

弧菌抑制剂“0/129 纸片”的制备和应用

徐迪诚 孙宝珩 杜淑芬

(哈尔滨市卫生防疫站, 哈尔滨)

蔡妙英 东秀珠

(中国科学院微生物所, 北京)

0/129 是一种弧菌抑制剂, 2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶 (2,4-diamino-6,7-diisopropylpteridine)。检查菌株对 0/129 的敏感性是鉴定弧菌科各菌属成员不可缺少的重要特征之一^[1,2]。我国以往使用国外的纸片, 有些单位在腹泻病原细菌鉴定中因缺少这种纸片不能做这项检查。1988 年, 我们使用进口药品, 经多次试验, 制备出“0/129 纸片”。经鉴定一致认为符合要求。已在山东、辽宁、福建等地使用。从而为我国各微生物学实验室进行弧菌及类似菌的鉴定和临床细菌学诊断提供一种新制品, 填补了国内空白。现将制备和应用情况报告如下。

材料和方 法

(一) 材料

1. 2,4-二氨基-6,7-二异丙基喋啶 (NO-D-3885), 美国 Sigma 化学公司生产。

2. 滤纸片: 将新华一号定性滤纸用打孔机打成直径 6 mm 的小圆片, 1 kg/cm² 高压蒸汽灭菌 15 分钟。

3. 培养基: 分离培养菌种使用普通营养琼脂。药敏试验使用浙江省杭州边防检查站军人服务社生产的水解酪蛋白琼脂 (Muller-Hinton

Agar, MHA) 及普通营养琼脂。

4. 菌种来源: 见表 1。

5. 0/129 纸片制备: 首先测出每张滤纸片的饱和吸水量, 配好两种浓度的 0/129 溶液, 倾入盛有灭菌滤纸片的灭菌容器中, 均匀地浸泡纸片, 再置 37℃ 恒温箱中将其干燥, 做成 150

表 1 菌种来源

菌 种	来 源
肋生弧菌 (<i>Vibrio costicola</i>)	中国科学院微生物研究所
海螵弧菌 (<i>V. nereis</i>)	中国科学院微生物研究所
河流弧菌 I (<i>V. fluvialis</i> 1)	中国科学院微生物研究所
介蛋白弧菌 (<i>V. proteolyticus</i>)	中国科学院微生物研究所
湿和气单胞菌 (<i>Aeromonas sobria</i>)	中国科学院微生物研究所
副溶血弧菌 (<i>V. parahaemolyticus</i>)	卫生部药品生物制品检定所
霍乱弧菌埃尔托生物型 [<i>V. cholerae</i> (eltor biotype)]	哈尔滨市卫生防疫站
溶藻弧菌 (<i>V. alginolyticus</i>)	哈尔滨市卫生防疫站
类志贺邻单胞菌 (<i>Plesiomonas shigelloides</i>)	哈尔滨市卫生防疫站
嗜水气单胞菌 (<i>Aeromonas hydrophila</i>)	哈尔滨市卫生防疫站
麦氏弧菌 (<i>V. metschnikovii</i>)	哈尔滨市卫生防疫站
水弧菌 (<i>V. aquatilis</i>)	沈阳市皇姑区防疫站
豚鼠气单胞菌 (<i>Aeromonas caviae</i>)	中国科学院微生物研究所
肠杆菌科 (<i>Enterobacteriaceae</i> sp.)	中国科学院微生物研究所

$\mu\text{g}/\text{片}$ 及 $10 \mu\text{g}/\text{片}$ 的两种含药纸片。然后从每批上中下三个不同部位抽取 10—15 张纸片,用上述菌株做药敏实验,观察对已知细菌的敏感性及其含药量均匀度。如不同部位的纸片均出现与文献相符的抑菌环或无抑菌环者认为符合要求。每次的实验结果完全相同时定为合格。部分试验以对照纸片进行,制备对照纸片是以微量注射器滴加 $150 \mu\text{l}/\text{片}$ 的 0/129 原液 ($1\text{mg}/\text{ml}$),烤干备用。

