

·诊疗技术·

霍乱监测中4号琼脂、TCBS琼脂 及庆大霉素琼脂优劣势对比

刘芷含

(浮梁县疾病预防控制中心检验科,江西 浮梁 333400)

摘要:目的 对比4号琼脂、TCBS琼脂及庆大霉素琼脂在霍乱监测中的优劣势。方法 选取2022年1月–2023年3月浮梁县疾病预防控制中心检验科分离保存的霍乱弧菌株,增菌后分别接种于4号琼脂、TCBS琼脂及庆大霉素琼脂三种培养基中进行分离培养,比较3种培养基成分,观察霍乱弧菌在不同培养基中的菌落特征,统计并对比其检测结果。结果 4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂培养基配方成分存在一定差异,其中TCBS琼脂培养基成分种类最多,但三者琼脂含量相同,其pH值无差异($P>0.05$)。霍乱弧菌在4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂中的菌落生长特征存在一定差异。本次霍乱弧菌检出率由高至低依次为4号琼脂>庆大霉素琼脂>TCBS琼脂($P<0.05$)。结论 4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂培养基均可有效分离霍乱弧菌,实现病菌检测,其营养成分不同、菌落生长表现各异,以4号琼脂培养基的检出效果最佳。

关键词:霍乱弧菌;4号琼脂;TCBS琼脂;庆大霉素琼脂;培养基成分;病菌检出率

中图分类号:R378.3

文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.1006-1959.2023.22.034

文章编号:1006-1959(2023)22-0148-04

Comparison of Advantages and Disadvantages of No.4 Agar,TCBS Agar and Gentamicin Agar in Cholera Surveillance

LIU Zhi-han

(Laboratory Department of Fuliang County Center for Disease Control and Prevention,Fuliang 333400,Jiangxi,China)

Abstract: Objective To compare the advantages and disadvantages of No.4 agar, TCBS agar and gentamicin agar in cholera surveillance. **Methods** From January 2022 to March 2023, the strains of *Vibrio cholerae* isolated and preserved by the Laboratory Department of Fuliang County Center for Disease Control and Prevention were inoculated into No.4 agar, TCBS agar and gentamicin agar respectively after enrichment for isolation and culture. The composition of the three media was compared, the colony characteristics of *Vibrio cholerae* in different media were observed, and the detection results were statistically compared. **Results** There were some differences in the composition of No. 4 agar, TCBS agar and gentamicin agar culture medium. Among them, TCBS agar culture medium had the most kinds of ingredients, but their agar contents were the same, and their pH values had no statistical difference ($P>0.05$). The colony growth characteristics of *Vibrio cholerae* in No. 4 agar, TCBS agar and gentamicin agar were different. The detection rate of *Vibrio cholerae* in this study was ranked from high to low in the order of No. 4 agar, gentamicin agar, and TCBS agar ($P<0.05$). **Conclusion** No. 4 agar, TCBS agar and gentamicin agar culture medium can effectively isolate *Vibrio cholerae* and realize the detection of the bacteria. The composition of the nutrient medium is different, and the colony growth performance is different. The detection effect of No. 4 agar culture medium is the best.

Key words: *Vibrio cholerae*; No. 4 agar; TCBS agar; Gentamicin agar; Composition of culture medium; Bacterial detection rate

霍乱(cholera)为我国法定甲类传染病之一,由霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)感染所致,多伴有剧烈呕吐、腹泻等明显症状,可引发脱水、休克等不良后果,具有发病急、传播快、致死率高等特点,对国内外公共卫生安全均构成了较大威胁^[1,2]。现如今,病原学诊断一直为我国疫情确诊报告金标准,其实验室检测结果可直接影响防疫管控工作的制定与开展,其中玻片凝集法(slide agglutination test)与胶体金法(colloidal gold method)均为霍乱弧菌常用检测方

