

317391

《预防医学情报》副刊之四

医学微生物快速检验方法

编者：钟健如

审阅：峻 杰



四川省预防医学情报网印

一九八五年六月

前 言

医学微生物的快速检验与鉴定,对卫生防疫流行病学和临床传染病的诊断与治疗,均有极其重要的意义。近卅年来,国内外微生物学工作者,对医学微生物的快速检验诊断方法,作了很多研究,取得了一定的成效,创立了很多对医学微生物快速检验与鉴定的有效方法,对人类健康作出了积极的贡献。然而资料分散,不便查阅和参考,为了满足这方面的要求,编者特查阅了建国以来国内主要医学期刊、杂志,选取其中有关细菌、病毒、钩端螺旋体、真菌及寄生虫等快速检验资料,且经编者实践验证,认为具有快速和准确的特点。

编者按细菌、病毒、钩端螺旋体、真菌及寄生虫等不同分类进行编排,为弥补编写的不足,书后附有参考文献,以便查阅。

在编写过程中,承朱荣昌、于友建等同仁协助查找资料,特此致谢。

由于水平有限,加上时间仓促,其中错误或疏漏之处在所难免,恳请同道批评指正。

编审者

一九八五年六月

第一章：各种医学微生物通 用的快速检验方法

一、用溶解过滤法作血液中细菌的快速培养	(1)
二、溶解离心法作血液中细菌的快速培养	(1)
三、放射性示踪法快速检测血培养中的细菌	(2)
四、气相色谱法对医学微生物的快速检验与鉴定方法	(3)
五、电阻抗测量法对医学微生物的快速检测诊断方法	(9)
六、利用生物发光测定法对细菌尿的快速诊断	(10)
七、应用微量量热器测定法对微生物的快速检测与鉴定	(10)
八、鲨肽溶解物试验（简称鲨试验LLT试验）以快速诊断革兰氏阴 性细菌感染	(11)
九、应用硝基兰四氮唑还原试验（即NBT试验）诊断细菌性感染 症的快速检验方法	(11)
一〇、血液中细菌的快速增菌培养	(12)
十一、尿中致病菌的快速培养法与抗菌药物的敏感性试验	(13)
十二、临床常见细菌的一些生物学特性的快速检测方法	(13)
十三、用纸片法快速测定细菌的生化反应	(15)
十四、应用快速发酵试验鉴别厌氧菌	(16)
十五、条件致病性肠道杆菌的快速培养与鉴定方法	(17)
十六、用五支生化鉴别管快速检定肠道杆菌的试验方法	(17)
十七、用三管法快速鉴定肠道杆菌	(19)
十八、乳胶凝集试验快速检测体液中的细菌抗原	(20)
十九、用对流免疫电泳法作血液分离培养物细菌抗原的快速检测	(20)
二〇、直接荧光微量凝集法快速鉴别诊断肠道杆菌	(21)
二一、应用亚硝酸盐试纸快速诊断尿路感染	(22)
二二、测定青霉素酶的快速玻片法	(22)

第二章：临床常见细菌的快速检验方法

第一节：痢疾杆菌的快速检验

一、痢疾杆菌的快速培养法	(23)
二、免疫染色法快速诊断细菌性痢疾的方法	(24)
三、直接荧光抗体法快速诊断痢疾	(24)
四、间接荧光抗体法对痢疾杆菌的快速诊断	(25)
五、应用多价痢疾噬菌体快速诊断细菌性痢疾	(25)
六、应用噬菌体效价增长反应快速诊断痢疾	(26)
七、用豚鼠和家兔的眼角膜感染法快速鉴别痢疾杆菌	(26)

第二节：伤寒、副伤寒沙门氏菌的快速检验

- 一、血液中伤寒及副伤寒沙门氏菌的快速培养…………… (27)
- 二、快速玻片凝集反应试验用于诊断伤寒和斑疹伤寒…………… (28)
- 三、培养基中凝集反应法可快速检验水中的伤寒和副伤寒杆菌…………… (29)
- 四、红细胞凝集试验可快速诊断伤寒和副伤寒…………… (29)
- 五、对流免疫电泳法可快速诊断伤寒…………… (30)
- 六、直接荧光抗体染色法可快速诊断伤寒杆菌及副伤寒杆菌…………… (30)
- 七、乳胶凝集试验可快速诊断沙门氏菌病…………… (31)
- 八、乳胶凝集试验可快速检验食品中的沙门氏菌…………… (31)
- 九、免疫制动法可用于快速分离与鉴定沙门氏菌属细菌…………… (32)
- 十、红细胞吸附免疫荧光抗体染色法能快速检测食品中的沙门氏菌…………… (32)

第三节：其他肠道致病菌的快速检验方法

- 一、肠炎细菌的快速培养诊断法…………… (33)
- 二、大肠杆菌性肠炎的快速诊断法…………… (33)
- 三、直接凝集反应法可快速检验诊断大肠杆菌性肠炎…………… (34)
- 四、直接荧光抗体染色法能快速检验致病性大肠杆菌…………… (34)
- 五、耶尔森氏菌结肠炎的快速培养…………… (34)
- 六、食品、饮水中大肠杆菌的快速培养检验法…………… (35)
- 七、营养纸片法可用于快速检验饮用水中大肠杆菌群…………… (36)

