

• 检验技术与方法 •

安瓿法系列 O-F 糖醇管在非发酵菌鉴定中的应用研究

邹凤梅,魏莲花,刘 刚
(甘肃省临床检验中心,兰州 730000)

摘 要:目的 对非发酵菌鉴定常用的 O-F 糖醇试管法进行改良,为实验室鉴定非发酵菌提供方便、准确的方法。方法 对标准菌株 2 株、临床分离菌株 387 株进行试验,将改良安瓿法 O-F 糖醇管与传统法、常量试管法进行对比,根据常规方法判断结果。结果 改良安瓿法与常量试管法结果完全一致。结论 用改良安瓿法 O-F 糖醇管进行试验,结果准确,该方法可以推广应用。

关键词:非发酵菌; 研究; 改良安瓿法 O-F 糖醇管
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 03. 039 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)03-0371-02

传统判别细菌代谢类型的方法是 Hugh-Lefson 方法(O-F 双试管法),除可观察细菌糖代谢方式外,还可用于测定非发酵菌分解利用碳水化合物。但传统 O-F 双试管法采用溴麝香草酚蓝作指示剂,对一些弱产酸菌不易判断结果,而且其中一管需要添加液体石蜡,操作繁琐。为克服这些不足,本组研制了用安德烈作指示剂的安瓿法(单支高管),无需加液体石蜡,可室温长期保存,实际应用效果良好,报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853,均购自中国药品生物鉴定所。试验菌株为本中心微生物实验室从各类临床标本中分离的生物学特性典型的菌株 387 株,包括铜绿假单胞菌(120 株)、嗜麦芽窄食单胞菌(80 株)、产碱假单胞菌(30 株)、恶臭假单胞菌(20 株)、洋葱伯克霍尔德菌(20 株)、斯氏假单胞菌(5 株)、腐败谢瓦那菌(2 株)、鲍曼不动杆菌(100 株)、洛菲不动杆菌(10 株)。

1.2 仪器及试剂 2 mL 安瓿(重庆北碚玻璃仪器厂);蛋白胨、琼脂、NaCl、K₂ HPO₄、溴麝香草酚蓝、酚红、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、甘露醇等,均为天津化学试剂厂生产。

1.3 方法

1.3.1 菌株复活及鉴定 菌种管中加入 0.5 mL 肉汤,充分溶解后吸取 1~2 滴菌液至血琼脂平板,分段划线接种,35 ℃ 孵育 24 h,用常规方法分离、涂片、染色镜检,用试管法、API-

20E 鉴定卡或 Vitek-32 鉴定。

1.3.2 培养基配制 配制糖醇氧化-发酵培养基,传统法采用溴麝香草酚蓝作指示剂^[1-2],常量试管法 O-F 糖管采用安德烈作指示剂^[3-4],每管分装 4~5 mL,改良安瓿法 O-F 糖醇管配制方法同常量试管法,分装时取 0.7 mL 加入 2 mL 安瓿中,汽油酒精喷灯拉丝封口,以上各种 O-F 糖醇管高压灭菌后,直立冷却,冰箱保存备用。

1.3.3 接种与孵育 传统方法为双管试验,挑取上述复活菌纯培养物穿刺接种 2 支 O-F 糖醇管,距管底约 1/4 处,一管在接种细菌后加无菌液体石蜡,此为封闭管,另一管不加,为开放管;常量试管法为单支高管,接种后无需加液体石蜡;改良安瓿法接种后用一小块封口膜封口并留有缝隙。以上各种 O-F 糖醇管接种后于 35 ℃ 培养 18~24 h,观察结果。

1.3.4 结果观察 (1)传统方法:阴性及未接种时均为绿色;两管均变黄色为发酵;封闭管不变,开放管表层或上层变黄色为氧化^[1,5]。(2)常量试管法与改良安瓿法:阴性及未接种时均为白色或淡粉色;产酸时呈明显的红色;氧化时仅培养基表层或上层变红,下层始终保持本色不变;发酵时整管培养基全部变红^[3,6]。