式,其培养基的选择在菌株分离鉴定中具有重要意义^[3,4]。目前,4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂均为致病性弧菌的选择性培养基,其平板制作及配方组成均存在一定差异,临床选择存在较大争议^[5,6]。在此,本研究结合2022年1月–2023年3月浮梁县疾病预防控制中心检验科分离保存的霍乱弧菌株,观察4号琼脂、TCBS琼脂及庆大霉素琼脂在霍乱监测中的应用效果,以期对霍乱弧菌培养基的选择提供有效参考,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取2022年1月–2023年3月浮梁县疾病预防控制中心检验科分离保存的霍乱弧菌株,该菌株种类为O139群霍乱弧菌,保存环境

作者简介:刘芷含(1990.11–),女,河南安阳人,本科,主管技师,主要从事疾病预防控制工作

为-80℃,培养前经霍乱防治手册鉴定。

1.2 方法

1.2.1 培养基制作 4 号琼脂培养基:取 4 号琼脂(生产编号:025030,广东环凯微生物科技有限公司,规格:250 g)53.5 g,置于 1000 ml 蒸馏水中加热煮沸,充分溶解后,冷却至 50℃左右,灭菌后倒平板,凝固后备用。TCBS 琼脂培养基:取 TCBS 琼脂(生产编号:022041,上海研尊生物科技有限公司,规格:250 g)88 g,置于 1000 ml 蒸馏水中加热煮沸,充分溶解后,冷却至 50℃左右,灭菌后倒平板,凝固后备用。庆大霉素琼脂培养基:取庆大霉素琼脂(生产批号:2108271,北京陆桥技术股份有限公司,规格:250 g)56 g,置于 1000 ml 蒸馏水中加热煮沸,充分溶解后,冷却至 50℃左右,灭菌后倒平板,凝固后备用。

1.2.2 病菌培养 将初始霍乱弧菌接种碱性蛋白胨水(生产批号:20210610,青岛高科技工业园海博生物技术有限公司,规格:250 g)进行增菌培养,37℃增菌 6~8 h 后,于其菌膜下表层取接种环培养物,分别接种于 4 号琼脂、TCBS 琼脂与庆大霉素琼脂 3 种培养基中,每种培养基各设置 10 个平板,采用生化培养箱(上海恒一科学仪器有限公司,型号 LRH-150F),37℃培养 18~24 h。

1.2.3 病菌检测 取培养物进行玻片凝集法与胶体金法检测。玻片凝集法:取培养基菌落与霍乱弧菌单克隆抗体(生产批号:20220301,郑州万泰生物技术有限公司,规格:4×1 支/盒)进行玻片凝集试验,若菌落 10 s 内出现明显凝集颗粒,且在生理盐水中不凝集,则评定为阳性。胶体金法:采用霍乱弧菌检测试剂盒(生产批号:20220401,郑州万泰生物技术有限公司,规格:50 人份)进行检测,检测线与质控线均显示红色条杠,则评定为阳性。

1.3 观察指标 ①比较三种培养基成分;②比较霍乱弧菌在不同培养基中的菌落特征;③比较霍乱弧菌在不同培养基中的检测结果。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 21.0 统计学软件进行数据处理,计量资料以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验;计数资料以[n(%)]表示,采用 χ^2 检验。以 *P*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三种培养基配方成分比较 4 号琼脂、TCBS 琼脂与庆大霉素琼脂培养基配方成分存在一定差异,其中 TCBS 琼脂培养基成分种类最多,但三者琼脂含量相同,其 pH 值无差异(*F*=5.021, *P*=0.857),见表 1。

表 1 三种培养基配方成分比较(*n*, $\bar{x}\pm s$)

