

抗酸菌 L 型(变异)分离培养方法的研究

庄玉辉 李国利 张晓刚

(解放军三〇九医院 结核病研究室,北京)

摘要 本文介绍用过滤法和酸碱中和离心法前处理痰标本,在胰酪大豆蛋白胨 0.25% 琼脂培养基 (TSA-L) 上,34 例肺结核病人 L 型的阳性率分别为 20.6%,14.7%,经统计处理,二者差异不显著 ($P>0.05$);在 TSA-L 斜面上培养,分别是 17.6%,14.7%,二法差异也不显著 ($P>0.05$)。77 例杆菌型培养阴性的肺结核病人 L 型阳性率为 18.2%。除酸碱中和离心法用 TSA-L 半流体培养基污染率高外,其它方法均可用于痰标本 L 型的分离培养。

关键词 抗酸菌; L 型; 分离培养方法

肺结核病人经化疗后结核菌较常发生变异出现 L 型已引起人们的关注。Knomeno 等^[1]报道 115 例肺结核病人化疗后痰液中杆菌型迅速消失,随之出现 L 型且持续很长时间。作者从结核性脑膜炎病人脑脊液内分离出了抗酸菌 L 型^[2]。还有人从结核病人多种临床标本中分离出抗酸菌 L 型^[3]。但痰标本前处理及分离培养的具体方法未见详细报道。由于痰液中杂质较多, L 型菌对渗透压又比较敏感,低渗环境易破碎。因此,抗污染和保护 L 型菌免遭破坏是痰标本前处理的一个重要问题。现将我们的初步结果报告如下。

材 料 和 方 法

(一) 痰标本来源

由我院结核科住院病人提供。留晨痰,搅匀后分成三份,备用。

(二) 结核菌培养

取一份痰液,按全国结核病细菌学检验标准化规程,在改良罗氏鸡蛋培养基上做结核菌杆菌型菌常规培养的对照。

(三) 过滤前处理法

取另一份痰液加入等量的 20% 蔗糖生理盐水,用玻璃研磨器研磨,经普通滤纸粗滤,后经 $0.45\ \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取滤液接种于下述培养基内,此法称为过滤前处理法。

(四) 酸碱中和离心前处理法

一份痰液加 2 倍量的 1N NaOH,消化痰液 20 分钟, 37°C 。尔后用 1N HCl 中和, 3000 r/min 离心 20 分钟。此法简称为酸碱中和离心前处理法。

(五) L 型培养基和培养条件

用我室改良的胰酪大豆蛋白胨琼脂培养基 (TSA-L)^[4],琼脂浓度为 1.5% 制成 TSA-L 斜面;琼脂浓度改为 0.25%,制成 TSA-L 半流体培养基。上述处理的滤液及沉淀物各取 0.1 ml,分别接种于前述的两种培养基内。每一种滤液或沉淀物,两种培养基各接种 2 支,均用橡皮塞塞紧。TSA-L 半流体培养基置于烛缸内,与 TSA-L 斜面一起置 37°C 温箱培养。前者于 2、4 周,后者于 4、8 周观察结果。

结果判定: 1. L 型菌在 TSA-L 半流体培养基内的生长: 首先肉眼观察 L 型生长情况,然后挑取培养物做 0.3% 美蓝液染色,于 10×40 相差显微镜下观察 L 型菌落。涂片做抗酸染色镜检,做返祖试验。用我室自制的人型结核菌荧光抗体做鉴定。2. L 型菌在 TSA-L 斜面上的生长: 肉眼观察 L 型菌落。挑取菌落做抗酸染色镜检。

本工作还有本研究室孙玲、结核科金关甫主任及杨宁、陈怡、马瑞娟等主治医师协助做部分具体技术工作或选病例,在此一并致谢。

结果与讨论

(一) 痰标本前处理方法对 L 型菌分离培养的影响

前处理方法既要抗污染又要保护 L 型菌。因此本文设计了过滤前处理法, 用高渗液保护 L 型菌。经过滤去除抗酸杆菌型和杂菌, 与酸碱中和离心前处理法进行比较。表 1 显示过滤前处理法 L 型阳性分离率为 20.6%, 酸碱中和离心前处理法的阳性分离率为 14.7%, 经统计学处理, 二者差异不显著 ($P > 0.05$)。在 34 例痰标本中, 有一部分痰标本只分离出结核杆菌型菌; 有一部分既有杆菌型菌又有 L 型菌, 两种前处理方法的结果相似。结果表明, 这两种前处理方法都能分离出 L 型菌, 而且在前处理过程中不会使杆菌型菌变成 L 型菌。

