

绿脓杆菌噬菌体快检法

江元培 胡飞凤* (浙江省药品检验所, 杭州 310004)

1 实验材料

1.1 菌株

绿脓杆菌敏感株号: 中国药品生物制品检定所提供656、35、203。

待检菌株号: (1)中国药品生物制品检定所提供101、104、110、120、123、106、210、205
(2)浙江株号: 1—32株。

1.2 供试品

牛磺酸眼药水 10 ml : 0.5 g 宁波第二制药厂 批号870928

1%阿托品滴眼液 浙江医科大学附属第一医院880113

醋酸去炎松软膏 杭州利民制药厂 批号880131

纯真珍珠粉 杭州胡庆余堂制药厂 批号880408

锡类散 0.3 g × 20支 浙江绍兴中药厂 批号870801

1.3 培养基:

肉汤琼脂培养基

肉汤培养基

B. L. 增菌液

十六烷三甲基溴化铵琼脂培养基

上述培养基按90年卫生部颁布的“药品卫生检验方法”进行配制。

2 实验方法

2.1 药品的人为污染: 取浙江1—32株和中央所8

株, 分别接种肉汤琼脂斜面, 37°C培养24 h, 再转种于肉汤培养基, 37°C培养24 h, 用灭菌生理盐水系列稀释至 10^{-4} 。称取纯真珍珠粉、阿托品滴眼液、锡类散、醋酸去炎松软膏和牛磺酸眼药水各8份, 每份0.5 g (ml) 分别用1—8号、9—16号、17—24号、25—32号株和中央株101、104、110、120、123、106、210、205污染。污染量为各株肉汤培养液的 10^{-4} 稀释液0.15 ml, 约加5400个菌。用玻棒混匀即得:

2.2 噬菌体的制备: 分别称取已污染1 h、0.5 mo、1 mo的含菌药品各0.1 g于10 ml B. L. 增菌液中, 37°C培养24 h, 取其中2 ml于小试管中, 再滴加0.15 ml氯仿液, 振荡片刻, 以3500 rpm离心15 min。上清液即为噬菌体备用。

2.3 敏感菌液的制备: 将656、35、203分别接种于肉汤琼脂斜面, 37°C培养24 h, 转种于10 ml肉汤。37°C培养16 h即得。

2.4 单层琼脂测定法: 取培养后的各敏感株0.5 ml于肉汤琼脂平板上, 用L棒推匀。37°C培养箱中开盖放置0.5 h, 取出后, 把每个平板反面划成8格(编号1—8), 然后用滴管对号滴加上述噬菌体液于平板上。37°C正置培养3、4、5 h。观察噬斑结果。

2.5 绿脓杆菌常规对照检查: 取B. L. 增菌液, 划线于十六烷三甲基溴化铵平板, 37°C培养24 h, 再挑取可疑菌落。进行氧化酶试验。

综合4和5两项结果, 列表如下:

*88届浙江医科大学药系实习生

表1 药品污染绿脓杆菌后测定噬斑结果

样品	噬菌液	656 菌株			35 菌株			203 菌株		
		1 h	15 d	30 d	1 h	15 d	30 d	1 h	15 d	30 d
珍珠粉	1	卅	+	+	卅	—	—	卅	++	—
	2	卅	卅	++	卅	++	++	卅	++	++
	3	卅	+	++	++	++	—	++	+	—
	4	卅	+	+	卅	++	—	++	+	++
	5	卅	+	—	++	—	—	++	+	—
	6	卅	+	+	卅	+	—	卅	+	—
	7	卅	卅	++	卅	++	++	卅	+	++
	8	卅	+	—	++	+	—	++	+	—
阿托品滴眼液	9	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	10	++	—	—	++	—	—	++	+	—
	11	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	12	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	13	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	14	++	—	—	++	—	—	+	—	—
	15	++	—	—	++	—	—	+	—	—
	16	++	—	—	++	—	—	++	—	—
铜类散	17	卅	—	—	卅	—	—	++	—	—
	18	卅	—	—	卅	—	—	++	—	—
	19	卅	—	—	++	—	—	++	—	—
	20	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	21	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	22	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	23	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	24	++	—	—	++	—	—	++	—	—
去炎松软膏	25	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	26	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	27	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	28	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	29	++	+	—	++	+	—	++	+	—
	30	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	31	++	—	—	++	+	—	++	—	—
	32	++	+	—	++	+	—	++	—	—
牛磺酸眼药水	33	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	34	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	35	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	36	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	37	++	—	—	++	—	—	++	—	—
	38	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	39	+	—	—	+	—	—	+	—	—
	40	+	—	—	+	—	—	+	—	—

*卅噬斑透明, ++较透明, +较混浊, 一无噬斑

表2 绿脓杆菌常规法检查与噬菌体法检出率比较

样品	噬菌液株号	常 规 法									裂 解 试 验								
		B、L、增菌液			C、A、平板			氧化酶试验			检 出 率			噬 菌 斑			检 出 率		
		1h	15d	30d	1h	15d	30d	1h	15d	30d	1h	15d	30d	1h	15d	30d	1h	15d	30d
珍珠粉	1—8	8/8	8/8	8/8	8/8	8/8	6/8	8/8	8/8	6/8	100	100	75	8/8	8/8	6/8	100	100	75
阿托品滴眼液	9—16	8/8	0/8	0/8	5/8	0/8	0/8	5/8	0/8	0/8	62.5	0	0	8/8	1/8	0/8	100	12.5	0
锡类散	17—24	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	100	0	0	8/8	0/8	0/8	100	0	0
去炎松软膏	25—32	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	100	0	0	8/8	2/8	0/8	100	25	0
牛磺酸眼药水	33—40	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	8/8	0/8	0/8	100	0	0	8/8	0/8	0/8	100	0	0

*33—40株为中国药品生物制品检定所菌株

3 实验结果与讨论

药品人为污染绿脓杆菌1h后,部颁法与噬菌体法均能检出。但半个月后情况就有所不同,除珍珠粉外四个品种部颁法均未检出,而噬菌体法尚能检出阿托品滴眼液与去炎松软膏2个品种。似乎噬菌体法检出率较部颁法高。但到1mo后除珍珠粉外四个品种两法均不能检出。至此认为两法检出率基本相同。

珍珠粉在污染绿脓杆菌1mo后,两法均能检出,说明绿脓杆菌的存活与药品性质有很大关系。

三株敏感株,以656最佳。从本次实验来看,敏感株的敏感性对检出率影响很大。如能大量进行交叉筛选试验,优选到理想的敏感菌株,并能防止其变异,则本法可考虑作为药品检查绿脓杆菌快检方法。

收稿日期:1993—02—01