

技术与方法

一种葡萄球菌分离培养基的研制和应用

曲 梅¹ 田军川² 徐春仙² 戴 玫¹ 寇光第¹(¹齐齐哈尔市卫生防疫站 齐齐哈尔 161006)(²齐齐哈尔市第一医院 齐齐哈尔 161005)

摘要 研制一种葡萄球菌分离用培养基对培养检查葡萄球菌具有选择性和一定的鉴别能力。在分离培养的同时,可利用同一平板的生长菌落观察耐盐性、色素产生、甘露醇发酵和明胶液化的试验结果。该培养基配制简单,成本低廉,可替代血液琼脂平板供临床、商检和卫生检验工作中葡萄球菌培养检查。

关键词 培养检查,耐盐性,色素产生,甘露醇发酵,明胶液化

分类号 Q93.335

许多种葡萄球菌是引起人、动物化脓性感染和医院内感染的重要病原菌。金黄色葡萄球菌能引起食物中毒并被列为食品、药品及化妆品污染的主要检测指标。随着细菌分类学研究的进步,葡萄球菌属的新种不断增加。由1974年的3个种,1986年增加为21个种^[1]。1996年公开发表的新种(亚种)已超过30个^[2]。当前,我国的医疗预防、药检及商检等机构的微生物实验室,培养检查葡萄球菌多使用血液琼脂平板,制备时需用新鲜脱纤维血液,该培养基无选择性,往往由于检样中的变形菌弥漫发育而影响葡萄球菌的检出。为了适应实际工作需要,提高葡萄菌的培养检出阳性率,我们研制一种既能用于分离培养又能同时做初步鉴定的葡萄球菌培养基。经过实验观察及实际考核应用效果良好,现报道如下:

1 材料与方法

1.1 菌株

实验用菌株共计338株。金黄色葡萄球菌107株,模仿葡萄球菌36株,表皮葡萄球菌25株,松鼠葡萄球菌17株,腐生葡萄球菌6株,人葡萄球菌4株,沃氏葡萄球菌4株,耳葡萄球菌

3株,产色葡萄球菌3株,溶血葡萄球菌2株,木糖葡萄球菌1株,马胃葡萄球菌1株,山羊葡萄球菌1株,葡萄球菌(未定种)55株,非葡萄球菌73株,其中标准菌株来自中国科学院微生物研究所。从临床食品及环境分离的葡萄球菌菌株来自齐齐哈尔市卫生防疫站。非葡萄球菌菌株来自中国科学院微生物研究所和齐齐哈尔市卫生防疫站。按文献^[3]方法鉴定到属,采用法国bio Merieux的API-20staph或日本日水制药株式会社的ID Test SP-18“Nissui”与美国BECTON DICKINSON公司试剂及Sceptor细菌鉴定仪鉴定到种。

1.2 待检标本

265份。来自齐齐哈尔市第一医院和齐齐哈尔市卫生防疫站,以血琼脂平板和研制的葡萄球菌平板同时进行分离。属种的鉴定方法同上述。

1.3 培养基

1.3.1 葡萄球菌分离培养基: 参照文献^[4]研制。主要成分:蛋白胨、明胶、甘露醇、氯化钠、磷酸氢二钾、琼脂等,将各成分溶于蒸馏水中,调pH7.0±0.1,高压蒸汽灭菌后,倾注平板。用葡萄球菌标准菌株质控,合格后备用。观察甘

露醇发酵时,往生长的菌落滴1滴0.04%BTB溶液,菌落呈黄色者为阳性,观察明胶液化时,需往单个菌落上滴20%碘基水杨酸或饱和硫酸铵,阳性者菌落周围呈现明显的透明环。

1.3.2 单管甘露醇发酵和明胶液化培养基:成分制法见文献^[5,8]。

1.3.3 国外同类制品对照:日本日水制药株式会社的“葡萄球菌培养基”(Staphylococcus Medium No110),批号:042701。

1.3.4 试验与应用方法:用265株已知菌株划线接种研制的葡萄球菌培养基,37℃培养36~43h,以血琼脂平板的37℃18~24h培养物对照,观察生长状况及其典型特征。葡萄球菌培养基在观察耐盐性、色素产生的同时记录甘露醇发酵与明胶液化的结果,并同时与日本进口的“葡萄球菌培养基”比较。对甘露醇发酵、明胶液化试验同时用单管试验的结果进行比较。将研制的葡萄球菌分离培养基应用于临床及卫生检验实际工作中检验标本265份。对研制的培养基成品,委托北京、沈阳市和哈尔滨市临床预防单位进行应用考核。并委托中国科学院微生物研究所鉴定。

