

## · 质量控制与质量保证 ·

## 分枝杆菌的实验室检查与质量控制

吴龙章 刘燕文 钟炳棠

**【摘要】** 我国结核病有上升趋势,实验室的分枝杆菌细菌学检查就成为指导流行病学调研和结核病诊疗的重要手段,因此做好分枝杆菌细菌学检验工作,是每个实验室义不容辞的职责。但如何做好则是摆在我们面前一道非常重要的研究课题。笔者通过总结和回顾广州市胸科医院多年来的经验与教训,把在实验室工作中得出的一些心得体会撰写成文,旨在与同道们一起研究如何做好实验室的检测工作,为流行病学调研和结核病诊疗打下坚实的技术基础。

**【关键词】** 分枝杆菌属; 细菌学技术; 质量控制

**Laboratory examination and quality control of *Mycobacterium*** WU Long-zhang, LIU Yan-wen, ZHONG Bing-tang.  
Laboratory of Guangzhou Chest Hospital, Guangzhou 510095, China  
Corresponding author: WU Long-zhang, Email: wlz8160@21cn.com

**【Abstract】** The prevalence of tuberculosis has been rising in China, and therefore bacteriologic studies of mycobacteria become the major means of the epidemiological research as well as clinical diagnosis of tuberculosis. This article is focus on how to improve diagnostic accuracy and tests quality control in a clinical laboratory. Retrospective study on both mycobacteria epidemiological process and its clinical diagnosis in the Guangzhou Chest Hospital, in order to provide some information in this field. Laid some technical foundation of TB epidemiological investigation and its diagnosis and treatment.

**【Key words】** *Mycobacterium*; Bacteriological techniques; Quality control

结核病尤其是耐多药(MDR-TB)结核病和非结核分枝杆菌(non-tuberculosis mycobacteria, NTM)病发病率近年有呈逐年上升趋势<sup>[1]</sup>,此时实验室的分枝杆菌检测工作对于指导流行病学调查研究 and NTM 病临床诊断起到了至关重要的作用,因此做好分枝杆菌检查和质量控制工作,是每个实验室义不容辞的职责。但如何做好则是摆在大家面前一道非常重要的研究课题。

## 痰液涂片

痰液涂片找抗酸杆菌,是简单、快捷且成本低廉的实验方法,WHO 对结核病流行病学调研也以痰液涂片找抗酸杆菌作为首选的调研手段。因而痰液涂片找抗酸杆菌的质量好坏,直接关系到结核病早期诊疗的效果和影响到结核病流行病学调研的真实性和可靠性。

但在日常工作中笔者发现:中国 CDC 制定的涂片方法(薄涂片)其阳性率较低<sup>[2]</sup>,已远远不能满足流行病学的调研和临床诊治的需求。究其原因:笔者的对照试验研究结果证实,其与涂片时所用的痰液体积量有着莫大的关联<sup>[3]</sup>。按中

国 CDC 制定的涂片方法操作,阳性率为 31.8%,但笔者在此基础上把痰液体积量加大 1.5~2.0 倍(厚涂片),其阳性率为 42.8%。后者比前者阳性率提高 11 个百分点( $\chi^2 = 24.04, P < 0.01$ ),差异有统计学意义。

因此在实验室的分枝杆菌检测工作中,宜在中国 CDC 制定的方法基础上把痰液体积量增加;但同时要相应地将脱色剂和复染剂浓度作出适当的调整,如:5% 盐酸乙醇脱色液和 0.06% 亚甲蓝复染液分别调整为 3% 和 0.03% 浓度。因为高浓度(5%)的脱色液或脱色时间过长,可把一些活力低、尤其是复治株或 MDR-TB 株,以及一些 NTM 株脱去红色而造成假阴性,因为这些分枝杆菌都只具有较弱的抗酸性;但复染剂浓度过高(0.06%)及复染时间过长,则非常容易把已染成红色的分枝杆菌菌体掩盖成深蓝色,同样也会造成假阴性;因此涂片时把样品体积量增加,同时相应地将脱色剂和复染剂浓度作出适当的调整是必要的,但要避免脱色或复染时间过长,这样可把涂片的阳性率在中国 CDC 制定的方法基础上提高 30% 或以上<sup>[3]</sup>。

