

牛奶样品中金黄色葡萄球菌测试片、确认片效果评价

(参照 GB4789.10—2016)

一、实验目的

将牛奶增菌液分别在 BHK 金黄色葡萄球菌测试片、3M 金黄色葡萄球菌测试片和 Baird-Parker 平板上划线分离,对分离出的可疑菌落用金黄色葡萄球菌确认反应片进行确认以及生化鉴定等。观察 BHK 金黄色葡萄球菌测试片、3M 金黄色葡萄球菌测试片和 Baird-Parker 之间, BHK 和 3M 确认反应片之间的效果。

二、实验样品

增菌液(编号: 4292、3469、3417、2578、2917、2436、2145 和 2094); 牛奶样品(编号: 2094-1、2094-2、2578)。

三、实验操作

1、牛奶样品增菌

取 1mL 混匀的牛奶样品(编号: 2094-1、2094-2、2578)至 9mL 的 7.5% 氯化钠肉汤试管中涡旋混匀。

2、培养

将上述样品匀液于 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。最终呈混浊生长。

3、分离

(1) 将增菌后的培养物,分别划线接种到 BHK 金黄色葡萄球菌测试片、3M 金黄色葡萄球菌测试片和 Baird-Parker 平板上,测试片 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h, Baird-Parker 平板 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 24h~48h。

(2) 将 BHK 金黄色葡萄球菌测试片上可疑金黄色葡萄球菌菌落,用 1 μL 接种环或接种针挑取划线至血平板上 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。

4、初步鉴定

(1) 金黄色葡萄球菌在 Baird-Parker 平板上呈圆形,表面光滑、凸起、湿润、菌落,颜色呈灰黑色至黑色,有光泽,常有浅色(非白色)的边缘,周围绕以不透明圈(沉淀),其外常有一清晰带。

(2) 在血平板上,形成菌落较大,圆形、光滑凸起、湿润、金黄色(有时为白色),菌落周围可见完全透明溶血圈。

(3) 对于 BHK 金黄色葡萄球菌测试片、3M 金黄色葡萄球菌测试片上分离出的可疑金黄色葡萄球菌菌落为品红-紫红色菌落,用各自配套的金黄色葡萄球菌确认反应片进行确认。BHK 金黄色葡萄球菌测试片加入确认反应片后 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 4~6h; 3M $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3~4h。

加入确认片后 BHK 上金葡表现为品红色菌落变成蓝紫色菌落; 3M 上表现为紫红色菌落周围有粉色晕圈。BHK 无明显颜色变化和 3M 菌落周围无粉色晕圈则判定不是金黄色葡萄球菌。

5、确证鉴定

(1) 革兰氏染色: 金黄色葡萄球菌为革兰氏阳性球菌,排列呈葡萄球状,无芽胞,无荚膜,直径约为 $0.5\mu\text{m}\sim 1\mu\text{m}$ 。

(2) 血浆凝固酶试验: 挑取 Baird-Parker 平板或血平板上至少 5 个可疑菌落(小于 5 个全选),分别接种到 5mLBHI 肉汤中, $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 18h~24h。将冻干血浆先用 0.5mL 生理盐水溶解,再加入 BHI 培养物 0.3 mL,振荡摇匀,置 $36\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养箱或水浴箱内,每半小时观察一次,观察 6h,如呈现凝固(即将西林瓶倾斜或倒

置时,呈现凝块)或凝固体积大于原体积的一半,被判定为阳性结果。同时以血浆凝固酶试验阳性和阴性葡萄球菌菌株的肉汤培养物作为对照

(3) 氧化酶和触酶试验

氧化酶:挑取血平板上分离出的可疑单菌落于氧化酶试纸表面,观察试纸的颜色,阳性为紫红色或红色,阴性为不变色。

触酶(载玻片法):用接种环挑取血平板上分离出的可疑单菌落至干净的载玻片上,加一滴3%~30%过氧化氢于载玻片的细菌上,即可观察气泡的产生,若产生气泡为阳性。金黄色葡萄球菌表现为氧化酶阴性,触酶阳性。

(4) 荧光探针法(金黄色葡萄球菌 PCR 检测试剂盒)

从血平板上挑取可疑菌落,充分悬浮于预先加有30 μ L裂解液的无菌离心管中,轻弹管壁消除气泡,99 $^{\circ}$ C热裂解10min。12000r/min离心5分钟,上清液即为粗提的DNA。

按照需求取n个PCR反应管(n=1管阴性对照+待检测样品数+1管阳性对照),从试剂盒中取出预混液,充分融化,涡旋后短暂离心,以上每管加入16 μ L预混液,待用。向上述n个反应管中分别加入阴性对照、待测样品DNA、阳性对照各4 μ L,盖紧管盖,短暂离心,立即进行PCR扩增反应。

