

胞壁来做,这样才能得到更确切的结果。

### (三) 细胞壁制备方法的改进

细胞壁的制备不仅操作工序多,而且又费时间,如王平的方法,每个菌株要用 10g 湿菌丝体,通过超声波破壁后,离心, KOH 皂化 2—3 天,洗涤几次,用胰蛋白酶、胃蛋白酶分别处理后,又洗涤 2—3 次,前后费时 3—4 天,最后只能得到很少一点细胞壁。这样测定大量菌株时就很难。为了解决这个问题,我们引用 Bousfield 处理节杆菌的方法(简称碱法)<sup>[4]</sup>来处理放线菌获得细胞壁,经过多次试验结果表明效果很好,而且方法既简单又容易。即将湿菌丝体 200mg,加 5% KOH 1ml,在 100°C 水浴中处理 40—50 分钟,使菌悬液由黄褐色变成清亮时为止,然后用蒸馏水洗涤 2 次,即得到细胞壁。通过涂片后用复红染色观察和氨基酸

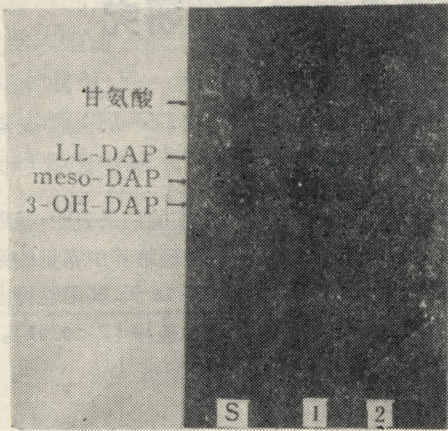


图 3 细胞壁和全细胞水解液氨基酸层析图谱

S: 混合氨基酸标准样; 1: 429A 的细胞壁; 2: 429A 全细胞水解液

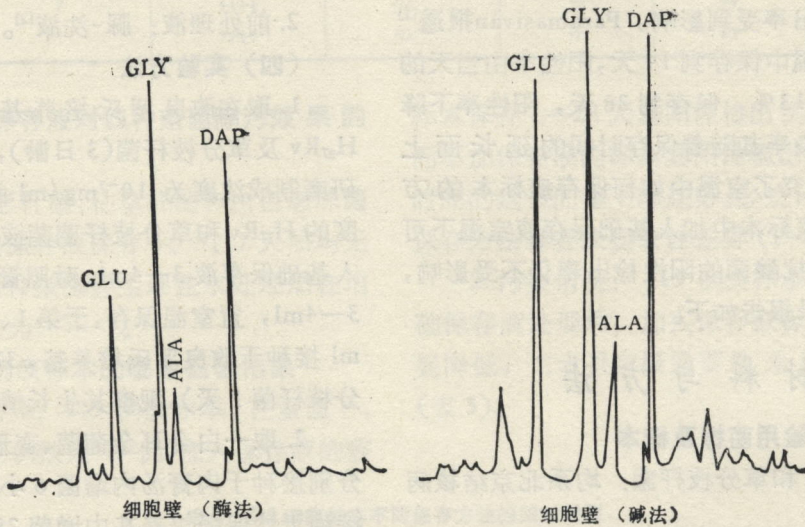


图 4 细胞壁氨基酸分析仪测定图谱

A. 酶法 B. 碱法

自动分析仪测定,结果都表明碱法制备的细胞壁完全能达到酶法制备的纯度(图 4)。

### 参 考 文 献

1. Becker B et al.: *Appl. Microbiol.*, **12**: 421—426, 1964.

2. Hasegawa T et al.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **29**: 319—322, 1983.  
3. 王平: *微生物学通报*, **13**(5): 228—231, 1986.  
4. Bousfield I et al. (eds): *Chemical methods in Bacterial Systematics* Academic Press, 222—236, 1985.

# 用于抗酸菌培养的痰标本室温保存方法的研究

宋志英 刘宇宁

(上海市奉贤县结核病防治所)

**摘要** 在痰标本中加入适量的基础保存液,作为在室温下保存痰标本的方法。实验结果表明,基础保存液对抗酸菌  $H_3R_v$  株及草分枝杆菌株无抑制作用,但对变形杆菌等痰标本抗酸菌培养中常见的杂菌具杀灭作用。219例临床痰标本的实验结果显示:痰标本用此法处理在室温中保存28天,其阳性检出率不受影响,与未经任何处理的在同样室温中保存的痰标本相比两者具有极显著性差异( $P < 0.01$ )。本方法可使痰标本在室温中保存21天,以保存14天以内为佳。

**关键词** 抗酸菌;痰液标本;室温保存;基础保存液

在农村及边远地区由于受人力、物力等因素的限制,病人的痰标本从留取到实验室检测的整个过程,往往需时较长,易使痰液标本抗酸菌培养的检出率受到影响。Paramasivan报道<sup>[1]</sup>痰标本在室温中保存到14天,阳性率由当天的88%下降至13%,保存到28天,阳性率下降至0,而污染率却随着保存时间的延长而上升。本文研究了室温中如何保存痰标本的方法,发现在痰标本中加入基础保存液室温下可保存4周,其抗酸菌的阳性检出率仍不受影响,现将实验结果报告如下。