同时需要注意的是:用于烘干涂片的烘箱其温度宜控制在 45℃~50℃ 之间;温度过高者容易使涂片(尤其血性和脓性痰标本)出现焦化现象(涂片呈咖啡色),一旦出现此现象,此时于显微镜镜下目测玻片时,其界面呈咖啡色而难以辨认分枝杆菌,甚至焦化现象会使分枝杆菌不能被石碳酸复红液染成红色而造成假阴性。

## 分枝杆菌培养

结核分枝杆菌(Mtb)的培养,是结核病临床诊断和流行

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2014.04.012

基金项目:广东省科技计划项目(2012A030400035);广州市医药卫生科技项目(20121A011082)

作者单位:510095 广州市胸科医院检验科

通信作者:吴龙章,Email:wlz8160@21cn.com

病学调查研究的重要依据,并可根据培养结果进行药物敏感性(简称“药敏”)试验和菌型鉴定,这对于指导临床用药和流行病学调研起到了至关重要的作用。但在实验室中培养 Mtb 时往往出现污染,以及阳性率不高(尤其是复治患者)和培养阳性需时较长等现象,因此如何解决在培养过程中出现的这些问题,一直是实验室迫切需要解决的重要课题。

### 一、减少污染

要提高分枝杆菌培养的阳性率,首先要解决培养出现的污染问题,因而除了操作过程要规范外,培养样品的前处理剂浓度和处理时间长短就成为关键。前处理剂的浓度过大或标本前处理时间过长,会使污染率降低但同时会造成阳性率偏低;但前处理剂的浓度过小或标本前处理时间过短,则会造成污染率高并也会使阳性率偏低,故两者都会严重影响培养的污染率和阳性率。因此,笔者认为:当培养污染率高于实验要求(固体培养基高于 3%,液体培养基高于 5%)时<sup>[4-5]</sup>,实验室有亟待改正的地方。如何解决? 笔者的体会如下。

1. 规范操作规程,注意无菌操作;实验所用的前处理剂和离心管、实验需用的辅助器材等均应消毒灭菌。

2. 根据微生物的分布情况而采用不同的浓度或不同的前处理剂;对培养所出现污染的样品进行微生物学分布常态的调查,根据微生物的分布情况而采用不同的浓度或不同的前处理剂;笔者的前期研究发现:不同时期和气候,其微生物分布有所区别<sup>[4]</sup>。如广东地处亚热带,每年的 3—5 月份是梅雨天气,由于此时气候潮湿与温度适宜,对酵母样菌属的生长尤为有利,故在该时期其分离率最高,如果此时用酸性前处理剂(4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液)处理标本,则污染率将有所升高,因酵母样菌属对 H<sup>+</sup> 有极强的耐受性,故当污染标本中以酵母样菌属分离率为主时,此时绝对不能以酸性前处理剂来处理标本,以减少污染;而在其他月份,污染则以革兰阳性菌属(如葡萄球菌属、链球菌属和革兰阳性杆菌属等)为主,对于这些菌属和酵母样菌属,以碱性前处理剂(2% NaOH 溶液)处理标本为宜,因这些菌属对 OH<sup>-</sup> 较为敏感;但如污染物以肠道菌科为主的样品,则宜以酸性前处理剂处理标本。

因此,在培养分枝杆菌而出现严重污染时,对污染标本作微生物分布常态的调查后,前处理剂或前处理剂浓度作相应的更改是必要的。但当污染现象降低并稳定至一定时间后,应逐渐将加大的前处理剂浓度降低至合理的水平(如 3%~4% 的 NaOH 溶液减低至 2% 浓度,或 5% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液减低至 2%~3%),以保证分枝杆菌在有利的环境中生长。

### 二、提高阳性率

众所周知,液体培养基培养分枝杆菌的阳性率和生长天数都比固体培养基(改良 L-J 培养基)优越<sup>[6]</sup>。但依据我国国情,我国大多数实验室仍以 L-J 固体培养基为主,因此如何在 L-J 培养基的基础上提高阳性率,是每个同道都必须重视的重要课题。

Stonebrink<sup>[7]</sup>于 1957 年提出在 L-J 培养基中加入丙酮酸,以观察其对耐异烟肼结核分枝杆菌促进生长的价值。笔者以丙酮酸钠替代 L-J 培养基中的甘油或在试剂中加有丙

