

分枝杆菌简化琼脂培养基的研究

匡铁吉 宋萍 王利平 王仲元

(解放军 309 医院 北京 100091)

摘要 报道三种组分简单、制备方便的简化琼脂培养基。试验结果表明: 7 个标准菌株在简化琼脂培养基 309A 和 309C 上的生长速度和数量均相似或优于改良罗氏培养基和 92 号土豆汤琼脂培养基。简化琼脂培养基 309C 和 309A 可用于结核杆菌分离和药敏试验。

关键词 分枝杆菌, 简化琼脂培养基

琼脂培养基是分枝杆菌细菌学基础研究和临床实验的重要工具。在美国得到广泛应用的 Middle-brook7H 系列琼脂培养基, 由于价格比较昂贵, 制作复杂, 且需要特殊装置, 其应用受到限制^[1]。作者新近报道了 92 号土豆汤琼脂培养基, 可用于痰菌分离和药敏试验^[2,3]。92 号土豆汤琼脂培养基价格比较低廉, 采用传统方法制备, 可用普通温箱培养, 可以推广应用。但是 92 号土豆汤琼脂培养基组分复杂, 制备过程较繁, 在基层单位推广应用尚有一定困难。为此在 92 号土豆汤琼脂培养基的基础上, 经过筛选, 研制出几种简化琼脂培养基, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 菌株

分枝杆菌 H₃₇Rv、BCG、鸟型、胞内和淋巴菌株, 由北京市结核病医院基础研究室提供。分枝杆菌牛型和偶发分枝杆菌由北京市结核病研究所提供。原菌株在 -15℃ 保存。罗氏斜面传代后培养 21d, 置 4℃ 冰箱待用。

1.2 培养基

改良罗氏和 92 号土豆汤琼脂培养基作为对照培养基。改良罗氏培养基的制作方法依照结核病细菌学检验方法暂行规程^[4]。92 号土豆汤琼脂培养基的制作方法见文献^[5]。

3 种简化琼脂培养基的组成见表 1。基础液的组成如下: 葡萄糖 2g, Na₂HPO₄ · 12H₂O 3.3g, KH₂PO₄ 1.31g, 柠檬酸铁铵 0.04g, MgSO₄ · 7H₂O 0.09g, 葡萄糖酸钠 0.4g, 丙酮酸钠 0.8g, 柠檬酸铵 0.5g, 酪蛋白水解物 0.8g, 牛肉蛋白胨 1.0g, 尿嘧啶 0.05g, 甘油 12ml, 蒸馏水 88ml, 上述组分加热溶解后, 置 -15℃ 贮存, 二年内可用。孔雀绿溶液的配制: 称取 0.2g 孔雀绿, 溶于 1000ml 蒸馏水中, 充分摇匀, 可长期使用。土豆汤的制备同 92 号琼脂培养基^[5]。

简化琼脂培养基制作步骤: 在三角烧瓶中, 按规定量加入琼脂粉、马铃薯粉、基础液、孔雀绿溶液、土豆汤和水后, 包装好, 于 121℃ 30min 湿热灭菌。取出, 冷却至 70℃ 左右, 加入小牛血清(化冻后提高至室温), 摇匀后即可分装斜面。

本文于 1994 年 5 月 14 日收到。

表 1 三种简化琼脂培养基的组成

Table 1 The composition of three simplified agar media

组 分 Constituents	加量 (100ml 培养基含量) Addition (in 100ml of medium)		
	309A	309B	309C
琼脂粉 Agar powder	1.5g	1.5g	1.5g
可溶性淀粉 Soluble starch	0.78g	0.0	0.78g
基础液 Basal solution	10ml	10ml	10ml
孔雀绿溶液(0.02%) Solution of malachite green	0.5ml	0.5ml	0.5ml
土豆汤 Potato soup	0ml	80ml	0ml
蒸馏水 Distilled water	85ml	10ml	80ml
小牛血清 Calf serum	5ml	0	10ml

1.3 接种、培养和观察结果

取冰箱保存的罗氏斜面菌种, 用 0.01% 吐温 80 溶液制成 1.0mg 湿菌/ml 种子原液, 然后依次稀释至 10^{-4} mg/ml, 取 10^{-2} mg/ml (大接种量) 和 10^{-4} mg/ml (小接种量), 二管接种, 每支斜面接种 0.1ml, 置 35—36℃ 培养。

快生长菌从第 2d 开始观察结果, 每 2d 看一次, 至第 10d。慢生长菌第 7d 观察结果, 每 3d 看一次, 至第 14d。以后每 7d 观察一次至第 35d。35d 结束后, 随即涂片, 经抗酸染色后镜检。

