

一种适于分离淋病和脑膜炎奈瑟氏球菌 (GCMC) 的培养基

梁君谋 白友华

(北京市海淀区微生物培养基制品厂)

陈仁声 和京果 任保国

(北京市卫生防疫站)

摘要 筛选出一种适于分离淋病和脑膜炎奈瑟氏球菌 (GCMC) 的培养基。该种培养基含有两种菌所需的营养物质, 已制成干燥产品。通过实验室和临床检验, 证实该培养基的适用性, 适用于基层的监测。

关键词 分离培养基 (Selective Medium); 淋球菌 (*Gonococcus*); 脑膜炎球菌 (*Meningococcus*)

近年来, 性病在我国死灰复燃, 蔓延流行。其中淋病是世界各国发病率最高的性传播疾病 (STD)^[1]。由于对接触者的感染率高, 潜伏期短, 在短期内病例可成倍增长。因此, 对淋病的诊断与防治是当前急待解决的课题。

淋病奈瑟氏球菌对营养的要求甚高, 在一般培养基上很难生长, 但复杂的配方与操作程序, 给基层实验室带来极大的不便。作者从不同营养成分制备的多种培养基中, 筛选出 GCMC 分离培养基。该培养基营养成分完善, 含有淋球菌生长繁殖所必需的生长因子, 制备简便, 对杂菌有一定的抑制作用。通过标准菌株的实验观察和临床标本的检验, 并与一些已有的培养基对比, 在淋球菌和脑膜炎球菌的分离培养上, 均获得比较满意的效果, 其结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌种

淋病奈瑟氏球菌 (菌号 29106, 29107)、A 群脑膜炎球菌 (菌号 29019)、大肠杆菌 (菌号 4:156)、金黄色葡萄球菌 (菌号 26001) 和绿脓杆菌 (菌号 10102), 均为中国药品生物制品检定所提供。

(二) 培养基

1. GCMC 分离培养基:

(1) 基础培养基 (干燥粉末): 蛋白胨 (北

京海淀区培养基厂生产) 20g; 牛肉粉 (北京海淀区培养基厂生产) 3g; 氯化钠 (北京化工厂) 5g; 氯化钾 (北京化工厂) 0.2g; 氯化钙 (北京化工厂) 0.1g; 磷酸二氢钠 (北京化工厂) 2.5g; 硫酸镁 (北京化工厂) 0.6g; 玉米淀粉 (食用) 1g; 琼脂 (浙江省洞头县长坑海藻化工厂生产) 13.5g。pH 7.4 ± 0.1。

(2) 添加物 I: 血红蛋白。添加物 II: 葡萄糖、半胱氨酸、嘌呤和维生素等。

(3) 完全培养基: 称取基础培养基 9.6g 溶于 100 ml 蒸馏水中, 经 1kg/cm² 20 分钟高压灭菌。待冷至 70℃ 左右, 以无菌手续加入等量 (100ml) 预热至 70℃ 左右的添加物 I, 充分混合, 再加入 2 ml 添加物 II, 混匀后倾注灭菌平皿备用。

2. N₂ 培养基: 牛肉浸液 1000 ml; 蛋白胨 17.5g; 氯化钠 5g; 葡萄糖 5g; 氯化钾 0.2g; 氯化钙 0.1g; 玉米淀粉 5g; 琼脂 15—20g; 羊血 10% (临用前无菌手续加入)。pH 7.4—7.6。

3. 桂敏培养基 (广西皮肤性病中心产品)。

4. TM 培养基 (英国 Oxoid 产品)。

(三) 实验方法

1. 淋球菌与脑膜炎球菌生长灵敏度测定:

(1) 挑取淋球菌第三代新鲜培养物涂抹转

本实验承蒙北京市性病防治所杨广禄所长的支持和实验室的大力协助, 谨此致谢。

种 GCMC 平板。经 36—37°C 烛缸培养 24 小时,刮取菌苔,用麦氏 (McFarland) 标准比浊法制成 10 亿/ml 的菌悬液,10 倍稀释至 10^{-6} 。吸取 0.1 ml 涂布于 GCMC 平板上,经 36—37°C 烛缸培养 24—48 小时,观察菌落形态、数量和直径大小。以 N_2 培养基对照。

