

明胶碳粒的研制及其在明胶液化试验中的应用

王晓力 周维民 包名家 张少红 孟庆敏

(佳木斯市卫生防疫站 佳木斯 154002)

徐迪诚

(哈尔滨铁路中心医院 哈尔滨 150010)

摘要: 自行研制明胶碳粒用于细菌鉴定中的明胶液化试验。将明胶碳粒加入基质中,经 37℃ 16~20h 培养后,如细菌具有明胶酶,基质即变黑色,反之明胶碳粒在基质中沉淀,基质不变色。经接种标准菌株和临床常见菌 203 株,试验结果表明,该明胶碳粒使用简便,容易判定,特异性强,灵敏度高,质量稳定,可以代替国外同类产品。有助于提高细菌鉴定工作效率和质量,降低检测成本,具有很好的应用价值。

关键词: 明胶碳粒,制备,明胶液化试验

中图分类号: Q93-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)03-0204-04

THE PREPARATION OF GCP-A NEW SUBSTRATE IN CULTURE MEDIUM AND IT APPLICATION IN GELATIN LIQUEFACTION TEST

WANG Xiao-Li ZHOU Wei-Min BAO Ming-Jia ZHANG Shao-Hong MEN Qing-Min

(Public Health and Anti-Epidemic Station of Jiamus City, Heilongjiang Province, Jiamus 154002)

XU Di-Cheng

(Halbin Railway Central Hospital, Heilongjiang Province, Harbin 150010)

Abstract: The authors investigated on the new reagent Gelatin Carbon Pellet as an enzyme testing agent (GCP) and used

收稿日期: 1999-02-11, 修回日期: 1999-12-18

it for gelatin liquefaction test in bacteriological identification. Incorporate the GCP to in the culture media testing substrate and incubating the media for 16~20 hrs at 37°C, if the inoculated bacterium produced gelatinase then the substrate appeared black, otherwise GCP would precipitate and the substrate would show no change. In this paper, we tested a total number 203 of bacteria strains including standard and clinically new isolates. This study showed that GCP assay appeared simple, easy in identification, its specificity and sensitivity high, and the quality of the testing reagent GCP steady. The reagent improved the efficiency and quality in our routine for bacteriological identification, and its cost low. Hence, Its use as a substrate in gelatin liquefaction assay in routine clinical bacteriological Lab. promotes wider application.

Key words: Gelatin Carbon Pellet (GCP), Preparation, Gelatin of liquefaction test

明胶是动物组织胶原中含有的一种蛋白质。明胶液化试验在细菌分类鉴定工作中经常使用,借以观察细菌是否具有明胶酶。按 Bergey 细菌分类系统鉴定细菌,该试验是鉴定一些细菌属与属、种与种差别的不可缺少的生物学特征。常规的明胶液化试验使用的明胶液化培养基,明胶凝固点在 25°C,因此接种细菌 37°C 培养后必须置 4°C 冰箱冷却 1h 观察结果,否则难以确定是否由于温度高明胶液化或细菌具有酶的作用。此外,明胶液化培养基的制备技术要求严格,如灭菌温度过高明胶凝固性减弱,而溶解明胶时如温度高于 100°C,明胶却不易溶于水,给鉴定细菌带来许多不便,为解决这一难题,1998 年以来开始研制明胶碳粒并用于明胶液化试验,取得了良好效果。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 明胶碳粒制备:取明胶 10g(上海生化试剂厂,分析纯),高温季节制备时,用量增至 13~15g,加无离子水 50mL,置 56°C 水浴 2h,使之溶解。

称取碳末 2g(浙江杭州木材厂,药用活性炭),及偶氮染料直接耐晒黑用微量(中国天津染料厂,含量 100%),混合均匀,用玛瑙乳钵研磨。与明胶水溶液迅速充分混合,立即放置 4°C 冰箱冷却。

将冷却的上述混合物浸泡在 12.6% 甲醛水溶液 30mL 中(哈尔滨新达化工厂,分析纯,甲醛含量 26.9%),置室温作用 24h,使固化。

将上述固化的混合物制成 15 目的颗粒,然后在流水中透析 18~24h,充分除去甲醛。将无甲醛的明胶碳粒经 $1.103 \times 10^5 \text{ Pa}$ 30min 间歇灭菌,无菌分装小安瓶,封口,检定合格后置室温保存、备用。

