

SPF 小鼠群中绿脓杆菌感染的快速检查法

晏 质 叶谋芬 王春玲 王国柱

(卫生部药品生物制品检定所)

SPF 小鼠及无菌小鼠被绿脓杆菌感染后,无临床症状。但进行医药、生物制品实验时,常影响试验结果。为迅速测出 SPF 小鼠体内是否被绿脓杆菌感染,我们用噬菌体裂解试验抽查了 398 份饲养在屏障系统和隔离器内的无胸腺裸鼠 (BALB/C—nu/nu) 和杂合子小鼠 (BALB/C—nu/+、C₅₇BL/6—nu/+) 的粪便标本。检查结果证实本法能在较短时间内获得较高的绿脓杆菌检出率,可及时将阳性鼠淘汰,为培育绿脓杆菌阴性鼠群提供了条件。

材料和方法

(一) 菌株及噬菌体

1. 从小鼠粪便中分离到绿脓杆菌 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 释放的噬菌体和 64 号绿脓杆菌指示菌。
2. 大肠杆菌 O₃、O₁₂、O₂₈、O₆₉、O₇₈、O₁₄₁、O₁₁₁、O₁₅₂、O₁₆₄ 释放的噬菌体和 K₁₂ 指示菌。
3. 沙门氏菌 1164、1157、2198、1823、50216 释放的噬菌体和 216 指示菌。
4. 其它菌种: 耶尔森氏菌、志贺氏痢疾杆菌、福氏痢疾杆菌、变形杆菌、粪产硷杆菌和付溶性弧菌。

(二) 培养基

1. 增菌用: NAC 液体培养基, 其配方为: 蛋白胨 20g, K₂HPO₄ 0.3g, MgSO₄·7H₂O 0.3g, 溴化 16 烷基三甲铵 0.2g, 萘定酮酸 15mg, 蒸馏水 1000ml, pH7.6, 15 磅 30 分灭菌。
2. 分离用: 伊红美蓝培养基。

(三) 小鼠

饲养在屏障系统和隔离器内的无胸腺裸鼠 (BALB/C—nu/nu) 和杂合子小鼠 (BALB/C—nu/+ 和 C₅₇BL/6—nu/+)。

(四) 具体方法(见图 1)

1. 鼠粪标本的采集: 用左手捉住小鼠颈背部皮肤和尾巴, 用右手轻轻压迫其腹部, 使粪便自然排出, 再用消毒镊子取粪便 1—2 粒放入盛有 7—8ml NAC 培养基的试管中, 置 37℃ 培养 20—24 小时。

2. 细菌分离: 用白金耳取粪标本培养液于伊红美蓝琼脂平板上划线分离, 37℃ 培养 24 小时, 观察菌落生长情况, 绿脓杆菌菌落呈浅粉褐色, 半透明, 中央稍有隆起, 边缘呈锯齿状。

3. 噬菌体分离: 取上述 NAC 液体培养基 2—3ml, 加入 0.05—0.1ml 的氯仿充分振荡, 待菌体自然沉淀, 取上清液为备检的绿脓杆菌噬菌体。

4. 噬菌体裂解试验: 从 64 号指示菌的新鲜斜面上取菌苔少许, 接种于普通蛋白胨肉汤中, 肉眼观察微有混浊, 置 37℃ 培养 2—3 小时, 制成浓度为 10 亿菌/毫升的菌悬液。将普通琼脂平板划 20 小格, 编号, 取菌悬液约 1ml 左右, 均匀涂布于普通琼脂平板上, 倾斜平板吸出多余菌液, 开盖放 37℃ 温箱内 20 分钟, 待平板表面菌液干后, 用白金耳取待检绿脓杆菌噬菌体, 按编号滴入格内。在 37℃ 培养 3—4 小时观察结果, 再放置室温, 次日复查一次。判断结果以单个噬斑、融合噬斑和全裂解者, 均为绿