(2) 挑取脑膜炎球菌第三代新鲜培养物涂抹转种 GCMC 平板。经 36—37°C 烛缸培养 4—6 小时,刮取菌苔,于约 3.5 ml 稀释液内制成均匀混浊菌液(光密度约为 0.10),经分光光度计在 540nm 波长处测 OD 值。据此值按公式计算 ($X = OD \times 10 - 0.1$) 求出所需稀释液的数值并进行稀释,使最后浓度约为每毫升含有 4000 菌落形成单位 (CFU) 为准。用标定滴管 (100 个菌/25 μ l) 滴于 GCMC 及 N_2 平板上,使流成一条线。经 36—37°C 烛缸培养 24—48 小时,观察菌落形态、数量和直径大小。

2. 杂菌抑制力试验: 分别挑取大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌等 3 株标准菌株的第三代新鲜培养物,转种在普通营养琼脂平板上。经 36°C 18 小时培养,刮取菌苔,制成 10 亿/ml 菌悬液,按前法稀释。吸取 0.1 ml 涂布于 GCMC 平板。经 36°C 18 小时培养,观察菌落形态、数量和直径大小。并以普通营养琼脂对照。

3. 敏感性观察: 将淋球菌与大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌按上法分别稀释至 10^{-3} 和 10^{-6} , 再将四种菌液按同一稀释度等量混合。吸取 0.1 ml 涂布于 GCMC 平板上,使每块平板分别含有淋球菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和绿脓杆菌各 250 个和 25 个。经 36—37°C 烛缸培养 24—48 小时,观察生长情况。

4. 现场考核: 对北京市性病防治所门诊病人用棉拭子采取男性及女性泌尿生殖器官的脓液或分泌物,进行细菌分离培养,同时接种在 GCMC 和桂敏平板上做对比试验。接种时,应尽可能多的将分泌物涂抹在平板的 1/4 面积,然后做划线分离。经 36—37°C 24—48 小时烛缸培养,挑取可疑菌落做氧化酶试验和涂片染色镜检。分纯后,做糖发酵试验。

结果和讨论

(一) 淋球菌的生长灵敏度测定(表1,图1)

图 1 为淋球菌的菌落形态。从表 1 看出,淋球菌在 GCMC 和 N_2 平板上的菌落数分别为 77 和 80 个 (10^{-6}), 菌落直径均为 1mm。淋球菌在两种平板上灵敏度测定结果,经统计学处理 ($P > 0.05$), 无显著差异。

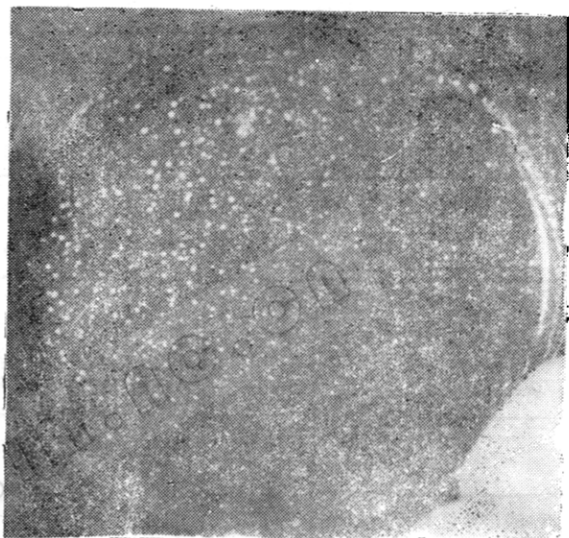


图 1 淋球菌菌落形态(48 小时培养,摄自 GCMC 平板)