(二) 实验方法

1. 准备菌种: 将拟作实验的菌种进行分离培养、纯培养和鉴定。

2. 准备实验用 M-H 琼脂平板: 将 M-H 琼脂粉溶化,冷却至 55°C 左右时将 20 ml 倒入直径 90 mm 的灭菌平皿中。待凝固后,将其放入 37°C 温箱中,除掉表面冷凝水。

3. 接种及观察结果: 将细菌肉汤纯培养物用接种针密涂抹(或用“L”玻璃棒)接种于平板后,用无菌镊子夹取纸片放在平板的适宜位置,再用镊子轻压,使纸片紧贴于平板表面,放入 37°C 温箱中培养 18—24 小时,然后取出观察结果。纸片周围出现明显抑菌环者为阳性(敏感),无抑菌环者为阴性(抵抗)。

结果与讨论

早已证实,某些嘌呤衍生物能够抑制细菌生长,如 0/61、0/69 及 0/120 对粪链球菌有很强的抑菌作用,而 0/129 则作用于弧菌,不同浓度的 0/129 对弧菌及其近似菌出现不同的抑制结果^[3]。Bain 与 Shewan^[4]的弧菌抑制剂纸片已被世界卫生组织指定为鉴定弧菌、气单胞菌及邻单胞菌时不可缺少的试验。

用我们自制的 $10 \mu\text{g}/\text{片}$ 及 $150 \mu\text{g}/\text{片}$ 两种纸片对大多数菌株测定 3, 4 次敏感性。前两次用标准 M-H 琼脂平板,后两次改用普通营养琼脂平板;第一、三次用肉汤培养物以“L”棒涂布,第二、四次用接种针取纯培养物密接种,所得结果无差异(表 2)。因此,广大基层实验室可以不必自制或另行购买价格昂贵的 M-H 琼脂,可直接用细菌纯培养物接种普通营养

表 2 与进口 0/129 纸片对弧菌及其近似菌的敏感性试验结果比较

菌种名称	150 $\mu\text{g}/\text{片}$		10 $\mu\text{g}/\text{片}$		
	菌株数	自制	进口	菌株数	自制
霍乱弧菌:					
埃尔托生物型	14	+(28.30)+(20.25)	14	+(21.00)	
非 O1 群	5	+(28.40)	5	+(23.20)	
副溶血弧菌	1	+(21.30)+(20.20)	1	—	
溶藻弧菌	1	+	1	—	
肋生弧菌	1	+	1	+	
海螵弧菌	2	+	2	+	
河弧菌	4	+	4	—	
梅氏弧菌	1	+	1	+	
水弧菌	1	+	1	+	
介蛋白弧菌	1	+	1	+	
类志贺邻单胞菌	8	+	8	+	*
嗜水气单胞菌	23	—	23	—	
温和气单胞菌	18	—	18	—	
豚鼠气单胞菌	9	—	9	—	
肠杆菌科	23	—	23	—	

注:“+”敏感;“—”抵抗;“*”有一株抵抗

琼脂,然后贴上两种“0/129 纸片”进行检查,十分方便。

从表 2 看出二种霍乱弧菌、肋生弧菌、海螵弧菌、梅氏弧菌、水弧菌和介蛋白弧菌对二种浓度的纸片敏感而现抑菌圈,副溶血弧菌、溶藻弧菌和河弧菌只对 150 μg 敏感;气单胞菌对二种浓度的纸片都表现抵抗,类志贺邻单胞菌对 150 μg 的纸片抵抗,而对 10 μg 纸片有的敏感,有的抵抗;肠杆菌科对这二种浓度都出现抵抗。这些实验结果符合文献[3]的报道,说明纸片含药浓度均匀一致,抑制弧菌作用良好,而对有些细菌呈现抵抗作用。自制“0/129 纸片”的成本费用仅为进口制品 1/8 左右,可以进一步推广使用。

小 结

自制 10 $\mu\text{g}/\text{片}$ 及 150 $\mu\text{g}/\text{片}$ 两种弧菌抑制剂纸片的含药均匀度和抑菌作用都符合要求可供微生物学实验室鉴定弧菌及近似细菌时使用,有助于保证细菌鉴定工作的质量。

用细菌纯培养物在普通营养琼脂平板上检
(下转第 193 页)