

典型性状葡萄球菌的筛选研究

杨 正 时

(中国药品生物制品检定所,中国医学细菌管理保藏中心大肠埃希氏菌专业实验室,北京)

摘要 本文对中国医用菌种保藏中心保存的 71 株国家标准菌株进行了筛选研究。通过对葡萄球菌色素的观察、溶血反应、血浆凝固酶试验、亚烯酸钾卵黄琼脂鉴别培养基、生化反应等研究,确定了典型性状的葡萄球菌菌株及其特征和用途,其菌株号为 26003、26058、26035、26062、26002、26105、26106、26104。这些国家标准菌株可供国内外葡萄球菌的研究和教学参考选用。

关键词 葡萄球菌;典型性状;国家标准菌株

中国医学细菌管理保藏中心具有向国内外使用单位分发性状典型的标准菌株的任务。葡萄球菌由于其鉴定方法欠统一,变异又多,中心虽贮存多种系列菌株,但对使用单位所需特殊要求的菌种常常不能满足。为此在对贮存株全面检定的基础上进行了筛选研究,提出了典型性状菌种单以供使用。

材 料 与 方 法

(一) 菌种^[1]

共 71 株,均有国家标准菌株号,其来源与用途详见表 1。

(二) 色素观察

葡萄球菌色素是鉴别葡萄球菌病原性的重要标志之一。但是菌株间差异很大,肉眼观察也存在着个人差异,为此我们应用化工部颁“油漆色本”作为标准对照,很为实用。该色本将黄色区分为 8 种,计有米黄、乳黄、牙黄、火车乳

表 1 葡萄球菌试验株概况

直接来源 (株号或特殊命名)	原定用途	株数
波 兰	噬菌体分型	23
罗马尼亚	噬菌体分型	29
挪 威	血清学分型	9
英 国		1
苏 联		1
英 国 (147)	抗生素检定	1
(209P)	抗生素检定	3
(26101)	教学用	1
(26102)	教学用	1
(26103)	教学用	1
(26104)	哮喘菌生产株	1
共 计		71

黄、浅黄、中黄、火车黄、深黄。其中深黄、火车黄、中黄相当于葡萄球菌的金黄色;浅黄和中黄之间的颜色可称为柠檬色;浅黄、火车乳黄、牙

本试验得到郑韦明主任支持,王薇媛、张焕春同志参加部分工作,谨致感谢。

黄为金黄色葡萄球菌色素不典型菌株;乳黄、米黄为白色。

(三) 溶血反应

用10%羊血和10%兔血琼脂平板直接划线分离观察溶血菌落,同时用不同液体培养基培养不同时间后的菌液(0.5ml)与等量的2%羊血或兔血悬液混合,37℃水浴3小时和过夜后观察溶血结果。

(四) 血浆凝固酶试验

将葡萄球菌接种于0.3ml脑心浸液肉汤的小试管中,37℃培养过夜,加0.5ml兔血浆于肉汤培养物中,充分混和,37℃水浴6小时和过夜检查凝块形成,分为五类:

阴性:“—”无纤维素形成的痕迹。

阳性:“+”小的无组织的凝块;“++”小的有组织的凝块;“+++”大的有组织的凝块;“++++”全部试管内容凝固,试管倒置也不移动。

(五) 鉴别培养基

亚硝酸钾卵黄琼脂,每升中含肉浸膏5g,酪蛋白胨10g,酵母膏粉1g,丙酮酸钠10g,甘氨酸12g,氯化锂5g,琼脂20g,pH7.6—7.0,高压灭菌后加入卵黄50ml,3.5%无菌亚硝酸钾3ml。

(六) 生化反应

按肠杆菌科鉴定的常规方法进行。

结果与讨论

(一) 菌落、菌形与色素

在普通营养琼脂平板上划线分离时,葡萄球菌菌落均为光滑型,圆形,边缘整齐,鼓凸,表面湿润而有光泽。绝大多数菌落大小均匀,个别菌株存在大小两种菌落,但未发现粗糙型,这与肠杆菌科细菌中常见的S-R变异现象成为鲜明的对比,这可能与革兰氏阳性球菌与阴性杆菌间细胞壁成份差异有关。

我们曾比较了多种鉴别培养基上的葡萄球菌菌落特征,其中包括甘露醇、盐酚红琼脂,氯化锂、甘氨酸、甘露醇酚红琼脂,“110”号琼脂以及亚硝酸钾卵黄琼脂。以后者更具特征性,菌