酮酸钠并对 714 例标本进行了实验对照,在 714 份标本中,L-J 培养基阳性分离率为 22.97%(164/714),丙酮酸钠培养基阳性分离率为 24.09%(172/714);两者间的阳性率比较差异没有统计学意义( $\chi^2=1.61, P>0.05$ ),但在复治结核病患者中,则丙酮酸钠培养基的阳性分离率(23.76%)较 L-J 培养基(19.80%)高出 3.96%,两者间比较差异有统计学意义( $\chi^2=7.03, P<0.05$ ),也证实其对分枝杆菌的培养均优于 L-J 培养基或没有加丙酮酸钠的培养基<sup>[8-9]</sup>。究其原因,是因为复治组的菌株经化疗后,其活力降低,生存和繁殖能力明显减弱,使得培养检出率也显著下降<sup>[10]</sup>。但由于丙酮酸钠具有比较简单的分子结构,是一个更容易能够接近的碳源<sup>[11]</sup>,使活力降低的菌株能充分利用其生长所需的碳元素而得以生长裂殖。故有 3.96% 的复治患者来源菌株在丙酮酸钠培养基中生长而在 L-J 培养基中未见生长的现象。在培养阳性所需时间上,L-J 培养基和丙酮酸钠培养基分别平均需时 31.29 d 和 25.33 d,后者比前者提前 6 d 得出培养结果,可见丙酮酸钠培养基比 L-J 培养基更具优越性。此外,两者的污染率分别为 2.52% 和 4.20%,丙酮酸钠培养基略高于 L-J 培养基<sup>[8,12]</sup>。

因此,在实验室做分枝杆菌培养时,宜平行用各含甘油和丙酮酸钠成分的两种培养基,以提高分枝杆菌的阳性分离率和减少污染的风险。

### 三、培养基质量控制

固体培养基(包括 L-J 培养基、丙酮酸钠培养基及药敏培养基)的制备应注意灭菌的温度和时间,要严格控制 85℃ 和 50 min 范围内。温度过低或灭菌时间过短,会造成培养基自身的污染;但温度过高或时间过长,培养基会出现老化现象(培养基斜面有一层薄薄的呈淡黄绿色的油性物质覆盖),使鸡卵中的脂肪酸游离出来,而这些游离脂肪酸经研究实验证实能抑制分枝杆菌、尤其是 MDR-TB 株的生长<sup>[13-14]</sup>。

以上 3 点,是减少污染率、提高阳性率和缩短培养阳性天数的必备条件,缺一不可!

## 药物敏感性试验

如前所述,国情驱使我国大多数实验室培养以固体培养基为主,药敏试验也不例外;同时方法学也以绝对浓度法较为普遍<sup>[15]</sup>。但不管哪种方法,在配制药敏培养基时,除要严格把关好灭菌温度和时间外,药物原液配制、尤其药物溶媒剂的选用,以及药物配制后如何使之能均匀地悬于培养基中是其关键。因为,目前我国实验室所用的药物溶媒剂(如 N,N-二甲基甲酰胺、甲醇等)能够使鸡卵蛋白凝固而形成凝块物<sup>[15]</sup>,这些凝块物内含有高浓度的实验药物,并且不能均匀地悬于培养基中,导致每支培养基的药物绝对浓度有差异而使药敏试验结果出现偏差,甚至产生截然不同的结果<sup>[14]</sup>。但遗憾的是:这种现象未能引起我国绝大多数实验室的高度重视或注意而被忽略。因此如何解决? 是大家必须考虑的课题。笔者的体会是:尽量避免使用这些溶媒剂,但对于非用不可溶媒剂时,则应先把实验药物用溶媒剂按规程要求溶解并配制好所需浓度后,按需要的量加到无机盐溶液中并充

分混匀,然后将鸡卵液放到该无机盐溶液中并再次混匀,这样可减少甚至避免了凝块物的形成。

此外,尤其值得注意的是:目前我国实验室做药敏试验时是以 0.5%吐温 80 (简称“吐温”)作为试验菌株研磨的媒介剂<sup>[15]</sup>。但实践发现:吐温能抑制分枝杆菌的生长!笔者的前期试验结果发现,没有加吐温的菌株能在 1 mg×10<sup>-8</sup> 高倍稀释后仍有菌落形成;但加有吐温的菌株只能在 1 mg×10<sup>-6</sup> 稀释浓度中有菌落形成,而在 1 mg×10<sup>-8</sup> 未见有菌落生长现象;同样在 1 mg×10<sup>-6</sup> 同时有菌落形成者,没有加吐温的菌落形成数明显比加有吐温的要多,笔者以 H37Rv 株作为质量控制(简称“质控”)进行重复试验,也出现了上述现象,可见吐温对分枝杆菌有抑制作用。遗憾的是,此现象在我国实验室未能被认识和重视,因此做药敏试验时以吐温作为媒介剂的方法学是否合理,值得商榷。

