

布鲁氏菌的一种简单敏感培养基

福建省地方病研究所

于恩庶 肖巧斌

目前分离布鲁氏菌所用的培养基以肝浸液琼脂和土豆琼脂培养基为主,为了促进菌的生长,添加葡萄糖和甘油有良好效果。这种培养基的材料(肝)来源,有时缺乏,大量供应困难,如果向培养基内添加营养物质,不仅制备手续麻烦,成本亦高。为了克服这些缺点,我们找到一种简单敏感培养基,用肉渣消化液制成琼脂培养基,它不需蛋白胨,也不需添加其他营养物质。现将结果报告如下:

材料与方法

菌株:牛、羊、猪三个种标准菌株系由卫生部药品生物制品检定所分让。另外一个羊种菌株“羊50”系从我省病羊所分离。以上四株在试验前做了鉴定,均具有典型布鲁氏菌的特性,三胜黄素试验阴性。

培养基:

(1)肝浸液培养基,按常法制备,略。

(2)肉渣消化液培养基,基本按赫金格尔消化液的方法从肉渣制成消化液,而不是从肉水消化,即新鲜牛肉切碎,每斤加水1000毫升,煮沸,过滤取出肉汁供制肉汤培养基外,所余肉渣每斤再加水1000毫升,并加胰酶4~5克,氯仿10~20毫升,以后同赫金格尔消化液的制法。

试验方法:取各生物种布鲁氏菌在肝琼脂上培养,在37℃孵育2天,刮菌,混悬于生理盐水内,制成每毫升含有30亿个菌体,然后10倍稀释,最后取0.1毫升(约30个菌)接种于各种培养基,每种三个平板,把菌摇开。均匀散布于培养基上,待稍干后,置37℃培养,间隔不同时间,观察出现菌落的时间,大小,第6天计算一次菌落数,菌落大小的计算方法,

是从每个平板各推选5个最大的菌落在显微镜下测量。

从实验感染的动物血液和肝脾分离布鲁氏菌的方法:是用本省地方羊种菌株“羊50”的不同菌数〔100, 1000, 10,000, 100,000, 1,000,000〕各皮下注射20只小白鼠。于接种后一周和一个月各杀10只,取肝脾直接在培养基上分离培养,取血液在肝汤和肉渣消化液内增菌,再间隔不同时间,分别移植于肝琼脂和肉渣琼脂平板,如有可疑菌落,先与免疫血清做玻片凝集,从中抽出一些菌落过纯培养,作进一步生化性状鉴定。

结 果

首先研究了各生物种布鲁氏菌在肉渣消化液琼脂的生长速度,并以肝琼脂为对照。结果发现在肉渣消化液琼脂上出现肉眼可见菌落的时间为2天,而在肝浸液琼脂上出现菌落的时间为3~5天,较前迟1~3天,见表1。

表1 各菌株在肉渣消化液琼脂和肝琼脂上出现菌落的时间(天)

菌 株	肉渣消化液琼脂 (氨基氮含量)			琼脂肝 浸液
	70mg%	100mg%	126mg%	
羊种标准株	2	2	2	4
牛种标准株	2	2	2	25
猪种标准株	2	2	2	3~5
羊种“羊50株”	2	2	2	4~5

注:本表系3次试验的综合结果

在观察菌落出现的同时,测量了菌落的大小。在肉渣消化液琼脂上,培养2天时猪种菌落大约0.5毫米,牛、羊种菌落在0.2~0.3毫米,培养4天有菌落出现,大小为0.3~0.9毫米,培养6天时为1~1.2毫米左右,很显然较前一

种培养基的菌落为小。

以上所用肉渣消化液培养基的氨基氮含量为70、100和126mg%三种浓度，在菌落出现时间和大小上，都没有明显差别。为了节约培养基的材料，将其稀释为10、30、50和70mg%，检查了各菌株的生长情况。结果培养基的氨基氮含量在10mg%以上者，各布鲁氏菌均能生长很好，并较肝浸液琼脂为佳，但在30mg%以下者不及50mg%以上的好，这可能因为消化液稀释过淡的关系。

上述培养基均加有甘油和葡萄糖，还不能真正看出培养基的优劣，现将不加任何营养物质和刺激剂的两种培养基，按同法进行比较试验，结果在肉渣消化琼脂不加甘油和葡萄糖时，对菌落出现时间和大小，与加有这两种物质者无大影响，而在肝浸液琼脂不加这两种物质，则延迟生长，参见表2。

表2 布鲁氏菌在不加甘油和葡萄糖两种培养基上生长情况

菌株	肉渣消化液琼脂			肝浸液琼脂		
	出现菌落时间(天)	菌落大小(mm)*	菌落数	出现菌落时间(天)	菌落大小(mm)*	菌落数
羊种标准株	2	2.9	17	6	0.4	5
牛种标准株	2	2.7	13	5	1.2	3
猪种标准株	2	4.5	19	3	2.3	16
羊种“50株”	2	2.7	22	6	0.1	3

* 第6天

其次我们又按制造肉渣消化琼脂培养基的方法，配制了肝渣消化琼脂和牛肉消化液琼脂，均不加甘油和葡萄糖。把各布鲁氏菌10个菌接种在这些培养基上，并观察菌落出现时间，菌落大小以及菌落数，并以肝琼脂添加甘油和葡萄糖为对照。其结果表明，三种消化液的固体培养基较一般常用的肝琼脂(加有甘油和葡萄糖者)为佳。又用这三种消化液制成液体培养基并以肝汤为对照，比较了羊种“50株”的生长情况，方法是每种培养基为5毫升，接种10个菌，次日起用肉眼观察生长情况，结果在接种后3~5天，肝汤基肉眼才见到微浊；而三种

