

# 一种改良的 V-P 试验方法

卫生部食品卫生监督检验所 唐细良<sup>①</sup> 周桂莲

**摘要** 改良的 V-P 试验方法系微量快速法与标准 V-P 试验方法比较有以下优点,一是时间缩短62—64h。二是改良法的灵敏度高,标准法只能判为 V-P 反应可疑的菌株,改良法可明确地判为 V-P 阳性反应。三是改良法判断结果的准确率不低于标准法。此外,改良的 V-P 试验可用于某些细菌的分离、筛选。改良法包括试管法和滤纸法,而滤纸法又明显优于试管法。

V-P 试验在某些细菌的实验室诊断,尤其是在鉴别诊断上较有意义,为当前微生物工作者普遍采用的一项生化试验。然而,目前所通用的 V-P 试验方法费时,灵敏度低,在某些情况下,甚至难以判断结果,给实验室诊断带来困难,且难免由此而引起误诊。为了克服上述缺点,达到准确、快速、灵敏度高的目的,根据实验原理,选用标准 V-P 阴性和阳性代表株进行了研究。提出了一种改良的 V-P 试验方法。

## 1 材料与方 法

**菌种** 副溶血性弧菌24株,溶藻性弧菌5株,沙门氏菌3株,大肠杆菌2株,河弧菌、拟态弧菌、创伤弧菌、非O1弧菌、梅契尼可夫弧菌、产气杆菌、肺炎克雷伯氏菌各1株。共有代表株41株。

**培养基成份及制备** 2%蛋白胨,0.2%酵母浸膏,3.5%氯化钠,1%葡萄糖,蒸馏水100ml,pH8.0。用于肠杆菌等非嗜盐弧菌时,改用0.5%氯化钠,pH7.0。将上述成份溶化后,校正 pH,121℃灭菌15min,冷却至50℃左右,倾注平皿,制成 V-P 试验平板。

标准对照用培养基为当前所通用的缓冲葡萄糖蛋白胨水<sup>[1]</sup>。

改良法包括试管法和滤纸法。将 V-P

试验平板等分为6—10个区,用接种环挑起不同菌液划线或点种于平板上,置37℃培养12—16h。

**试管法** 挑起菌落或带菌落的琼脂约黄豆大小,置于小试管中,加热溶解。先滴加6% a-萘酚酒精溶液6至10滴,再加入40%氢氧化钾3至5滴,充分振摇试管,2min 内呈红色者为阳性、无色或铜色者为阴性。超过2min 呈淡红色者亦为阴性。

**滤纸法** 挑起菌落(若为分区纯培养亦可挑起带菌落的琼脂)约绿豆大小,置于直径约1.5cm 的滤纸片上,先滴加6% a-萘酚酒精溶液2滴,再加40%氢氧化钾1滴,自然干燥或置于酒精灯上烘干,菌落周围立即显出鲜红色环者为 V-P 试验阳性,无色者为阴性。

**标准 V-P 试验法:**每株菌均同时接种至5支 V-P 试管中,每管含葡萄糖蛋白胨水3ml。37℃,分别置于12—16、48、72、96 及120h 取出,以2:1的比例加入适量6% a-萘酚酒精溶液和40%氢氧化钾,37℃,4h 后观察判断结果,红色者为阳性,铜色者为阴性,介于二者之间者为可疑。

## 2 结果

结果见表1,改良 V-P 试验法与标准法

<sup>①</sup> 现在湖南省卫生防疫站食品卫生科工作。

表1 改良法与标准法 V-P 试验结果比较

菌 株	改良法 V-P 试验(h)		标准法 V-P 试验(h)					
	滤纸法	试管法	12-16	48	72	96	120	
	12-16	12-16	12-16					
弧菌 90 <sub>(1)</sub>	+	+	-	+	+	+	±	
129 <sub>(1)</sub>	+	+	-	±	+	+	+	
169 <sub>(1)</sub>	+	+	-	±	+	+	+	
170 <sub>(2)</sub>	+	+	-	±	+	+	+	
178 <sub>(1)</sub>	+	+	-	-	+	+	+	
190 <sub>(2)</sub>	+	+	-	+	+	+	+	
90 <sub>(3)</sub>	+	+	-	±	±	±	±	
<b>溶藻性弧菌</b>								
156	+	+	-	±	+	+	+	
166	+	+	-	+	+	+	+	
145	+	+	-	+	+	±	±	
144	+	+	-	+	+	+	+	
154	+	+	-	±	+	+	+	
<b>肺炎克雷伯氏菌 (46106)</b>								
产气杆菌 (45102)	+	+	-	+	+	+	+	
<b>拟态弧菌</b>								
非O1弧菌	+	+	-	+	+	+	+	
<b>梅契尼可夫弧菌</b>								
17株典型副溶血性弧菌	-	-	-	-	-	-	-	
2株标准大肠杆菌	-	-	-	-	-	-	-	
3株标准沙门氏菌	-	-	-	-	-	-	-	
河弧菌	-	-	-	-	-	-	-	
创伤杆菌	-	-	-	-	-	-	-	