另外在研磨试验菌株的时间勿超过 10 s,以免减少活的试验菌株数目而影响试验结果;对于药敏结果的观察时间,快速生长型分枝杆菌的药敏结果观察时间万勿超过 7 d,以保证药敏结果的可靠性。

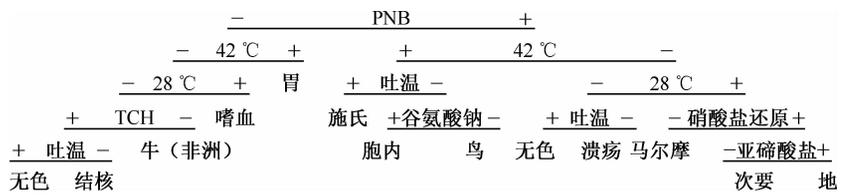
### 菌型鉴定

NTM 有逐年上升的趋势<sup>[1]</sup>,而 NTM 病患者在临床症状和 X 线表现方面与结核病没有任何的差别,但治疗用药有很大的区别甚至完全不同<sup>[16]</sup>,因此菌型鉴定显得非常重要。故中国防痨协会在 1995 年制定并至今仍作为实验室常规操作标准的《结核病诊断细菌学检验规程》(简称“规程”)<sup>[15]</sup>,体现了实验室的细菌学检查对结核病诊断和流行病学调研的重要性。但在日常实验室工作中笔者发现:规程存有值得商榷的地方,实验结果也有很大的缺陷且操作繁琐<sup>[17]</sup>。

1. 笔者的研究结果:8.3%的 NTM 株受到对硝基苯甲酸(PNB)抑制而被误判为 Mtb 株<sup>[18]</sup>,且有 3%~5%的 Mtb 株对 PNB 产生了耐受性<sup>[19]</sup>。与 175 μg/ml 的盐酸羟胺(hydroxylamine hydrochloride, HA)相比较,后者对分枝杆菌进行菌群初筛更具特异性和可靠性,因后者只有 0.9%的 Mtb 对 HA 产生耐受性,同样只有 0.9%的 NTM 受到 HA 的抑制<sup>[18]</sup>。因此基于 PNB 作为实验室分枝杆菌菌群初筛的实验标准值得商榷。

2. 菌型鉴定:规程要求在完成繁多的生物化学试验后须进行图谱检索,以定出实验株的菌名<sup>[15]</sup>。但是其过程繁琐且结果有缺陷<sup>[15,17]</sup>,因而我国众多实验室到目前为止只做分枝杆菌菌群的初筛而没有做进一步的菌种鉴定,这非常不利于 NTM 病的诊疗和流行病学的调研。

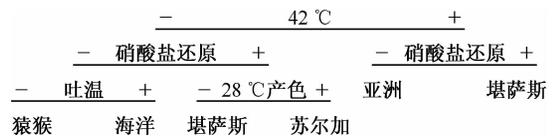
依据多年的研究经验累积,笔者编写了双歧索引法并以此进行菌型鉴定且收到良好的效果(图 1~6)。其依据和体会如下。(1)抓重点:①PNB 生长与否;②温度生长点,如,



+ :实验或生长阳性; - :实验或生长阴性; 吐温:吐温 80 水解试验;硝酸盐还原:硝酸盐还原试验;牛:牛结核分枝杆菌;胞内:胞内分枝杆菌;龟:龟分枝杆菌;施氏:施氏分枝杆菌;鸟:鸟分枝杆菌;溃疡:溃疡分枝杆菌;无色:无色分枝杆菌;马尔摩:马尔摩分枝杆菌;结核:结核分枝杆菌;地:地分枝杆菌;次要:次要分枝杆菌

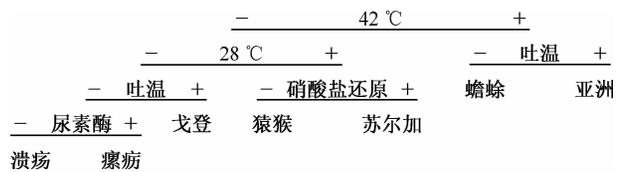
图 1 缓慢生长型不产色株双歧索引法

28 °C 和 42 °C;③生长速度,如:快速生长型和缓慢生长型;④产色性,如:非色源性、光产色和暗产色。(2)寻找常见和可靠试验为主要识别方法:如:硝酸盐还原试验、吐温 80 水解试验等。(3)筛选有特点的试验为辅助识别方法:如:5% NaCl 培养基、铁离子吸收试验等。只要找出以上几点试验重点,然后依此编写双歧索引法并以此来检索试验结果,即可使繁琐的检索规程得以简化并较为准确地鉴定出菌种,且需做实验项目不多(见各双歧索引表)但可收到较为理想的试验结果。



