

酚氧化酶试纸条制备与应用

赵国辉 郑震雄* 纪元 梁玉君* 刘晶*

(哈尔滨市药品检验所 哈尔滨 150076)

摘要: 制备出一种酚氧化酶试纸条, 于 37℃ 6h 内可完成酵母样真菌的酚氧化酶试验, 较常规培养基试验法至少能提前 18~24h 获得结果。该纸条置 4℃ 保存, 有效期 6 个月, 对鉴定酵母样真菌具有快速、准确、实用性。

关键词: 酵母样真菌, 酚氧化酶试验, 纸条, 制备方法

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)02-0135-03

THE DEVELOPMENT AND APPLICATION OF PHENOLOXIDASE TEST STRIP

ZHAO Guo-Hui, ZHENG Zhen-Xiong*, JI Yuan*, LIANG Yu-Jun*, LIU Jing*

(Institute of Medicine Assay of Haerbin City, Haerbin 150076)

(Haerbin Chest Hospital, Haerbin 150026)*

Abstract: We developed a phenoloxidase test strip, it completed assay phenoloxidase at 37℃ 6 hours for yeast-like fungus. The strip test quick than ordinary medium for 18~24 hours, it effecttly stored at 4℃ for 6 mounth. The strip possess quick, accurecy, plactical for yeast-like fungus.

Key words: Yeast-like fungi, Test phenoloxidase, Strip, Preparation

目前, 由于医疗上大量使用广谱抗生素、免疫抑制剂与皮质类固醇激素, 临床酵母样真菌的感染日益增多, 多数由白假丝酵母 (*Candida albicans*) 引起, 而新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 引起的严重呼吸道感染、慢性炎症和脓肿等也屡有报道。系统鉴定此类酵母样真菌需要作酚氧化酶试验, 但因试剂中的咖啡酸 (Caffeic acid) 价格较贵, 如果采用培养基检查法, 需要制备专用培养基, 30℃ 培养 2~3d, 而且制成的培养基因不能长期保存而造成浪费。1998 年以来, 我们制备出一种酚氧化酶试纸条, 可在 6h 报告试验结果, 有助于对酵母样真菌、特别是新型隐球酵母的快速鉴定。

1 材料与方法

1.1 菌种

共 94 株, 包括白假丝酵母 (*Candida albicans*) 62

株; 光滑假丝酵母 (*Candida glabrata*) 11 株; 季也蒙假丝酵母 (*Candida guilliemondii*) 5 株; 近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*) 2 株; 克鲁斯假丝酵母 (*Candida krusei*) 1 株; 热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 6 株; 新型隐球酵母 (*Cryptococcus neoformans*) 4 株; 浅白隐球酵母 (*Cryptococcus abidus*) 1 株; 多孢丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) 2 株。其中标准菌株 27 株, 由中国科学院微生物研究所提供; 临床参考菌株 67 株, 由医院从临床标本分离和辽宁省临床检验中心提供, 使用常规法及 API-20AUX 鉴定。

1.2 培养基

* 哈尔滨市胸科医院

收稿日期: 1999-02-15, 修回日期: 1999-09-30

菌种培养使用沙堡罗氏琼脂。酚氧化酶对照试验使用咖啡酸培养基,按文献[2]制备。分装成 2mL 小安瓿,灭菌后置斜面,4℃避光保存。用白假丝酵母 2·538(酚氧化酶试验阴性)及新型隐球酵母 2·1562(酚氧化酶试验阳性)进行质控。

1.3 酚氧化酶试纸条制备

组分:咖啡酸(Caffeic acid 日本光和本药株式会社生产)。柠檬酸铁(分析纯,北京化学试剂厂生产)Sørensen 缓冲液,高压灭菌的新华层析滤纸。

制法:将每 mL 含 0.2mg 咖啡酸及 0.05g 柠檬酸铁溶液加于 0.5mol/L Sørensen 缓冲液中(pH7.0),用该溶液浸泡 2×1cm 大小的滤纸条,将浸透的滤纸条于 15~20℃条件下迅速脱水真空干燥。干燥好的滤纸条收集于褐色瓶内,密封,避光,4℃保存备用。

1.4 用法

将酚氧化酶试纸条从褐色瓶取出置平皿中,滴上 2 滴蒸馏水,再用小木棍蘸取沙堡罗氏培养基上 30℃生长 24h 的被检菌涂在纸条上。纸条旁置一块蘸蒸馏水的湿棉球,盖上皿盖。于 37℃孵育 5~6h,用肉眼观察涂菌处是否变色,呈褐色或黑色时判定为酚氧化酶试验阳性;6h 后呈乳灰色或不变色者判定为阴性。同时,将被检菌接种咖啡酸培养基,30℃孵育 48~72h,观察是否变黑或变褐色,以资对照。每次试验使用白假丝酵母 2·538 及新型隐球酵母 2·1562 作质控。