1.4 结核病患者痰标本的前处理、接种和培养

依照参考文献[5]介绍的方法。对痰标本进行酶消化处理。其中第 4 步所用的 2% 牛血清白蛋白, 0.002% 溴百里蓝以及 1% 鸡蛋清盐水溶液在使用前经滤膜除菌过滤, 以防污染。每支斜面接种酶消化后的痰标本液 0.2ml, 置 37℃ 培养。

2 结果和讨论

7 株分枝杆菌大接种量和小接种量时在简化琼脂培养基上的生长结果分别列于表 2 和表 3 中。表 2 的结果说明, 309A 和 309C 适合于各类菌株生长, 其生长速度大多快于罗氏培养基, 而与 92 号琼脂培养基相似。其生长量也多于罗氏而与 92 号培养基相近, 但多数菌株在罗氏培养基上生长得较旺盛。309B 培养基比较适合胞内分枝杆菌和淋巴分枝杆菌的生长。结核分枝杆菌在 309B 培养基上生长较差。

表 3 结果表明, 供试分枝杆菌小接种量时在简化琼脂培养基 309C 和 309A 上的生长速度快于罗氏培养基, 其菌落数也略多于罗氏培养基。三种简化琼脂培养基均能促进小

表 2 简化琼脂培养基和罗氏培养基的比较(大接种量)*

Table 2 Comparison of simplified agar media and Lowenstein-Jensen medium (large inoculum)

受试菌株 Strains tested	初生长时间 (d) The time of initial growth					生长量** The quantity of the growth				
	L-J	No. 92	309A	309B	309C	L-J	No. 92	309A	309B	309C
	人型分枝杆菌 ($H_{37}Rv$) <i>M. tuberculosis</i>	12	9	9	9	9	++	+++	+++	++
牛型分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	12	10	10	10	10	++++	+++	+++	++	+++
BCG	12	12	10	12	10	++	++	+++	++	++
鸟型分枝杆菌 <i>M. avium</i>	9	9	9	9	9	++++	>+++	+++	+++	>+++
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellular</i>	5	7	7	7	7	++++	++++	++++	++++	++++
淋巴分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	12	8	9	9	8	++++	++++	+++	++++	++++
偶发分枝杆菌 <i>M. parafortnitium</i>	3	2	2	2	2	+++	+++	+++	+++	+++

* 每支斜面接种量为 10^{-3} mg 湿菌。The quantity of inoculum is 10^{-3} mg humid cells per slant.

** 计算生长量的时限;慢生长的 42d,快生长的 7d;生长量的表示法“+”1—50 个菌,“++”大于 50 个菌,少于 300 个菌;“+++”大于 300 个菌;“++++”成菌苔生长。

+ = 1—50 colonies; ++ = >50 < 300 colonies; +++ = >300 colonies; ++++ = Innumerable.

接种量胞内分枝杆菌生长。

简化琼脂培养基上生长的各型分枝杆菌菌落,形态各具特征,可相互区别。人型结核杆菌菌落为扁平状,表面干燥,呈灰褐色;BCG 和牛型分枝杆菌菌落也为扁平状,表面干燥,但有皱折,边缘不齐,呈灰白色。所试非典型分枝杆菌在简化琼脂培养基上的菌落多为圆形,或呈乳突状,表面湿润光滑。淋巴分枝杆菌菌落初呈浅黄色,后转变为桔黄色、橙红色,鸟分枝杆菌菌落多呈暗橙红色;偶发分枝杆菌菌落色白,呈一般浆糊色。罗氏培养基上生长的各型分枝杆菌菌落形态无明显差异。

在预试验中,对简化琼脂培养基中的某些组分进行过筛选,试验结果表明:简化琼脂培养基中的丙酮酸钠,能促进 BCG 和牛型分枝杆菌的生长,并对临床分离的部分人型结核菌株的生长有利。该结果证实了 Stonebrink 的报道^[6]。

初步研究结果表明:简化琼脂培养基 309C 和 309A 用于涂片呈阳性痰标本的分离培养,其阳性率与罗氏和 92 号培养基相同(表 4)。309C 和 309A 用于涂片阴性痰标本的结核杆菌分离培养,其阳性分离率在 26% 以上,高于对照罗氏培养基(表 5),但分离率差异不显著 ($P > 0.05$)。上述结果还说明:用胰酶消化法处理痰标本,可以获得比酸碱处理法高得多的阳性分离率。采用 2% NaOH 处理痰标本时,简化琼脂 309C 的结核菌阳性分离率与罗氏培养基相同,该实验还在进行中。

表 3 简化琼脂培养基和罗氏培养基比较(小接种量)*

Table 3 Comparison of simplified agar media and Lowenstein-Jensen medium (small inoculum)