结果判读:Ct值 \leq 35金黄色葡萄球菌阳性;若Ct值 \geq 37,则金黄色葡萄球菌阴性。

四、实验结果与分析

1、4292、3469在Baird-Parker平板上为阳性,其它为阴性;3469、2917、2436、2145、2578、2094-1、2094-2在测试片和3M上均为阳性,其它为阴性。

样品编号	BHK	3M	Baird-Parker
4292	-蓝绿色菌落	-黑色菌落	+黑色菌落,周围有水解圈
3469	+品红色菌落	+紫红色和蓝绿色菌落	+黑色菌落,周围有水解圈
3417	-无	-无	-灰白色菌落
2578	-无	-无	-无
2917	+品红色菌落	+紫红色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈
2436	+品红色菌落	+紫红色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈
2145	+品红色菌落	+紫红色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈
2094	-无	-无	-黑色菌落,周围无水解圈
2578 牛奶样品	+品红色菌落	+紫红色和蓝绿色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈
2094-1 牛奶样品	+品红色菌落	+紫红色和蓝绿色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈
2094-2 牛奶样品	+品红色菌落	+紫红色和蓝绿色菌落	-黑色菌落,周围无水解圈

2、3469、2917、2436、2145、2578、2094-1、2094-2测试片上分离到的疑似阳性菌经初步确认为金黄色葡萄球菌,在baird-parker上显阳性的4292经确认为阴性。

样品编号	BHK 确认片	3M 确认片	血平 板	血浆凝 固酶	氧化酶	触酶	革兰氏染 色
4292	/	/	/	-	-	+	G+球菌
3469	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2917	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2436	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2145	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2578	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2094-1	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌
2094-2	+蓝紫色	+粉红色	β溶血	+	-	+	G+球菌

3、经金黄色葡萄球菌 PCR 检测试剂盒（荧光探针法）确认，3469、2917、2436、2145、2094-1、2094-2、2578 样品均为金黄色葡萄球菌，与测试片确认片的结果一致。

样品编号	CT 值	结果判定
NG（阴性对照）	Undeter	-
PS（阳性对照）	23.49	+
3469-2	16.725	+
2917	19.970	+
2436	17.677	+
2145	15.706	+
2094-1 牛奶样品	17.617	+
2094-2 牛奶样品	17.692	+
2578 牛奶样品	17.234	+

五、结论

本实验证明 BHK 金黄色葡萄球菌测试片、确认反应片和 3M 金黄色葡萄球菌测试片、确认反应片效果无明显差异。实验中 Baird-Parker 平板存在假阳性（4292）以及假阴性（3469-2、2917、2436、2145、2094-1 牛奶样品、2094-2

