

• 论 著 •

定位显色培养基在细菌快速初步鉴定中的应用

杨自副¹, 陈默蕊^{2△}

(1. 云南省楚雄州中医院检验科 675000; 2. 广东省潮州市中心医院检验科 521000)

摘要:目的 评价定位显色培养基在细菌快速初步鉴定中的作用。方法 将 3 313 株临床菌株和 145 株室间质评菌株接种于定位显色培养基上, 观察显色特点, 总结细菌显色规律。结果 不同种属的细菌在定位显色培养基上具有一定的显色规律。结论 定位显色培养基对细菌的快速初步推测和鉴定具有重要的应用价值, 具有成本低廉、有助于提高工作效率等优势, 值得推广应用。
关键词:定位显色培养基; 显色; 导航; 快速; 细菌鉴定
DOI:10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2011. 07. 017 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)07-0760-03

Application of orientation chromogenic medium on initial rapid identification of bacteria

Yang Zifu¹, Chen Morui^{2△}

(1. Department of Laboratory Science, Chuxiong Prefecture Hospital of Traditional Chinese Medicine Yunnan 675000, China; 2. Department of Laboratory Science, Chaozhou Center Hospital, Guangdong 521000, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the application of orientation chromogenic medium (OCM) on initial rapid identification of bacteria. **Methods** 3 313 strains of bacteria isolated from clinical specimens and 145 strains of external quality assessment were inoculated on OCM, chromogenic character of different strains were observed and analyzed. **Results** There were certain chromogenic laws of different genera and species of bacteria on OCM. **Conclusion** OCM might have significant application value on initial rapid speculation and identification of bacteria, with the advantages of low-cost and high efficiency, and worth for widely clinical application.
Key words: orientation chromogenic medium; chromogenic; navigational; rapid; identification

定位显色培养基(即科玛嘉尿道定位显色培养基)是一种通用型营养性商品化培养基, 尿液标本中常见细菌能在其表面生长良好并显示出特定的菌落颜色, 因此被用于尿道标本病原菌的初步鉴定; 其检测原理是培养基中含有的人工合成底物(由产色基团和微生物可代谢物质组成)在细菌产生的特异性酶(如β-半乳糖苷酶等)作用下, 游离出产色基团显示特定颜色, 直接观察菌落或菌苔颜色即可对菌种做出快速初步鉴定^[1-5]。在临床工作中发现, 该培养基除可用于尿液标本中主要病原菌的初步鉴定外, 在其他类型标本常见分离菌的快速初步鉴定和药敏试验的选择上也能发挥很好的指导作用。为评价定位显色培养基用于细菌快速初步鉴定的应用价值, 笔者进行了相关的研究和分析, 结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 3 313 株临床菌株在该两家医院 2008 年 1 月至 2009 年 12 月分离自临床血液、尿液、粪便、痰液等不同类型标本; 145 株同期卫生部及省临检中心室间质评菌株。
1.2 主要试剂 定位显色培养基干粉购自郑州博赛生物工程有限公司、麦康凯琼脂(MacConkey agar, MAC)干粉购自杭州天和微生物试剂有限公司, 均按试剂说明书配制平板。血琼脂培养基(blood agar culture-medium, BAC)平板购自广州迪景

微生物科技有限公司和郑州博赛生物工程有限公司。
1.3 细菌鉴定 用法国生物梅里埃的 API 鉴定软件及相关试条鉴定, 补充试验采用杭州天和微生物试剂有限公司的生化微量管。
1.4 质量控制 以金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、粪肠球菌 ATCC 29212、大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853 进行质控。
1.5 方法 将 3 313 株临床菌株点和 145 株室间质评菌株接种于定位显色培养基上, 35℃培养 2 h 后开始观察菌落、菌苔显色变化; 同时进行 API 生化鉴定。为直观表述定位显色培养基上细菌的显色特点, 选择其中的代表性菌株(以质评菌为主), 按一定顺序(字母或阿拉伯数字)接种于定位显色培养基上, 35℃培养 2 h 后观察菌落、菌苔显色特点; 根据不同细菌的显色特点, 参照《全国临床检验操作规程》等资料^[6-9], 辅以生化试验将常见细菌(代表性菌株)鉴定到种; 比较定位显色鉴定结果与 API 鉴定结果, 评价定位显色培养基的快速初步鉴定和指导作用。
2 结果
2.1 细菌定位显色 细菌在定位显色培养基上培养 24 h 的显色特点见插图Ⅱ图 1~3。API 及定位显色鉴定结果比较见表 1。

