

LLS 培养基的研制及其效果考核

邓涤夷 陈毓玲 邓燕 陈霞

(福州铁路卫生防疫站)

摘要 本文采用含量在 98.8% 的食用赖氨酸和十二烷基硫酸钠代替脱氧胆盐, 研制了乳糖赖氨酸十二烷基硫酸钠琼脂培养基 (LLS), 通过对分离出的 168 株沙门氏菌的生化试验、肠杆菌科分属噬菌体裂解试验和血清学分型, 结果证明 LLS 培养基分离沙门氏菌的检出率较高 (达 76.2%), 成本低廉 (每个平板为 0.04 元) 适于推广使用的一种肠道致病菌分离用的培养基。

关键词 LLS 培养基; 效果考核

目前用于沙门氏菌的分离培养基, 经许多学者数十年的不断研究和改进, 种类颇多, 较近期报告的有木糖赖氨酸脱氧胆酸盐琼脂 (XLD)^[1], 但其中赖氨酸价格昂贵, 难以推广。我们经过反复试验, 采用食用赖氨酸 (含量在 98.8%) 和十二烷基硫酸钠代替脱氧胆盐, 研制了乳糖赖氨酸十二烷基硫酸钠琼脂 (简称 LLS), 现将试验结果报告如下。

材料与方 法

1. 试验菌种: 系我站分离保存, 并经生化试验, 肠杆菌科分属噬菌体裂解试验及血清学分型, 鉴定的沙门氏菌、志贺氏菌和大肠杆菌。

2. 肉类食品样品来源: 12 种肉类食品 (猪肉、血、肺、心、胃、牛肉, 羊肉, 鸭肉、鸭血等) 采自福州火车站农贸市场。从肉类食品中采到 547 份菌标本。

3. 培养基:

(1) 四硫磺酸盐煌绿增菌培养基^[2]。

(2) HE 培养基^[2]。

(3) SS 干燥培养基: 上海市医学化验所生产。

(4) LLS 培养基: 蛋白胨 1g, 酵母浸膏 0.3g, 食用赖氨酸 0.5g、乳糖 0.75g、蔗糖 0.75g、氯化钠 0.5g、硫代硫酸钠 0.68g、枸橼酸铁铵 0.08g、十二烷基硫酸钠 0.2g、琼脂 2g、蒸馏水 100ml, 调 pH7.0, 加 0.4% 酚红 2ml, 煮沸后倾注平板。

(5) 营养琼脂: 上海医学化验所生产。

(6) 九项生化试验试剂: 即苯丙氨酸、氰化钾、V-P、淀粉质、西蒙氏枸橼酸盐、硫化氢、尿素、赖氨酸、蔗糖均系本室自制。

4. 肠杆菌科分属噬菌体: 由江西省卫生防疫站生产。

5. 诊断血清: 沙门氏菌属诊断血清 (57 种) 系成都生物制品研究所出品。

6. 细菌计数: 将实验菌接种于肉汤培养基中, 37℃ 培养 18 小时, 用生理盐水稀释至 10^{-3} — 10^{-10} 制成稀释液, 取 0.025ml 点种于营养琼脂、SS、HE、LLS 平板上, 同一稀释度各点种 5 个平板, 37℃ 培养 24 小时, 计算各平板上生长的菌落数, 测定菌在培养基上的敏感性。

7. 实用效果考核: 取 12 种肉类食品的 547 份标本, 经四硫磺酸盐煌绿增菌培养基于 $42 \pm 1^\circ\text{C}$ 增菌 8 小时后, 划线接种于 LLS、HE、SS 培养基上, 观察沙门氏菌的分离情况。

试 验 结 果

(一) 供试菌株在四种培养基上生长的菌落数 (表 1)

供试菌株在营养琼脂、LLS、HE、SS 四种培养基上生长的菌落数是取各培养基上生长的菌落数在 300 个左右的同一稀释度的平板进行计数。其结果表明, 以不含任何抑制剂的营养琼脂为对照, LLS 培养基对细菌抑制性较弱, 其生长的菌落数与营养琼脂上的相差不大。而 SS 培养基对菌的抑制性较强, 生长的菌落数明显减少。

表 1 沙门氏菌和福氏志贺氏菌在四种培养基上生长的菌落数

菌种名	营养琼脂	LLS	HE	SS
<i>Salmonella chester</i>	180	184	158	160
<i>S. agona</i>	398	449	428	411
<i>S. derby</i>	88	74	73	66
<i>S. typhi-murium</i>	255	217	213	197
<i>S. thompson</i>	317	315	305	283
<i>S. newport</i>	187	176	178	136
<i>S. meleagridis</i>	5	1	2	1
<i>S. anatum</i>	178	156	166	149
<i>S. london</i>	13	7	10	4
<i>S. saksony</i>	219	167	180	142
<i>Shigella flexneri</i> (1a)	6	5	4	2
<i>Shigella flexneri</i> (2a)	37	25	31	14
<i>Escherichia coli</i>	185	133	97	79

注: 表内数字为 5 个平行样本的平均值

(二) 沙门氏菌及福氏志贺氏菌在四种培养基上的敏感性测定

用已知含菌量的实验菌种稀释液, 取一白金环接种在营养琼脂, LLS、HE、SS 四种培养基上, 37℃ 培养 24 小时, 检查各菌生长情况(表 2)。表 2 结果表明, 凡能在营养琼脂上生长的菌种, 均能在 LLS 琼脂上生长。

