DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.02.030

三种难培养细菌新分离培养基的研制和应用

Preoaratuib and application of new selective medium for three kinds of fastidious bacteria to cultivate

邓光贵 张文俊 吴丽娟 (第三军医大学附属大坪医院检验科) 重庆,630042

提 要 目的: 研究更适合 3种较难培养细菌—— 流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌和阴道加德纳菌生长的分离培养基。 方法: 以国产原材料为主,改进和自配 GCYSB-V 培养基, MHEY培养基和阴道加德纳菌选择培养基。 结果: GCYSB-V 培养基对 225份临床标本中流感嗜血杆菌的分离率是 30.2%, MHEY培养基及传统的 Skirrow培养基对菌的检出率分别为 54.78%和 46.96% ($P < 0.05$)。用自配的阴道加德纳菌培养基对 80例非特异性阴道炎患者的阴道拭予检出阴道加德纳菌 23例,阳性检出率为 28.7%,接近国外报告的最高检出率。 结论: 3种新培养基具有较好实用价值。

流感嗜血杆菌 (haemophilus influenzae)可引起多种原发感染和继发感染,是临床常见的病原菌。近年的研究确认,幽门螺杆菌 (Helicobacter pylori, HP)是一种与慢性胃炎及胃癌发病有密切关系的细菌,而阴道加德纳菌 (Gardneralla vaginalis, GV)是非特异性阴道炎的重要病原菌,它还可引起败血症、尿路感染、肾周脓肿或阴道脓肿等。 分离培养这 3种细菌对于它们所致感染的诊断和治疗具有重要意义。临床微生物室分离培养这 3种细菌依靠的传统分离培养基[1,2,3]各有缺点,不适应临床标本分离培养要求,如流感嗜血杆菌在传统巧克力琼脂上生长缓慢,阳性检出率低;分离幽门螺杆菌的 Skirrow培养基和分离阴道加德纳菌的培养基均参照国外文献配方,自配应用效果差,有的成分依靠进口原料,增加了实际应用的困难。近年我们针对这 3种细菌改进或研制了新的选择性分离培养基经临床标本实践应用证明效果良好。 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 新的选择分离培养基

1.1.1 万古霉素淋球菌基础酵母浸膏羊血培养基,科称 GCYSB-V,参照文献[4]配方予以改进。取国产淋病奈瑟菌培养基 (上海医化所) 52 g,酵母浸膏 10 g,万古霉素 50 mg,溶于 1000 ml蒸馏水,调 pH7.2~7.4,经高压灭菌后于 85℃加入脱纤维羊血并维持 10 min,冷至 50℃倾注平板。用于流感嗜血杆菌分离培养。

1.1.2 MH卵黄琼脂培养基,简称 MHEY,取 MH琼脂 (浙江省军区后勤卫生防疫检验所) 30 g,玉米淀粉 2.0 g,酵母透析液 (0.3 g/ml) 20 ml,加水至 1 000 ml调 pH至 8.7,经 121℃灭菌 20 min,冷至 60℃左右加入 50%卵黄盐水 10 ml,灭菌活性炭 2 g,多粘菌素 B(2 500 u/mo) 1 ml,万古霉素 1.0 g,乳酸-TMP混合液 5 ml后倾注平板。 本培养基用于分离幽门螺杆菌。

1.1.3 阴道加德纳菌选择培养基,取多价蛋白胨 5 g,胰蛋白胨 5 g,葡萄糖 0.2 g,琼脂 20 g,加水 1000 ml将各成分混合溶解,调 pH至 6.5~6.6, 121℃高压灭菌 20 min,冷至 50℃,加多粘菌素 B(750 mg/L),灭菌的吐温 80(0.075 mg/L)。另加 20%无菌胸 (腹)水和 5%人库存血混匀后倾注平板。用于分离阴道加德纳菌。