表 1 API 及定位显色培养基鉴定结果及显色特点

细菌	质评菌株		临床菌株		显色特点
	API(n)	定位显色培养基[n(%)] ^a	API(n)	定位显色培养基[n(%)] ^a	
大肠埃希菌	8	8(100%)	1 086	1 069(98%)	粉红色
克雷伯菌属	5	5(100%)	246	244(99%)	蓝色, 较深, 菌落大, 有黏性
肠杆菌属	5	5(100%)	259	250(97%)	蓝色, 较深, 无黏性
枸橼酸杆菌属	3	3(100%)	71	68(96%)	蓝色, 较深, 无黏性 ^b
沙雷菌属	4	4(100%)	69	67(97%)	蓝色, 稍浅, 无黏性 ^c
变形杆菌属	6	6(100%)	37	35(95%)	褐色晕轮背景 ^d

△ 通讯作者, E-mail: hampc@163. com。

续表 1 API 及定位显色培养基鉴定结果及显色特点

细菌	质评菌株		临床菌株		显色特点
	API(n)	定位显色培养基[n(％)] ^a	API(n)	定位显色培养基[n(％)] ^a	
摩根菌属	0	0(100％)	10	10(100％)	褐色晕轮背景,半透明菌落
普罗威登菌属	1	1(100％)	6	5(83％)	褐色晕轮背景,半透明菌落 ^e
沙门菌属	8	8(100％)	25	24(96％)	无色,透明
志贺菌属	11	7(64％)	8	6(75％)	无色,透明 ^f
嗜水气单胞菌	4	4(100％)	13	10(77％)	蓝色,边缘显色较浅
副溶血弧菌	3	3(100％)	8	5(62％)	浅绿色,少量接种不易生长
不动杆菌属	6	6(100％)	237	237(100％)	奶油色,不透明凸起菌落
铜绿假单胞菌	12	12(100％)	339	330(97％)	淡绿色半透明,边缘扩散生长
洋葱伯克霍尔德菌	6	6(100％)	18	18(100％)	无色透明,边缘不扩散
嗜麦芽假单胞菌	3	3(100％)	25	24(96％)	同上,延长培养呈翠绿色
棒状杆菌属	4	4(100％)	15	10(67％)	蓝色 ^g
红斑丹毒丝菌	3	3(100％)	0	0(100％)	紫色,微弱生长
李斯特菌属	3	3(100％)	0	0(100％)	蓝色,较深
奴卡菌属	3	3(100％)	2	2(100％)	淡蓝色,生长缓慢
金黄色葡萄球菌	12	12(100％)	286	270(94％)	淡黄色至金黄色
凝固酶阴性葡萄球菌	15	15(100％)	146	130(89％)	白色 ^h
链球菌属	10	8(80％)	46	30(65％)	浅蓝色,生长较弱 ⁱ
肠球菌属	10	10(100％)	361	345(95％)	蓝色,产色快、深
合计	145	139(95％)	3 313	3 189(96％)	/

^a:百分率表示定位显色培养基鉴定结果与 API 鉴定结果的符合率;^b:部分杨氏枸橼酸杆菌呈粉红色;^c:有颜色的粘质沙雷菌呈特殊颜色;^d:褐色背景上,部分普通变形杆菌菌落呈蓝色,其他变形杆菌为半透明菌落;^e:雷氏普罗威登菌在褐色背景上呈蓝色菌落;^f:宋内志贺菌呈粉红色;^g:部分棒状杆菌呈白色;^h:腐生葡萄球菌和模仿葡萄球菌呈浅粉红色,木糖葡萄球菌呈粉红色,松鼠葡萄球菌呈蓝绿色;ⁱ:马链球菌、停乳链球菌及甲型链球菌呈粉红色;/:无对应结果。

表 2 定位显色和补充生化试验鉴定常见革兰阴性杆菌结果^[6-9]