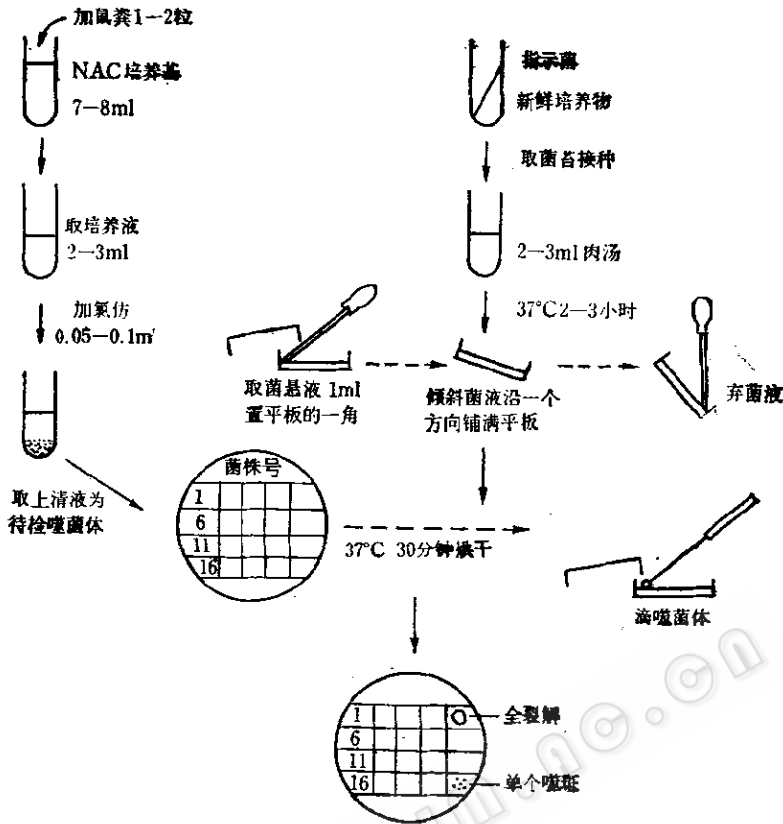


图1 绿脓杆菌噬菌体裂解试验程序图

(结果判断: 全裂解、融合噬斑、单个噬斑者为阳性; 无裂解、无噬斑者为阴性。)

脓杆菌阳性, 无噬斑不裂解者均为绿脓杆菌阴性。

结果与讨论

1. 鼠粪标本经增菌培养基增菌后, 再经分离培养基伊红美蓝和噬菌体裂解试验, 检测结果噬菌体裂解试验比分离培养基略高, 在BALB/C-nu/nu小鼠中检出率为42.8%。

2. 利用绿脓杆菌多数系溶原性菌株, 不经诱导即可自然释放噬菌体的特性, 将小鼠粪便中分离得绿脓杆菌选出30株, 经培养液交叉裂解试验, 结果64号菌株为敏感, 能被29株(96.7%)噬菌体裂解, 实验中采用64号为敏感的指示菌株。另取鼠粪便中分离得40株绿脓杆菌, 取其培养液对64号菌株敏感性测定, 结果39株绿脓杆菌培养液对64号菌株裂解试验阳性, 说明64号菌株具有较高的敏感性, 可用

于从小鼠分离的绿脓杆菌溶原性的检查, 从而为诊断绿脓杆菌的佐证。

3. 以指示菌64、K₁₂和216菌株对由小鼠粪中得到的1-9号菌株释放的噬菌体和大肠杆菌O₃、O₁₂、O₂₈、O₆₉、O₇₈、O₁₄₁、O₁₁₁、O₁₅₂、O₁₆₆释放的噬菌体以及沙门氏菌1164、1157、2198、1823、50216释放的噬菌体进行裂解试验, 结果证明64号指示菌对大肠杆菌和沙门氏菌释放的噬菌体均无交叉裂解作用, 只有绿脓杆菌噬菌体被裂解, 证明此指示菌是有特异性的。

4. 用噬菌体裂解试验检查不同条件下饲养小鼠的绿脓杆菌的污染率。

389份小鼠粪便标本(取自389只小鼠)用噬菌体裂解试验检查鼠群的绿脓杆菌污染情况, 以伊红美蓝琼脂生长的细菌作对照(见表1)。

从表1结果所示由于饲养条件不同, 各种

表1 噬菌体裂解试验检查不同鼠群的绿脓杆菌污染率

小鼠品种	饲养条件	标本数	噬菌体裂解法		伊红美蓝琼脂	
			阳性数	%	阳性数	%
昆明小鼠	普通环境	239	187	78.2	187	78.2
BALB/C-nu/nu BALB/C-nu/+	屏障系统	120	115	95.8	115	95.8
BALB/C-nu/nu BALB/C-nu/+	隔离器	22	0	0	0	0
C ₅₇ BL/6-nu/+	隔离器	8	0	0	0	0

小鼠的污染率也不同,在隔离器饲养由于饲料、垫料一切用物都经过高压消毒,即使是无胸腺的裸鼠其绿脓杆菌污染率均为0,在普通环境饲养的昆明小鼠,其在自然环境中接受绿脓杆菌机会多,小鼠由于自然免疫力提高,其绿脓杆菌污染率相对为78.2%,而屏障系统的小鼠BALB/C-nu/nu是无胸腺的裸鼠,免疫功能缺陷、抵抗力弱,一旦绿脓杆菌感染,容易污染,因此其检出率高达95.8%。

从以上试验结果看出噬菌体裂解试验,具

有快速(6小时出结果)、简便、特异性强等优点,适用于检测不同饲养条件下的鼠群绿脓杆菌感染情况。64号绿脓杆菌敏感菌株是由本所饲养的小鼠感染绿脓杆菌中分离到的,它虽然对同一污染来源的标本噬菌体裂解试验敏感,但对其他不同污染来源(食品、创伤,尿和人粪等)的标本噬菌体裂解试验的敏感性,尚待继续检测和探讨,为寻找更为广泛的敏感菌株作基础。此外实验中还应排除非增殖性裂解现象。