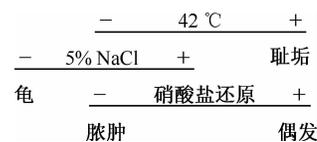
猿猴:猿猴分枝杆菌;海洋:海洋分枝杆菌;堪萨斯:堪萨斯分枝杆菌;苏尔加:苏尔加分枝杆菌;亚洲:亚洲分枝杆菌

图 2 缓慢生长型(光)产色株双歧索引法



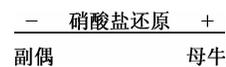
蟾蜍:蟾蜍分枝杆菌;戈登:戈登分枝杆菌;瘰疬:瘰疬分枝杆菌

图 3 快速生长型(暗)产色株双歧索引法



耻垢:耻垢分枝杆菌;脓肿:脓肿分枝杆菌;偶发:偶发分枝杆菌

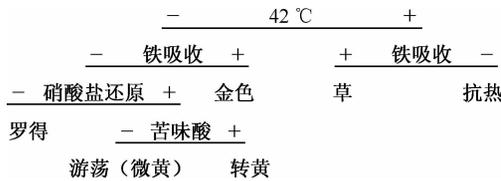
图 4 快速生长型不产色株双歧索引法



副偶:副偶分枝杆菌;母牛:母牛分枝杆菌

图 5 快速生长型(光)产色株双歧索引法

但在试验中要注意:(1)培育温箱内温度要准确,以温箱内温度计为标准。(2)每批试验要用标准株做质控对照:如:H37Rv 株、耻垢分枝杆菌。(3)试验菌株浓度要精确:接种



金色: 金色分枝杆菌; 草: 草分枝杆菌; 抗热: 抗热分枝杆菌; 罗得: 罗得分枝杆菌; 游荡 (微黄): 游荡 (微黄) 分枝杆菌; 转黄: 转黄分枝杆菌; 铁吸收: 铁离子吸收试验; 苦味酸: 苦味酸试验

图 6 缓慢生长型 (暗) 产色株双歧索引法

浓度为 0.01 mg; 但硝酸盐还原试验和吐温 80 水解试验的菌量则需 5~10 mg/支试验管。此外试验菌株的菌龄以 2~3 周 (快速生长型除外) 为宜。(4) 如 PNB 基有菌落形成者, 则尽量以 PNB 基上的菌株来做菌型鉴定为宜; 以减少由于混合感染而造成结果不可靠。(5) 对于试验结果不典型者, 要追加其他试验项目, 以求正确结果。

综上所述, 笔者体会到: 质量源于实践! 只要在实验室的日常工作中注意抓住重点, 一切难题都会迎刃而解。但愿笔者的经验与教训能有助于各位同道的实验室日常工作!

### 参 考 文 献

[1] 吴龙章, 陈素颖, 曾少芳, 等. 广州市 12 年间分枝杆菌菌型与药物敏感性结果变迁的分析. 中华预防医学杂志, 2011, 45(1): 26-29.

[2] 中国疾病预防控制中心. 痰涂片镜检实验室质量保证手册. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 5-18.

[3] 吴龙章, 高俊文, 周辉林, 等. 厚薄不同的两种涂片方法对痰液涂片抗酸杆菌阳性率的影响. 中国防痨杂志, 2008, 30(2): 142-143.

[4] 吴龙章, 黄洁玲, 谢敏娜, 等. 减少分枝杆菌培养污染的方法学研究. 中国防痨杂志, 2006, 28(6): 398-400.

[5] 李仲兴, 郑家齐, 李家宏, 等. 诊断细菌学. 香港: 黄河文化出版社, 1992: 234-256.

[6] 吴龙章, 陈素颖, 曹务华, 等. 抗酸性分枝杆菌三种培养方法的对比评价. 国际医药卫生导报, 2003, 9(16): 108-109.

[7] Stonebrink B. Tubercle bacilli and pyruvic acid. Proceeding of the Tuberculosis Research Council, 1957, 44(1): 66-74.