细菌	菌落特点	MOT	V-P	IND	ADH	LDC	ODC	SOR	预期细菌	其他特性
革兰氏阴性发酵杆菌	粉红色	/	/	+	/	/	/	/	大肠埃希菌	/
		/	/	—	/	/	/	/	杨氏枸橼酸杆菌	/
	蓝色(金属蓝)	—	/	+	/	/	/	/	产酸克雷伯菌	克雷伯菌属菌落
		—	/	—	/	/	/	/	肺炎克雷伯菌	大、有黏性
		+	—	/	/	/	+	/	差异枸橼酸杆菌	/
		+	—	/	/	/	—	/	弗氏枸橼酸杆菌	/
		+	+	/	—	—	—	+	聚团肠杆菌	/
		+	+	/	—	+	+	+	产气肠杆菌	/
		+	+	/	—	+	+	—	格高非肠杆菌	/
		+	+	/	+	—	+	+	阴沟肠杆菌	/
		+	+	/	+	—	+	—	阪崎肠杆菌	MAC 平板上阪崎肠杆菌
		+	+	/	+	—	+	—	生癌肠杆菌	显紫色,生癌肠杆菌无色
	蓝色(水晶蓝)	+	+	/	—	+	+	+	粘质沙雷菌	MAC 平板上菌落无色
	褐色晕轮背景	/	/	—	/	/	+	/	奇异变形杆菌	BAC 平板上迁延生长,显色
		/	/	+	/	/	—	/	普通变形杆菌	定位培养基上普通变形杆菌
		/	/	—	/	/	—	/	彭氏变形杆菌	显蓝色,奇异和彭氏肠杆菌无色
		/	/	+	/	/	+	/	摩根摩根氏菌	BAC 平板上无迁延生长
		/	/	+	/	/	—	/	普罗威登菌属	
	无色透明	+	/	/	/	/	/	/	沙门氏菌	血清学试验
		—	/	/	/	/	/	/	志贺菌属	血清学试验
革兰氏阴性非发酵菌	奶油色不透明凸起边缘扩散淡绿色半透明	—	/	/	/	/	/	/	鲍曼/醋酸不动杆菌	鲍曼不动杆菌 42 ℃生长
		/	/	/	/	/	/	/	铜绿假单胞菌	特殊气味

MOT:动力试验;V-P:Voges-Proskauer 试验;IND:吡哌试验;ADH:精氨酸双水解酶试验;LDC:赖氨酸脱羧酶试验;ODC:鸟氨酸脱羧酶试验;SOR:山梨醇发酵试验;/:无需额外补充试验。

2.2 定位显色和补充生化试验鉴定常见革兰阴性杆菌结果见表 2。

3 讨 论

能在传统培养基上生长的细菌,大部分也能在定位显色培养基上生长。革兰阴性菌生长良好,且显色速度快;革兰阳性菌生长弱于阴性菌,但大部分显色也较快,其产生的色素易渗

入培养基;弧菌属由于对盐的特别需求而在此培养基上几乎不生长,或需大量接种才能生长并显色。上述现象可能与细菌所需营养和生长速度不同有关。

大肠埃希菌、宋内志贺菌和部分枸橼酸杆菌能够产生 β-半乳糖苷酶,所以在定位显色培养基上显粉红色。98%的大肠埃希菌显粉红色,2%不显色,提示定位显色培养基鉴定此菌特异

性较高,与有些研究报道基本一致^[1-5];通过补充靛基质试验,能够快速鉴别呈粉红色的大肠埃希菌与其他细菌。在定位显色培养基上克雷伯菌属、肠杆菌属、枸橼酸杆菌属(K-E-C 群)均呈金属蓝色,部分菌落带有粉红色外晕,沙雷菌属则呈水晶蓝色(产色株除外),虽难以通过定位显色培养基鉴别上述细菌,但可根据他们在其他培养基上的生长特点和补充生化试验进行鉴别(如克雷伯菌属动力试验阴性、在 BAC 上菌落较大且有黏性;枸橼酸杆菌属 V-P 试验阴性)^[6-12]。变形杆菌属、摩根菌属和普罗威登菌属(P-M-P 群)可产色氨酸脱氨酶,在定位显色培养基上呈褐色晕轮背景(褐色渗入培养基中,菌落本身可不显色),补充 IND 和 ODC 试验可鉴定至种。沙门菌属和志贺菌属在定位显色培养基上呈无色透明菌落(宋内志贺菌除外),可用于快速鉴别粪便标本中的沙门、志贺菌。由于不发酵乳糖革兰阴性菌很多,其在 MAC/SS 培养基上为无色菌落,在定位显色培养基上则部分菌种显色,若粪便标本中的不发酵乳糖且氧化酶(OX)阴性革兰阴性杆菌接种于定位显色培养基上呈无色透明菌落时,可通过补充 MOT、IND 和血清学试验实现快速鉴定。宋内志贺菌在定位显色培养基上呈粉红色,因此将粪便标本接种于 MAC/SS 培养基上培养 18~24 h 后挑取无色菌落点种于定位显色培养基上培养并呈粉红色时,补充 OX、IND 和血清学试验可实现快速鉴定。大部分革兰阴性非发酵糖菌在定位显色培养基上不显色,呈透明菌落,而不动杆菌属呈奶油色、铜绿假单胞菌呈淡绿色且菌落边缘呈扩散生长、嗜麦芽窄食单胞菌菌落周围呈翠绿色,上述特性对快速初步鉴定细菌具有一定的指导作用。

