

微菌落观察法快速检测和鉴别

结核杆菌培养物的研究

匡铁吉 宋 萍 金关甫 王仲元 朱建华

(解放军三〇九医院 北京 100091)

摘 要 将取自肺结核患者的 219 例痰标本接种匡氏琼脂平板,共分离到 112 例结核菌生长物。其中培养法 104 例(92.8%)阳性,微菌落观察法 108 例(96.4%)阳性,微菌落法阳性率稍高。培养法和微菌落法阳性标本首次检出时间分别为 18.6d 和 11d,微菌落检出时间更短($P < 0.01$)。常规菌型鉴别方法与微菌落法对结核杆菌菌型鉴别的符合率为 99%。

关键词 结核杆菌,微菌落,琼脂培养基

我国的结核病防治工作近年来取得了显著的成绩和进步,很多地区的结核病发病率都有大幅度下降^[1]。但与世界总体水平相比,我国的结核病发病率仍然较高,加上人口基数大,大多数结核病患者又居住在农村,而那里的医疗卫生条件尚不完备,在及时诊断和治疗方面存在着技术和经济上的双重困难。因此,从现在到下世纪初,我国结核病防治任务依然是非常艰巨^[2]。

结核病诊断和治疗中一个主要问题是结核病细菌学诊断十分费时,菌型鉴别试验非常繁杂且花费很大。近年来,聚合酶链反应(PCR)快速检测结核菌技术已显示出很多优越性^[3,4]。但该方法在技术上尚有待完善,费用有待降低,结果的临床含义也有待明确^[5]。因此,在今后较长一段时间内,像我国这样的发展中国家,结核病的实验诊断和鉴别,将仍然依赖于传统的细菌学方法。

早在 1965 年, Vestal 报道了生长在 7H10 琼脂培养基上的各种分枝杆菌的早期菌落形态,可用来区分不同种分枝杆菌^[6]。最近, Idigoras 等报道微菌落显微镜观察法可用于 7H11 琼脂培养基上结核菌分离物的检测和鉴别,平均培养 12d 就能报告阳性结果。作者采用显微镜观察微菌落法,对匡氏琼脂培养基上 219 例痰菌分离培养结果做了检测,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 痰标本与前处理

按常规自我院住院肺结核患者留取 219 例痰标本,大约 10ml 痰标本收集在一个 100ml 的干净广口玻璃瓶内。用酶消化法处理痰标本,操作方法见文献^[7]。

本文作者还有刘金伟、秦振伦、李伟霞、陈洪斌。

本文于 1995 年 3 月 6 日收到。

1.2 琼脂培养基的制备和接种

匡氏琼脂培养基的组份和制作步骤, 见文献[7,8]。痰结核菌分离培养采用直径 7cm 透明塑料平皿, 以便能进行显微镜观察。按常规操作制备匡氏琼脂平板, 然后取 0.2ml 经前处理过的痰标本接种, 涂布后用聚乙烯塑料薄膜将平皿密封, 确保其不透水而透气。再将平皿翻转后(培养基面在上)置 36℃ 培养, 每份试验标本接种 8 个平皿。

1.3 结果观察

每份痰标本接种 8 个平皿, 培养第 3d、7d、10d、14d、21d、28d 和 35d 分别取一个平皿做微菌落检查, 并同时记录培养结果。微菌落法检测的平皿, 检测前将其打开后置一密闭容器中, 用氯仿蒸气薰蒸 1h 后, 用普通显微镜(100×)观察平皿表面的微菌落。

1.4 结核杆菌菌型鉴别

采用常规分型试验对微菌落法确定为结核杆菌的分离物进行菌种鉴定。微菌落法则根据琼脂平板上生长的结核菌早期菌落形态来鉴别结核菌。

2 结果和讨论

表 1 结果表明, 微菌落法检测琼脂培养基分离物的阳性率稍高于培养法。其原因是由于有 7 份痰培养物的生长一直停留在微小菌落阶段。推测这 7 份痰标本中的结核杆菌因受抗痨药物或机体免疫因子的作用, 菌细胞的生长、代谢途径可能发生了某些改变, 因而不能在匡氏琼脂培养基上生长成正常菌落。对微菌落法阳性, 而培养阴性的培养皿, 作者将其表面生长物冲洗下来, 用 PCR 技术检测结核菌基因, 结果均为阳性。这证明了微菌落法检测结核菌的可靠性。另有 4 例标本, 结核菌培养为阳性, 微菌落法却为阴性。这 4 例标本在培养基平皿上的菌落数均不多, 平均不足 5 个。这说明漏检有可能使微菌落法出现假阴性结果。为了有效地防止漏检, 作者根据实验经验建议: 用微菌落法检查培养皿, 在检测结果为阴性时, 每个平皿应观察 5min 或更长时间, 以确保平皿上微菌落数很少时也不会漏掉。