1.2 对照用传统培养基

1.2.1 万古霉素巧克力琼脂,简称 Choc-V,即普通巧克力琼脂加万古霉素 (50 mg/L),用作 GCYSB-V 的对照培养基。

1.2.2 Skrrow培养基为文献推荐的分离幽门螺杆菌培养基,按常规配制,用作 MH卵黄琼脂的对照培养基。

1.2.3 临床标本阴道加德纳菌的分离培养结果与文献报告的结果作比较。

1.3 临床标本分离培养及细菌鉴定方法

1.3.1 标本来源 分离流感嗜血杆菌 225份临床标本,包括痰标本 175份,取自呼吸内科住院病人,咽拭子 50份取自有发热、咳嗽等呼吸道症状患儿。 分离幽门螺杆菌 115份标本为接受胃镜检查患者的胃粘膜活检标本。 分离阴道加德纳菌 80份标本是诊断为非特异性阴道炎病人的阴道拭子。

1.3.2 分离培养方法 分离流感嗜血杆菌时将标本分别接种 GCYSB-V 和 Choc-V 培养基;分离幽门螺杆菌时将胃粘膜活检标本放入 0.5ml 20%葡萄糖运送液,即刻送至实验室置灭菌的组织匀浆器研磨后,取匀浆分别涂布并划线接种于 MH卵黄琼脂及 Skirrow巧克力培养基上;分离阴道加德纳菌时将病人阴道拭子划线接种在相应选择培养基上。流感嗜血杆菌和阴道加德纳菌的接种培养基平板置 CO_2 烛缸中, 37℃培养 48 h观察;分离幽门螺杆菌的平板置厌氧缸中,用抽气换气法在含 80% N_2 10% CO_2 及少量氧的混合气中 36℃~37℃培养 3.5

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

7 d观察。

1.3.3　菌种鉴定　　从各分离平板挑取相应可疑菌落,按细菌学常规鉴定到种[5,6]。流感嗜血杆菌除观察形态学特点外,还包括 X、V因子快速鉴定[7],卫星试验和生化反应鉴定。

幽门螺杆菌根据平板上生长出无色半透明、圆形隆起,边缘整齐,湿润有光泽的菌落,革兰氏染色呈阴性,S形、螺旋形、海鸥展翅或弧形、稍弯等多形态菌体,氧化酶、触酶、尿素酶阳性,马尿酸水解、硝酸盐阴性作出鉴定。

阴道加德纳菌在分离培养基平板上生长为灰白色、光滑凸起、半透明形似露滴状菌落,周围有弥漫性溶血环,革兰氏阴性或染色不定的小杆菌,氧化酶、触酶、尿酶、靛基质、甘露醇发酵均为阴性;淀粉酶水解,葡萄糖、麦芽糖发酵,马尿酸水解均为阳性。

1.4　生长指数(GI)测定

为比较流感嗜血杆菌在 GCYSB-V 和 Choc-V 两种培养基上的生长能力,取该菌单个菌落置于 1 ml无菌生理盐水中制成悬液,经 10倍连续稀释后取各稀释度菌液 0.1 ml接种两种培养基平板,用"L"棒涂布均匀,放 CO_2 烛缸 37℃培养 48 h,用游标卡尺准确测量菌落直径(精度为 0.02 mm),GI等于平板上生长菌落数少于 10个的最高稀释倍的对数乘以该平板菌落平均直么。如 10^{-4}平板上生长 6个菌落,菌落平均直径为 2.5 mm,则 GI= 4×2.5= 10。

1.5　统计学分析

3种细菌在各自培养基上的阳性检出率比较用 χ^2 检验法,流感嗜血杆菌的生长指数用 t 检验。

2　结果

2.1　GCYSB-V 培养基对流感嗜血杆菌的分离检出

225份临床标本在 GCYSB-V 培养基上分离到 5种嗜血杆菌 97株,对嗜血杆菌属的检出率为 43.1%,而 Choc-V 培养基上只分离到 3种 29株,检出率 12.9%,两者相差显著($P<0.005$)。其中 GCYSB-V 分离检出流感嗜血杆菌 68株(30.02%),而在 Choc-V 上只分离到 19株(8.4%),两者相差非常显著($P<0.01$),见表 1。

