

# 厌氧菌数值鉴定系列培养基的制备和应用

哈尔滨市卫生防疫站 徐迪诚 张 澜 赵 卓 张根生

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 刘秉阳 李忠元 张旭帆

中国兽药监察所 文希喆 屠伟英 王泰健 中国人民解放军222医院 陈尚元

厌氧菌是人类和动物感染症的主要病因。厌氧菌的快速鉴定是我国临床医学、兽医学工作中急待解决的课题。使用常规鉴定手续繁杂,需要时间长,耗费人力、物力较多,不能满足实际工作的需要。七十年代以来,国外成功地研制出API-20A等商品化的鉴定系统,取代了预还原后的厌氧菌生化试验<sup>[1, 2]</sup>。我们引进国外的先进技术,利用国产材料和试剂,研制出厌氧菌数值鉴定系列培养基,建立了我国的简易、快速厌氧菌鉴定系统。经北京、长春、南昌等地的六个医疗、科研单位考核应用,效果良好,已向全国部分医疗卫生、兽医及科研教学单位推广。

## 材料和方法

一、培养基制备和使用:厌氧菌数值鉴定系列基础培养基和稀释液基础液的组成:蛋白胨10g,大豆胨3g,豚胨10g,酵母膏3g,氯化钠3g,磷酸二氢钾2.5g,硫乙醇酸钠0.3g,牛肉浸液220ml,牛心浸液120ml,牛肝浸液120ml,琼脂0.1g,加蒸馏水至1,000ml。加热溶解。加L-盐酸半胱氨酸0.3g,消化动物血清60ml。调pH至7.3,过滤。10磅灭菌20分钟,备用。

向基础液中加10%浓度的糖、醇等基质制成生化管,用于测定21种生化反应。包括:靛基质、尿素、葡萄糖、甘露醇、乳糖、蔗糖、麦芽糖、水杨素、木糖、阿拉伯糖、明胶、七叶灵、甘油、纤维二糖、甘露糖、松三糖、棉子糖、山梨醇、鼠李糖、海藻糖、接触酶。接种物为含新鲜菌的基础液,菌液浓度调整到McFarland 3号管,每支生化管接种2滴,

经37℃48小时厌氧条件下培养后判定。如反应可疑或基质中的指示剂脱色时,需在管中滴加溴甲酚紫指示剂。往甘露醇管中加入过氧化氢检查过氧化氢酶。为测定靛基质,加Kovac试液;反应不明显时,用二甲苯提取。

每一种反应判定结果后,用数值表示阳性或阴性。加上被检菌中是否有芽孢、革兰氏染色及菌的形态,共计24项。每3项为一组,数值化后得出8位数编码,按规定查检索表后确定菌种名称<sup>[3]</sup>。

## 二、数值鉴定系列培养基的确定:

1.基础培养基效果的实验观察:将小韦荣氏球菌、衣氏放线菌、产黑色素拟杆菌、疮疱丙酸杆菌同时接种TEP基础培养基(日本荣研株式会社)、厌氧菌干燥培养基基础(卫生部上海生物制品研究所)及我们研制的厌氧菌数值鉴定系列基础液,进行厌氧菌生长实验对比。按培养基的混浊度,结合涂片染色镜检的菌数判定结果(表1、2)。

2.与API-20A的生化性状符合率:用法国API Systems.A生产的API-20A与数值鉴定系列培养基对比,观察55株已知菌株的性状符合率。

3.对已知菌株的鉴定符合率:用数值鉴定系列培养基鉴定我国保存的标准厌氧菌,求出鉴定符合率。

经过以上实验,表明数值鉴定系列培养基的质量达到了国内外同类标准产品的水平。

三、编辑厌氧菌数值鉴定指南:为提供使用数值鉴定系列培养基进行厌氧菌鉴定的检索工具书,编译出厌氧菌数值鉴定指南。介绍数



表 1 三种培养基培养厌氧菌的生长状况比较

培养基种类	培养基稀释度(×)						
	2	4	8	16	32	64	128
TEP(日本荣研)	+++	++	+	+	+	+	+
厌氧菌干燥基础液(沪)	+++	++	+	+	-	-	-
数值鉴定系列基础液	+++	++	++	++	++	+	+

注: 菌液浓度为 $2,000 \pm 50$ 个/ml, 每管加入2滴

表 2 不同浓度菌液在三种培养基中生长状况比较

培养基种类	菌液浓度*(×)						
	2	4	8	16	32	64	128
TEP	+++	++	++	++	++	++	++
厌氧菌干燥基础液	++	++	++	++	++	++	++
数值鉴定系列基础液	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++