[8] 潘美玉, 吴龙章, 陈剑锋, 等. 两种不同固体培养基对结核分枝杆菌培养阳性率的影响. 实用医学杂志, 2012, 28(5): 830-831.

[9] 吴龙章, 蔡杏珊, 黄洁玲, 等. 应用噬菌体裂解法测定吡嗪酰胺药物敏感性试验的方法学研究. 中国防痨杂志, 2008, 30(3): 191-193.

[10] 吴龙章. BACTEC 系统检测分枝杆菌若干影响因素的初步探讨. 中华结核和呼吸杂志, 1994, 17(1): 23.

[11] Katila M. Enhancement of growth of *M. malmoense* by acid pH and pyruvate. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1989, 8(11): 998.

[12] 蔡杏珊, 吴龙章, 吴妙玲, 等. 两种固体培养基对分枝杆菌培养影响的比较. 中华检验医学杂志, 2003, 26(5): 314.

[13] 郭钧. 结核病细菌学. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1983: 11-52.

[14] 吴龙章. 老化培养基对结核菌培养及乙醇溶解药物原液对耐药性试验影响的若干问题//广东省防痨协会. 广东省第三届结核病学术交流汇编. 广州: 广东省防痨协会, 广州, 1988.

[15] 中国防痨协会基础专业委员会. 结核病诊断实验室检验规程. 北京: 中国教育文化出版社, 2006: 13-65.

[16] 吴龙章, 蔡杏珊, 关玉华, 等. 66 例非结核分枝杆菌肺病的临床分析. 中国防痨杂志, 2003, 25(4): 257-259.

[17] 吴龙章, 钟炳棠, 刘燕文, 等. 对《结核病诊断细菌学检验规程》的一点看法. 中国防痨杂志, 2012, 34(3): 192-193.

[18] 吴龙章, 谭守勇, 谭耀驹, 等. 对硝基苯甲酸与盐酸羟胺对分枝杆菌菌群进行初筛的比较. 中华结核和呼吸杂志, 2013, 36(11): 833-835.

[19] 吴龙章, 潘美玉, 刘欣, 等. 结核分枝杆菌对对硝基苯甲酸耐药性的研究. 中华结核和呼吸杂志, 2011, 34(2): 117-119.

(收稿日期: 2013-11-27)

(本文编辑: 张晓进)

## 关于举办“现代结核病控制理论与实践——临床诊治提高研讨班”的通知

为了满足各级结核病防治人员学习现代结核病控制新知识、新技术的需要, 经研究决定举办 2014 年“现代结核病控制理论与实践——临床诊治提高研讨班”。本次提高研讨班将使用新修订出版的教材, 邀请我国结核病领域著名专家王撷秀、马琦、朱莉贞、周新华、赵雁林等授课。每位参加者可获得继续医学教育 I 类学分 10 分, 请组织有关人员参加。

### 一、培训对象

从事结核病防治、临床工作的各级各类医务人员。

### 二、培训日期

2014 年 5 月 12 日报到, 5 月 13—15 日学习, 16 日撤离。

### 三、培训地点

北京市朝阳区香河园路左家庄 12 号院 (解放军总装备部工程设计研究总院招待所)。电话: 010-66358546、010-66359177。

### 四、培训费用

资料费 800 元/人。交通费、食宿费用自理 (食宿统一安排)。

### 五、乘车路线

1. 北京南站: 地铁 4 号线到角门西站下, 换乘地铁 10 号

线到三元桥站下, D 西北口出, 换乘 942、934、923、918、980、850 路公交车到左家庄站 (1 站) 下车, 步行 150 米即到。

2. 北京西站: 乘地铁 9 号线, 到军事博物馆站 (1 站) 换乘地铁 1 号线到国贸站, 或到白石桥南换乘地铁 6 号线到呼家楼站, 换乘地铁 10 号线到三元桥站下, 其他同上; 或从北广场乘 52 路公交车至东单路口西站, 换乘 120 路公交车到左家庄站下车。

3. 首都机场: 乘机场大巴或机场快轨到三元桥站, D 西北口出, 换乘同上。

4. 北京站: 北京站前街乘 24 路公交车直达左家庄站下车。

### 六、报名

请于 2014 年 4 月 30 日以前将报名回执以电子邮件或传真发往中国防痨协会秘书处, 电子信箱: zglnxyx@163.com, 传真: 010-65257475、010-65257509。

联系人: 13683368336 (蒋建英)、13520348637 (朱桂林)。

中国防痨协会秘书处

二〇一四年二月十日