2 结 果

2.1 传统法、常量试管法与改良安瓿法鉴别细菌代谢类型结果对比 见表 1。

表 1 3 种方法鉴别细菌代谢类型阳性率(%)

菌种	n	葡萄糖			乳糖			麦芽糖			蔗糖			甘露醇		
		方法 1	方法 2	方法 3	方法 1	方法 2	方法 3	方法 1	方法 2	方法 3	方法 1	方法 2	方法 3	方法 1	方法 2	方法 3
铜绿假单胞菌	120	99	100	100	0	0	0	9	9	9	0	0	0	76	76	76
嗜麦芽食单胞菌	80	100	100	100	90	90	90	100	100	100	100	100	100	0	0	0
产碱假单胞菌	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
恶臭假单胞菌	20	99	100	100	10	10	10	18	18	18	0	0	0	0	0	0
洋葱伯克霍尔德菌	20	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	100	100	100
斯氏假单胞菌	5	100	100	100	0	0	0	100	100	100	0	0	0	80	80	80
腐败谢瓦那菌	2	100	100	100	0	0	0	100	100	100	100	100	100	0	0	0
鲍曼不动杆菌	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0
洛菲不动杆菌	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
大肠埃希菌 ATCC25922	1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
绿假单胞菌 ATCC27853	1	100	100	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	76	76	76

注:方法 1 为传统法;方法 2 为常量试管法;方法 3 为安瓿法。

2.2 改良安瓿 O-F 糖醇管贮存期观察 将以上各种安瓿 O-F 糖醇管贮存于室温环境下,分别在 0.5、1、1.5、2 年观察,O-F 糖醇管无干燥、变色、细菌污染等现象。接种相应质控菌株,试验结果与初始配制时结果相同。

3 讨 论

近年来,随着各种先进的诊疗技术及抗生素的应用,非发酵革兰阴性杆菌感染发生率明显增加,其耐药问题引起广泛关注^[7-8]。从临床标本中分离这些细菌并无困难,但对它们的准确鉴定远比肠杆菌科细菌难度大的多。对各种 O-F 糖醇的利用试验仍是手工法鉴定非发酵菌的主要鉴定方法之一。传统法用溴麝香草酚蓝作指示剂,双管试验,其中一管要加液体石蜡,方法繁琐,阳性结果有时呈黄绿色,与本色绿色不易区别,难以判断,同时还需冰箱保存,占位大且保存期短,试剂成本高。改用安德烈作指示剂,单支高管,不加液体石蜡,方法简单,颜色反应明显稳定,结果容易判定,但常量试管法仍然存在成本高、冰箱保存,不仅占位大而且保存期短的问题。将常量试管法研制成改良安瓿法,不仅体积小,试剂用量少,节约成本,而且安瓿管完全密封,可长期室温保存。通过对 387 株非发酵菌进行对比试验,两法颜色反应一致,结果完全相同,而且改良法比另两种方法都具有优越性,适合于采用手工法鉴定非

• 检验技术与方法 •

发酵菌的各级医疗机构、科研院所使用。

参考文献

[1] MacFaddin JF. 医学细菌生化试验鉴定手册[M]. 林万明,译. 北京:人民卫生出版社,1985.
[2] 张卓然. 临床微生物学和微生物学检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2003.
[3] 刘锡光. 现代诊断微生物学[M]. 北京:人民卫生出版社,2002.
[4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程/中华人民共和国卫生部医政司[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006.
[5] 李仲兴,郑家齐,李家宏. 诊断细菌学[M]. 香港:黄河文化出版社,1992.
[6] 周庭银. 临床微生物学诊断与图解[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2007.
[7] 周卫东,陈月洁. 非发酵革兰阴性杆菌的耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(6):612-613.
[8] 朱永华,史伟峰. 三种常见非发酵菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2006,27(12):1083-1084.

