

結核病的細菌檢驗

(讲义試用稿)

北京市結核病防治所

一九七三年

毛主席语录

路线是个纲，纲举目张。

人的正确思想，只能从社会实践中来，只能从社会的生产斗争、阶级斗争和科学实验三项实践中来。

人类总得不断地总结经验，有所发现，有所发明，有所创造，有所前进。

把医疗卫生工作的重点放到农村去。

前 言

在毛主席无产阶级革命路线指引下，全国形势大好，医药卫生事业蓬勃发展。广大医务人员，包括结核病防治工作者，遵照毛主席“把医疗卫生工作的重点放到农村去”的教导，和“预防为主”的方针，面向农村，面向工矿，面向基层，积极开展防病灭病运动，热情为工农兵服务。

结核病的细菌检验是结核病防治工作中不可缺少的重要部分。它是确定诊断、考核治疗效果、判断有无传染性和传染性的的大小的重要参考资料。特别是细菌检验工作中的痰厚涂片法，对在农村开展结核病防治工作更具有重要意义。

为了使基层化验人员掌握结核病的细菌检验方法，我所化验室集体编写了这本讲义，曾在我所举办的化验人员学习班进行试讲，并根据试讲结果作了修改。这本讲义是以介绍实用技术为主，不涉及理论性问题，在实用技术中，又以介绍痰的厚涂片法为主，以便农村、基层防痨机构在简便的设备条件下也能开展细菌检验工作；同时，也介绍了集菌检查法和培养法，以供有条件的基层化验室参考使用；此外还简要地介绍一点结核菌的药物敏感试验方法。

由于结核菌的检验方法很多，我们水平有限，这本讲义的缺点和错误在所难免，希望读者给予批评、指正。

北京市结核病防治所

1973年9月

目 录

一、细菌检验在结核病防治工作中的重要意义·····	(1)
---------------------------	-----

二、结核菌的一般形态与分类·····	(2)
--------------------	-----

三、痰液厚涂片法·····	(3)
---------------	-----

什么是厚涂片法，结核菌的抗酸染色性，操作方法，报告方式，提高检出率与准确性。

四、结核菌的集菌检查·····	(8)
-----------------	-----

什么是集菌法，浮游集菌法的原理，操作方法，集菌法的优缺点。

五、结核菌的培养·····	(11)
---------------	------

器材的准备，改良罗氏培养基的配方，配方中各种营养成分的作用，改良罗氏培养基的制备法，标本的接种，菌落的观察与鉴别，结果的报告，影响结核菌生长的因素。

六、结核菌的药物敏感试验·····	(19)
-------------------	------

敏感试验培养基的制备，结核菌悬液的制备，接种及其结果的判定，结核菌耐药性与敏感性的界限。

一、细菌检验在结核病防治 工作中的重要意义

结核病的细菌检验，主要是查痰工作，在结核病防治工作中占有重要地位，它既有流行病学方面的意义，又有临床方面的意义。

结核病防治的目标，是控制结核病的流行，具体地说，就是控制传染，减少发病。而控制传染是根本的。控制传染主要是控制传染源的问题，即发现传染源、掌握传染源和消灭传染源。传染源就是痰里有结核菌（主要是用涂片法从痰里找到结核菌）的肺结核病人，也叫开放性肺结核。结核菌通过飞沫传染等各种方式传播，因此在控制传染源的整个过程中，细菌检验，特别是用涂片法查痰，是不可缺少的步骤。在流行病学意义上来说，查痰比 X 线透视、照片有时更为重要。

查痰在临床上的重要性表现在肺结核的诊断和观察治疗效果方面。肺结核与其他肺部疾病的鉴别诊断常常是根据查痰的结果解决的。痰菌的阳性或阴性都有诊断价值。为了确定诊断，查痰不仅用涂片法，有时还需要用集菌法或培养法。由于痰菌检查对于确定诊断来说具有决定性的意义，是关键，因此，痰菌检查的高度准确性和检查方法的改进是非常必要的。

