

不同动物血液对流感嗜血杆菌生长影响的研究

张建明¹, 滕昆仑¹, 卢勉飞¹, 蔡芷荷¹, 吴清平², 石小帆¹

1. 广东环凯微生物科技有限公司, 广东 广州 510663; 2. 广东省微生物研究所, 广东 广州 510070

摘要: 目的 比较不同动物血液制备的巧克力平板在不同的储存温度下对流感嗜血杆菌的影响。方法 用羊血和兔血分别制备成巧克力平板, 同时以国内厂家 I 和厂家 II 的平板作对照, 分别放置在冷库(4 ℃)、常温(25 ℃)、高温(42 ℃) 3 种不同的储存条件下, 在 3 个月的保质期内不同的时间点, 分别接种流感嗜血杆菌, 比较各配方上其菌落大小和生长率。结果 放置在冷库的羊血制备的巧克力平板上流感嗜血杆菌菌株生长良好, 放置在常温下的平板 1 个月后菌落变小, 2 个月后菌落不生长, 放置在高温下的平板 1 周后流感嗜血杆菌不生长。而兔血制备的巧克力平板在不同储存条件下对流感嗜血杆菌生长差异无统计学意义($P > 0.05$)。厂家 I 在 4 ℃ 和 25 ℃ 储存 1 个月后菌落明显变小, 42 ℃ 1 周后无生长。厂家 II 在 4 ℃、25 ℃、42 ℃ 储存后菌落大小差异无统计学意义($P > 0.05$), 但生长率明显降低。结论 兔血制备的巧克力平板质量稳定, 优于羊血所制备的平板和国内同类产品。

关键词: 巧克力平板; 流感嗜血杆菌; 温度; 动物血

中图分类号: S852.61 文献标识码: A 文章编号: 1004-8685(2016)17-2487-03

Study on the effect of different animal blood on the growth of *Haemophilus influenzae*

ZHANG Jian-ming*, TENG Kun-lun, LU Mian-fei, CAI Zhi-he, WU Qing-ping, SHI Xiao-fan

* Guangdong Huankai Microbial Science and Technology Corporation Limited, Guangzhou, Guangdong 510663, China

Abstract: Objective To study the effect of chocolate plate prepared by different animal blood at different storage temperatures on the growth of *Haemophilus influenzae* (*Hi*). **Methods** The chocolate plates prepared with sheep and rabbit blood were placed in three different storage conditions: cold storage, room temperature and high temperature, meanwhile, with plates from domestic factory I and II for comparison. Inoculating the dilution of *Hi* on the chocolate plate and comparing the colony size and growth rate at different time points within 3 months of the shelf life. **Results** *Hi* grew well on the chocolate plate made with sheep blood under cold storage condition. *Hi* colony shrank in 1 month and even stopped growing in 2 months at room temperature. The growth of *Hi* did not obviously change on the chocolate plate made by rabbit blood under different storage conditions, with the difference statistically significant ($P > 0.05$). Colony size of *Hi* on the chocolate plates from factory I shrank after stored at 4 ℃ and 25 ℃ for 1 month and even totally be inhibited at 42 ℃ just for 1 week. Colony size of *Hi* on the chocolate plates from factory II did not obviously change after stored at 4 ℃, 25 ℃ and 42 ℃, with the differences statistically significant ($P > 0.05$), but the productivity ratio decreased significantly. **Conclusion** The quality of the chocolate plate prepared by rabbit blood was stable, which is better than that of the plates by sheep blood and domestic similar products.

Key Words: Chocolate plate; *Haemophilus influenzae*; Temperature; Animal blood

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)是引起婴幼儿脑膜炎、肺炎等急性呼吸道感染病的主要病原体。由于该菌生长必需依赖 X 因子(正铁血红素)、V 因子(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸),对培养基的营养要求特殊,给临床分离、培养流感嗜血杆菌及诊断带来了很大的困难^[1]。巧克力平板是常见的分离流感嗜血杆菌的培养基,实际检测中由于 V 因子在常温或者高温条件下很容易失去效应,导致流感嗜血杆菌在巧克力平