1.1.2 实验菌种:实验菌种包括两部分,共计 203 株。其中标准株 74 株,由中国科学院微生物研究所、中国药

品生物制品鉴定所提供,其余 129 株由天津医科大学微生物教研室、辽宁省卫生防疫站、哈尔滨铁路中心医院、鞍山市卫生防疫站、齐齐哈尔市卫生防疫站、佳木斯大学附属第一医院微生物实验室从标本中分离获得,均经革兰氏阴性杆菌编码鉴定系列培养基和法国梅里埃的 API-20E、API-20NE 和 API-20A 进行编码鉴定。实验菌种名称及株数见表 1。

1.1.3 培养基:厌氧菌及兼性厌氧菌使用普通营养肉汤(pH7.2),厌氧菌使用硫乙醇酸盐肉汤(pH7.2),按常规方法配制。一部分细菌明胶酶产生试验用 API-20 系列制品。

1.2 方法

1.2.1 接种培养:将制备的明胶碳粒以无菌手续加入上述培养基,取各菌种在适宜平板或斜面培养基的新鲜培养物-白金耳,接种于明胶碳粒培养基中,然后置 37°C 培养,厌氧菌放无氧环境培养。

1.2.2 明胶碳粒用于明胶液化试验的特异性观察:将各菌种接种明胶碳粒培养基,37°C 16~20h 观察结果。同时以常规明胶液化培养基和国外同类制品对照。培养物从 37°C 孵箱取出后,黑色明胶碳粒的黑色染料向周围扩散,明胶液化试验为阳性,培养基不变色为阴性。

用标准菌株和临床菌株 203 株做特异性试验(表 1)。实验结果证明,明胶碳粒用于明胶液化试验与国外同类制品和常规方法完全符合。质控对照用菌株:阴性株用大肠艾希氏菌(ATCC 25922),阳性株用粘质沙雷氏菌(GMCC 11652)。

1.2.3 明胶碳粒用于明胶液化试验的稳定性:将质控试验合格的明胶碳粒分别置 4°C 和室温保存,每月分别从中取出 10 支,分别接种质控菌株,37°C 16~20h 后观察结果,连续进行 10 次试验,确认在 4°C 和室温保存的