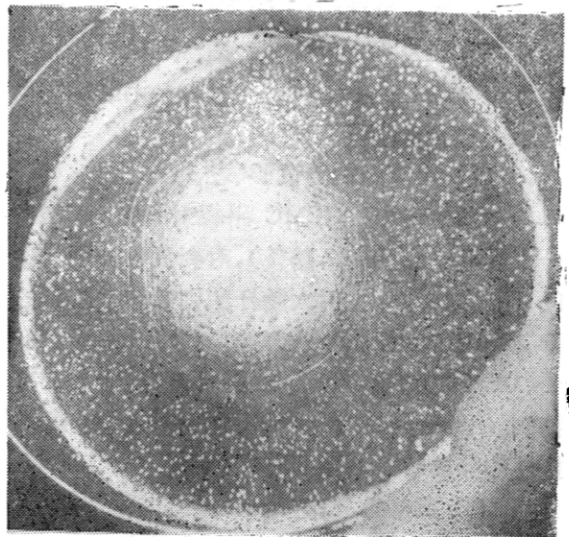


图 2 脑膜炎球菌菌落形态(24 小时培养,摄自 GCMC 平板)

(二) A 群脑膜炎球菌的生长灵敏度测定(表 2, 图 2)

图 2 为脑膜炎球菌菌落形态。由表 2 看

表1 淋球菌在 GCMC 和 N₂ 平板上生长情况

培养基 \ 结果	第一次		第二次		第三次		平均	
	菌落数 (10 ⁻⁶)	菌落直径 (mm)	菌落数 (10 ⁻⁶)	菌落直径 (mm)	菌落数 (10 ⁻⁶)	菌落直径 (mm)	菌落数 (10 ⁻⁶)	菌落直径 (mm)
GCMC 平板	81	1	72	1	78	1	77	1
N ₂ 平板	88	1	75	1	77	1	80	1

表中数值均为两块平板的平均值

表2 A群脑膜炎球菌在 GCMC 和 N₂ 平板上生长情况

培养基 \ 结果	第一次		第二次		第三次		平均	
	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)
GCMC 平板	92	1.5	84	1.5	90	1.5	89	1.5
N ₂ 平板	95	1.5	82	1.5	95	1.5	91	1.5

表中数值均为两块平板的平均值

表3 GCMC 平板对大肠、金葡和绿脓三种菌的抑制力

培养基 \ 结果	大 肠			金 葡			绿 脓		
	菌落数		菌落直径 (mm)	菌落数		菌落直径 (mm)	菌落数		菌落直径 (mm)
	10 ⁻⁴	10 ⁻⁷		10 ⁻⁴	10 ⁻⁷		10 ⁻⁴	10 ⁻⁷	
GCMC 平板	0	0	—	48	4	1.4	75	8	2
普通营养琼脂平板	115	14	2	94	8	1.5	103	11	2

表中数值均为三块平板的平均值

出, A群脑膜炎球菌在 GCMC 和 N₂ 平板上, 菌落数分别为 89 和 91 个, 菌落直径均为 1.5 mm。经统计学处理 ($P > 0.05$), 无显著性差异。

(三) 杂菌抑制力试验(表 3)

由表 3 看出, GCMC 平板对绿脓杆菌有一定的抑制作用 (27.18%), 对金黄色葡萄球菌的抑制力约 50%, 对大肠杆菌则有非常明显的抑制作用(100%)。在 GCMC 平板上滴加 100 个(10⁻⁶)和 10 个 (10⁻⁷) 大肠杆菌时, 均全部被抑制。因此, GCMC 平板是一种具有较强选择性的分离培养基。

(四) 敏感性观察(表 4)

由表 4 看出, GCMC 平板上接种同等数量的淋球菌、大肠、金葡和绿脓时, 大肠杆菌可全部受到抑制, 金黄色葡萄球菌与绿脓杆菌可部分受到抑制, 而淋球菌生长良好。因此, 在进行淋病的监测检验中, GCMC 平板可不同程