\* 原菌液浓度为 $2,000 \pm 50$ 个/ml, 每管加入2滴

值鉴定原理、数值鉴定系列培养基使用方法、补充试验、厌氧菌新种、药敏试验、厌氧菌代谢终产物的气相色谱检查等。附有临床常见11个菌属63个种的厌氧菌编码2,100余个, 共20万字。

四、建立国产气相色谱仪分析厌氧菌代谢终产物的方法: 气相色谱检查是厌氧菌鉴定中

的重要手段。为了方便我国的基层单位开展厌氧菌鉴定, 使用国产气相色谱仪和材料、试剂等建立具有我国特色的气相色谱分析方法, 用于厌氧菌鉴定。

五、对临床厌氧菌的考核鉴定: 用数值鉴定系列培养基, 对北京、南昌等地从临床各种感染症分离的厌氧菌进行鉴定, 与各单位按日本<sup>[6]</sup>或美国<sup>[7]</sup>通用的常规鉴定(并用气相色谱)结果对比。

### 结果与讨论

一、与标准厌氧菌株的鉴定符合率: 用厌氧菌数值鉴定系列培养基鉴定64株标准厌氧菌, 在补充试验以前菌属的鉴定符合率为96%, 种的鉴定符合率为33%。补充试验后, 属与种的鉴定符合率均达到100%(表3)。被鉴定的菌株中, 无芽孢厌氧菌占的比重较小, 待今后补充。气相色谱检查对于厌氧菌株的鉴定是不可少的, 梭菌属尤其是破伤风梭菌的鉴定必须做补充试验。

二、与API-20A的生化性状符合率: 用55

表 3 使用数值鉴定系列培养基鉴定64株标准厌氧菌的结果

菌名	株数	补充试验前符合(%)		补充试验后符合(%)		不符合	菌株来源
		属	种	属	种		
破伤风梭菌	26	100	0	100	100	0	中国兽药监察所、卫生部长春生物制品研究所
产气荚膜梭菌	10	100	90	100	100	0	中国兽药监察所
败毒梭菌	10	80	40	100	100	0	中国兽药监察所
肉毒梭菌	3	100	0	100	100	0	中国兽药监察所
难辨梭菌	1	100	100	100	100	0	CDC
脆弱拟杆菌	4	100	100	100	100	0	CDC、VPI、英国
吉氏拟杆菌	1	100	100	100	100	0	英国
产黑色素拟杆菌	1	100	100	100	100	0	CDC
具核梭杆菌	1	100	100	100	100	0	VPI
坏死梭杆菌	1	100	100	100	100	0	CDC
消化链球菌	1	100	100	100	100	0	CDC
小韦荣氏球菌	1	100	100	100	100	0	CDC
疮疱丙酸杆菌	2	100	0	100	0	0	日本
迟缓真杆菌	1	100	100	100	100	0	CDC
衣氏放线菌	1	100	100	100	100	0	CDC
合计	64	96	33	100	100	0	



株已知厌氧菌，检查数值鉴定系列培养基与API-20A的单个性状符合率。在1,155对性状中，1,080对符合，75对不符合，符合率为93%。分别从不符合性状的管中取其培养物涂片，镜检发现有16%是由于污染杂菌造成的，今后应防止操作中的污染。靛基质、甘油等性状的不符合者较多，可能由于有些菌株增殖速度不一，待今后调整观察结果的时间，研究其

规律性。

三、临床厌氧菌株的考核鉴定，用数值鉴定系列培养基鉴定277株临床分离的厌氧菌。属的鉴定符合率为95%，种的鉴定符合率为70%(表4)。加上64株标准厌氧菌的鉴定结果，属和种的鉴定符合率各为96%和76%。与国外文献报道API-20A的鉴定符合率相仿[1, 2]。

有66株临床分离的厌氧菌在我们的检索表

表 4 使用数值鉴定系列培养基鉴定277株临床分离的厌氧菌结果

菌 名	株 数	属 符 合		种 符 合		不 符 合	
		株数	%	株数	%	株数	%
脆弱拟杆菌	81	76	94	70	86	5	6
普通拟杆菌	27	27	100	23	85		
多形拟杆菌	14	14	100	13	93		
栖瘤胃拟杆菌短亚种	5	5	100	4	80		
栖瘤胃拟杆菌瘤胃生亚种	8	8	100	7	88		
吉氏拟杆菌	7	6	86	6	86	1	14
单形拟杆菌	4	4	100	4	100		
口腔拟杆菌	7	7	100	5	71		
产黑色素拟杆菌	5	4	80	4	80	1	20
锐利拟杆菌	2	2	100				
卵形拟杆菌	2	2	100				
多毛拟杆菌	1	1	100				
不解糖拟杆菌	1	1	100	1	100		
3452A群	2	2	100	2	100		
具核梭杆菌	1	1	100	1	100		
变形梭杆菌	2	2	100	1	50		
发酵乳杆菌	3	3	100	3	100		
嗜酸乳杆菌	2	2	100	1	50		
消化球菌	1					1	100
消化链球菌	6	6	100				
丙酸杆菌	1	1	100				
疮疱丙酸杆菌	8	8	100	8	100		
颗粒丙酸杆菌	1	1	100	1	100		
蛛网丙酸杆菌	1						
内氏放线菌	3	2	66	2	66	1	100
粘性放线菌	1	1	50	1	50	1	33
衣氏放线菌	2	2	100	2	100		
青春双歧杆菌	9	9	100	9	100		
双歧杆菌属	1					1	100
迟缓真杆菌	1					1	100
梭菌	43	40	93			3	7
难辨梭菌	25	25	100*	25	100*		
合 计	277	262	95	193	70	15	5