肺结核在治疗的过程中，特别是在有效抗痨药物合理应用的情况下，痰菌的变化比较敏感。因此，应用痰菌检查的结果来观察肺结核治疗的效果更有现实意义。肺结核的复发

或恶化首先表现在痰菌的阳转上。所以，在肺结核的复查中查痰是必不可少的，比X线检查更为重要。

从以上所说的情况看来，查痰工作不是可有可无，而是非有不可，而且必须做好。因此，负责查痰工作的化验人员必须树立全心全意为人民服务的思想，不断提高路线觉悟，认真改造世界观，认真攻读马列主义的书和毛主席著作，理论联系实际，热爱本职专业，在工作中不断总结经验，找出规律性的东西，有所发明，有所创造，有所前进。要在政治统帅下，努力钻研业务，以白求恩同志为榜样，在技术上精益求精，制定严密的操作常规，确保效率、质量的提高，以促进结核病防治工作更好地开展。

二、结核菌的一般形态与分类

结核杆菌在细菌分类上属于裂殖菌纲、放线菌目、分枝杆菌科、分枝杆菌属。

根据宿主的不同，结核杆菌大体上分成四型：

1. **人型** 主要使人类致病，也可使某些哺乳动物得病。
2. **牛型** 主要使牛得病；也可传染给人类。
3. **鸟型** 主要使家禽及鸟类得病；对人类的感染极少见。
4. **冷血动物型** 主要感染龟、鱼、蛙、蛇、鳄鱼等冷血动物。

在普通显微镜下，结核菌经过抗酸染色，用900倍以上的显微镜头即可看到。在显微镜下观察到的结核菌为细长而略呈弯曲的杆状菌，菌体有时可见排列着色较深的颗粒。形态上有时呈某种程度的变异，变粗或变短。结核菌在培养基

上生长的形态，可参阅结核菌的培养法一章。

三、痰液厚涂片法

(一) 什么是厚涂片法

过去作镜检时，认为涂片不宜过厚，否则会使染料遮盖标本，影响检出率。实际上，薄涂片所取痰液标本有限，当细菌在每毫升痰液中少于5~10万时就不易查出，检出率不够高。我所化验室经过十余年的实践，在染色方法上作了改进，可将涂片标本加厚三~五倍，并不影响清晰程度，而能显著提高检出率。1959年，我所曾选择肺结核患者痰标本255份，与萆尼氏涂片法、即薄涂片法进行了严格对比，其结果是：萆尼氏涂片法检出率为27.8%，厚涂片法检出率为41.2%。1962年，又选择门诊新发现未经抗结核药物治疗的患者痰标本310例，对每一标本都用厚涂片法、浮游集菌法、培养法三种方法进行比较，检出率是：培养法为21.3%，厚涂片法为12.9%，浮游集菌法为11.6%。又根据北京市结核病研究所编的内部刊物《结核病》1973年第一期上发表的厚涂片法和集菌法的最新比较结果，在330份痰液标本中，厚涂片法检出率为44.2%，高压稀释浮游集菌法检出率为42.7%，两者检出率相似。这与我所实验结果是一致的。

(二) 结核菌的抗酸染色性

细菌一般要经过染色才能在显微镜下观察。结核菌的染

色依据是结核菌的抗酸性，这是分枝杆菌属细菌所特有的性质。结核菌的抗酸染色性，简单地说即结核菌一旦被苯胺类试剂染色后就不易被含酸的酒精所脱色，而其他杂菌则被脱色。根据这一特点，就可把抗酸杆菌与杂菌在显微镜下进行初步的鉴别。

(三) 操作方法

涂 片

(1) 嘱患者清晨起床后用力咳出1~3口痰，吐入痰盒内送检（痰盒为内层涂蜡的特制纸盒，直径四厘米，高二厘米；也可用其他合适容器代替）。

(2) 取玻璃片一张，用蓝色蜡笔在正面划线，在反面编号，以免字迹在染色过程中脱掉。

(3) 用牙签取痰中干酪样物，或类似干酪样物，或脓样物，涂抹于玻璃片上，平均涂抹量为0.1毫升左右。标本取样务求合于上述要求，这是提高检出率的关键。

(4) 标本涂抹后，使之自然干燥。

(5) 用酒精灯将标本加热固定。具体操作是：用酒精灯的火焰在玻璃片背面来回烤3~4次，杀死结核菌，并使涂片固定，易于染色（火烤不宜过久，以免细菌焦化，影响检出率）。