第四节：霍乱、副霍乱弧菌的快速检验方法

- 一、霍乱弧菌的快速培养…………… (37)
- 二、红血球凝集试验法能快速鉴别霍乱弧菌和EL-Tor弧菌…………… (37)
- 三、氧化酶反应可快速诊断霍乱弧菌和EL-Tor弧菌…………… (38)
- 四、显微镜暗视野检查法对霍乱弧菌的快速检定…………… (38)

第五节：鼠疫杆菌和土拉杆菌的快速检验

- 一、鼠疫杆菌的快速培养与鉴别…………… (38)
- 二、荧光抗体染色法的快速检验…………… (39)
- 三、鼠疫杆菌的毒力可应用美兰还原试验进行体外快速测定…………… (39)
- 四、玻片凝集反应可快速检出土拉菌…………… (40)

第六节：炭疽芽胞杆菌的快速检验

- 一、炭凝集反应可快速检出炭疽杆菌芽胞…………… (40)
- 二、荧光抗体双重染色法可快速检验炭疽杆菌…………… (41)
- 三、串珠荧光抗体法对炭疽杆菌的快速检验与鉴定…………… (42)

第七节：布鲁氏杆菌的快速检验方法

- 一、玻片凝集反应法可快速诊断人布鲁氏杆菌病…………… (43)

二、菌素悬浮凝集素可快速检验布鲁氏菌.....	(43)
-------------------------	--------

第八节：白喉杆菌及百日咳杆菌的快速检验

一、荧光抗毒素染色法能快速检验诊断白喉杆菌.....	(44)
二、乳胶玻片凝集试验能快速检测百日咳杆菌抗体.....	(44)
三、鼻咽部涂片用荧光抗体染色法快速诊断百日咳.....	(45)

第九节：绿脓杆菌的快速检验

一、应用氧化酶试验快速检验外科病人的创面绿脓杆菌.....	(45)
二、放射免疫测定法快速诊断绿脓杆菌性尿路感染.....	(45)

第十节：结核杆菌的快速检验

一、结核杆菌快速培养法.....	(47)
二、结核杆菌微量快速培养法.....	(47)
三、应用氯化三苯四氮唑(TTC)对结核病细菌学的快速诊断	(48)
四、涂片和组织切片内抗酸菌的快速染色方法.....	(49)
五、用小白鼠试验作结核杆菌的快速诊断方法.....	(49)

第十一节：肉毒杆菌和产气荚膜杆菌的快速检验

一、抗肉毒菌素悬浮凝集素试验快速发现肉毒杆菌.....	(50)
二、产气荚膜杆菌的快速培养.....	(50)

第十二节：嗜肺性军团菌和脆弱类杆菌的

快速检验

一、嗜肺性军团菌的玻片凝集试验快速诊断法.....	(51)
二、用间接免疫荧光法快速诊断脆弱类杆菌感染.....	(52)

第十三节：脑膜炎细菌的快速检验诊断方法

一、反向血凝试验快速诊断流行性脑脊髓膜炎.....	(52)
二、应用对流免疫电泳法诊断细菌性脑膜炎.....	(53)
三、尿液对流免疫电泳快速诊断细菌性脑膜炎.....	(53)
四、间接荧光抗体染色法快速检验诊断流行性脑膜炎.....	(54)
五、噬珠溶解物试验快速诊断革兰氏阴性细菌性脑膜炎.....	(54)

第十四节：葡萄球菌,链球菌及肺炎双球菌的快速检验

一、含多粘菌素B的选择性鉴别培养基快速鉴别凝固酶阳性葡萄球菌	(55)
二、在同一平板培养基上作葡萄球菌定型及凝固酶试验的快速方法.....	(55)
三、沉淀反应试验快速诊断猩红热.....	(56)
四、肺炎双球菌的快速胆汁溶解试验.....	(56)

第三章：抗菌药物敏感性的快速检测方法

- 一、抗菌药物敏感性试验的自动化装置和使用操作方法……………(57)
- 二、溴甲酚紫葡萄糖琼脂培养基作细菌对抗生素的快速敏感性试验……………(57)
- 三、用氯化三苯基四氮唑(TTC)作指示剂以测定细菌对抗生素的敏感性试验……………(58)
- 四、结核菌耐药性的快速测定法……………(58)
- 五、用重氮雷琐率(Resaryurin)指示剂法快速测定结核菌对药物的敏感性试验……………(59)
- 六、用玻片培养法快速检查痰中的抗药结核菌……………(59)
- 七、结核杆菌放射性快速药敏试验……………(60)

第四章：病毒的快速检验方法

第一节：肠道病毒通用的快速检验方法

- 一、用微量琼脂扩散试验快速检定肠道病毒……………(60)
- 二、用间接固相放射免疫测定法快速检测人血清肠道病毒特异的 IgG 和 IgM 抗体……………(61)

第二节：脊髓灰质炎病毒的快速检验方法

- 一、在乳儿集体中快速分离脊髓灰质炎病毒的方法……………(62)
- 二、脊髓灰质炎病毒用纸片法滴定和测定中和抗体及鉴别该病毒的简易方法……………(62)
- 三、用滤纸条法测定血清中脊髓灰质炎抗体的简易快速方法……………(63)
- 四、用乳胶凝集试验快速鉴定脊髓灰质炎病毒和柯萨基病毒……………(63)
- 五、用荧光抗体法快速鉴定新分离的脊髓灰质炎病毒……………(64)

