

一种改良的苯丙氨酸试验方法

唐细良 刘加吾 唐紫琳 湖南省卫生防疫站 (410005)
史娟 长沙市中心血站 (410000)

苯丙氨酸试验在细菌的鉴别性诊断中常用。而目前通用的苯丙氨酸试验方法耗时较长,^[1]灵敏度欠佳。本着准确、快速、经济、简便的宗旨,我室就此项生化试验的改进作了较深入的研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 从本站流行病科细菌室获得标准菌株 24 株。其中沙门氏菌属 4 株、志贺氏菌属 2 株、变形杆菌 4 株、非 O1 弧菌 2 株、大肠杆菌 4 株、蜡样芽胞杆菌 2 株、耶尔森氏菌、枸橼酸杆菌、肺炎克雷伯菌、水弧菌、产气杆菌、绿脓杆菌各 1 株。

1.2 仪器 温箱、玻璃平皿、吸管、试管、滤纸、酒精灯、接种环、高压灭菌器。

1.3 培养基

酵母浸膏 3g,DL-苯丙氨酸(或 L-苯丙氨酸 1g)/2g,氯化钠 5g,琼脂 15g,蒸馏水 1000ml,10% 三氯化铁溶液。以上成份加热溶解后,校正 pH7.2 ± 0.1,分装小试管,每管约 0.5ml,121℃ 高压灭菌 15min,或于高压消毒灭菌后、冷却至 55℃ 左右,倾注平皿。

对照用培养基及制法同“国标法”。

1.4 方法 采用双盲对照实验方法。先将标准菌株编号,再由 2 人分别完成未知标准株的改良法苯丙氨酸试验及标准对照试验。分别记录实验结果。

1.4.1 改良法与标准法苯丙氨酸试验结果比较 改良法又可分为平板法和试管法。

平板法 将平板等分为 10—15 个区,用接种环挑取不同菌液分别点种于各区中

央,37℃ 培养 4—6h,平板上可见薄层菌斑即可。挑取菌落或带菌落的培养基约绿豆大小,置于直径约 1cm 大小的滤纸片中央,滴加 1 滴 10% 三氯化铁溶液,挑取物或滤纸立即呈深绿色者为阳性,不变色者为阴性。

试管法 按严格无菌操作技术要求,将待检菌接种环点种于培养基表面,于 37℃ 培养 4—6h,培养基表面可见薄层菌斑即可。余同上述平板法。

标准苯丙氨酸试验法 每株菌均同时接种至 2 支苯丙氨酸试管中,每管含培养基 3ml,37℃ 培养,分别于 4—6、24h 取出,滴加 10% 三氯化铁溶液 2—3 滴,苯丙氨酸脱氨酶阳性者呈深绿色,不变色者为阴性,介于二者之间者为可疑。

2 结果 结果见表 1

2.1 由表 1 可知,改良法与标准法苯丙氨酸试验比较有如下优点:其一是时间缩短,改良法 4—6h 就能明确地判断结果,而标准法所需时间长短不一,一般需要 24h 才能较为准确地判断结果。其次,改良法的灵敏度高于标准法。标准法只能判为结果可疑的情况下,改良法可明确地判为结果阳性。其三,改良法判断结果的准确率不低于标准法。

2.2 同一平板上混合点种苯丙氨酸试验阳性菌株和阴性菌株结果观察

改良法中平板法和试管法均具有快速、准确、简便、经济等优点。而平板法在鉴定数量较多的细菌时,尤为适合。同一平板上

阴性菌株和阳性菌株之间有无相互干扰, 见表 2。

表 2 同一平板上苯丙氨酸试验
阴性和阳性菌株混合点种结果

两菌距离 (mm)	37℃ 培养 时间 (h)	阴性菌株★			阳性菌株*		
		次数	(+)	(-)	次数	(+)	(-)
5	6	10	0	10	10	10	0
5	24	10	0	10	10	10	0
10	48	10	0	10	10	10	0

注: ★: 伤寒沙门氏菌 * 莫根氏变形杆菌

由表 2 可知, 在控制菌斑之间的距离与培养时间的前提下, 苯丙氨酸试验阴性株和阳性株混合点种, 无相互干扰作用。

3 讨论

3.1 改良法较标准法试验时间明显缩短。改良法 4—6h 就能明确地判断出结果。而标准法一般需要 24h 才能保证结果较为准确。

3.2 改良法较标准法苯丙氨酸试验的灵敏度高。在 6—24h 内, 改良法判断结果非常明确, 不存在可疑现象。而标准法就同一菌株而言, 不同时间可表现出不同结果。有的菌株 4—6h 时表现为可疑, 而 24h 时表现为阳性; 有的菌株则相反, 4—6h 时表现为阳性, 而 24h 时表现为可疑。个别甚至表现出相反结果。无疑标准法不可避免地将出现假阴性。而改良法在较大程度上提高了代谢产物的浓度, 因此, 灵敏度高, 不会出现假阴性。

3.3 改良法中平板法与试管法均具有上述优点。而平板法对大批细菌的鉴定尤为合

适, 能较大程度地减少清洗、消毒过程的工作量。试管法适合于少量细菌的鉴定, 经济效益更佳。

表 1 改良法与标准法苯丙氨酸试验结果比较

菌 株	改良法	标准法 (h)
	4—6	24
伤寒沙门氏菌	—/—	—/—
鼠伤寒沙门氏菌	—/—	—/—
波茨坦沙门氏菌	—/—	—/—
沙门氏菌 B ₁	—/—	—/—
致病性大肠杆菌 (I)	—/—	—/—
致病性大肠杆菌 (II)	—/—	—/—
致病性大肠杆菌 (III)	—/—	—/—
普通大肠杆菌	—/—	—/—
奇异变形杆菌 (I)	+ / ±	+ / +
奇异变形杆菌 (II)	+ / +	+ / +
莫根氏变形杆菌	+ / —	+ / +
雷极氏变形杆菌	+ / +	+ / ±
福氏痢疾杆菌	—/—	—/—
宋内氏痢疾杆菌	—/—	—/—
非 O1 弧菌 (内蒙)	—/—	—/—
非 O1 弧菌 (儿)	—/—	—/—
耶尔森氏菌	—/—	—/—
蜡样芽胞杆菌 (I)	—/—	—/—
蜡样芽胞杆菌 (II)	—/—	—/—
绿脓杆菌	—/—	—/—
枸橼酸杆菌	—/—	—/—
肺炎克雷伯菌	—/—	—/—
水 弧 菌	—/—	—/—
产 气 杆 菌	—/—	—/—

参 考 文 献

- 1 中华人民共和国国家标准·食品卫生检验方法 (微生物学部分)·北京·第一版: 中国标准出版社, 1986

新资源食品制标协作组会议会讯

由卫生部食品卫生监督检验所主持召开的“新资源食品制标协作组会议”于 1993 年 10 月 10 日—12 日在广西北海召开。来自卫生部、卫生部食检所及其它省市食检所、企业的代表共 42 人。与会代表就新资源食品的标准、GMP 的制定、特异性检测方法的建立、功能学试验及目

前新资源食品管理中存在的问题进行了广泛地讨论。一致认为只有行政、监督监测及企业三方面的通力合作, 才能有利于新资源食品的开发利用, 确保消费者利益。

(余强 供稿)