染液的配制

(1) 碱性复红酒精饱和液：

碱性复红 10克

95%酒精 100毫升

复红用乳钵研磨后再加酒精。

在配制时，要注意生产染料单位和批号，新硷性复红在95%酒精中溶解度为3.2克，硷性复红为8.16克。

(2) 硷性复红石炭酸染液

复红饱和液	16毫升
5%石炭酸	90毫升

(3) 3%盐酸酒精液

95%酒精	97毫升
浓盐酸	3毫升

(4) 氨水酒精液

蒸馏水	90毫升
浓氨水	10毫升
95%酒精	20毫升

(5) 硷性美兰液

美兰饱和液	30毫升
10%氢氧化钾溶液	0.1毫升
蒸馏水	100毫升
同时稀释20~30倍	

※ 饱和美兰液配法：取美兰2~3克，加95%酒精100毫升。

染色

(1) 将复红染液滴满标本玻璃片上，用酒精灯在玻璃片背面徐徐加温1~2分钟，使染液微冒蒸气，但不能煮沸。3~4分钟后，用水轻轻冲去染液。

(2) 用3%盐酸酒精脱色1~3次，以颜色退尽呈无色或微呈粉红色为止（加盐酸酒精时不可过多，以免流至背面将编号冲掉）。

(3) 将片上水倒尽，滴加氨水酒精，过1分钟再用水

冲，待自然干燥后即可镜检。

(4) 如果需要复染，可在盐酸酒精脱色后立即用美兰稀液复染半分钟，这样染出的片子背景是淡兰色的，看去比较柔和。但这一步骤可视情况而省去，我所化验室十余年来都不采用复染步骤。

镜 检

在900倍以上的显微镜下，可观察到紫红色、红色、淡红色等菌体。

(四) 报告方式

从涂片找到的菌体，只能说明是抗酸菌，不能确定细菌的型别，因此不能报告为“发现结核杆菌”，而只能报告为“发现抗酸杆菌”。反之，在一张片子中未找到抗酸杆菌，也不能说明这个病人就一定不排菌，因为任何检验方法都有其局限性，因此不能简单地报告为“阴性”。

准确的报告方式应是：

(1) 发现抗酸杆菌的报告：“发现抗酸杆菌”。并根据片上的菌数多少，用格富基氏计数法报告结果。

格 富 基 氏 法 (GAFFKY氏法)

格 富 基 氏 号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
平 均 每 视 野	仅全发现片	数视野有	每视野	每视野	每视野	每视野	每视野	每视野	每视野	每视野
菌数(根)	1~4	1	1	2~3	4~6	7~12	13~35	50以上	100	极多

例如：片上每视野平均有4~6个菌，则报告：“发现抗酸杆菌5号”。

(2) 如没找到抗酸杆菌，则报告：“未发现抗酸杆菌”。

(五) 提高检出率与准确性

(1) 痰液标本的选择对检出率有很大关系。我所曾对1,208份痰标本进行了比较，结果如下表所示，说明干酪样痰、血痰及黄色脓样痰的检出率最高。

1,208份痰标本性状及检出结果

痰标本性状	标本份数	阳性份数	阳性率
干酪样痰	21	7	33%
血痰	13	4	31%
黄色脓样痰	140	37	26.4%
白色粘稠痰	847	74	8.7%
浆液样痰	116	6	5.2%
唾液	71	2	2.8%

(2) 防止假阳性的问题

1. 由于结核菌含有脂肪和蜡质，玻璃片虽用清洁液浸洗，有时也难以彻底破坏菌体，而玻璃片又是反复使用的，如果将残留菌体的玻璃片再使用时，就会造成假阳性。避免的方法是，将玻璃片严格清洗，并高温处理。具体方法如下：用完的玻璃片用肥皂水煮若干小时，然后充分洗去残留于片上的痰膜，再放在清洁液中浸泡1~2天，洗净后放入