表 1 34 例痰标本前处理与培养基对抗酸菌 L 型分离效果的比较

		L 型菌		杆菌型菌	
		阳性数	%	阳性数	%
过滤法	TSA-L 半流体培养基	7	20.6	10	29.4
	TSA-L 斜面	6	17.6		
中和离心法	TSA-L 半流体培养基	5	14.7	10	29.4
	TSA-L 斜面	5	14.7		

(二) 培养基对 L 型菌分离培养的影响

从表 1 看出, 在过滤前处理法, TSA-L 半流体培养基培养, L 型菌阳性分离率为 20.6%, TSA-L 斜面培养 L 型菌阳性分离率为 17.6%, 二种培养基 L 型阳性分离率相似 ($P > 0.05$)。当以酸碱中和离心前处理法时, 二种培养基 L 型阳性分离率相同 (14.7%)。TSA-L 半流体培养 2 周, 肉眼可见试管培养基内培养物呈云雾状生长, 中间夹有细小的颗粒状菌落。培养基表面未见膜状生长, 管底部无沉淀。培养 4 周颗粒状菌落更为明显。挑取培养物滴加在载玻片上, 轻轻压上盖玻片, 在相差显微镜下观察, 可见由折光性很强的, 无色球状体或巨大体菌细胞组成的 L 型菌落。同一培养物用美蓝液染

色, 镜下可见蓝色菌落。经抗酸染色多数菌细胞呈抗酸阴性球状体, 少数为抗酸阳性球状体或短杆菌。将这种培养物涂抹在改良罗氏鸡蛋培养基上, 37℃ 培养, 2 周可见光滑型针尖大小的小菌落。这样的痰标本鉴定为 L 型培养阳性。观察 4 周即可。

在 TSA-L 斜面上, 培养 4 周即可见到针尖大小、无色、光滑型菌落, 中央稍隆起, 边缘整齐。培养 8 周菌落变大, 仍为光滑型。培养 4 和 8 周的阳性分离率基本相似。但培养 8 周时结果较易观察。阳性分离例数稍多。菌落涂片经抗酸染色, 过滤前处理法分离的培养物基本上是抗酸阴性球状体或丝状体; 而酸碱中和离心前处理法分离的培养物, 多数菌落除含有抗酸阴性丝状体、球状体或短杆菌菌细胞外; 还有少数抗酸阳性的短杆菌或细长杆菌。这可能与前处理的方法不同有关, 过滤前处理法用微孔滤膜仅仅能通过 L 型菌, 而酸碱中和离心前处理法可能有一部分菌细胞的胞壁轻微损伤, 因此形成抗酸阳性的杆菌。

为验证过滤前处理法及 TSA-L 半流体培养基的分离培养效果, 本文选择 77 例痰涂片镜检和痰菌培养均为阴性的肺结核病人痰标本, 同时做杆菌型和 L 型菌培养。TSA-L 半流体培养基内的培养物, 平行做美蓝液染色和结核菌荧光抗体染色鉴定。77 例结核菌杆菌型培养均为阴性, 而 L 型菌培养 14 例阳性, 占 18.2%。结果表明, 用这种前处理法和培养基提高了肺结核的阳性检出率。

在做痰标本的前处理时, 比较了过滤前处理法和酸碱中和离心前处理法在二种培养基内的污染率。结果表明, 酸碱中和离心前处理法在二种培养基内污染率较高, 尤其是 TSA-L 半流体培养基更为严重。过滤前处理法污染率稍低, 主要是霉菌污染在培养基的表面。固体斜面上杂菌菌落呈分散分布, 肉眼观察 L 型菌落可与霉菌初步区别开, 尔后按上述方法做进一步鉴定。今后有必要筛选合适的抗污染剂。

(下转第 373 页)

(上接第 349 页)

参 考 文 献

1. 董光天: 国外医学(内科学分册), 14(3): 封三, 1987。
2. 庄玉辉等: 中华结核和呼吸杂志, 10: 95, 1987。

3. Domingue G J: Cell wall-deficient bacteria basic Principles and clinical significance. Massachusetts. Addison-Wesley publishing company. 85, 1982.

4. 庄玉辉等: 微生物学通报, 13(12): 91, 1986。