落黑色,外周有溶卵黄环。

革兰氏染色涂片中,大多数(90%)的葡萄球菌成簇状,个别菌株以单个分散的菌细胞为主。

色素的变化较大,在标记为金黄色葡萄球菌的67株菌中,金黄色35株(52.2%),柠檬色2株(3%),白色20株(30%),不典型的有10株(14.7%)主要为火车乳黄。

(二) 溶血

在67株标记为金黄色葡萄球菌中,在羊血平板上有56株(83.5%)呈现β溶血,其中4株溶血缓慢,少数菌株溶血微弱。在56株溶血菌株中有5株出现溶血与不溶血两种菌落,说明溶血特性也是可能变异的。对羊血与兔血的溶解并不一致,在53株比较试验中溶解兔血的有51株,而溶解羊血的为36株(表2)。

表2 金黄色葡萄球菌溶血与血球种类的关系

血球种类	溶血反应			
兔 血	+	+	-	-
羊 血	+	-	+	-
株 数	35	16	1	1

因此兔血球对金黄色葡萄球菌溶血素较羊血球为敏感。在比较了液体培养基后,溶血素试验比平板法更为可靠,特别是使用牛心浸液和马丁内水,经72小时培养的菌液,产生的溶血素明显而稳定。

(三) 凝固酶

在64株测定凝固酶的菌株中有56株(87%)阳性,8株(13%)阴性。阳性菌株中强阳性(3+与4+)的占95%。一般认为血浆凝固酶、色素、溶血反应、甘露醇发酵及明胶液化与否和葡萄球菌的病原性有关。凝固酶与溶血反应的符合率为84.7%(表3)。凝固酶阳性的溶血株,当解离出不溶血菌落时,该菌落仍为凝固酶阳性。同时溶血反应也受到血球种类、培养条件等影响而变化,而凝固酶试验相对较为稳定,作为致病性的标记似乎更为可靠。分析9株凝固酶阴性菌株与有关特征间的关系时,发

现其中 7 株为白色,色素固然有演变,但纯白的菌株一般致病力差,凝固酶阳性的比率显著减少。

表 3 凝固酶试验与溶血反应的比较

试验项目	反 应			
凝 固 酶	+	+	-	-
溶 血	+	-	+	-
株 数	51	6	4	5
%	77.2	9	6.2	7.5

(四) 生化反应

66 株葡萄球菌均迅速发酵葡萄糖、蔗糖、果糖、半乳糖,产酸不产气,基本上均能发酵乳糖和麦芽糖,少数菌株不发酵甘露醇,基本上不发酵木糖、阿拉伯糖、山梨醇、棉子糖和菊糖。不产生淀粉,少数菌株迅速液化明胶,但大多数迟缓液化(2—11 天),有 36% 的菌株不液化明胶(表 4)。

表 4 葡萄球菌的生化反应(66 株)

生化项目	+	(+)	-
葡萄糖	66	0	0
蔗 糖	66	0	0
果 糖	66	0	0
乳 糖	64	1	1
半乳糖	64	2	0
麦芽糖	64	2	0
甘露醇	52	8	6
木 糖	1	0	65
山梨醇	0	1	65
棉子糖	0	0	66
阿拉伯糖	2	0	64
菊 糖	0	0	66
石蕊牛乳	0	7	59
明 胶	8	35	23
明 噪	0	0	66

同一菌株解离出溶血与不溶血两种菌落时,其生化反应仍保持一致。

在上述试验的基础上,根据库内现存菌株情况,确定了某些典型性状的标准菌株,其主要

表 5 典型性状葡萄球菌

菌株及菌株号	特 征					参考用途
	色素	溶血	凝固酶	甘露醇	明胶	
金黄色葡萄球菌 26003	金黄	+	+	+	+	教学用
金黄色葡萄球菌 26058	金黄	+	+	-	-	教学用
金黄色葡萄球菌 26035	金黄	+	-	+	+	凝固酶阴性株
金黄色葡萄球菌 26062	黄色	-	-	+	+	不溶血株
金黄色葡萄球菌 26002	黄色	+	+	+	+	强产毒株
柠檬色葡萄球菌 26105	柠檬色	+	+	+	+	教学用
白色葡萄球菌 26106	白色	+	+	+	+	教学用
白色葡萄球菌 26104	白色	-	-	-	+	教学用

特征与用途归纳于表 5。供国内外同行参考择用。由于分类学的进步和对葡萄球菌病原性的进一步了解,一些其它系列的标准菌株如产各型肠毒素的葡萄球菌,具有不同耐药性和不同耐药因子的菌株,尚需今后进一步补充和完善。

参 考 文 献

1. 中国微生物菌种保藏管理委员会编:中国菌种目录,轻工业出版社,北京,1983。