烤箱 (160°C) 2 小时, 这样就能将残留玻璃片上的少量 结核菌体彻底炭化, 而防止假阳性的出现。

2. 旧玻璃片上的玻璃纹在着色后也容易误认为是菌体。可将显微镜细调节器反复转动, 如有较强的折光, 即为玻璃纹而非菌体。玻璃片太旧者应更换新片。

3. 用蜡笔在玻璃片上划线与编号, 蜡笔不宜用红色, 以免与细菌颜色混淆; 滴香柏油的玻璃棒不可接触标本; 看完阳性标本的镜头要擦拭, 总之, 要避免标本之间的交叉污染所造成的假阳性。

(3) 观察要仔细, 每个标本要检查 5~10 分钟, 以前后七行、左右四行为标准。少于此要求, 可降低检出率 1~3%。

(4) 油镜用油宜用香柏油, 不可用液体石蜡等代用品。因液体石蜡折光系数较小, 在厚涂片的情况下, 观察不够清晰。

四、结核菌的集菌检查

(一) 什么是集菌法

标本通过一定的方法处理后, 其中所含结核杆菌往往呈分散状分布, 如果将这些分散的细菌聚集在一处, 就可以使检出率大大提高, 这种检出结核菌的方法称为“集菌法”。较早期的集菌法是首先将痰标本用强酸或强碱液化, 然后用高速离心机长时间地离心, 以其沉淀进行镜检或培养。目前多数采用浮游集菌法, 检出率较沉淀法为高, 而且操作简

便、易行。

(二) 浮游集菌法的原理

结核菌的菌体含有大量的脂肪与蜡质，因此对亲脂性有机溶剂的亲合力远大于对水的亲合力。如果在一个分散着结核杆菌的液体中，加入少量的汽油或二甲苯一类的亲脂性溶剂，加以剧烈振荡，结核菌就会被这种溶剂（如汽油）的小滴所吸附，这时将标本静置，少量汽油由于比重比水轻就带着被吸附的结核菌飘浮于液面，而达到集菌的目的。

(三) 操作方法

结核菌经高热杀死后菌体依然存在，因而痰标本可以完全液化，不但结核菌检出率较高，也减少了对工作人员的感染机会。因此在集菌以前将标本进行加热前处理是合适的。

操作步骤

(1) 收集患者24小时内吐出的痰液，或清晨起床后连续吐出的痰液，不少于10—20毫升。

(2) 将痰液倾入300毫升三角烧瓶内，加等量2%盐水稀释，这样可避免加热后痰液的凝固。如痰标本过浓，可把盐水多加2—3倍。经过这样稀释的痰标本用沸水浴加热30分钟使其液化（有条件者可用高压）。

(3) 如标本煮沸后仍有蛋白凝固现象，再加入0.5%氢氧化钠加以摇动，促进痰标本更好的液化。但不能在加温前放入，以免菌体被破坏。

(4) 待标本冷却后，加入0.4—1毫升二甲苯（或汽

油)，用胶塞或玻璃纸将瓶口塞紧或包严，放入振荡器内振荡10分钟（亦可用手摇动）。

（5）加入2%盐水至瓶颈处（加2%盐水的目的是为了提提高液体比重），使结核菌易于上浮，提高检出率。

（6）加水后等30分钟，将泡沫小心吸取于小试管内。

（7）等约5—10分钟，试管内分出三层：上为油层，中间为泡沫层，下为水层。

（8）涂片时，在玻璃片背面编号，正面划一圆圈，涂以10%健康人血清或蛋清为粘附液，防止标本被冲掉。

（9）用毛细吸管将泡沫层小心地吸入管内，并保持垂直姿势，略等2—3分钟，在吸管内又可分为三层，将吸管尖的水层放出，以泡沫层均匀涂于玻璃片上。干后可反复涂1—2次。

（10）自然干燥。

（11）加温，染色。

（12）自然干燥，镜检。

（四）集菌法的优缺点

浮游集菌法的检出率并不高于厚涂片法。原因是集菌法在操作中须经稀释，以及瓶壁吸附菌体等，造成结核菌的损失；而厚涂片法则可随意选择痰液的可疑部分直接镜检，使检出率大大提高。但集菌法也有它的优点，主要是检出的结果比较稳定，特别是随着治疗的进展，从片子上可以较有规律地反映出菌量变化的动态情况，因此能给医师提供较为可靠的依据。而厚涂片法由于标本的挑选对检出的影响较大，因此反映菌量的动态规律性较差。另外，对尿液及胃液等标