表 1 微菌落法和培养法结果的比较

Table 1 Comparison of results of microcolony observation and culture method

微菌落法 Microcolony	培养法 Culture		共计 Total
	阳性例数 Dositive cases	阴性例数 Negative cases	
阳性例数 Positive cases	101	7	108
阴性例数 Negative cases	4	107	111
共 计 Total	105	114	219

琼脂培养基用于痰结核菌培养, 平均初生长时比改良罗氏培养基缩短 7d 以上。本试验 105 例培养阳性标本, 平均初生长时间为 18.6d, 说明结核菌在匡氏琼脂培养基上的

生长速度还是比较快的(表 2)。而微菌落法检测的 108 例阳性生长物中,平均初生长时间为 11d,比培养法平均提早 7d,二者差异很显著($P < 0.01$)。采用微菌落法,有 15.7%、35.2%和 91.6%的阳性标本分别在培养第 3d,第 7d 和第 14d 获得结果。这一速度远快于常规培养法,而与同位素检测法相似。

表 2 微菌落法和培养法报告结果时间的比较

Table 2 Comparison of the time for reporting of microcolony observation and culture method

检测方法	阳性例数	平均报告结果时间(t/d)
Method	Positive cases	Average reporting time
微菌落法	108	11.0(3~35)
Microcolony		
培养法	105	18.6(7~42)
Culture		

结核杆菌在琼脂培养基上早期微菌落形态十分特殊,与胞内、鸟型、淋巴和脓肿等常见致病非典型分枝杆菌的菌落形态差异很大(见图版 I)。这一特征可用于结核菌菌型鉴别。经常规菌型鉴定结果证实:微菌落法鉴别的 101 例结核菌分离物中,有 100 例菌型相符。只有 1 例分离物经常规菌型鉴定排除了属结核杆菌的可能性,并初步确定为堪萨斯分枝杆菌。说明微菌落法鉴别结核菌菌型的准确性很高。但堪萨斯分枝杆菌早期菌落形态与结核杆菌相似,要注意区别。

本实验中,作者采用氯仿蒸气熏杀平皿表面生长的结核杆菌分离物,操作比较麻烦,也不适合常规工作。在常规开展微菌落法的单位,应在改制的无菌操作箱内用固定的显微镜观察平皿上生长的微菌落。这样所有的操作均可在无菌条件下进行,同一培养皿可连续做微菌落检查和常规培养。并可以根据临床和门诊的实际需要,随时采用微菌落法了解培养结果。

本研究结果说明,匡氏琼脂培养基用于检测结核菌微菌落和菌型鉴别具有快速、准确、简易和廉价的优点,适合没有 Bactec 设备的防痨单位和各类医院使用。

参 考 文 献

- [1] 阙冠卿,张立兴,吴绍琴. 中国防痨杂志, 1995, 17(1): 1~3.
- [2] 宋文虎,端木宏谨. 中国防痨杂志, 1995, 17(2): 51~53.
- [3] Fauville-Dutaux M, Vantieteren B. *Europ J of Clin Microb & infect*, 1992, 11: 797~803.
- [4] Shawar R M, El-Zaatar F A, Nataraj A *et al.* *J of clin Microb*, 1993, 31: 61~65.
- [5] 潘毓查. 中华结核和呼吸杂志, 1995, 12(4): 197~198.
- [6] Vestal A L, Kubica G P. *Am Rev of Respir Dis*, 1965, 94: 247~252.
- [7] 匡铁吉,王利平. 微生物学报, 1990, 17(1): 17~22.
- [8] 匡铁吉,宋 萍,王利平,等. 微生物学报, 1995, 35(4): 298~302.

MICROCOLONY OBSERVATION FOR RAPID DETECTION AND IDENTIFICATION OF CULTURES OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*

Kuang Tieji Song Ping Jin Guanfu Wang Zhongyuan Zhu Jianhua

(Hospital 309 of the PLA, Beijing 100091)

Abstract 219 sputa were seeded on Kuang's agar plates. A total of 112 isolates of *Mycobacterium tuberculosis* were detected in 219 specimens. Of these 112 isolates, 104 (92.8%) were detected in Kuang's agar medium and 108(96.4%) were detected by microcolony observation. The detection time of microcolony observation and culture method needed 11 and 18.6 days respectively. The detection time of microcolony method is much shorter ($P < 0.001$). The results of conventional tests of different species of *Mycobacterium* and microcolony differentiation were identical in 99% of isolates of *Mycobacterium tuberculosis*.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, Microcolony, Agar medium

图 版 说 明

Explanation of plate

匡氏琼脂培养基上结核杆菌(a)和鸟分支杆菌(b)的微菌落。

The microcolony on Kuang's agar plates of *Mycobacterium tuberculosis* (a) and *Mycobacterium avium* (b).