消化液的培养基内，接种后2天即见明显生长，液体混浊，比肝汤提早1~3天。

最后使用肉渣消化液琼脂和肉渣消化汤对实验感染羊种布鲁氏菌的小白鼠进行了病原分离，并以肝琼脂和肝汤为对照，结果见表3。

表3 用两种培养基从感染动物分离布鲁氏菌的比较

感染后时间	感染菌数	直接分离培养				增菌培养	
		肉渣消化液琼脂		肝浸液琼脂		肉渣消化汤	肝汤
		出菌率	出现菌落天数	出菌率	出现菌落天数		
—周	100	0/10	—	1/10	—	0/10	0/10
	1,000	0/10	—	0/10	—	1/10	1/10
	10,000	0/10	—	0/10	—	0/10	0/10
	100,000	2/10	3.5	0/10	—	2/10	3/10
	1000,000	5/10	3.0	0/10	—	1/10	1/10
	合计	7/50	3.1	0/50	—	4/50	5/50
—个月	100	2/8	4.0	1/8	5.0	1/8	1/8
	1,000	0/6	—	0/6	—	0/6	0/6
	10,000	4/6	4.2	3/6	7.0	1/6	0/6
	100,000	3/6	4.3	3/6	6.3	1/6	0/6
	1000,000	3/6	4.3	3/6	7.6	2/6	2/6
	合计	12/32	4.3	9/32	6.8	5/32	3/32

注：有一只鼠培养、污染杂菌做阴性计算

从表3结果可以看出，用液体增菌培养方法从机体内分离细菌，两种培养基的差别，尚难肯定。但用固体培养基直接分离方法，则表现出肉渣消化液琼脂的优越性，第一检出阳性数多，第二出现菌落时间快，第三不同批制备的肝浸液的质量差别很大，而每批肉渣消化液的质量基本是稳定的。

为了进一步比较两种固体培养基对分离感染动物的检菌效果，又用羊种“50株”感染一批小白鼠，13天后杀死，取血和脾分别接种两种培养基，共检查60只，结果血液阳性者一只，两种培养基同样检出。从脾脏分离阳性者，肝琼脂为20份，肉渣消化液琼脂为20份，两种培养基的出菌率没有差别，但菌落出现时间则有明显差别。肝琼脂第4天才看到菌落，最迟7~9天，平均5.4天出现；肉渣消化液

琼脂第3天就可看到菌落,最迟5~6天,平均3.7天出现。

讨 论

我们利用制造牛肉汤所剩下的肉渣,再按赫金格尔培养基的制造方法,制造肉渣消化液培养基,很适于布鲁氏菌的生长,生长速度快,培养2天,肉眼即可见到菌落。其次是从感染动物分离的出菌率高,不低于添加甘油和葡萄糖等营养物质的肝浸液琼脂。

配制培养基所用肉渣消化液浓度,我们是按氨基氮含量来稀释的,实验证明在氨基氮含量50mg%以上时,布鲁氏菌即能生长良好,少于此数菌落小,生长较差。

肉渣消化液培养基的优点,第一,生长速度快,培养2天即有菌落出现,比肝琼脂提早1~3天,第二,从有菌材料直接分离的阳性率很高,适于初代直接分离培养用。第三,成本低可大量供应,一斤半牛肉除制成1000毫升肉汤,供其他用处外,可制成1000毫升肉渣消化液琼脂,节省了蛋白胨和其他营养物质的消耗,并简化了培养基的制备手续。但是各菌株在肉渣消化液琼脂上移植不同代后生化特性的检查结果表明,有出现变异的情形,故用于长期保留菌株不一定相宜。

摘 要

利用牛肉汤所剩下的肉渣,再用胰酶消化为肉渣消化液,按氨基氮50~70mg%的浓度稀释,配成液体和固体培养基,适于各布鲁氏菌的生长,表现在出菌快,培养最初几天的菌落大,对初代分离培养,可代替肝琼脂培养基,但长期传代不适合,容易变为粗糙型。

这种培养基所需材料少,不用蛋白胨和其他营养物质,成本低,符合节约原则,具有在广大疫区推广使用的条件。

ABSTRACT

After veal infusion broth being made, the residue of veal can digested by adding trypsin. Then the digestive juice can be used to make liquid and solid media. The method is the same as making other infusion broth media, but they must contain amino-nitrogen from 50—70%. These media can support better growth of each biotype of Brucella. Using the media to separate the contaminants of Brucella shows the positive result sooner than using liver infusion agar. Also the colonies is larger. So, the veal residue digest broth can be used to culture Brucella primarily from infective materials instead of using liver infusion broth.

Since it only uses less materials and it needs not to add glycerine and dextrose, and it's cheap in making the medium, the media is worth being widely used in epidemic areas.

家犬弓形体病的血清学调查

沈阳军区后勤部军事医学研究所 刘国栋

为了查明辽宁地区家犬感染弓形体病的情况,我们抽测了法库、岫岩二县的家犬,兹报告如下:

血清标本:从法库县食品收购站取家犬血清18份,岫岩县食品收购站27份,计45份。

弓形体抗原:哈尔滨兽医研究所提供,溶血素由本室制备。

补结试验:按Kolmer—Boerne氏法。血清稀释自1:4至1:64,以1:16为阳性。

结果:法库县食品收购站18只犬,阳性10只,阳性率为55.6%,岫岩县食品收购站27份,阳性11只,阳性率为40.7%,GMT前者1:16.00,后者为1:13.13。

本调查证实,法库、岫岩二县犬间存在着弓形体病感染,而犬与人的关系密切,可能引致人间感染传播,十分值得注意。