第三节：柯萨基(coxsackie)病毒的快速检验

第四节：肝炎病毒的快速检验方法

- 一、反向间接血球凝集试验快速检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg)……………(64)
- 二、对流免疫电泳法快速检测乙型肝炎表面抗原(HBsAg)……………(65)
- 三、炭凝集试验快速检测乙型肝炎抗原的方法……………(66)
- 四、用间接微量酶联免疫吸附试验(ELISA)测定抗-HBs抗体……………(66)
- 五、甲、乙型肝炎病毒的快速免疫电镜检查方法……………(67)

第五节：流感病毒的快速检验

- 一、鼻细胞镜检法快速诊断流行性感胃的方法……………(68)
- 二、浓缩微量法直接鉴别含漱液中的流感病毒……………(69)
- 三、应用红细胞吸附荧光免疫法检查咽喉漱洗液以诊断流感……………(69)
- 四、应用荧光抗体法快速诊断流感……………(70)
- 五、婴儿流感患者恢复期血清以快速检测流感病毒抗原性变异的方法……………(70)

第六节：腺病毒的快速检验

- 一、直接荧光抗体染色法快速诊断腺病毒感染的检验方法..... (71)
- 二、间接荧光抗体染色法快速诊断腺病毒感染的检验方法..... (72)

第七节：脑炎病毒的快速检验..... (72)

第八节：BK病毒感染的快速诊断方法..... (73)

第九节：披盖病毒(Togaviruses)的快速检测..... (74)

第十节：天花病毒的快速鉴别诊断方法..... (75)

第十一节：巨细胞病毒感染的快速诊断方法..... (75)

第十二节：风疹病毒的快速检验..... (75)

第十三：Ross River病毒快速检验方法..... (76)

第五章：钩端螺旋体的快速检验

- 一、钩端螺旋体的简易染色检查法..... (77)
- 二、用对流免疫电泳法快速诊断钩端螺旋体病..... (77)
- 三、用炭凝集试验快速诊断钩端螺旋体病的检验方法..... (78)
- 四、乳胶凝集试验快速诊断钩端螺旋体病的检验方法..... (78)
- 五、用钩端螺旋体膨胀试验快速鉴定钩端螺旋体菌群..... (79)
- 六、应用含A蛋白的葡萄球菌(SPA)快速鉴定钩端螺旋体菌株群
(型)的方法..... (79)

第六章：真菌的快速检验方法

- 一、白色念珠菌的快速鉴定..... (80)
- 二、用血浆凝固试验快速鉴定白色念珠菌的方法..... (81)
- 三、用厚膜孢子形成及染料还原等综合试验鉴别白色念珠菌..... (81)
- 四、利用糖发酵试验快速鉴别酵母类真菌的方法..... (82)
- 五、应用玻片培养法快速检查真菌结构的方法..... (82)

第七章：寄生虫的快速检验方法

- 一、湿血片染色法快速检验疟原虫..... (83)
- 二、疟原虫的荧光检查法..... (83)
- 三、阴道滴虫快速染色法..... (84)
- 四、肠原虫的快速染色检查法..... (84)
- 五、血吸虫的快速染色检查法..... (85)
- 六、姜片虫快速染色检查法..... (86)
- 七、血液中幼丝虫的快速染色检查法..... (86)
- 八、水中血吸虫尾蚴的快速检查法..... (87)
- 九、应用对流免疫电泳快速诊断寄生虫病..... (87)
- 附录：参考文献..... (88)

第一章：各种医学微生物通用的快速检验方法

一、溶解过滤法作血液中细菌的快速培养^[1,2]

用溶解过滤法作血液中细菌的快速培养等方法，为Farmer氏等(1972年)所创用，系采用一种Tritonx-100及碳酸钠溶解红细胞后，用滤膜过滤，然后取滤膜置于固体培养基上进行培养。可省去自液体培养基培养后再移种至固体培养基这一步骤。此法较液体肉汤培养法缩短一半的时间，而且对菌血症的检出率较液体肉汤培养法为高，其原因是能将血液中的致病菌与血液中的抑制物质，如抗生素、抗体、补体及吞噬系统等有碍因素分开，从而提高其阳性检出率。

(一)实验材料：

1. 微孔滤膜：IM型，孔径 $0.7\mu\text{m}$ 。由市售购买备用。
2. 过滤装置：(1)密封式过滤漏斗，(2)真空泵，(3)空气过滤器，(4)抽气瓶，(5)洗气瓶(6)血培养瓶等。
3. 0.05% Tritonx-100，
4. 0.08% 碳酸钠，
5. 肉汤培养基，
6. 肉汤琼脂平板培养基。

(二)实验方法：

取患者静脉血液5ml，注入肉汤培养液中(防止血液凝固)，再加入0.05% Tritonx-100及0.08%碳酸钠液，使标本中的红血球完全被溶解后，注入密封式过滤漏斗中进行抽气过滤，过滤完毕后，取下微孔滤膜，立即使之平贴于肉汤琼脂平板培养基上，放 37°C 进行培养后，观察结果。整个过程均须无菌操作。