表1 203株细菌的明胶液化试验结果

细菌名称	株数	不同方法的明胶液化试验结果					细菌名称	株数	不同方法的明胶液化试验结果				
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)
肠杆菌科													
普通变形菌	8	+	+				腐败交替单胞菌	1	-	-			
奇异变形菌 49005 ^②	1	+	+	+			葱头伯头霍尔德氏菌 1813 ^①	1	-	-			-
奇异变形菌	5	+	+	+			木糖氧化产碱菌 11800 ^①	1	-	-			-
彭氏变形菌	6	+	+				木糖氧化无色杆菌 12007 ^①	1	-	-			-
摩氏摩根氏菌 44086 ^②	1	+	+	+			椰毒假单胞菌 11001 ^②	1	-	-			-
鼠伤寒沙门氏菌 87004 ^②	1	-	-	-			革兰氏阳性杆菌						
鼠伤寒沙门氏菌 50013 ^②	1	-	-	-			假白喉棒杆菌 38204 ^②	1	-	-			
伤寒沙门氏菌 50096 ^②	1	-	-	-			谷氨酸棒杆菌 1818 ^①	1	-	-			
布洛克兰沙门氏菌	1	-	-	-			谷氨酸棒杆菌 1805 ^①	1	-	-			
痢疾志贺氏菌 51335 ^②	1	-	-	-			北京棒杆菌 1299 ^①	1	-	-			
痢疾志贺氏菌	10	-	-	-			钝齿棒杆菌 1542 ^①	1	-	-			
大肠埃希氏菌 44748 ^②	1	-	-	-			产氨棒杆菌 1601 ^①	1	-	-			
大肠埃希氏菌 ATCC 25922	1	-	-	-			产氨棒杆菌 1844 ^①	1	-	-			
大肠埃希氏菌 44121 ^②	1	-	-	-			单核细胞增生李斯特氏菌	1	-	-			
大肠埃希氏杆菌	12	-	-	-			54001 ^②						
侵袭性大肠埃希氏菌 44105 ^②	1	-	-	-			单核细胞增生李斯特氏菌	4	-	-			
大肠埃希氏菌 190 ^①	1	-	-	-			枯草芽胞杆菌 118 ^②	1	+	+			
大肠埃希氏菌 196 ^①	1	-	-	-			枯草芽胞杆菌 63501 ^②	1	+	+			
成团肠杆菌	4	-	-	-			枯草芽胞杆菌 188 ^②	1	+	+			
坂崎肠杆菌	3	-	-	-			蜡样芽胞杆菌 11626 ^②	1	+	+			
粘质沙雷氏菌 11652 ^①	1	-	-	-			蜡样芽胞杆菌 11689 ^②	1	+	+			
粘质沙雷氏菌 41002 ^②	1	+	+	+			蜡样芽胞杆菌 63302 ^②	1	+	+			
粘质沙雷氏菌	13	+	+	+			蜡样芽胞杆菌 63301 ^②	1	+	+			
弗氏柠檬酸杆菌 11732 ^①	1	-	-	-			蜡样芽胞杆菌	9	+	+			
无丙二酸柠檬酸杆菌 12020 ^①	1	-	-	-			巨大芽胞杆菌 63101 ^②	1	+	+			
迟钝爱德华氏菌 11872 ^①	1	-	-	-			环状芽胞杆菌 12008 ^①	1	-	-			
肺炎克雷伯氏菌	8	-	-	-			球状芽胞杆菌 11370 ^①	1	-	-			
弧菌科													
嗜水气单胞菌	7	+	+				球状芽胞杆菌 11371 ^①	1	-	-			
简达气单胞菌	1	-	-				嗜热脂肪芽胞杆菌 11865 ^③	1	-	-			
类志贺邻单胞菌	4	+	+				嗜热脂肪芽胞杆菌 11866 ^①	1	-	-			
非O1群霍乱弧菌 73008 ^②	1	+	+	+			嗜热脂肪芽胞杆菌 11923 ^①	1	-	-			
非O1群霍乱弧菌 17020 ^②	1	+	+	+			侧孢芽胞杆菌 12012 ^①	1	-	-			
副溶血性弧菌 20001 ^②	1	+	+	+			短小芽胞杆菌 11847 ^①	1	-	-			
溶藻弧菌 93026 ^②	1	+	+	+			地衣芽胞杆菌 11858 ^①	1	-	-			
非发酵革兰氏阴性杆菌													
真养产碱菌 11841 ^①	1	-	-	-			藤黄微球菌 1290 ^①	1	+	+			
粪产碱菌 11799 ^①	1	-	-	-			藤黄微球菌 1258 ^①	1	-	-			
铜绿假单胞菌 11785 ^①	1	+	+	+			类炭疽芽胞杆菌 63015 ^②	1	+	+			
铜绿假单胞菌 10102 ^②	1	+	+	+			革兰氏阳性球菌						
铜绿假单胞菌 1858 ^①	1	+	+	+			金黄色葡萄球菌 26001 ^①	1	+	+			
铜绿假单胞菌 1238 ^①	1	+	+	+			金黄色葡萄球菌 6538 ^②	1	+	+			
铜绿假单胞菌	9	8+,1-	8+,1-				金黄色葡萄球菌	5	+	+			
荧光假单胞菌 11802 ^①	1	+	+	+			消化链球菌	1	-	-			
荧光假单胞菌 11758 ^①	1	+	+	+			链球菌	3	-	-			
荧光假单胞菌	7	+	+	+			金色链球菌 189 ^③	1	+	+			
恶臭假单胞菌 1756 ^③	1	-	-	-			金色链球菌 11861 ^①	1	+	+			
恶臭假单胞菌 1759 ^①	1	-	-	-			肺炎链球菌 31001 ^②	1	+	+			
绿针假单胞菌 11793 ^①	1	+	+	+			无芽孢厌氧菌(革兰氏阳性)						
门多萨假单胞菌 11804 ^③	1	-	-	-			消化球菌	1	-	-			-
产碱假单胞菌 11820 ^①	1	+	+	+			索氏梭菌 64931 ^②	1	+	+			+
粪产碱假单胞菌 11806 ^①	1	-	-	-			双歧梭菌 64921 ^②	1	+	+			+
无芽孢厌氧菌(革兰氏阴性)													
							脆弱拟杆菌	3	-	-			-
							韦荣氏球菌	3	-	-			-
							尸毒梭菌	1	+	+			+