2 结果与讨论

2.1 葡萄球菌分离培养基的实用性

用338株已知菌株接种研制的葡萄球菌培养基,培养后有73株非葡萄球菌的生长受到不同程度的抑制。其中微球菌生长不良,嗜热链球菌、肠球菌、大肠埃希氏菌、鼠伤寒沙门氏菌、福氏志贺氏菌、普通变形菌、奇异变形菌、肺炎克雷伯氏菌、产气克雷伯氏菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、枯草芽孢杆菌、腊状芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、弧菌及铜绿假单胞菌等均不生长。而265株葡萄球菌均生长良好,与血琼脂平板的生长状况基本相一致。在分离培养的同时,能观察葡萄球菌鉴定用的四个特征,即耐盐性、色素形成、甘露醇发酵和明胶液化。不同菌株在葡萄球菌分离培养基上的四个特征除耐盐性均为100%外,其余略有不同。107株金黄色葡萄球菌色素产生为70.09%,(75/109),甘露醇

发酵阳性率为91.59%(98/107),明胶液化检出率为88.79%(95/107)。与文献报道基本一致。与日本进口制品相比,上述四种特征表达情况,耐盐性、色素产生和甘露醇发酵的符合率均为100%,明胶液化的符合率为99.05%。66株葡萄球菌重复性试验结果,其耐盐性、色素产生、甘露醇发酵的符合率为100%,明胶化的符合率为98.41%,经统计学处理,二者的结果无显著差异。265份临床标本、食品、环境及餐具标本,用所研制的培养基和血琼脂平板同时做葡萄球菌培养检查,其检出阳性率也一致。

2.2 葡萄球菌分离培养基与单管对照生化反应结果的一致性

在所研制的培养基上,甘露醇发酵、明胶液化试验与其相应的单管试验结果基本一致。甘露醇发酵阳性率分别为91.59%(98/107)和89.72%(96/107),明胶液化阳性率为88.79%(95/107)和90.65%(97/107)。统计学处理,二者无显著性差别。

2.3 葡萄球菌分离培养基的稳定性

1997年3月,大量制出此种培养基,将其中一部分置4℃冰箱储存,分别在一个月、二个月、三个月与五个月取出制成平板,划线接种葡萄球菌菌株进行质控,观察稳定性。证实4℃储存五个月以后使用仍效果良好。

2.4 使用葡萄球菌分离培养基应注意的问题

使用前应将培养基表面的水份充分干燥,防止细菌蔓延生长。

应在挑取菌落后,观察甘露醇发酵产酸和明胶液化的结果,防止因加试剂受到污染。

葡萄球菌产生的色素是非水溶性的,如果不易观察,可将平板37℃培养36~43h后取出过夜,翌日观察或放30℃培养时色素产生十分明显。在葡萄球菌分离培养基上,除金黄色葡萄球菌外,产色葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和溶血葡萄球菌在37℃24~36h后都产生了黄色色素。

观察甘露醇发酵,可在往菌落滴加0.04%BTB水溶液后立即判定,最迟不要超过60s。观察明胶液化,应在往菌落滴加饱和硫酸铵或20%碘基水杨酸后2分钟以内观察培养基表面

菌落四周的透明环, 否则, 白色环轮消失, 误判为假阴性。

致谢 哈尔滨市预防医学研究所主任医师兼哈尔滨医科大学教授徐迪诚, 对本研究给予悉心指导, 表示衷心谢意。

参 考 文 献

- [1] Schlefer K H. Family 1. Micrococcaceae. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2 (Sneath PHA in chief Holt JG ed.), Williams & Wilkins,

Baltimore, 1986, 1003.

- [2] 赵乃昕, 岳启安. 医学细菌名称及分类鉴定. 济南: 山东大学出版社, 1996.

- [3] Barrow G I, Feltham P K A: *Manual for the identification of medical bacteria* (3rd ed.), Cambridge University Press, 1993, 104.

- [4] Chapman G H. J. *Bacteriol*, 1949, 51: 409.

- [5] 坂崎利一. 新细菌培地学讲座(下). 东京: 近代出版, 1987.

- [6] Edwards P R, Ewing W H. *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd ed, Minneapolis; Burgess Publishing Company, 1972, 345.