板上不生长,经常被漏检。本文通过研究不同动物血液制备的巧克力平板在不同温度下储存后,对流感嗜血杆菌生长的影响,为巧克力平板的制备提供参考。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株 流感嗜血杆菌 ATCC10211 本实验室保存;分离菌株:5 株流感嗜血杆菌分离菌株 FSCC(I) 162001、FSCC(I) 162003、FSCC(I) 162004、FSCC(I) 162005、FSCC(I) 162006 为本实验室分离鉴定。

1.2 仪器与试剂 电热恒温培养箱(广东环凯微生物科技有限公司);水浴锅(广东环凯微生物科技有限公司)。哥伦比亚琼脂;脱纤维兔血;脱纤维羊血;脱纤维羊血;万古霉素;巧克力平板(厂家 I 批号:2015-

基金项目:广州市科技计划项目(2014Y2-00148)

作者简介:张建明(1979-),男,本科,工程师,主要从事培养基研发工作。

通讯作者:吴清平 E-mail: wuqp203@163.com; zjm987654@sina.com

1002; 厂家 II 批号: 20150929; HK: 改进新配方)。

1.3 方法

1.3.1 巧克力板的制备 按照使用说明配制哥伦比亚琼脂并灭菌, 放置至 78 °C 的水浴锅中, 当温度稳定后每哥伦比亚琼脂分别加入脱纤维羊血(a 北京、b 郑州)、脱纤维兔血(郑州), 恒温 10 min 后继续冷却, 冷却至 45 °C ~ 50 °C 加入万古霉素, 充分摇匀后倾注平板备用。

1.3.2 储存试验 将巧克力板分别置于冷库(4 °C)、常温(25 °C)、高温(42 °C) 3 种条件下存放, 高温放置 1 周后改为冷库储存。在 1 周、1 个月、2 个月、3 个月 4 个时间点, 分别比较流感嗜血杆菌在巧克力平板生长的菌落数和大小。

1.3.3 菌悬液制备 将流感嗜血杆菌 ATCC10211 接种于巧克力平板中(35 ± 2) °C 5% CO₂ 培养 24 h 后, 挑取菌落在无菌生理盐水中悬浮, 制备含活菌数为 3 × 10² cfu/ml ~ 3 × 10³ cfu/ml 的菌悬液, 备用。

1.3.4 试验菌悬液的接种 各取上述菌悬液 0.1 ml 分别螺旋接种至运输试验前后的各配方巧克力平板上, 每个配方做 3 个平行, 于(35 ± 2) °C 5% CO₂ 培养 18 h ~ 24 h 后进行菌落计数。

1.3.5 比对试验 在流感嗜血杆菌 ATCC10211 标准株基础上, 增加 5 株流感嗜血杆菌的分离株。将前 2 次实验比较好的改进配方制备的巧克力板与国内厂家的巧克力平板比较实验前后生物学效果。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 软件, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同血液制备的巧克力在不同温度下对流感嗜血杆菌的菌落大小和生长率影响 羊血配置的巧克力板在不同的储存条件下流感嗜血杆菌的生长率差异显著 4 °C 下储存的巧克力平板在 3 个月内生物学效果始终良好 25 °C 下储存的巧克力板在 1 个月后菌落已经变小 2 个月以后流感嗜血杆菌不生长 42 °C 下储存的巧克力平板在 1 周后菌落即已经不生长。而兔血制备的巧克力板在不同储存温度下对流感嗜血杆菌生长的差异较小。羊血、兔血巧克力平板在 4 °C 储存条件下对流感嗜血杆菌的生长差异无统计学意义(P > 0.05), 而在 25 °C 和 42 °C 储存条件下, 兔血、兔血制备的巧克力板与羊血巧克力板差异有统计学意义(P < 0.05) (表 1)。

2.2 改进的配方巧克力板与国内同类产品的对比 在 4 °C 储存条件后 HK 的巧克力平板上流感嗜血杆菌菌落大小优于厂家 I, 生长率优于厂家 II。25 °C 存放 1 个月和 42 °C 存放 1 周后, HK 的巧克力平板在运输实验后菌落数和菌落大小与 4 °C 冷库放置的巧克力平板差异无统计学意义(P > 0.05), 而厂家 I 的巧克力平板在 25 °C 放置下流感嗜血杆菌菌株明显变小, 在