(收稿日期:2010-03-09)

不同溶血方法对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性影响的研究

贾璋林¹,杨发达¹,谢煜楠¹,孙 威¹,梁睿熙²

(1. 广州中医药大学附属南海妇女儿童医院检验科,广东佛山 528200;2. 海南医学院检验系,海口 571101)

摘 要:**目的** 探讨溶血方式对葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)活性的影响。**方法** 采用不同溶血方式处理标本后立即上机测定 G6PD 活性,并每隔 10 min 测定 1 次,共测定 5 次,计算在放置过程中 G6PD 活性的下降率,并进行统计分析。**结果** G6PD 活性下降率与皂素、十六烷基三甲基溴化铵的浓度呈正相关,皂素的最低溶血浓度为 0.02%,十六烷基三甲基溴化铵为 0.006%;0.03%皂素-CPDA、0.02%皂素-CPDA、0.03%皂素-生理盐水、纯净水、0.006%十六烷基三甲基溴化铵-CPDA、0.006%十六烷基三甲基溴化铵-生理盐水、冻溶-CPDA、试剂盒配套溶血剂共 8 种溶血方式 G6PD 活性下降率分别为 6.2%、2.9%、8.68%、9.94%、5.9%、8.93%、3.76%、10.58。**结论** 0.02%皂素-CPDA、冻溶-CPDA 2 种溶血方式能较好地维持 G6PD 活性,建议测定 G6PD 活性时采用这 2 种溶血方式

关键词:溶血; 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性; 放置时间

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.03.040 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)03-0372-03

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) 缺乏症是人类最常见的伴性遗传疾病^[1]。目前用于 G6PD 活性检测的方法主要包括:高铁血红蛋白还原法、亚硝基四氮唑蓝法、荧光斑点法、G6PD/6PGD 比值法、酶动力学法^[2]。后 3 种方法均需制备溶血液才能进行测定。但是在标本制成溶血液后,G6PD 活性随时间的延长而呈明显的下降趋势,从而可能导致假阳性结果的出现。因而探索溶血液中 G6PD 活性不稳定的原因,改良溶血剂的配方及溶血方法,提高酶在溶血液中的稳定性,是 G6PD 测定方法学改进中值得研究的问题。

1 资料与方法

1.1 标本来源 本院门诊及住院受检验者的 ACD 抗凝血标本。

1.2 仪器及试剂 日立 7060 生化分析仪,漩涡混合器,离心机、冰箱、分析天平。ACD 血液保存液:葡萄糖 14.7 g/L,柠檬酸钠 13.2 g/L,柠檬酸 4.4 g/L, pH5.03;CPDA 血液保养液:

葡萄糖 25.5 g/L,柠檬酸钠 26.3 g/L,柠檬酸 3.27 g/L,磷酸氢二钠 2.22 g/L 腺嘌呤 173 mg/L, pH5.63;柠檬酸钠溶液 (31.3 g/L);皂素-生理盐水溶液 (1 g/100 mL);十六烷基三甲基溴化铵-生理盐水溶液 (1 g/100 mL);G6PD 测定试剂盒由广州科方生产。

1.3 方法 (1)冰冻溶血试验:随机抽取 10 份 ACD 抗凝标本,3 000 r/min 离心 5 min,吸取管底的压积红细胞 10 μL 进行试验,每个标本取样 3 次,分别加在 A、B、C 3 个样品杯中,分成 A、B、C 3 组进行试验,分别放入-12℃、-15℃、-25℃冰箱中,每隔 5 min 迅速从每组的冻室中取出 1 个样品,加入生理盐水 500 μL,混匀后观察溶血情况,以外观液体清亮,无任何混浊,显微镜下无红细胞或红细胞影为完全溶血。冰冻溶血试验每天 1 次,重复 3 d。(2)溶血剂最低溶血浓度试验:取小细胞低色素红细胞标本 10 份,随机分成 A、B 2 组,每组 5 份,经 3 000 r/min 离心 5 min,吸取管底的压积红细胞 10 μL 进行试验,每个标本取样 8 次,分别加入 8 个样品管中,A 组 1~8 号