牛奶样品和 2578 牛奶样品)。BHK 金黄色葡萄球菌测试片和确认片对实际样品的分离效果良好。

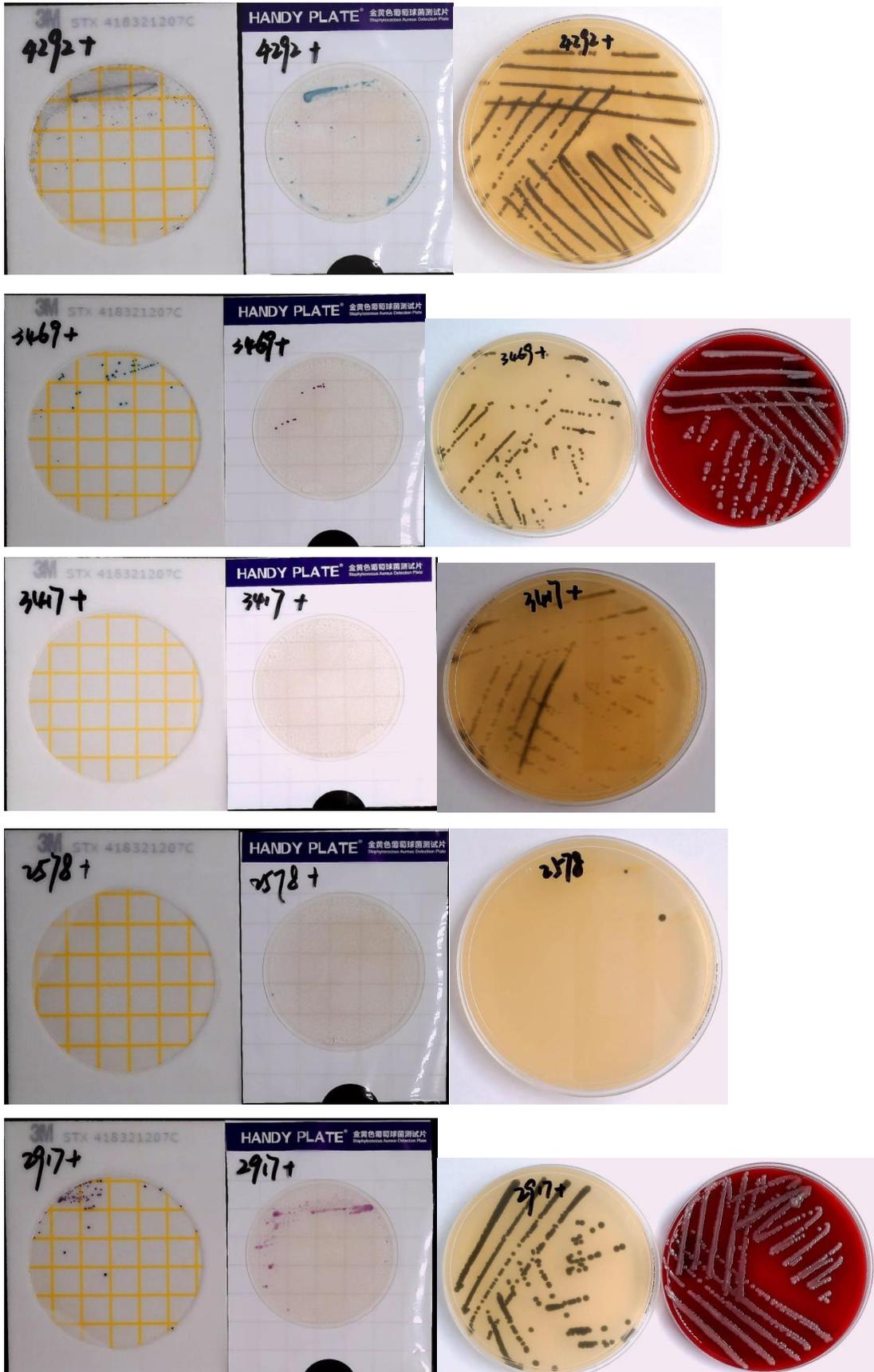
附件 1 样品在 BHK 测试片、3M 测试片和 Baird-parker 上的初步分离结果