42 °C 放置后流感嗜血杆菌不生长。厂家 II 的生长率和菌落大小在各储存温度下对流感嗜血杆菌生长差异无统计学意义(P > 0.05), 但是生长率明显低于 HK 巧克力平板。流感嗜血杆菌在不同厂家的巧克力平板上的比较具体见表 2。

表 1 流感嗜血杆菌在不同血液巧克力板上的生长率和菌落大小

血液	储存时间	储存温度(°C)	菌落数(cfu/ml)	菌落大小(mm)
羊血	1 周	4	208	0.5 ~ 1
		25	202	0.5 ~ 1
		42	0	
羊血 b	1 周	4	205	0.5 ~ 1
		25	200	0.5 ~ 1
		42	0	
兔血	1 周	4	204	0.5 ~ 1
		25	203	0.5 ~ 1
		42	189	0.5 ~ 1
羊血 a	1 个月	4	156	0.5 ~ 1
		25	144	< 0.5
		42	0	
羊血 b	1 个月	4	154	0.5 ~ 1
		25	140	< 0.5
		42	0	
兔血	1 个月	4	155	0.5 ~ 1
		25	150	0.5 ~ 1
		42	149	0.5 ~ 1
羊血 a	2 个月	4	108	0.5 ~ 1
		25	0	
		42	0	
羊血 b	2 个月	4	106	0.5 ~ 1
		25	0	
		42	0	
兔血	2 个月	4	105	0.5 ~ 1
		25	101	0.5 ~ 1
		42	98	0.5 ~ 1
羊血 a	3 个月	4	137	0.5 ~ 1
		25	0	
		42	0	
羊血 b	3 个月	4	139	0.5 ~ 1
		25	0	
		42	0	
兔血	3 个月	4	138	0.5 ~ 1
		25	135	0.5 ~ 1
		42	134	0.5 ~ 1

表2 流感嗜血杆菌在不同厂家的巧克力平板上的比较

菌株	厂家	储存温度 (°C)	储存时间	菌落数 (cfu/ml)	菌落大小 (mm)
ATCC10211	HK	4	1个月	101	0.5~1
		25	1个月	99	0.5~1
		42	1周	95	0.5~1
	厂家I	4	1个月	103	<0.5
		25	1个月	86	<0.5
		42	1周	0	
	厂家II	4	1个月	52	0.5~1
		25	1个月	49	0.5~1
		42	1周	56	0.5~1
FSCC(I) 162001	HK	4	1个月	87	0.5~1
		25	1个月	81	0.5~1
		42	1周	83	0.5~1
	厂家I	4	1个月	82	<0.5
		25	1个月	76	<0.5
		42	1周	0	
	厂家II	4	1个月	57	0.5~1
		25	1个月	50	0.5~1
		42	1周	56	0.5~1
FSCC(I) 162003	HK	4	1个月	46	0.5~1
		25	1个月	45	0.5~1
		42	1周	46	0.5~1
	厂家I	4	1个月	41	<0.5
		25	1个月	38	<0.5
		42	1周	0	
	厂家II	4	1个月	30	0.5~1
		25	1个月	26	0.5~1
		42	1周	32	0.5~1
FSCC(I) 162005	HK	4	1个月	123	0.5~1
		25	1个月	129	0.5~1
		42	1周	116	0.5~1
	厂家I	4	1个月	116	<0.5
		25	1个月	98	<0.5
		42	1周	0	
	厂家II	4	1个月	68	0.5~1
		25	1个月	65	0.5~1
		42	1周	67	0.5~1
FSCC(I) 162006	HK	4	1个月	154	0.5~1
		25	1个月	149	0.5~1
		42	1周	147	0.5~1
	厂家I	4	1个月	128	<0.5
		25	1个月	119	<0.5
		42	1周	0	
	厂家II	4	1个月	88	0.5~1
		25	1个月	80	0.5~1
		42	1周	68	0.5~1