受试菌株 Strains tested	初生长时间(d) The time of initial growth					菌落数 Colony counts				
	L-J	No. 92	309A	309B	309C	L-J	No. 92	309A	309B	309C
人型分枝杆菌 ($H_{37}Rv$) <i>M. tuberculosis</i>	18	14	12	14	12	60	71	62	35	75
牛型分枝杆菌 <i>M. bovis</i>	14	14	12	17	12	104	112	110	91	119
BCG	21	16	14	21	14	28	51	50	19	55
鸟型分枝杆菌 <i>M. avium</i>	14	12	12	14	12	125	167	149	73	153
胞内分枝杆菌 <i>M. intracellulare</i>	9	7	7	7	7	38	>200	>200	>200	>200
淋巴分枝杆菌 <i>M. scrofulaceum</i>	12	9	9	9	9	170	196	192	179	185
偶发分枝杆菌 <i>M. parafortuitum</i>	3	3	3	3	3	143	165	194	202	198

* 每支斜面接种量为 10^{-7} mg 湿菌。The quantity of inoculum is 10^{-7} mg humid cells per slant.

表 4 简化培养基用于痰结核杆菌分离的效果*

Table 4 The effect of simplified agar media in isolation of tuberculosis bacilli from sputum

培养基 Medium	样本数 Number of specimens	阳性例数 No. of positive Culture	阳性率 Positive rate (%)
L-J	40	30	75.0
No. 92	40	30	75.0
309A	40	30	75.0
309B	40	26	65.0
309C	40	30	75.0

* 所试痰标本均来自涂片阳性住院肺结核病人, 并采用胰酶消化法处理痰标本。

All the specimens of sputum in isolation test are smear-positive for acid-fast bacilli; and are treated by enzyme digestion.

表 5 简化琼脂培养基用于痰结核杆菌分离的效果*

Table 5 The effect of simplified agar media in isolation of tuberculosis bacilli from sputum

培养基 Medium	样本数 Number of specimens	阳性例数 Number of positive culture	阳性率 Positive rate (%)
L-J	50	11	22.0
No. 92	50	14	28.0
309A	50	15	30.0
309C	50	13	26.0

* 所试痰标本均来自涂片阴性肺结核病人, 并采用胰酶消化法处理痰标本。

All the specimens of sputum in isolation test are smear-negative and are treated by enzyme digestion.

初步研究结果还表明, 简化琼脂培养基 309A 和 309C 用于分枝杆菌药敏试验, 培养 21d 可报告结果, 试验结果准确可靠, 其性能远优于罗氏培养基。

涂片镜检结果显示, 生长在简化琼脂培养基上的结核杆菌标准株和痰菌分离株, 均呈

现典型的抗酸杆菌细胞形态。简化琼脂培养基上菌细胞的长短、粗细因菌株不同而有差异,它与对照罗氏培养基上生长的菌细胞形态基本一致。鸟型分枝杆菌在简化琼脂培养基上生长的菌细胞,分枝较多,抗酸着色深一些。简化琼脂培养基上生长的淋巴分枝杆菌呈典型抗酸染色特征,但其菌细胞较罗氏培养基上生长的菌细胞短小。

由于简化琼脂培养基 309C 和 309A 组成简单,制备方便,中小医院检验科和基层防痨系统都具有制备简化琼脂培养基的条件,因而有利于在发展中国家推广应用。进一步简化痰标本前处理方法,并使琼脂培养基药敏试验标准化,将是今后的研究解决的任务。

参 考 文 献

- [1] Middlebrook G, Maurice L. *A J P H*, 1958, 48(7): 844-853.
- [2] 匡铁吉,王利平,王晓红. 中国防痨通讯,1990,12(1): 17-19.
- [3] 匡铁吉,王利平. 中华结核和呼吸杂志,1990,13(6): 38.
- [4] 中国防痨协会. 全国结核病细菌学标准化规程,1984.
- [5] 匡铁吉,王利平. 微生物学通报,1990,17(1): 22-25.
- [6] Stonebrink S. *Amer Rev Resp Dis*, 1962, 86(1):147.

THE STUDY ON THE SIMPLIFIED AGAR MEDIA FOR MYCOBACTERIA

Kuang Tieji Song Ping Wang Liping Wang Zhongyuan

(No. 309 Hospital of the People's Liberation Army, Beijing 100091)

Abstract Three kinds of simplified agar media were reported in this paper, which are easy to prepare and are simple in constituents. The velocity and the quantity of growth of seven strains tested on simplified agar media 309A and 309C were similar to or prevail over those on Lowenstein-Jensen medium and No. 92 potato-soup agar medium. Simplified agar media 309C and 309A could be applied to isolate mycobacteria from sputum and to test the drug susceptibility of *M. tuberculosis*.

Key words Mycobacteria, Simplified agar media