本的检验以采用浮游集菌法为好，见下表：

胃 液 标 本 的 比 较

方 法	总标本数	浮游阳性	厚涂片阳性	培养阳性
例 数	130	9	5	12
%	100	6.9	3.8	9.2

五、结核菌的培养

结核菌的培养法，检出率较厚涂片法和集菌法均高。而且根据菌落的形态可以判断是否为结核菌。获得纯培养又可为进一步测定耐药性及进行科学研究创造条件。这些是直接镜检所无法做到的。使用培养法究竟能提高检出率多少，我所曾做过一次数量较大的对比，如下表：

2,529 份痰标本检出率的比较

	总标本数	阳 性 数		阳 性 情 况 分 析			
		厚涂片	培养	涂片(-) 培养(-)	涂片(+) 培养(+)	涂片(+) 培养(-)	涂片(-) 培养(+)
例数	2,529	258	503	1,988	217	38	286
%	100	10.2	19.9	78.6	8.6	1.5	11.3

从表可见培养法的检出率比厚涂片法约高一倍。

培养法也有它的缺点，主要是生长太慢，时间太久，同时，成本较高。如何使培养快些，即快速培养问题，多年来一直是国内外研究的课题，可惜到目前为止尚无一个满意的方法能使临床达到快速诊断的目的，这有赖于防痨工作者今后的进一步努力。下面介绍一种常用的改良罗氏固体培养法。用此法培养结核菌，快的可在第九天开始生长，一般二星期到20天为生长高峰。但阴性结果仍需要两个月方能报出。

(一) 器材的准备

以做一份培养基的量计算，约1,600毫升（可得培养基200支左右），需要准备器材如下：

- (1) 1,000毫升搪瓷量筒1个。
- (2) 2,000毫升玻璃球瓶1个。
- (3) 1,000毫升三角烧瓶1个。
- (4) 搪瓷漏斗1个（过滤鸡蛋用）。
- (5) 15毫米直径左右的玻璃漏斗1个，安装一小段橡皮管于口上，皮管中间加一弹簧夹以备分装培养基用。
- (6) 纱布2块（过滤用）。
- (7) 筷子一双（打鸡蛋用）。

以上所有物品均用纸分别包装，高压灭菌备用。

(二) 改良罗氏培养基的配方

- | | |
|-------------|-------|
| (1) 无水磷酸二氢钾 | 2.4克 |
| (2) 硫酸镁 | 0.24克 |
| (3) 柠檬酸镁 | 0.6克 |

- (4) 天门冬素 (可用味精代替, 量需加倍) 3.6克
- (5) 甘油 12毫升
- (6) 蒸馏水 600毫升
- (7) 马铃薯淀粉 30克
- (8) 新鲜鸡蛋液 1,000毫升
- (9) 2%孔雀绿水溶液 (先行高压灭菌) 20毫升

(三) 配方中各种培养成分的作用

简要说明如下:

(1) 碳源。主要为甘油及柠檬酸所提供。甘油除作为碳源外, 还作为菌体类脂体的主要来源。但量过多则对结核菌的生长有抑制作用。

(2) 氮源。主要为天门冬素或味精所提供。

(3) 磷酸二氢钾、硫酸镁等。主要供给磷、硫、镁、钾等无机盐类。结核菌生长所需的其他微量元素, 可从鸡蛋中获得。

(4) 鸡蛋。卵黄是结核菌生长所需的磷脂质的主要来源, 能促进结核菌的生长。卵白对于结核菌生长无益, 且过量似有阻止生长的作用, 但它能中和培养基内分解产物脂肪酸的毒性。整个鸡蛋所含的蛋白质在培养基中能起维持酸碱度稳定的主要缓冲体系的作用, 所以改良罗氏培养基不用调节酸碱度。

(5) 马铃薯淀粉。能显著促进结核菌的生长。

(6) 孔雀绿。主要为杂菌生长的抑制剂, 以减少培养基被杂菌污染的机会。