注：“+”示 V-P 试验阳性；“±”示可疑；“-”示阴性

比较有以下优点：首先是时间缩短62—64h。标准法需在37℃存放72h，观察判断结果亦需4h；而改良法全过程仅需12—16h。其次，改良法的灵敏度高于标准法。标准法只能判为 V-P 反应可疑的菌株，改良法可明确地判为 V-P 反应阳性。其三，改良法判断结果

的准确率不低于标准法，二者判断的结果完全相符。

在同一平板上同时接种几种不同的细菌，就 V-P 试验而言，相互之间有无干扰，参见表2。

表2 同一平板上 V-P 阴性和阳性株混合点种结果

两菌落 距离 (MM)	37℃培 养时间 (H)	试管法 V-P 试验						滤纸法 V-P 试验					
		V-P 阴性株 *			V-P 阳性株 #			V-P 阴性株			V-P 阳性株		
		试验 次数	V-P (+)	V-P (-)	试验 次数	V-P (+)	V-P (-)	试验 次数	V-P (+)	V-P (-)	试验 次数	V-P (+)	V-P (-)
5	40	5	3	2	5	5	0	5	0	5	5	5	0
10	14	5	0	5	5	5	0	5	0	5	5	5	0
10	40	5	2	3	5	5	0	5	0	5	5	5	0
15	135	5	4	1	5	5	0	5	1	4	5	5	0
18	135	5	3	2	5	5	0	5	0	5	5	5	0

注: \* 吴照海株 # :90(1)株

从表2可知,就 V-P 试验而言,在一定时间内,相距一定的距离,两菌之间无相互影响。但随着存放时间的延长,就有可能表现出 V-P 阴性和阳性菌株之间的相互干扰。滤纸法较试管法又有明显的优越性,两菌落仅相距5mm,37℃存放40h,V-P 试验不表现出相互干扰作用。若相距18mm,即使存放135h,亦不表现出相互干扰作用。主要是因为滤纸法所需菌量较少,所挑菌落带琼脂较少之故。

### 3 讨论

文献报道<sup>[1,2]</sup>,V-P 试验需在37℃存放2—5天,加入 V-P 试验试剂后判断结果尚需存放4h。本文研究表明,标准法 V-P 试验中,同一菌株在不同时间 V-P 试验结果可能不一致。有的菌株48h 表现为 V-P 阳性,而96h 表现为 V-P 可疑。实验工作者究竟应在什么时候加入 V-P 试验试剂,需凭经验确定。无疑,误判的可能性较大。在某些情况下,难免由此而致误诊。而改良法不会出现上述情况。

不同的菌株在 V-P 平板上可能有其相应的肉眼、镜检特征,再结合 V-P 试验结果,准确挑取所需菌落的把握就大。因此,改

良法 V-P 试验可考虑用于某些菌株的分离、筛选。既能减少工作量,又有可能提高检出率。

改良法包括试管法和滤纸法,二者均较标准法有明显的优越性。这是因为细菌在平板上形成菌落,其代谢产物以菌落为中心向四周扩散,越近菌落,其浓度越高,故改良法 V-P 试验较标准法快速,且灵敏度高。同理,也就能理解为什么改良法中的滤纸法又明显优于试管法。

本研究内容为“副溶血性弧菌分离鉴定方法改进”课题中的一部分,故所用代表株大部分为嗜盐弧菌,为了检验此方法的普遍性与实用性,只选用了其它几个菌种,不能说明改良的 V-P 试验培养基成份适合所有的细菌。采用此法时,可根据细菌的生长特性,适当增加或减少某些营养成份。

### 参 考 文 献

1. 周桂莲,等·副溶血性弧菌检验·见:孟昭赫主编·食品卫生微生物学检验·第一版·北京:技术标准出版社,1984:42.
2. 上海第一医学院卫生统计学教研组·医学统计学方法·第二版·上海:科学技术出版社,1982:235.