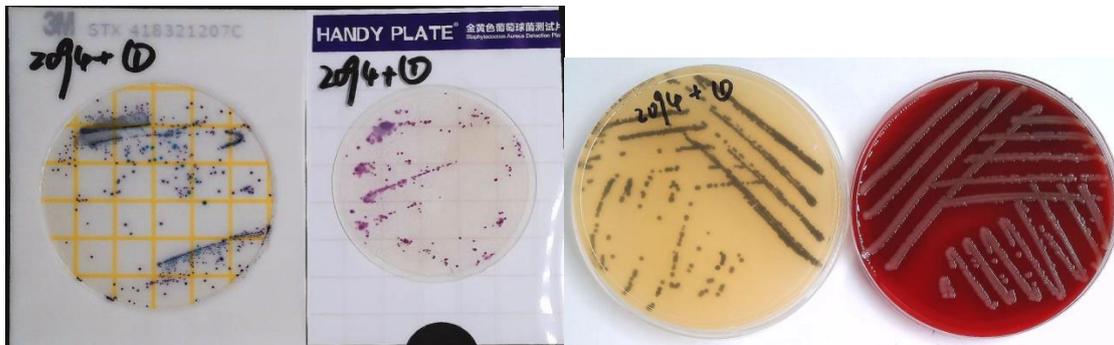
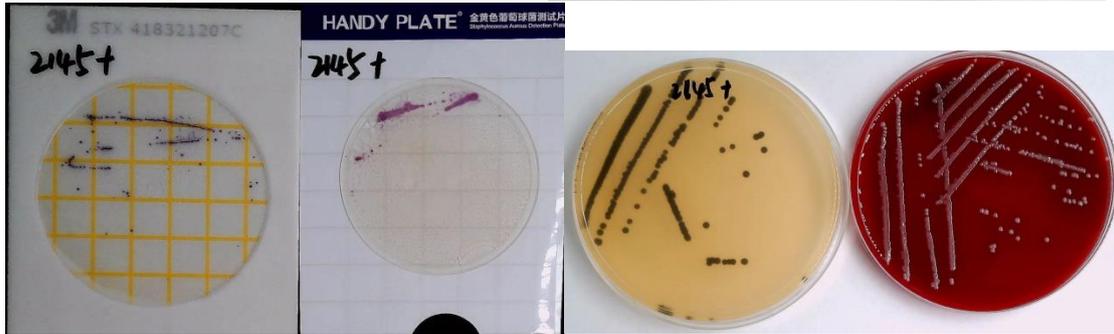
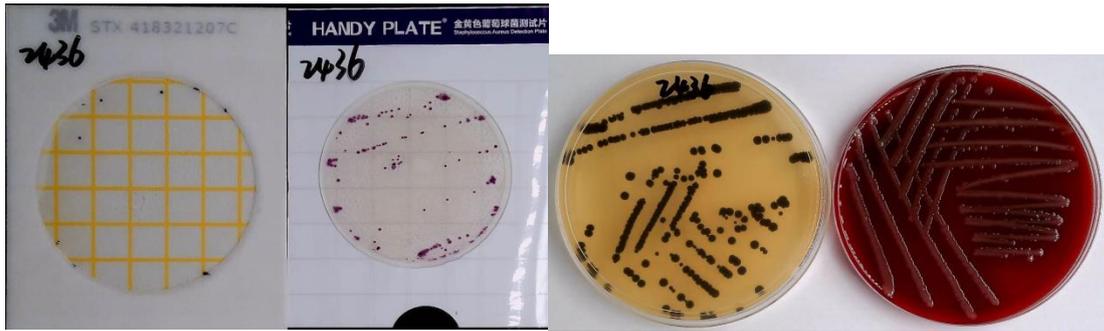
附件 2 分离菌的确认片鉴定结果