(三)实验结果：

经用大肠杆菌和金色葡萄球菌作滤膜过滤法培养试验证明，每毫升血液中含有10—20个左右的细菌，均可获得满意的培养结果。

作者曾对念珠菌菌血症患者，用溶解过滤法进行培养，在3554次血培养中，用溶解过滤法培养获得29次念珠菌阳性，而用胰蛋白胨大豆肉汤培养仅获得17次阳性。

溶解过滤法的培养技术，国外已较为广泛地应用于临床对菌血症的早期快速诊断。此法能将混在大量体液中的极少量细菌浓缩收集于滤膜表面，同时又能把体液中抑制物质消除，而有利于细菌的生长繁殖，从而提高了培养的阳性率，并能缩短培养时间，及早地为临床提供可靠的科学依据。

二、溶解离心法作血液中细菌的快速培养

用溶解离心法作血液中细菌的快速培养法，为Dorn氏等(1976年)所创用。系用溶血剂先将血液标本中的红血球溶解后，然后用离心法将细菌集中在密度层上，再取此层液进行培养，可缩短检出细菌的时间，并能提高阳性检出率，其操作方法如下：

(一)实验材料：

1. 0.35%聚茴香脑磺酸钠 (SPS)。

2. 12%Solryth。

3. 蔗糖。

4. 明胶。

5. 肉汤琼脂平板培养基。

(二)实验方法:

以无菌操作法抽取静脉血液5ml,放入含有0.35%聚茴香脑磺酸钠(SPS)的B—D试管中,再加12%solryth0.3ml,以溶解红细胞,(solryth为一种有效的溶解因子,耐高压,对许多细菌既无抑制,亦无杀菌作用),待红细胞完全溶解后,用无菌针筒吸出,注入含有1.5ml蔗糖明胶混合液的V-D, Vracuttriner试管中,并将其放入45℃水浴中5分钟,使之与明胶混合,经离心后,其蔗糖层中即含有细菌,然后取蔗糖层混合液接种于肉汤琼脂培养基或其他适宜的培养基中。分别培育于需氧及厌氧环境中。此方法对需氧菌,厌氧菌,真菌及支原体和L型菌均能分离出来。

(三)实验结果:

经我们用伤寒杆菌和金黄色葡萄球菌作溶解离心法血培养试验证明,每毫升血液中含有50个左右的细菌,都能获得满意的阳性结果。同时对1000份疑似菌血症患者,用溶解离心法培养及用常用胰蛋白胨大豆肉汤培养法进行对比,溶解离心法培养阳性为73%,而胰蛋白胨大豆肉汤培养阳性仅38%,培养时间亦以溶解离心法培养为短。

三、放射性示踪法快速检测血培养中的细菌^[1·3·4·5]

放射性示踪法,即是用同位素标记培养基以检查血液或体液中的细菌的方法,根据细菌在培养基中生长繁殖时,必须分解各种养料的原理,应用放射性同位素¹⁴C或³⁵S标记的糖或氨基酸制成合成培养基进行细菌培养,作为细菌生长的标志,如细菌分解含有¹⁴C的葡萄糖时,可放出¹⁴CO₂,因此培养基接种标本后,经培养一定时间后,用特制的仪器,细菌生长检出器(Bacterial growth Detector简称Bacter),可自动地测定其培养液中所产生的放射性¹⁴CO₂的含量,即可测知有无细菌生长。对菌血症的诊断快速而准确,一般可于2—4小时内即可证明标本中有无细菌。

(一)实验材料:

1. 细菌生长检出器 (Bacter):此仪器系美国Tohnston厂制造,以Bacter460型为最新产品,为全自动化装置,一次可测试25—60份标本,细菌生长的情况,以生长指数(GI)于显示器上表示出来,其阳性判断标准,通常以生长指数(GI)30—35为起点,需氧菌以GI30以上作为阳性,厌氧菌以GI20即作为阳性。

2. 含聚茴香脑磺酸钠胰酶消化大豆肉汤 (TRB): 作需氧培养用。

3. 硫乙醇酸钠肉汤培养基: 作厌氧培养用。

(二)实验方法:

1. 用无菌操作法取患者血液,立即接种于含聚茴香脑磺酸钠胰酶消化大豆肉汤(TRB)和硫乙醇酸钠培养基中。

将需氧培养瓶置于细菌检出器上进行振荡培养,每隔1—4小时测定一次结果,直至18小时,以后可每天测定一次,直至7天。如有细菌生长,当其生长指数(GI)达20—30以上时,即可作革兰氏染色,并移种平皿培养基上以分离纯菌,作进一步的鉴定。

厌氧培养瓶，放于35℃作静置培养，每天取出测定一次，直至7—14天，若仍然为阴性者，则可报告。

2. 应用细菌检出器对菌尿症病人尿液的快速检测诊断方法：

于含浓缩10倍的肉汤和1 μ Ci的 14 C底物的培养基瓶中，加入5ml新鲜病人尿液标本，然后置于细菌检出器上培养，于培养后1、2、3、4小时进行检测。同时与标准平板法进行计数菌数作比较。当在细菌检出器上，其生长指数（GI）在10以上时，和培养物浓度达 10^5 个菌/毫升时，即作为阳性。

3. 应用细菌生长检出器对食物和水中细菌快速检测方法：

取一定量的食物或水样标本接种于浓缩10倍的肉汤和1 μ Ci的 14 C底物的葡萄糖培养基中，置于细菌检出器上培养，于接种培养2、3、和6小时后进行检测，其生长指数（GI）在10以上时，即作为阳性。