表 1　GCYSB-V培养基对 225份临床标本中嗜血杆菌的分离结果

菌种	GCYSB-V 分离株数(%)	Choc-V 分离株数(%)	χ^2(P值)
流感嗜血杆菌	68(30.2)	19(8.4)	34.212(<0.01)
副流感嗜血杆菌	24(10.7)	9(4.0)	7.357(<0.01)
溶血嗜血杆菌	2(0.08)	0(0)	-
嗜沫嗜血杆菌	2(0.08)	1(0.04)	-
副嗜沫嗜血杆菌	1(0.04)	0(0)	-
合计	97(43.1)	29(12.9)	5.097(<0.005)

流感和副流感嗜血杆菌在 GCYSB-V 培养基上生长较快、形成较大灰白色半透明菌落,易于识别。两种细菌在 GCYSB-V 培养基上的生长指数显著高于在 Choc-V上的生长指数,见表 2。

表 2　流感、副流感嗜血杆菌在两种培养基上的 GI比较

菌　种	GCYSB-V		Choc-V		t(P)值
	菌落直径(平均 mm)	GI	菌落直径(平均 mm)	GI	
流感嗜血杆菌(n= 10)	2.21	7.72	1.78	5.94	7.590(<0.001)
副流感嗜血杆菌(n= 8)	2.15	7.37	1.71	5.66	7.664(<0.001)

2.2　MH卵黄琼脂培养对幽门螺杆菌的分离结果

115例疑为慢性胃炎患者胃粘膜活检标本经 MH卵黄琼脂平板检出幽门螺杆菌 63株,检出率为 54.78%;而用 Skirrow 巧克力培养基检出 54株,检出率为 46.96%(χ^2= 9, $P<0.005$)。在 MH卵黄琼脂平板上生长的 63株幽门螺杆菌均在培养的 3 d内长出,而在相同时间内 Skirrow巧克力培养基上只长出 45株,继续培养 5 d~6 d,后者又陆续长出 9株。培养 3 d检出率,MH卵黄琼脂培养基明显高于 Skirrow培养基(χ^2= 18, $P<0.005$)。

2.3　阴道加德纳菌选择培养基对该菌分离结果

应用自制的培养基对临床 80例非特异性阴道炎患者的阴道分泌物作培养,有 23例检出阴道加德纳菌,阳性检出率为 28.7%。

3　讨论

流感嗜血杆菌、幽门螺杆菌及阴道加德纳菌都是人的重要病原菌,能引起不同感染,从临床标本分离培养这 3种细胞仍然是诊断其相关感染的黄金标准。针对这 3种细菌都比较娇弱,营养需求苛刻或需特殊生长刺激因子等特点,我们改进研制了相应的选择性分离培养基,主要依据以下几方面:

GCYSB-V 培养基参考了 Rennie等的配方特点,利用上海医化所生产的淋病奈瑟菌培养基(GC)为提供丰富营养成分的基础,加入 1%酵母浸膏和 5%脱纤维羊血(85℃热处理 10 min)提供了足量的 X、V因子,能满足嗜血杆菌,特别是流感嗜血杆菌对复杂营养

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

和生长要素的需求。实验结果表明,流感或副流感嗜血杆菌在 GCYSB-V培养基上生长快,菌落大,呈圆形灰白而突起,极易识别。该菌在 GCYSB-V的生长指数(GI)显著高于 Choc-V上的生长指数。在临床标本的分离培养中,GCYSB-V对流感嗜血杆菌检出率显著高于 Choc-V,见表 1。

分离幽门螺杆菌的 MH卵黄琼脂培养基以 MH琼脂作基础,加入卵黄,增加了营养成分,并含有大量带胆固醇和磷脂的脂蛋白以及类脂生长因子,加入酵母透析物,在去除了酵母中小分子毒性物质的前提下,补充了多种生长因子,以上物质均可促进幽门螺杆菌生长。培养基中的玉米淀粉及活性炭可吸附培养基或标本中某些对幽门螺杆菌有毒的物质,如取材时局部使用的麻醉药等。该培养基调 pH至 8.7亦为幽门螺杆菌的生长创造了最适环境。