成分	4 号琼脂	TCBS 琼脂	庆大霉素琼脂
蛋白胨(g/L)	20	10	10
牛肉膏粉(g/L)	5	/	3
氯化钠(g/L)	5	10	5
无水亚硫酸钠(g/L)	3	/	3
柠檬酸钠(g/L)	/	10	10
庆大霉素(U/L)	500		500
蔗糖(g/L)	/	20	10
十二烷基硫酸钠(g/L)	0.5	/	/
猪胆汁粉(g/L)	5	/	/
雷佛奴尔(g/L)	0.03	/	/
酵母粉(g/L)	/	5	/
硫代硫酸钠(g/L)	/	10	/
枸橼酸钠(g/L)	/	10	/
牛胆粉(g/L)	/	5	/
牛胆酸钠(g/L)	/	3	/
柠檬酸铁(g/L)	/	1	/
麝香草酚兰(g/L)	/	0.04	/
琼脂(g/L)	15	15	15
pH	8.50±0.20	8.60±0.20	8.50±0.20

2.2 霍乱弧菌在不同培养基中的菌落特征比较 霍乱弧菌在 4 号琼脂、TCBS 琼脂与庆大霉素琼脂中的菌落生长特征存在一定差异,见表 2。

2.3 霍乱弧菌在不同培养基中的检测情况比较 霍乱弧菌检出率由高至低依次为 4 号琼脂>庆大霉素琼脂>TCBS 琼脂($\chi^2=4.445$, *P*=0.035),见表 3。

表 2 霍乱弧菌在不同培养基中的生长特征

培养基	10 h	14 h
4 号琼脂	有菌苔生长,可见单个细小菌落	可见 0.5~1 mm 圆形、光滑、凸起菌落,其中心褐色、周边无色
TCBS 琼脂	有菌苔生长,可见单个细小菌落	可见 0.5 mm 左右圆形、光滑小菌落,其中心浅褐色隆起、边缘无色
庆大霉素琼脂	有菌苔生长,可见单个细小菌落	可见 0.5~1 mm 圆形、光滑菌落,其中心浅褐色隆起、周边无色

表2(续)

培养基	18 h
4号琼脂	可见2~3 mm圆形、光滑、凸起菌落,其中心深褐色、边缘无色
TCBS琼脂	可见2 mm左右圆形、光滑菌落,其中心深褐色、边缘无色,伴大量绿色菌落
庆大霉素琼脂	可见2~3 mm圆形、光滑、凸起菌落,其中心深褐色、边缘无色

表3 霍乱弧菌在不同培养基中的检测率比较[n(%)]

培养基	平板数(个)	玻片凝集法检出率	胶体金法检出率
4号琼脂	20	10(50.00)	10(50.00)
TCBS琼脂	20	7(35.00)	6(30.00)
庆大霉素琼脂	20	8(40.00)	8(40.00)

3 讨论

霍乱弧菌属于典型革兰氏阴性菌,呈弧形或逗点状,其血清群丰富,细菌运动活跃,存活时间较长,多发于免疫力低下人群,具有较高易感风险^[7,8]。其中,O1群与O139群霍乱弧菌是引发霍乱的主要病原菌,二者可通过毒素共调菌毛(toxincoregulated-pilus, TCP)与霍乱毒素(cholera toxin, CT)的释放,引发急性肠胃道症状,对患者生命安全构成了极大威胁,其临床诊断尤为重要^[9,10]。目前,玻片凝集法与胶体金法均为霍乱弧菌常用鉴定方式,其检测需从强选择性培养基中挑取可疑菌落,以完成病菌的快速测定,实现疫情的及时防控^[11,12]。故,其培养基的选择将直接影响病菌鉴定的时效性与准确性,在疫情防控管理中具有重要意义。4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂均为分离霍乱弧菌的强选择性培养基,其菌落特征是识别病菌的重要依据,但其培养生长速度不同,菌落特征存在一定差异,对其病菌检出效果造成了一定影响^[13,14]。

本研究结果显示,4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂培养基配方成分存在一定差异,其中TCBS琼脂培养基成分种类最多,但三者琼脂含量相同,其pH值无差异($P>0.05$),表明4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂培养基的部分配方存在差异,但其琼脂量与pH值较为一致,均为固体碱性培养基。这是由于霍乱弧菌属于兼性厌氧菌,其在固体培养基中生长良好,且碱性环境下增殖更快,以上培养基均可作为霍乱弧菌的生长提供良好条件^[15,16]。其中,4号琼脂与庆大霉素琼脂培养基的配方成分较为相近,二者均以蛋白胨、牛肉膏粉作为碳氮源、