（三）实验结果：

1. 放射性示踪法，以细菌生长检出器作血液培养的检测结果：对804名患者的血液标本进行培养。用细菌生长检出器检测，于培养6小时的需氧培养即可出现阳性结果。在最初24小时内能检出77%的阳性标本。而常规培养法却只有48%。对厌氧菌，此法在第4天能检出100%的阳性，而常规方法同样时间的阳性检出率也仅有48%。

2 用放射性示踪法，以细菌生长检出器作菌尿症患者尿液标本的检测结果：

此法和用标准平板法进行菌数计数法比较试验，经对537份标本尿液检查，两种方法均为阳性者有527份，其符合率为98%，此法在1小时检出率为74%，2小时为91%，3小时末其阳性率即为100%。结果快速而准确。

3. 用放射性示踪法，以细菌生长检出器对食品和水中细菌的快速检测结果：

此法检测罐头食品中的细菌，可于数小时内测得结果。经实验证明，当把鼠伤寒杆菌和金黄色葡萄球菌接种于含有0.013 μ Ci 14 C—葡萄糖/毫升的培养基中，细菌浓度为 $10-10^4$ /ml时，其检出时间为3—10小时。用肉毒杆菌和梭状芽孢杆菌作同样的试验，亦得到类似的结果。

用此法作水中细菌的检测结果：实验证明，当标本含 10^8 、 10^2 和10个菌时，在用细菌生长检出器检测时，可分别于2、3、和6小时即能检出细菌。

四、气相色谱法对医学微生物的快速检验与鉴定方法^[1、4、5、6、7、8]

气相色谱法（Gas chromatography，简称GC），亦称气体层分析法，系用特殊的气相色谱仪器，根据检测微生物的细胞成分或微生物的特异性代谢产物。从而作出病原微生物的诊断和鉴定。

自从1963年Oyama氏用裂解气相色谱法研究微生物细胞，和Able氏等通过对细菌细胞的类脂成分、碳水化合物和代谢产物等进行分类与鉴定，并提出用气相色谱法（GC）快速检测诊断传染病后，国内外很多学者，都相继用气相色谱法对病原微生物的检测鉴定和对传染病的快速诊断作了很多研究和报道。应用气相色谱法（GC）对病原微生物的分析鉴定和检测方法如下：

（一）实验仪器：

气相色谱仪：国内已有数种产品，以北京分析仪器厂生产的SP—2308型和上海分析仪器厂生产的103型较为理想，该两种仪器均具有氢火焰离子化（又名火焰电离）电子捕获，火焰光度鉴定器，并能作色谱柱箱的程序升温控制。可连结xwc—100型自动平衡记录仪记录色谱峰，若加上数据处理装置可进行复杂的数据处理，使分析结果可靠，手续简化。裂解器

可选用上海分析仪器厂生产的30瓦居里点裂解器。

(二)实验材料的制备与处理:

一、对微生物细胞成份分析材料的制备和处理方法

为了达到对病原微生物的快速检测和鉴定,必须先把待检微生物进行处理后,再用气相色谱仪进行检测分析,其常用的处理方法有以下两种:

1. 加热裂解法:即把待检微生物的整个细胞加热裂解,使其分子量较大的物质和生物材料,在严格控制的操作条件下加热,使之迅速裂解成为分子很小的碎片后,直接进入气相色谱仪(GC)中进行分析,此即称之为裂解气相色谱法(Pyrolysis Gas Chromatography,简称PGC),这种分析方法,由于细菌细胞碎片的组成和相对含量与被检微生物物质的结构组成一定的相应关系,每种微生物所含物质的裂解色谱图都具有各自的特征,因此根据裂解气相色谱图的不同,而作为检测鉴别微生物的依据。这种方法很灵敏,仅由一种基因产物的差别,就可以将不同菌株区别开来,故可作为鉴别不同微生物的依据。

2. 细胞水解法:即将待检细菌的整个细胞进行水解,直接用气相色谱仪(GC)分析其挥发性的水解产物,此即称之为细胞水解法。若遇到难以挥发的成分,则可先制备其衍生物,而后进行GC分析。这个方法实质是对脂肪酸和类脂成分的分析,即将整个细胞或提取物先行皂化,将所得脂肪酸甲酯化后,再进行GC分析。也可通过对细胞中糖的分析,即先将糖转化成三甲基硅烷(TMS)或三氟乙酸衍生物后,再进行GC分析,也可以达到鉴定的目的。用这种方法可在培养出菌落后的一小时内,便可得到鉴定的结果。

二、对培养基中细菌代谢产物的材料的检测分析方法。

将由患者分离出的待检菌株接种于3%葡萄糖胰酶消化大豆肉汤培养基中,培养3小时的代谢产物(特别是对三羧循环的有机酸及其相关物质),用气相色谱仪(GC)进行分析,这些分析过程均可自动化,分析数据亦可在仪器的积分仪(integrator)及带式记录系统(Tape recorder system)上自动地标出来。

也可用1%葡萄糖液体培养基,将待检细菌接种于此培养基中,经培养后用GC仪来分析细菌的代谢产物。亦得到较好的结果。

微生物在培养过程中,产生挥发性的气体成份,用GC方法进行分析,极为方便可靠,可直接从培养基管的顶隙空间,取气体样品进行GC分析,以鉴定厌氧杆菌,目前对从食品中检出微生物和对厌氧菌的检出鉴定,多采用这种方法。