度地抑制泌尿生殖器官常见细菌的干扰, 有利于淋球菌的检出。并且在菌落形态上均能显示出各自的特征。金黄色葡萄球菌菌落不透明, 呈黄色圆形隆起; 绿脓杆菌菌落常轻度蔓延生长, 半透明, 有时带绿色有金属光泽; 而淋球菌为圆形、光滑、湿润、半透明、呈露滴状的小菌落, 易于识别和辨认。平板上可直接观察氧化酶试验, 在可疑菌落上滴加氧化酶试剂 (1% 二甲基对苯二胺盐酸盐), 立即呈现粉红色, 而后变红紫色, 最后呈黑色为阳性反应。另外, 为了进一步验证 GCMC 平板对淋球菌的生长效果, 以 TM 培养基做对比试验, 并与桂敏培养基同时进行计数观察, 实验方法同前。结果见表 5。

由表 5 看出, GCMC、桂敏和 MT 平板对淋球菌的生长效果相当。

(五) 临床标本培养

将来自性病防治所门诊可疑淋病的标本 71 份, 同时接种在 GCMC 和桂敏培养基上, 进

表4 在 GCMC 平板上淋球菌与大肠、金葡、绿脓三种菌混合敏感性观察

含菌数(个)	结果		淋球菌		大肠		金葡		绿脓	
	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)	菌落数	菌落直径 (mm)
250	232	1.5	0	—	117	1.2	148	1.5		
25	22	1.5	0	—	12	1.2	15	1.5		

表中数值均为三块平板的平均值

表5 淋球菌在 GCMC、桂敏和 TM 培养基上生长情况

培养基	菌落数
GCMC	255
桂敏	253
TM	262

表中数值为两块平板的平均值

行分离培养,其中17份为阳性,阳性率为23.9%。淋球菌和杂菌在两种平板上的生长情况见表6。

由表6看出,GCMC 平板对杂菌有一定的抑制力,17份阳性标本中有两份标本的杂菌全部被抑制。而且在 GCMC 平板上为阳性的两

表6 同一临床标本在 GCMC 和桂敏培养基上的培养结果

标本号	培养基 结果	桂 敏		GCMC	
		淋球菌数目	杂菌数目	淋球菌数目	杂菌数目
1		0	150	100	50
2		1000	13	1000	37
3		ND	ND	1000	100
4		200	300	200	150
5		30	150	200	100
6		50	100	80	150
7		500	30	500	30
8		100	14	100	75
9		0	0	100	0
10		100	0	100	0
11		400	20	400	20
12		400	10	400	10
13		400	20	400	50
14		150	70	200	20
15		ND	ND	200	40
16		ND	ND	200	6
17		ND	ND	300	50

份标本,在桂敏平板上则为阴性。由此看出 GCMC 平板对淋球菌的培养效果是比较理想的。

小 结

淋病是由淋球菌引起的泌尿生殖系统化脓性感染。实验室诊断以细菌培养方法较直接涂片检验为佳,因后者仅能观察有无疑似淋球菌的存在,为了确诊还须作细菌培养证实^[2]。特

别是女性淋病的确诊,必须做淋球菌的分离培养和鉴定^[3]。因此,在淋病监测中,作泌尿生殖道涂片检查的同时,必须进行淋球菌的培养,已成为诊断淋病的重要实验手段。本文介绍的 GCMC 分离培养基,包括基础培养基(干燥粉末)和添加物 I 和 II。在品种上是一种新型的脱水培养基。目前国内尚无同类剂型的产品生产。使用时可按需要量随时配制。平板制成后放塑料袋中,4℃ 保存两周无污染。接种淋病

和脑膜炎球菌于 27℃ 可存活 6 天。每块平板只需 1 元多钱,比 TM 培养基低 7—8 倍。通过灵敏度、敏感性、阳性检出率、杂菌抑制力和保存等项试验,并与一些培养基比较,GCMC 培养基均取得比较满意的效果。该培养基制备简便、节约经费、性能稳定、方便基层使用,有助于淋病和脑膜炎奈瑟氏球菌的诊断,有一定实用

价值,值得推广使用。

参 考 文 献

1. 肖鹭白等: 性与性传播疾病,上海科学技术出版社,上海, p. 31, 1987。
2. 蔡宏道等: 实用临床检验学,上海宏文书局,上海, p. 1168—1171, 1954。
3. Meheus A et al.: Bench-Level Laboratory Manual For Sexually Transmitted Diseases, 1989.