维生素及生长因子的主要来源,通过氯化钠维持渗透压平衡,其配方中的亚硫酸钠可刺激弧菌生长,并以琼脂作为培养基的凝固剂^[17,18]。但在抑菌配方中,4号琼脂培养基包括庆大霉素、十二烷基硫酸钠、猪胆汁粉与雷佛奴尔等成分,庆大霉素琼脂培养基则以庆大霉素、柠檬酸钠为主,其抑菌成分相对单一^[19]。TCBS琼脂培养基配方中,其蛋白胨、酵母膏粉、蔗糖可作为碳氮源、维生素与生长因子的主要来源,通过氯化钠维持渗透压平衡,刺激弧菌生长,并利用柠檬酸钠、胆酸钠、牛胆粉及硫代硫酸钠等成分抑制革兰氏阳性菌及大肠菌群的生长,其中硫代硫酸钠与柠檬酸铁可作为硫化氢产生的重要指示剂,麝香草酚兰则属于培养基pH指示剂^[20]。在其培养生长过程中,霍乱弧菌在4号琼脂、TCBS琼脂与庆大霉素琼脂中的菌落生长特征存在一定差异,提示不同培养基的菌落生长速度存在一定差异。其中,4号琼脂与庆大霉素琼脂培养基的菌落特征较为相近,这与其相似的培养基配方存在直接关联,而TCBS琼脂培养基的菌落生长速度明显较慢,且在18 h后出现两大绿色菌落,易导致误检及漏检的发生。本次检测结果显示,霍乱弧菌检出率由高至低依次为4号琼脂>庆大霉素琼脂>TCBS琼脂($P<0.05$),可见4号琼脂培养基的检测效果最佳,而TCBS琼脂培养基的检测作用相对最弱。分析认为,4号琼脂与庆大霉素培养基均含有亚硫酸钠与庆大霉素,前者可刺激弧菌生长,后者则可有效抑制革兰氏阳性菌与部分革兰氏阴性杂菌,其中4号琼脂还包含十二烷基硫酸钠、猪胆汁粉与雷佛奴尔等成分,可进一步减少培养基杂菌对检测结果的影响,保证霍乱弧菌的检测准确

性^[21]。而 TCBS 琼脂培养基的抗菌成分相对较少,仅通过枸橼酸钠、牛胆粉、牛胆酸钠抑制肠道菌及革兰氏阳性菌的生长,对霍乱弧菌的生长速度造成了一定影响,同时 TCBS 琼脂的蔗糖成分相对较多,其蔗糖发酵菌的产生,可进一步干扰弧菌的鉴定,不利于病菌的准确检出^[22]。

综上所述,4号琼脂、TCBS 琼脂与庆大霉素琼脂培养基均可有效分离霍乱弧菌,实现病菌检测,其培养基成分不同、菌落生长表现各异,以4号琼脂培养基的检出效果最佳。

参考文献:

- [1]杨明强,朱兴荣,林婷,等.漳州市龙海区2018-2021年霍乱弧菌监测结果分析[J].海峡预防医学杂志,2022,28(5):70-71.
- [2]段刚,王文斟,赵婷,等.分离自免疫力低下患者的5株非O1/O139群霍乱弧菌病原学特征分析[J].预防医学情报杂志,2022,38(10):1392-1396.
- [3]邱艺燕,欧秀华,陈嘉祥.2011-2018年厦门市集美区霍乱监测结果分析[J].热带病与寄生虫学,2021,19(2):95-97.
- [4]周霞霞,邱晶磊,杨广,等.传统培养法与荧光PCR法检测弧菌的方法评价[J].食品安全质量检测学报,2021,12(4):1550-1556.
- [5]Bokma J,Pardon B,Deprez P,et al.Non-specific, agar medium-related peaks can result in false positive *Mycoplasma alkaliscens* and *Mycoplasma arginini* identification by MALDI-TOF MS[J].Res Vet Sci,2020,130:139-143.
- [6]Bittar F,Gouriet F,Khelaifia S,et al.FastFung: A novel medium for the culture and isolation of fastidious fungal species from clinical samples[J].J Microbiol Methods,2021,180:106108.
- [7]舒高林,李东迅,彭华,等.2013-2019年北京市昌平区霍乱弧菌病原学和分子流行病学特征分析[J].疾病监测,2020,35(8):735-741.
- [8]黄瑛,贾蕾,田祎,等.2015-2021年北京市霍乱弧菌病原学和流行特征分析[J].中华流行病学杂志,2022,43(5):734-738.
- [9]何牧,张爽,张彦春,等.2015-2017年北京市顺义区食源性霍乱弧菌感染及病原学特征分析[J].疾病监测,2019,34(6):525-528.
- [10]罗朝晨,陈爱平,谢芳钦,等.2013-2017年福建省霍乱监测分析[J].预防医学论坛,2019,25(1):1-4.
- [11]Wangman P,Chaivisuthangkura P,Taengchaiyaphum S,et al.

Development of a rapid immunochromatographic strip test for the detection of *Vibrio parahaemolyticus* toxin B that cause acute hepatopancreatic necrosis disease [J].J Fish Dis,2020,43(2):207-214.

[12]施连琴,徐烨,曹卫中.1962-2018年上海市崇明岛域霍乱流行特征分析[J].上海预防医学,2020,32(9):764-766,772.

[13]Surekhamol IS,Deepa GD,Somnath Pai S,et al.Isolation and characterization of broad spectrum bacteriophages lytic to *Vibrio harveyi* from shrimp farms of Kerala, India[J].Lett Appl Microbiol,2014,58(3):197-204.

[14]Iramiot JS,Rwego IB,Kansiime C,et al.Epidemiology and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* associated with the 2017 outbreak in Kasese district, Uganda[J].BMC Public Health,2019,19(1):1405.

[15]屠博文,薛银刚,姚萍,等.不同来源的霍乱弧菌毒力特征的质谱学分析[J].食品工业科技,2021,42(06):130-136,150.

[16]Iramiot JS,Rwego IB,Kansiime C,et al.Epidemiology and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* associated with the 2017 outbreak in Kasese district, Uganda[J].BMC Public Health,2019,19(1):1405.

[17]Ajuzieogu CA,Dyboh IC,Nwobodo DC.Culture-dependent examination of the bacteriological quality of ready-to-eat African salads in Enugu metropolis, Nigeria and antibiotic resistance profile of associated bacteria[J].Heliyon,2022,8(10):e10782.

[18]郎中凯,王恒芹.O139型霍乱弧菌在四种4号琼脂培养基上的生长特性研究[J].中国卫生检验杂志,2011,21(4):907-909.

[19]Happy AH,Alam MG,Mahmud S,et al.Isolation, Identification and Characterization of Gram Negative Bacteria from Popular Street Food (Chotpoti) at Savar Area, Dhaka, Bangladesh[J].Open Access Library Journal,2018,5(11):1-11.

[20]格西克图.用溴麝香草酚兰代替混合指示剂观察缓冲溶液的缓冲作用[J].锡林郭勒职业学院学报,2015(1):40-42.

[21]吴三明,李元珍,李国民.一起O139群霍乱疫情的实验室检测方法探讨[J].中国卫生工程学,2014,13(2):153-154,156.

[22]Pfeffer C,Oliver JD.A comparison of thiosulphate-citrate-bile salts-sucrose (TCBS) agar and thiosulphate-chloride-iodide (TCI) agar for the isolation of *Vibrio* species from estuarine environments[J].Lett Appl Microbiol,2003,36(3):150-151.

收稿日期:2023-06-28;修回日期:2023-07-11

编辑/杜帆