三、对临床标本材料在检测前的处理方法

气相色谱法(GC)可用于临床标本如血液,体液、脓液及组织匀浆等,各种标本在进行GC分析之前,应先进行处理,使之适合于分析要求,再进行GC法分析。临床常见标本,在进行气相色谱法(GC)分析前的处理方法及分析处理程序图附列如后(图1至图4):

图1:气相色谱法(GC)分析的血液标本的处理方法,其中。

(方法1)系分析样品中的酸性和中性化合物。

(方法2):系分析胺类及其有关化合物。

(方法3):系测定中性大分子化合物。

这些方法可用于分析正常人和感染者的血清,以诊断由各种细菌所引起的菌血症。人体正常血清的主要成分是棕榈酸甲酯,油酸甲酯,亚油酸甲酯和硬脂酸甲酯等,而受微生物感染患者血清中,除上述成分外,尚含有其它不正常成分,从而得以诊断。

图2:气相色谱法(GC)分析的尿液标本的处理方法:其中

的检测分析为例,其具体实验操作方法叙述如下:

取适量干燥的细菌粉末,置乳钵中研磨,加适量的蒸馏水制成悬液。用经称量恒重的纯铁丝尖端部分,负载沾取适量的样品后,在热气流下吹干成膜,反复沾取样品600—800微克(干重),准确称重后,用裂解温度770℃,裂解时间12.5秒,以氮气为载体,流速30ml/分,氢气为燃气,流速30ml/分,氧气为助燃气,流速300ml/分,所用色谱柱为长2米,内径4毫米的W型不锈钢柱,填充物为84—100目的porapakq,柱炉在开始的温度为150℃,当样品裂解后,再以4℃/分的速度上升至200℃,每次分析大约需用45分钟,火焰电离鉴定器温度为230℃,汽化器温度定为240℃,放大器衰减位置为1/4,灵敏度位置调节至1000,记录纸移动速度为5毫米/分每种样品至少分析三次。检测操作完毕之后,根据气相色谱分析所呈现图谱进行分析结果。

(四)实验的结果和分析:

经用枯草芽孢杆菌,炭疽芽孢杆菌,蜡样芽孢杆菌,土拉杆菌,马鼻疽杆菌,类鼻疽杆菌,鼠疫杆菌和假结核杆菌等纯菌株,经裂解气相色谱法PGC分析后,其结果如下:

从目测同一个枯草芽孢杆菌样品的三次裂解分析图谱,可以看出其图形轮廓和色谱峰形之间的比例基本相同,说明此分析法的重复性是好的。

在上述八种杆菌的裂解图谱中,都有A, B, C, D四个特征峰部分, A为单个色谱峰, B, C, D为峰群。每个菌种的裂解图谱都各有其特征“指纹”,其特征是:

枯草杆菌的裂解图谱中,最明显的特征为A峰,其高度比其它菌种裂解图谱中的相应峰都高, C峰群中的三个峰,由右至左其高度递增, B峰群中的三个峰、右边峰最小。

马鼻疽杆菌的裂解图谱中, D峰群右边是一对等高的低矮双峰,这是其主要区别的特征峰形。

类鼻疽杆菌的裂解图谱中、B峰群中出现特别突出的峰,而D峰群中则缺少马鼻疽杆菌所具有的特征。

炭疽杆菌的裂解图谱中, D峰群的三个峰其峰高递减、B峰群的三个峰,其峰高递增的特征。

蜡样芽孢杆菌的裂解图谱中、B、D两峰群与炭疽杆菌不同。

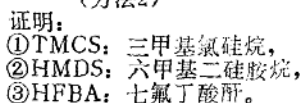
土拉杆菌的裂解图谱中, B峰群出现明显的四重峰, D峰群则是峰高递减的三个峰。

鼠疫杆菌和假结核杆菌的裂解图谱的图形轮廓很相似,但通过C峰群的中间峰和D峰群的左侧峰可将两者区分开来。

从上述实验的条件所得的结果看出,对上述八种杆菌,用气相色谱法(GC)进行检测分析和鉴定,其峰形图谱的区别是明显的,再用标准菌株作对比分析测定,当可作出鉴定。

(五)各种标本的处理程序图如下:

血液(2ml) 4℃离心15分钟血清。



尿液 (2—5ml) 加 50% H_2SO_4 PH 调至 2.0.