为考查酚氧化酶试纸条的稳定性,将制好并检定合格的纸条置 4℃保存。经 2、4、6、8、10 个月从中抽取 2~3 条,按上述方法检查质控菌株的酚氧化酶试验结果。

2 结果与讨论

2.1 酚氧化酶试纸条的实用性

使用制备的酚氧化酶纸条,共计检查了 94 株酵母样真菌的酚氧化酶。结果表明:87 株包括 6 个种的假丝酵母、2 株多孢丝孢酵母和 1 株浅白隐球酵母的酚氧化酶试验结果均呈阴性,只有新型隐球酵母呈阳性,这些结果与文献报道一致。因此菌的细胞中含有一种酚氧化酶(Phenoloxytase),在适宜条件下作用于纸条上的咖啡酸,产生一种褐色或黑色色素而沉积于细胞壁,能用肉眼观察这些结果,这与使用咖啡酸培养基法获得的结果完全相符(表 1)。

酚氧化酶试验是鉴定临床标本中酵母样真菌时不

可缺少的生化特征之一。用我们制备的酚氧化酶试纸条作酚氧化酶试验,操作简便且判定容易,结果又灵敏特异。

2.2 酚氧化酶试纸条的稳定性

表1 用酚氧化酶试纸条检查94株酵母样真菌酚氧化酶的结果*

菌种名称	株数	30℃不同培养时间的阳性菌株数		
		2~4h	5~6h	7~8h
白假丝酵母	62	0	0	0
光滑假丝酵母	11	0	0	0
季也蒙假丝酵母	5	0	0	0
近平滑假丝酵母	2	0	0	0
克鲁丝假丝酵母	1	0	0	0
热带假丝酵母	6	0	0	0
新型隐球酵母	4	1	3	4
浅白隐球酵母	1	0	0	0
多孢丝孢酵母	2	0	0	0

* 用咖啡酸培养基检查94株酵母样真菌的酚氧化酶,于37℃培养48~72h与酚氧化酶纸条法的结果相符

将制备检定合格的酚氧化酶试纸条保存于褐色瓶中,同时制备咖啡酸培养基均置 4℃冰箱避光,密封保存。每间隔 2 个月从中抽取 2~3 条,接种白假丝酵母与新型隐球酵母,检查其酚氧化酶,同时接种 2 支咖啡酸培养基为对照。连续抽取 5 次,结果用保存 2、4、6 个月的酚氧化酶试纸条检查新型隐球菌的酚氧化酶均呈阳性,而使用咖啡酸培养基作培养检查时,保存 2 个月者出现阳性,而 4 个月者为弱阳性。说明该培养基在 4℃条件下只能保存 2 个月(表 2)。由此可见,酚氧化酶试纸条不仅特异而且使用效果稳定,有效期至少 6 个月。

表2 酚氧化酶试纸条与咖啡酸培养基的稳定性实验结果

使用菌种	方法①	不同保存时间出现的结果②					
		2个月	4个月	6个月	8个月	10个月	
白假丝酵母	酚氧化酶试纸条	-	-	-	-	-	
2·538	咖啡酸培养基	-	-	-	-	-	
新型隐球酵母	酚氧化酶试纸条	+	+	+	-	-	
2·1562	咖啡酸培养基	+	±	-	-	-	

注:①酚氧化酶试纸条30℃培养6h的结果,咖啡酸培养基为48~72h的结果

②-浅灰白色;+黑色;±灰褐色

(下转 148 页)

(上接 136 页)

总之,我们制备的酚氧化酶试纸条,用于检查临床酵母样真菌的酚氧化酶具有广泛的实用性。便于临床微生物实验室直接挑取酵母样真菌培养物作这种检查,操作十分简便,判定容易,6h 即可获得试验结果,有助于提高酵母样真菌鉴定工作质量,若进一步推广应用,必将产生良好的效益。

致谢 承哈尔滨铁路中心医院主任医师、顾问兼哈尔滨医科大学公卫学院名誉教授徐迪诚悉心指导,日本国高知市民病院临床检查部藤田龟明主任大力协助,

在此,表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 深泽义村. 酵母酵母样真菌、病原真菌同定法の指针 (文部省总合研究. 真菌症班编), 东京: 文光堂, 1988.
- [2] 谢正场, 吴挹芳. 现代微生物培养基和试剂手册. 福州: 福建科学技术出版社, 1994.
- [3] Kreger van Rij, N T W. The yeasts, A taxonomic study (3rd Ed) Elsevier Sci. Publ., Amsterdam, 1984.
- [4] Mopfer, R I Groschel D. Six-hour Pigmentation test for the identification of *Cryptococcus neoformans*, J. Clin. Microbiol, 1975, 2:96.