## 材料与方 法

### (一) 实验用菌株及标本

1.  $H_3R_v$  和草分枝杆菌:均系北京结核病研究所提供。

2. 金黄色葡萄球菌(以下简称金葡菌),变形杆菌,枯草杆菌,白色念珠菌:均由上海医科大学微生物教研室提供。

3. 痰液标本:取自本所门诊病人当天的痰液。

### (二) 培养基

1. 肉膏汤培养基, 2. 营养琼脂培养基, 3. 沙保弱培养基, 4. 改良罗氏培养基。

### (三) 试剂

1. 基础保存液: 磷酸二氢钾 1.2g, 硫酸镁 0.12g, 味精 3.6g, 甘油 5ml, 蒸馏水 800

ml, 加热溶解,待冷,调正 pH 至 7.0, 然后再加入葡萄糖 4g, 硒酸钠 8mg, 洗必泰 1.6g, 混匀溶解后置室温保存备用。

2. 前处理液: 脲-洗液<sup>[2]</sup>。

### (四) 实验方法

1. 取在改良罗氏培养基上生长20天的  $H_3R_v$  及草分枝杆菌(3日龄),用无菌生理盐水研磨制成浓度为  $10^{-2}$ mg/ml 的菌液,取上述浓度的  $H_3R_v$  和草分枝杆菌菌液各 1ml, 分别加入基础保存液 3—4ml, 对照管加无菌生理盐水 3—4ml, 置室温保存,于第 1、7、14 天各取 0.1ml 接种于改良罗氏培养基, 37℃ 培养 4 周(草分枝杆菌 3 天),观察其生长情况。

2. 取一白金耳金葡菌、变形杆菌、枯草杆菌分别接种于肉膏汤内增菌 6 小时,白色念珠菌接种于沙保弱培养基内增菌 28 小时,然后均以无菌生理盐水稀释成  $10^{-3}$ mg/ml, 取菌液 1ml 加入基础保存液 3—4ml, 置室温中保存。金葡菌、变形杆菌和枯草杆菌于保存第 1、3、7 天各取处理后的菌液 0.1ml, 划线于营养琼脂平板上,白色念珠菌菌液 0.1ml 接种于沙保弱培养基,置 37℃ 培养,于 24、48 小时各观察一次细菌生长情况。

3. 为了观察基础保存液在室温中保存痰标本的效果,特选定上海地区的霉雨及高温季节

本文承蒙上海市结核病中心防治所陈惠兰主任审阅,特此致谢。

(4月下旬—9月下旬)作临床实验的时间。取病人留取的当天痰液标本( $\geq 10\text{ml}$ )219例,每份标本定量分成二份,一份加入基础保存液2—3ml混匀;另一份不加基础保存液。盖紧瓶盖,置室温( $22-33^{\circ}\text{C}$ )保存,于第1、7、14、21、28天时各取出标本1ml,作痰液抗酸菌培养。

## 实验结果

### (一) $H_{37}R_v$ 和草分枝杆菌 基础保存液作用后的生长情况

$H_{37}R_v$  和草分枝杆菌经基础保存液作用1、7、14天的生长情况与生理盐水对照无差异(表1)。

表1 基础保存液保存  $H_{37}R_v$  和草分枝杆菌的生长情况

	保存时间(d)	培 养 时 间 (d)				
		草分枝杆菌	$H_{37}R_v$			
			3	7	14	21
基础保存液	1	++++	少	++	++++	++++
	7	++++	少	++	++++	++++
	14	++++	少	++	+++	+++
生理盐水对照	1	++++	少	++	+++	++++
	7	++++	少	+	++	+++
	14	++++	少	+	++	+++

### (二) 基础保存液对四种杂菌除污效果 的观察

金黄色葡萄球菌、变形杆菌、枯草杆菌和白色念珠菌四种杂菌经基础保存液保存1、3、7天后均无细菌生长,而四种杂菌经生理盐水处理后在培养基上的生长均为“++++”。

### (三) 219例痰标本的临床检验结果

1. 阳性检出率: 219例痰标本,在室温下,当天培养其阳性例数为49例,加入保存液的痰

标本保存1—28天其阳性检出例数均为54例,而不加保存液的标本其阳性检出数却随着保存时间的延长而呈下降趋势,经统计学处理,两种保存方法存在极显著性差异( $P < 0.01$ )(表2)。

2. 污染情况: 219例痰标本经加与不加基础保存液处理后,加入保存液保存者污染率明显降低,二者具有极显著性差异( $P < 0.01$ )(表3)。

表2 219例痰标本不同保存方法的阳性结果

	室 温 保 存 时 间 (d)				
	1	7	14	21	28
加基础保存液	49(22.37%)	54(24.66%)	54(24.66%)	54(24.66%)	54(24.66%)
不加基础保存液	49(22.37%)	43(19.63%)	41(18.72%)	34(15.53%)	14(6.39%)

表3 219例痰标本用不同保存方法保存后的污染情况

	室 温 保 存 时 间 (d)				
	1	7	14	21	28
加基础保存液	9(4.11%)	5(2.28%)	9(4.11%)	15(6.85%)	15(6.85%)
不加基础保存液	9(4.11%)	35(15.98%)	47(21.46%)	63(28.77%)	67(30.59%)