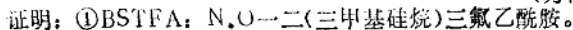


图 3：组织样品分析程序图：

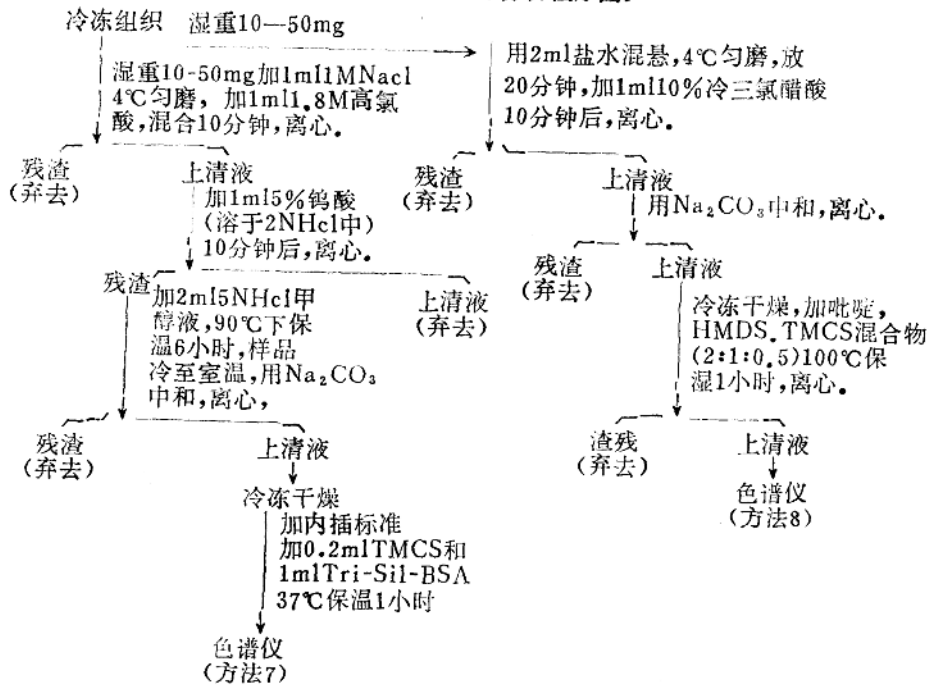
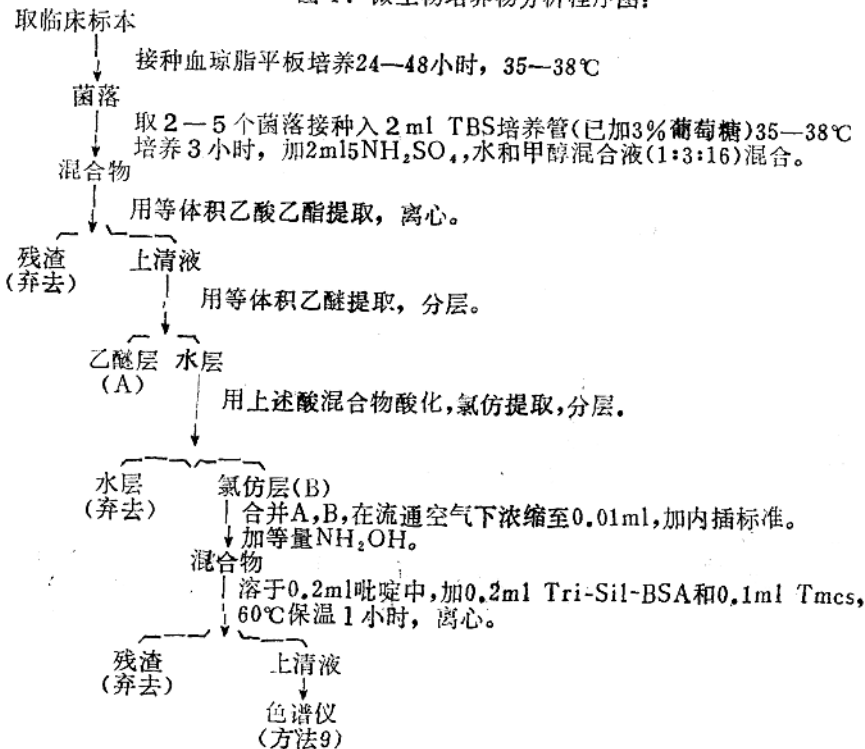


图 4：微生物培养物分析程序图：



附注: TBS(Trypticase soy Broth)培养基的制备:

胰蛋白胨(酪蛋白)	17克
木瓜酶消化大豆粉	3克
氯化钠	5克
二盐基磷酸钾	2.5克
葡萄糖	5克
蒸馏水加至	1000毫升

调节PH7.3, 高压15磅15分钟灭菌后备用。

五电阻抗测量法对医学微生物的快速检测诊断方法^[1,4,9]

阻抗测量法(impedance measurement)是测量微生物活性的一种物理化学方法。它和微生物的常规培养法相比,它具有高度的敏感性和快速性,通常可于培养2小时内测出每毫升培养物中含有 10^5 菌数细胞的代谢活性,而且仪器结构简单,且能自动化。

自1973年Bzomn氏等报导细菌生长时其最终的代谢产物,导致培养液带电性质的改变,离子数目及带电分子的增加,结果造成导电率的增加,阻抗(impedance)降低,从而反映细菌生长的情况。各种细菌的阻抗曲线各不相同,根据各种细菌的阻抗曲线的图形特征,即可对细菌作出诊断和鉴别。

(一)实验材料和仪器:

1. 阻抗测量仪器:

现在采用的微生物阻抗测量仪器有两种,即Strattometer和Bactometer32型两种,而以Bactometer32型应用较多。Bactometer32型阻抗测量仪,系美国加州帕洛阿尔托的Bactom aTic公司所制造,此仪器系由一振荡培养箱,四个带平板式电极的印刷电路模板,32对阻抗测量容器, A/D转换器和一多路记录仪等部件所组成,使用较为简便。

Bactometer32型阻抗测量仪的使用方法: Bactometer乃是一种极其敏感的阻抗电桥,每次进行阻抗测量时,采用一对同样的测量容器(试管),在容器底部各有一对蚀刻于印刷电路模板上的平板式电极,电极系用不锈钢,金或镀金材料制成。在作标本试验时,即用此容器(试管)进行检测试验。