阴道加德纳菌需要叶酸、生物素、烟酸、硫胺素、核黄素,并至少需要两种嘌呤嘧啶作为生长因子,故在一般培养基上难以生长或生长不良。国外研究过多种培养基,报告的分离率从 12.5%~ 30%不等[8]。文献中所推荐的培养基,其中有些特殊成分不易获得,我们在自制培养基中首次采用未经抗菌治疗的病人胸、腹水(56℃灭活)以增加培养基营养成分看来是有效的。用此培养基分离阴道加德纳菌的阳性检出率(28.7%)接近国外报告的最高检出率,而高于国内已报告的检出率[8,9]。

3种培养基均加入适量的抗生素(多粘菌素 B和万古霉素)可抑制杂菌生长而不抑制目的菌生长,增加了培养基的选择性是这 3种新培养基的又一特点。

总的来看,3种新培养基设计合理,取材立足国产,容易获得,配制简便,对临床标本分离应用效果满意。因此具有较好的适用性。

关键词 流感嗜血杆菌;幽门螺杆菌;阴道加德纳菌;初次分离;培养基

中图法分类号 R446.5

参考文献

1 李仲兴,郑家齐,李家宏主编.诊断细胞学.香港:黄河文化出版社,1992:437,451,467

2 陈忠余.幽门螺杆菌分离培养研究现状.国外医学:临床生物化学与检验学分册,1996;17(1):28

3 邓光贵,张文俊,冯 刚.阴道加德纳菌临床检出方法探讨.临床检验杂志,1992;10(4):79

4 Rennin R, Cordon T, Yaschuk Y *et al*. Laboratory and clinical evaluation of media for the primary isolation of Haemophilus species. J Clin Microbiol, 1992; 30(8): 1917

5 叶应妩,王毓三主编.全国临床检验操作规程.南京:东南大学出版社,1991:412~414

6 Lennette E H. Manual of clinical Mircrobiology. 4th ed, American Society for Microbiology, Washington, 1985: 302, 387, 874

7 邓光贵,张文俊,陶红群.改良 GCYSB培养基分离流感嗜血杆菌的应用评价.临床检验杂志,1995;13(3):115

8 马子行.阴道加德纳氏菌.国外医学:微生物学分册,1986;9(6):265

9 谭巨莲,吴宝印,李仁英等.阴道加德纳氏菌的分离鉴定.中华医学检验杂志,1991;14(2):107

(收稿:1996-03-21;修回:1997-01-15)

(编辑 王 红、沈锡庚)

妇炎宁栓的体外抗菌活性试验

Antibacterial activities of Fuyanning suppository against clinical isolates *in vitro*

林 彩 唐先哲 (第三军医大学附属西南医院药剂科)重庆,630038

张淑华 欧珍蓉 (四川抗菌素工业研究所)成都,610051

提 要 目的:测定妇炎宁栓对 240株临床分离菌的体外抗菌作用。方法:采用琼脂二倍稀释法测定妇炎宁栓对临床分离菌的最小抑菌浓度(MIC),测定接种菌量、pH值和血清浓度对 MIC的影响,采用试管二倍稀释法测定妇炎宁栓对阴道滴虫的 MIC。结果:妇炎宁栓对金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、甲型溶血性链球菌、变形杆菌、白色念珠菌、曲霉菌、绿脓杆菌、脆弱拟杆菌、普通消化链球菌、丙酸杆菌有较好的抗菌活性,其 MIC_{50}为 0.5μg/ml~ 8μg/ml,对大肠杆菌、淋球菌也有抑制作用,其 MIC_{50}分别为 32μg/ml和 16μg/ml。对阴道滴虫的 MIC_{50}为 2μg/ml。接种细菌量增加,pH值降低,可使妇炎宁栓 MIC值增加;血清浓度增加,对妇炎宁栓 MIC影响不大。结论:妇炎宁栓对一些临床分离菌和阴道滴虫有较好的抗菌活性。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net