肠球菌属在定位显色培养基上呈深蓝色,通过补充胆汁七叶苷(BEA)、6.5% NaCl、SOR、阿拉伯糖(ARA)、MOT 及 45℃ 生长试验可进一步鉴别粪肠球菌、屎肠球菌和鹌鸡肠球菌^[3-8]。链球菌属在定位显色培养基上多数呈浅蓝色,少数呈粉红色,也有不能生长的菌种,不确定因素导致其不能得到快速、准确的鉴定,需要根据 BAC 平板上菌落溶血特点有针对性地通过兰氏分群或用 API 进行鉴定。多数葡萄球菌属细菌在定位显色培养基上无特异性显色,金黄色葡萄球菌呈浅黄至金黄色;多数凝固酶阴性葡萄球菌呈白色,少数呈特殊颜色,如腐生葡萄球菌和模仿葡萄球菌呈浅粉红色、木糖葡萄球菌呈粉红色、松鼠葡萄球菌呈蓝绿色。若显色培养基上出现上述特殊显色菌落,提示标本中可能有少见的葡萄球菌,这对后续菌种鉴定工作具有一定的指导作用。

在定位显色培养基上,多数棒状杆菌呈蓝色(少数呈白色)、奴卡菌生长缓慢且呈淡蓝色、李斯特菌属呈较深蓝色、红斑丹毒丝菌呈粉红色,由于上述菌种检测数量较少,仍不能确定其显色规律,但其显色特点能为进一步细菌鉴定提供重要信息。

细菌点种于定位显色培养基后,多数细菌培养数小时后即显色,结合菌落形态、革兰染色(G 染色)、触酶(H₂O₂)、OX、克氏双糖(KIA)及 O/F 等试验即能初步判定细菌的大致菌属,对细菌药敏试验的选择具有一定的指导作用。这对鉴定分离自无菌区标本的细菌尤其重要,比如从血或脑脊液标本中分离出在定位显色培养基上呈粉红色或蓝色的革兰阴性杆菌,应选择肠杆菌科药敏试验;H₂O₂ 阴性的革兰阳性球菌在定位显色培养基上快速(2 h 后)呈蓝色者应考虑肠球菌属药敏试验。

利用细菌在定位显色培养基上呈不同颜色的特点,可快速

鉴别分离自临床标本的细菌是单一菌或混合菌^[3,11],也可发现少见菌,有助于无菌区标本的微生物检测,也有助于选择初级药敏试验。

本研究结果表明,定位显色培养基除可应用于尿标本来源菌株的快速初步鉴定外,也可用于其他类型标本来源菌株的鉴定,证实此培养基在各种类型标本来源病原菌的快速初步推测、鉴定和选择药敏试验都有很重要的应用价值,且有助于降低检测成本、提高微生物学实验室的工作效率。但定位显色培养基检测有可能出现漏检,不能完全替代传统的生化反应鉴定,因此必要的 G 染色、H₂O₂、OX、KIA、MOT 及 O/F 试验依然不宜忽略,部分特殊菌株的鉴定仍依赖于 API 等方法。本研究获得的相关结果数据仅是冰山一角,对于同种属细菌显色特点的重复性还有待通过进一步研究以得到确认。

(致谢! 感谢复旦大学附属华山医院抗生素研究所胡付品博士对本研究的精心指导。)