2. 培养基: 阻抗测量法常用胰胨大豆肉汤培养基作微生物的培养检测。本方法不宜使用缓冲液培养基作阻抗测量,因为缓冲液将减低微生物代谢产物电活力的效应。

(二)实验的操作方法:

阻抗测量试验时,于试验容器(试管)和对照容器中,均同样加入相同的培养基,而只在试验容器(试管)中接种待检标本。对照容器中加入培养1Ml,于试验各容器中,分别加入0.5Ml的培养基和待检标本0.5ml,而后放入阻抗测量仪器中,即将印刷电路电极模板连同容器(试管)放入仪器的35℃培养基箱内,接上电钮,仪器即开始运转,以40毫伏,200赫兹的正弦信号,通过培养箱内模板模上成串联的对照容器和试验容器,即可连续自动地把各容器中的阻抗变化,借助于转换器换成阻抗率输送至记录仪,记录于纸上。

在Bactometer上显示的数字读数,为对照容器的阻抗(z_r)同对照容器阻抗(z_r)加试验容器阻抗(z_e)的总和之比。即 $z_r/z_r + z_e$,当细菌产生代谢变化时,试验容器中阻抗即行下降,其比值也就增大,从而得出各种微生物的阻抗曲线以鉴别微生物。

(三)实验的结果:

1. 经实验证明,在含有葡萄糖、蔗糖、和麦芽糖的塞耶—马丁氏肉汤中,分别接种淋球菌后,经培养24小时后,用阻抗测量仪测定,结果只有在含有葡萄糖的培养基中产生电阻抗减低的现象,而在蔗糖,和麦芽糖培养基中电阻抗率无变化。此即表示淋球菌,只分解葡萄糖,而不分解蔗糖和麦芽糖。

2. 血液标本:利用Bactometer32型进行对血培养的检测,一般可于10—15小时培养后即能检出血培养基中的电阻抗变化。经用Bactometer32型阻抗测量和常规培养法对785份血培养标本进行检查,其结果两法一致,且阻抗法简便快速,系自动化,结果准确。

3. 尿液标本:用阻抗法检测尿液标本时,其敏感度较常规培养法为高,阻抗法能检测出每毫升尿标本中含 10^3 个细菌的敏感度,而常规法至少每毫升含有 10^6 个细菌的浓度时才能检出。经用阻抗法和常规法对1133例临床尿液标本进行检查,两法的符合率达95.8%。

4. 脑脊液标本:阻抗法对临床脑膜炎患者脑脊液的快速诊断,亦很满意,平均含有 10^4 个菌/ml时,阻抗法测定,仅需6小时即可检出,比常规法约快3—4倍。

六、利用生物发光测定法对细菌尿的快速诊断、[4*5]

生物发光(Bioluminescence)诊断法是用发光计(Luminometer)和荧光素酶试剂来测定由某种生物的生物性化合物的反应而放出的可视光线的诊断方法。

(一)生物发光诊断法的原理:

当荧光素酶在有Mg离子时,能与还原荧光素及ATP复合而生成荧光素—荧光素酶—ATP复合物和焦磷酸。此复合物与氧结合则发出冷光而变成水和荧光素酶—脱氢—荧光素—ATP复合物,此光能持续1秒钟。

上述反应中所放出的光的总量为荧光素酶、荧光素、氧及ATP浓度的函数,在前三者过剩的情况下,放出的光量及强度与ATP的量成比例关系。由于已知细菌细胞中的ATP的含量是 $10^{-10} - 8 \times 10^{-10}$ 微克/细胞,所以用生物发光法测定ATP量,就可以定量得出被检样品中的细菌数量,每一样品的测定记录所需的时间,仅需15秒钟。

(二)生物发光诊断法的实验方法:

本方法应用于临床上对含有 10^5 个细菌/ml的菌尿检查敏感而快速,但测定尿中细菌细胞的ATP时,必须对尿中的血细胞及其它细胞的ATP有选择性地加以分解,这是本方法在目前应用时的最大难点。

经实验研究和改进,将被检尿液用蝶螈(Fritonx-100)及三磷酸腺苷,双磷酸酶(apysase)来处理被检尿液后再进行测定,用蝶螈x-100能使动物细胞溶解,而三磷酸腺苷双磷酸酶,能使ATP水解,因此将用蝶螈x-100,三磷酸腺苷双磷酸酶处理过的尿液,加入沸腾过的三羟甲基氨基甲烷—乙二胺四乙酸[Tris-EDTA(0.1克分子量的tris缓冲液,PH 7.75,加2毫克分子(mm)的乙二胺四乙酸(EDTA)]中,以提取来自细菌的ATP后,再用发光计(Luminometer)和荧光素酶试剂来测定。

(三)实验与检测结果的计算:

在临床上以 10^5 个细菌数/ml的尿菌量作为诊断细菌尿的依据,由于每个细菌细胞的ATP含量为 3.6×10^{-18} 毫克分子,所以 10^5 个细菌/ml尿,就相当于 3.6×10^{-13} 克分子ATP/ml尿,此种ATP浓度相当于应用荧光素/荧光素酶系统所能检出的ATP的最低浓度的4倍。因此这种方法在检出 10^5 个细菌数/ml的细菌尿时,是有充分的敏感度,而且操作简便、迅速。

七、应用微量量热器测定法对微生物的快速检测与鉴定, [4*5]