注: 1 在不同环境中37℃ 16~20h的结果, +产生明胶酶, -不产生明胶酶, 空白表示未用此法作检查

2 ①中国科学院微生物研究所 IMCAS, ②中国药品生物制品检定所 NICBP

3 (1) 碳粒明胶法, (2) 常规明胶法, (3) API-20F, (4) API-20NE, (5) API-20A

明胶碳粒,每次抽验结果与新制备的试验结果是否一致。

2 结果与讨论

2.1 明胶碳粒用于明胶液化试验的实用性

根据 Bergey 氏细菌学分类系统,属与属、种与种间的鉴别,明胶液化试验是一项重要的生物学特征。在明胶液化试验方法中,分为使用明胶培养基进行常温培养法和 35℃ 培养法,进行常温培养时培养温度为 20~22℃,室温不得超过 25℃;采用 35℃ 培养法时因明胶在 25℃ 以上溶解,必须置冰箱 1h 后判定结果。另一种为明胶琼脂法,培养后必须另加氯化汞溶液借此与培养基的明胶蛋白反应呈白浊判定,操作不便。Kohn 氏 1963 年根据明胶与甲醛作用后变性固定后于 100℃ 不溶解,而细菌的明胶酶仍可与之作用的理论,创立“硬化明胶法”。目前,硬化明胶已广泛用于细菌生化试验中。我们独自研制出“明胶碳粒”。将标准菌株和临床菌株共 203 株接种明胶液化试验用培养基,37℃ 16~20h 后即可反应出明胶液化特征。如表 1 所示,其特异性与国外同类制品和常规明胶液化试验方法比较完全符合且操作简单,结果清晰,适于基层微生物实验室应用,可见明胶碳粒用于明胶液化试验具有实用性。

2.2 明胶碳粒组成的合理性

制备明胶碳粒的关键在于用 12.6% 甲醛水溶液固化明胶,从而使明胶的凝固点从 25℃ 提高到 100℃,使试验不受温度的影响。明胶碳粒中所加入的碳末,包被于明胶中起到指示剂作用。当明胶酶作用于明胶,明胶液化使蛋白质分子降解为氨基酸时,碳末释放游离,从而使培养基变黑,试验结果清晰,肉眼明显可见,容易判定。另外,因加入偶氮类染料直接耐晒黑,提高了试验的灵敏度。接种细菌后经 8~12h,被检菌即使具有少量明胶酶也可使耐晒黑染料释放于培养基周围,使培养基的指示颜色加深,结果更加清晰。在明胶碳粒中加入偶氮类染料直接耐晒黑,有助于提高反应灵敏度,是我们研制工作中的创新。

2.3 明胶碳粒的稳定性

将明胶碳粒在密封安瓶置 4℃ 和室温保存,每月取出 10 支重复接种质控菌株,10 次实验结果与新制备的明胶碳粒反应结果一致。因此认为,该制品在安瓶密封条件下置 4℃ 或室温保存,10 个月质量稳定,仍可使用。

2.4 制备与使用中应注意的问题

2.4.1 制备:制备的明胶碳粒往往残留少量甲醛,虽经流水透析,但不易除净,必要时可将流水洗过的明胶碳粒放在广口烧杯的水中,置石棉金属网上加热,反复换水,直到闻不到甲醛气味为止,以免甲醛残留,抑制细菌生长。

2.4.2 使用:用明胶碳粒进行明胶液化试验,可以采用琼脂斜面培养法或肉汤培养法,将一小粒放入基质水或基质液中接种培养。无论采用那种方法,观察结果时都应注意黑色碳粒的不规则变形与包埋的碳末游离或沉淀。液化程度弱不好判定液化状况时,应以黑色碳末的游离与否为判定指标,如出现肉眼可见的黑色游离物,即可判定为明胶液化阳性。

总之,我们制备的明胶碳粒用于明胶液化试验的实用性强,操作简单、反应灵敏,特异性强,成本费用仅为国外制品的五分之一,进一步推广使用将会收到更好的社会效益和经济效益。

致谢 本研究承中国科学院微生物研究所赵玉峰教授和周宇光副研究员,天津医科大学微生物教研室陈锦英博士,日本高知市民病院临床检查部藤田龟明主任的热情指导和协助,在此表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] Jean F. MacFaddin, *Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria* (3rd ed) Baltimore: Williams & Wilkins Company, 1992, 110.
- [2] Edwards R P, Ewing W H. *Identification of Enterobacteriaceae*, (4th ed.), Minneapolis: Burgess Publishing Company, 1995, 236.
- [3] Kohn J. *J Clin Path*, 1963, 6: 249~253.
- [4] Latrop H. *Int Bull Bact Nomencl*, 1971, 11: 107~111.
- [5] Ve'ron M, Chatelain G C. *Int J Syst Bacteriol*, 1983, 23: 122~125.
- [6] Hoyt R E, Pickett M J. *Amer J Clin Path*, 1957, 24: 343~345.
- [7] 坂崎利一, 他. *新细菌培地学讲座* (第 2 版) 下 1. 东京: 近代出版, 1998, 50.
- [8] 徐迪诚, 蔡妙英等. *革兰氏阴性杆菌新编码鉴定手册*. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1994, 637.