\* 补充试验后的结果统计



中无编码,我们称为“待编码菌”。这些无芽胞厌氧菌,在我国临床上颇为常见,均为拟杆菌属的细菌,待继续收集,补充编码。因条件所限,考核鉴定的临床菌株数较少,待今后进一步补充。

摘要

本文报道使用国产材料及试剂研制出厌氧菌数值鉴定系列培养基,用国产气相色谱仪建立厌氧菌代谢终产物的检查方法,并以厌氧菌的数值鉴定原理、操作方法、药敏试验、厌氧菌的新种及厌氧菌常见属种编码等为内容编辑出《厌氧菌数值鉴定指南》,在我国首次建立厌氧菌的简易鉴定系统。

用常规厌氧菌鉴定法为对照,使用这个鉴定系统检查64株标准厌氧菌和277株从临床感染症分离到的厌氧菌。鉴定结果,属水平的鉴定符合率为96%,种水平的鉴定符合率为76%,与法国的API-20A的鉴定效果一致。经北京、长春、南昌等地的六个科研、生产及医疗单位考核验证,共同认为:这个厌氧菌鉴定系统操作简便,出报告结果的时间快,费用低廉,适合医学、兽医学、科研教学单位的中小型实验室使用。

A System of Numerical Identification of Anaerobic Bacteria Studies on Preparation & Use of the Culture Media Xu Dicheng, et al. Health & Antiepidemic Station, Harbin Municipality, etc

The paper presents the initial establishment in China a system for numerical identification of anaerobic bacteria (NISA). The system consists of preparing serial culture media with nutritional biochemicals for use in identification tests, utilizing Chinamade gas chromatography system in analysing the end metabolites, and publishing a Manual on (Theory & Practice of Numerical System for Identifying Anaerobes) comparable to that of API-20A.

For evaluation of the proposed system, 64

strains of known anaerobes (type strains from CDC, VPI included) & 277 strains of anaerobic bacteria clinically isolated in China were identified with our systems compared with controls by utilizing the routine standard techniques for identifying anaerobes. A correlation of 96% was obtained at the level of Genus and 76% as species. These results of identifying anaerobes compared favorably with those obtained from API-20A.

The results of evaluation prove that the proposed NISA in China possess the advantages of simplicity in application, rapidity in yielding laboratory report, inexpensive in cost, and suitable for clinical & laboratory use in assisting medical & veterinary diagnosis, and for teaching purposes in microbiology.

参考文献

1. Starr SE, et al. Appl Microbiol 1973; 25(5): 713.
2. Groschel D. Zbl Bakt Hyg 1 Abt, A 1974; 238: 51.
3. 徐迪诚,等.第三届全国微生态学术讨论会论文专辑. 52页.中华流行病学杂志编辑部,中国微生物学会人兽共患疾病病原学专业委员会,1985.
4. 徐迪诚主编.刘秉阳审校.厌氧菌数值鉴定指南.哈尔滨市卫生防疫站、中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所,1985.
5. 张根生,等.使用国产色谱仪及试剂分析厌氧菌的代谢终产物(内部资料).1985.
6. 日本细菌学会教育委员会.嫌气性菌の分离と同定法. 第20页.1983.
7. Holdeman LV. Anaerobe Laboratory Manual 4 ed. p13. Virginia Polytechnic Institute and State University. Blacksburg. 1977.
8. Burlage RS, et al. J Clin Microbiol 1985; 22 (1):32.

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 卢金星、阙旭初、李革,中国中医研究院中药研究所刘林祥、李志军,解放军三〇四医院何道生,江西省科学院微生物研究所熊德鑫,北京市口腔医院杨圣辉、任蕾、张春梅,卫生部长春生物制品研究所李惠发、石云祥,北京友谊医院苏建荣及中国科学院微生物研究所赵玉峰、蔡妙英、刘聿太等同志,对应用考核给予协助,致衷心谢意。哈尔滨市卫生防疫站冉祥杰、姜远珠、李连洁、李恩华、曲艳秋、郭晶英及杜淑芬等同志参加部分工作)