3 讨论

流感嗜血杆菌属于条件致病菌,主要引起人类急性化脓感染及严重的继发感染,如急性咽炎、肺炎和败血症等^[2]。在我国临床标本的检验中,因受巧克力

琼脂质量的影响,流感嗜血杆菌的分离率一直偏低^[3-5]。修清玉、黎静华等人研究发现^[6-7],哥伦比亚琼脂作为巧克力平板的基础培养基对流感嗜血杆菌的检出率和菌落大小都较优,本文采用的也正是哥伦比亚琼脂作为基础培养基。近10余年来,国内外学者对此作了有益的探索,在有因子V、X的培养条件下,流感嗜血杆菌易于生长。相关文献表明,马血、羊血巧克力琼脂培养基做痰培养流感嗜血杆菌的检出率差异有统计学意义^[8-9]。但是也有研究显示直接加入自制的V、X因子以满足流感嗜血杆菌对生长因子的需求,流感嗜血杆菌在此培养基上生长良好^[10-12]。本研究发现,羊血巧克力板在运输实验前可以达到马血和兔血的巧克力平板的效果,但是在常温和高温放置一段时间后,马血和兔血的巧克力板明显优于羊血的巧克力板。表明马血和兔血的巧克力平板在运输和保质过程中性能比较稳定。

此外,流感嗜血杆菌的生长非常依赖X、V因子,而V因子在新鲜血液中处于抑制状态,必需加热至80℃~90℃,才能释放出来,并使血液中破坏V因子的NAD酶失活^[13-14]。因此巧克力板配置中对温度的控制非常关键,温度过高、过低对巧克力板的质量都有很大影响。各种巧克力平板通常都加入万古霉素,以抑制革兰阳性菌生长,提高嗜血杆菌的分离率。

参考文献

- [1] 吴丽华,周第,杨秀琴,等. 流感嗜血杆菌的培养、鉴定及免疫血清的试剂[J]. 中国生物制品学杂志, 1994, 7(1): 23-25.
- [2] 赵建喜,李会超,鹿强,等. 64排螺旋CT血管造影诊断下肢动脉病变的临床分析[J]. 中国全科医学, 2010, 13(9): 1003-1004.
- [3] 沈叙庄,陆权,邓力,等. 2000~2002年北京、上海及广州三地儿童携带流感嗜血杆菌抗生素敏感性监测[J]. 中华医学杂志, 2004, 84(16): 1335-1339.
- [4] 胡阳,熊芸,孙静. 流感嗜血杆菌的培养及耐药性分析[J]. 吉林医学, 2014, 35(17): 3737-3738.
- [5] 楚文瑛. 临床微生物实验室需重视嗜血杆菌的分离培养[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(18): 2160-2162.
- [6] 修清玉,赖国祥,王桂芳,等. 改良哥伦比亚巧克力培养基分离流感嗜血杆菌[J]. 第二军医大学学报, 1999, 6(20): 394-396.
- [7] 黎静华,王文婧,麦惠简. 三种选择性培养基分离流感嗜血杆菌的效果分析[J]. 中国医疗前沿, 2011, 5(10): 64-68.
- [8] 黄旭强,邓力,邓秋连,等. 应用马血、兔血、羊血巧克力琼脂培养基分离流感嗜血杆菌的效果评价[J]. 中国基层医药, 2006, 5(13): 711-712.
- [9] 苏盛通,陈惠业. 常见苛养菌培养的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2010, 3(5): 221-223.
- [10] 要瑞丽. 高选择性快速分离嗜血杆菌属XV琼脂培养基生物医学新产品研究与开发[J]. 生物医学, 2015, 5(1): 1-8.
- [11] 谭萍,张松,赖秀花,等. 改良流感嗜血杆菌培养基的研究[J]. 实用预防医学, 2003, 4(10): 150-151.
- [12] 邱坚. 副流感嗜血杆菌鉴定中三种不同方法对V因子需求试验比较分析[J]. 实用预防医学, 2013, 20(9): 1144-1145.
- [13] 林干,卢勉飞,容艳芬,等. 巧克力琼脂对流感嗜血杆菌生长影响的讨论[J]. 中国卫生检验杂志, 2014, 24(3): 685-687.
- [14] 刘建侠. 痰标本流感嗜血杆菌的分离培养及耐药性分析[J]. 继续医学教育, 2014, 28(10): 35-37.

收稿日期: 2015-03-28