参考文献

- [1] Scarparo C, Piccoli P, Ricordi P, et al. Comparative evaluation of two commercial chromogenic media for detection and presumptive identification of urinary tract pathogens[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2002, 21(4): 283-289.
- [2] Samra Z, Heifetz M, Talmor J, et al. Evaluation of use of a new Chromogenic agar in detection of urinary tract pathogens[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(4): 900-994.
- [3] Merlino J, Siarakas S, Robertson GJ, et al. Evaluation of chromogenic orientation for differentiation and presumptive identification of gram-negative bacilli and enterococcus species[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(1): 1788-1793.
- [4] 刘彩霞, 李向阳, 杨锦红, 等. 定位显色培养基快速鉴定尿路感染病原菌的临床应用评价[J]. 中华医院感染学杂志, 2007, 17(1): 112-114.
- [5] Ohkusu K. Cost-effective and rapid presumptive identification of gram-negative bacilli in routine urine, pus, and stool cultures: evaluation of the use of CHROMagar orientation medium in conjunction with simple biochemical tests[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(12): 4586-4592.
- [6] 刘锡光, 何晓青, 洪秀华, 等. 现代诊断微生物学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 390-423.
- [7] 叶应妩, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京: 东南大学出版社, 2006: 801-818.
- [8] 周庭银, 倪语星, 张秀珍. 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: 141-177.
- [9] 张秀珍, 朱德妹, 陈东科, 等. 临床微生物检验问与答[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 136-159.
- [10] 胡付品, 叶信予, 朱德妹. 一种同时鉴定和检测产超广谱 β 内酰胺酶细菌的方法[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(10): 1181-1185.
- [11] Perry JD, Freydière AM. The application of chromogenic media in clinical microbiology[J]. J Appl Microbiol, 2007, 103(6): 2046-2055.
- [12] Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, et al. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(9): 3110-3111.

(收稿日期: 2011-02-11)



1:化脓性链球菌; 2:星座链球菌; 3:松鼠葡萄球菌; 4:咽峡炎链球菌; 5:溶血葡萄球菌; 6:牛链球菌; 7:腐生葡萄球菌; 8:表皮葡萄球菌; 9:木糖葡萄球菌; 10:金黄色葡萄球菌; 11:伊氏李斯特菌; 12:红斑丹毒丝菌。A:产单核细胞李斯特菌; B:红斑丹毒丝菌; C:星型奴卡菌; D:鼻疽奴卡菌; E:伊氏李斯特菌; F:解脲棒状杆菌; G:马链球菌; H:尿肠球菌; I:停乳链球菌; J:粪肠球菌; K:无乳链球菌; L:中间链球菌。

图 1 革兰氏阳性菌显色特点



M:德比沙门菌; N:大肠埃希菌; O:鼠伤寒沙门菌; P:阴沟肠杆菌; Q:痢疾志贺菌; R:日沟维肠杆菌; S:产酸克雷伯菌; T:福氏志贺菌; U:小肠结肠炎耶尔森菌; V:甲型副伤寒沙门菌; X:(产色)粘质沙雷菌; Y:宋内志贺菌。a:肺炎克雷伯菌; b:斯图普罗威登菌; c:彭氏变形杆菌; d:嗜水气单胞菌; e:摩氏摩根菌; f:蜂房哈夫尼亚菌; g:腐败希瓦菌; h:副溶血弧菌; i:类志贺邻单胞菌; j:嗜麦芽窄食单胞菌; k:鲍曼不动杆菌; l:琼氏不动杆菌。

图 2 革兰氏阴性菌显色特点



13:迟缓爱德华菌; 14:杨氏枸橼酸杆菌; 15:粪产碱杆菌; 16:斯氏普罗威登菌; 17:布利丹沙门菌; 18:异型枸橼酸杆菌; 19:松鼠葡萄球菌; 20:副溶血弧菌; 21:肺炎克雷伯菌; 22:奇异变形杆菌; 23:模仿葡萄球菌; 24:铜绿假单胞菌。m:弗氏枸橼酸杆菌; n:洛菲不动杆菌; o:木糖氧化产碱杆菌; p:粘液大肠埃希菌; q:嗜麦芽窄食单胞菌; r:宋内志贺菌; s:阪崎肠杆菌; t:恶臭假单胞菌; u:宋内志贺菌; v:肠炎沙门菌; w:(产色)粘质沙雷菌; x:粘质沙雷菌。

图 3 其他细菌显色特点