(三) 实用效果考核结果

1. LLS、HE、SS 培养基分离沙门氏菌效果比较: 12 种肉类食品的 547 份标本, 经增菌后用 LLS、HE、SS 培养基培养共分离出 168 株沙门氏菌, 其中以 LLS 培养基的分离阳性率最高, 占 23.4%, 其敏感指数为 76.2%, 居于首位(表 3, 4)。

2. 分离菌株的生化特性: 分离出的 168 株

表 2 实验菌株对四种培养基的敏感性测定

菌名	菌量 (个/ml)	结 果			
		营养琼脂	LLS	HE	SS
<i>Salmonella chester</i>	300	+	+	+	-
<i>S. agona</i>	700	+	+	-	-
<i>S. derby</i>	300	+	+	+	+
<i>S. typhi-murium</i>	400	+	+	+	+
<i>S. thompson</i>	300	+	+	+	+
<i>S. newport</i>	600	+	+	+	+
<i>S. meleagridis</i>	120	+	+	+	+
<i>S. anatum</i>	300	+	+	+	+
<i>S. london</i>	300	+	+	+	+
<i>S. saksony</i>	100	+	+	+	+
<i>Shigella flexneri</i> (1a)	200	+	+	-	+
<i>Shigella flexneri</i> (2a)	200	+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i>	700	+	+	-	-

注: +: 生长, -: 不生长

表 3 三种培养基分离沙门氏菌效果对比

培养基	标本数	阳性数	阳性率(%)	敏感指数(%)
LLS	547	128	23.4	76.2
HE	547	115	21.0	68.5
SS	547	101	18.5	60.1
LLS + HE + SS	547	168	30.7	100.0

沙门氏菌 9 项生化试验结果是: 苯丙氨酸-, 赖氨酸+, V-P 试验-, 靛基质-, 枸橼酸盐-, 尿素-, KCN-, H₂S+, 蔗糖-。

3. 分离菌株的噬菌体裂解试验和血清学分型: 分离的 168 株沙门氏菌经肠杆菌科属噬菌体裂解试验, 除 E₁ 群沙门氏菌外, 均被 O-I 裂解。E₁ 群鸭沙门氏菌 53 株, 被 O-I 裂解的

表4 547份标本在三种培养基分离沙门氏菌的比较。

		HE+	HE+	HE-	HE-
		SS+	SS-	SS+	SS-
LLS	+	63	22	20	23
	-	7	22	10	379

$$\chi^2 = 5.415 \quad P > 0.05$$

有8株,仅占15.1%,伦敦沙门氏菌6株,被O-1裂解的有5株,占83.3%,所分离的168株沙门氏菌均不被C, E, CE, E₄, Ent和Sh裂解。168株沙门氏菌的血清学分型见表5。

表5 168株沙门氏菌血清型鉴定结果

O群菌名	抗原式	株数	%
B <i>S. typhi-murium</i>	4,5,12:i:1,2	1	0.6
S <i>agona</i>	4,12:f,g,s:-	8	4.8
S. <i>stanley</i>	4,5,12:d:1,2	2	1.2
S. <i>derby</i>	1,4,12:f,g:-	91	54.2
C ₆ <i>S. newport</i>	5,8:eh:1,2	6	3.6
E ₁ <i>S. anatum</i>	3,10:eh:1,6	53	31.5
S. <i>london</i>	3,10:lv:1,5	6	3.6
E ₄ <i>S. taksony</i>	3,19:i,z ₁	1	0.6

讨 论

1. Taylor等(1965年)研制成功XLD琼脂,分离沙门氏菌和志贺氏菌的效果较好^[1],但由于其中使用赖氨酸(每克市价11.5元)价格昂贵,影响其推广使用。我们使用目前市售营养赖氨酸粉(含赖氨酸98.8%,每克价0.024元)来代替,制成LLS培养基,从实验结果看,对分离沙门氏菌的检出率为76.2%,与HE培养基的检出率68.5%,无显著差异($\chi^2 = 2.6 \quad P > 0.05$),但明显高于SS培养基的检出率60.1%

($\chi^2 = 11.6 \quad P < 0.001$)。因本次试验未使用XLD培养基作对比试验,其检出情况无法探讨。

2. 由于培养基中含有赖氨酸,沙门氏菌属细菌能使赖氨酸脱羧,形成鲜明中心黑色边缘红色的菌落,极易与变形杆菌的菌落相区别,假阳性菌落的挑选机会就减少,从而避免了在HE和SS培养基上变形杆菌菌落与沙门氏菌的菌落很难区别的缺点。

3. 从实际效果考核中,采取的547份肉类食品样品分离沙门氏菌的结果看,同时在LLS、HE、SS等三种培养基共分离出168株沙门氏菌。其中LLS上分离128株,敏感指数为76.2%,漏检率为23.8%,HE上分离出115株,敏感指数为68.5%,漏检率为31.5%,SS上分离出101株,敏感指数为60.1%,漏检率为39.9%。

4. 一种新的培养基的推广使用,除了其使用效果好外,还取决于药源的来源及经济价值。上述LLS、HE和SS培养基按其成本依次为每个平板约0.04元、0.77元、0.23元,实验证明LLS培养基成本低,能生长出具有典型特征的沙门氏菌落,它和HE培养基一样可以提高工作效率和减少工作量,适宜于推广的肠道致病菌分离用的培养基。

参 考 文 献

- [1] 郝士海等译:肠杆菌科的鉴定,第三版,卫生部药品生物制品检定所出版,377,1978。
- [2] 中华人民共和国卫生部:食品卫生检验方法(微生物学部份),中华人民共和国国家标准,163—167,1985。
- [3] 路文彬:国外医学(微生物学分册),6:255,1981。