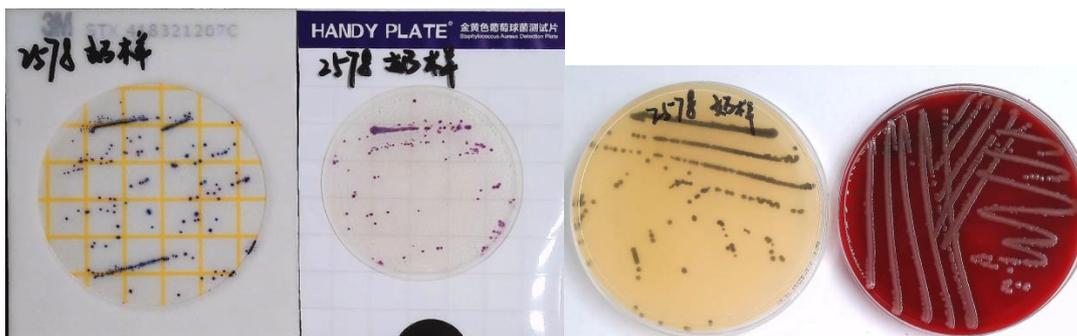
附件 3 分离菌的分子鉴定结果



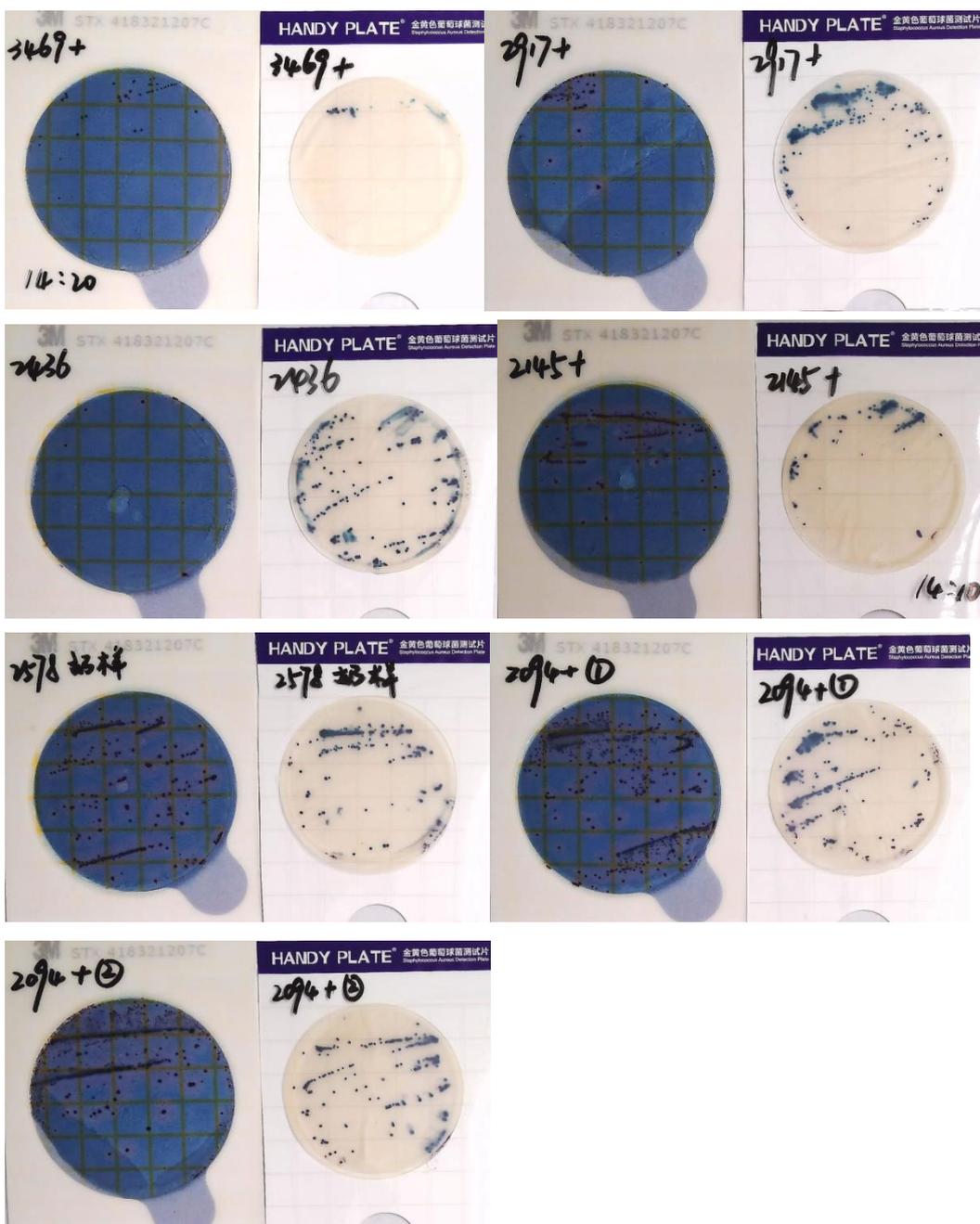
附图一：样品在测试片、3M 和 Baird-parker 上的分离结果





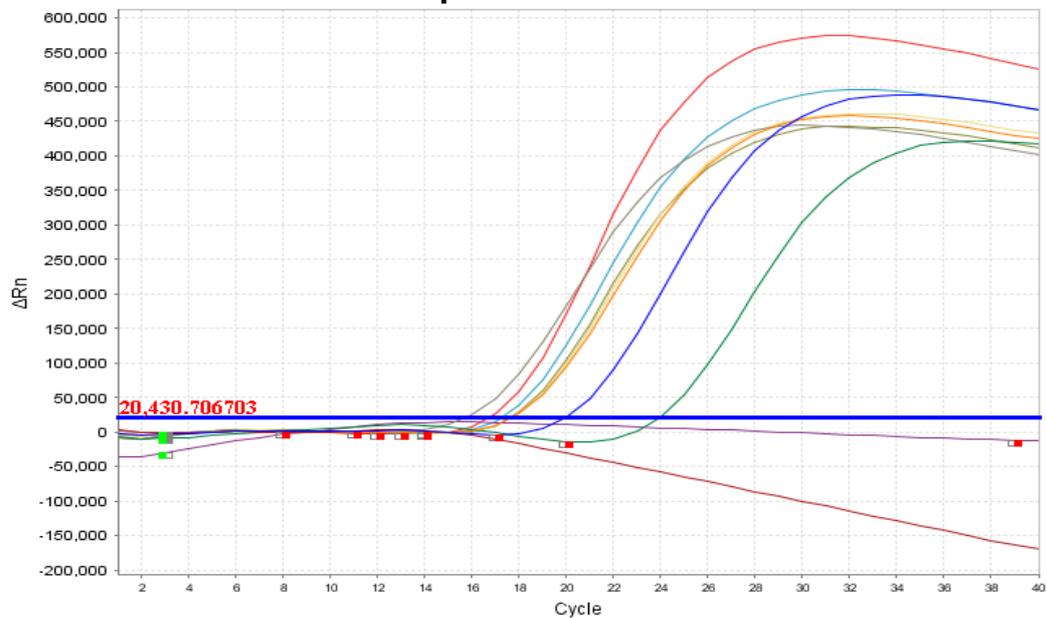


附图二：确认片确认结果



附图三：金黄色葡萄球菌核酸测试剂盒结果

Amplification Plot



- 2094-1milk ■ 2094-2milk ■ 2145 ■ 2436 ■ 2578milk ■ 2917 ■ 3469-1 ■ 3469-2
- NG ■ PS