

# 腹泻患者粪便病原微生物培养方法的探讨

苏加云(云南省楚雄彝族自治州广通医院检验科 651225)

**【摘要】** 目的 探讨腹泻患者粪便中肠道致病菌培养的方法。方法 粪便标本由微生物检验人员常规做粪便性状观察和盐水涂片革兰染色或抗酸染色镜检,用 5% 血琼脂平板、中国蓝琼脂平板、SS 琼脂平板、碱性蛋白胨水增菌液作一般细菌培养。结果 200 例腹泻患者粪便病原微生物检验诊断回顾性分析,传统培养方法分离的沙门菌属和志贺菌属细菌已不是主要的肠道病原菌。结论 传统的单一使用一种 SS 琼脂平板已经难以适应肠道致病菌发生的重大变迁,用 5% 血琼脂平板、中国兰平板、SS 琼脂平板、碱性蛋白胨水增菌液对腹泻患者粪便培养,并在培养之前,由微生物检验人员常规做大便性状观察和盐水涂片革兰染色或抗酸染色镜检,以提高病原菌的检出率。

**【关键词】** 腹泻; 粪便标本; 肠道致病菌; 培养基; 涂片

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2011.08.014 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2011)08-0924-02

**Discussion on the pathogenic microorganism cultivation method from feces samples of diarrhea patients** SU Jia-yun  
(Department of Clinical Laboratory, Guangtong Hospital of Chuxiong Yi Minority Autonomous Prefecture, Chuxiong, Yunnan 651225, China)

**【Abstract】** **Objective** To explore the enteropathogen cultivation method from feces samples of diarrhea patients. **Methods** Feces samples were tested by microorganism inspectors with routine observation and gram stain or acid-fast stain microscopic examination, and then blood agar plate with 5%, Chinese orchid agar plate, SS agar plate, peptone alkaline water media were used for general bacteria cultivation. **Results** We retrospective analyzed the feces samples of pathogenic microorganism from 200 diarrhea patients, and found out that the salmonella bacteria and bacterial isolated by traditional method were not the main enteropathogens. **Conclusion** The traditional and single method of SS agar plate is difficult to adapt to the changes of enteropathogens. Using feces samples from diarrhea patients cultured by blood agar plate with 5%, Chinese orchid agar plate, SS agar plate and peptone alkaline water media after routine observation and gram stain or acid-fast stain microscopic examination by microorganism inspectors could improve the reorganization rate of pathogenic bacteria.

**【Key words】** diarrhea; feces samples; enteropathogen; medium; smear

健康人体的肠道中栖居着大量的不同种类的微生物,组成了与人类健康极为重要的体内微生态环境-微生态菌膜屏障,参与机体营养、消化、吸收及整洁肠道,维护人体生命、健康起着极为重要的作用。感染性腹泻是各种病原体肠道感染引起的,包括病原细菌、病毒、寄生虫、真菌等。急性感染性腹泻的病原体以细菌居多,具有传染性的病原体易引起暴发流行,肠道感染引起的腹泻必须抗感染治疗,以针对病原体的抗菌治疗最为理想<sup>[1]</sup>。引起腹泻的细菌种类较多,目前认为临床常见的病原菌有革兰阳性球菌:金黄色葡萄球菌、结核分支杆菌、蜡样芽胞杆菌、艰难芽胞梭菌、白色念珠菌;革兰阴性杆菌:伤寒及其他沙门菌种、志贺菌属菌种、致病大肠埃希菌[肠毒素型大肠埃希菌(ETEC)、肠致病性大肠埃希菌(EPEC)、肠侵袭型大肠埃希菌(EIEC)、肠出血型大肠埃希菌(EHEC)]、弧菌属菌种、气单胞菌属菌种、类志贺邻单胞菌、小肠结肠炎耶尔森菌、弯曲菌属菌种等<sup>[2]</sup>。实验室如何对病原微生物的检出,是疾病诊断和治疗的关键。目前部分医院检验科微生物室对粪便标本培养仅使用 SS 琼脂平板,而 SS 琼脂平板中含有胆盐量较高,有较强的抑菌能力,属于一种选择性培养基,一般情况下 SS 琼脂平板用于分离沙门菌属和志贺菌属,革兰阳性球菌及部分革兰阴性杆菌不生长<sup>[3]</sup>。因此,这种传统的培养方法,已不能满足临床。用 5% 血琼脂平板、中国兰琼脂平板、SS 琼脂平板、碱性蛋白胨水增菌液对腹泻患者粪便标本进行培养,并在培养之前,由微生物检验人员常规做大便性状观察和涂片镜

检,重视条件致病菌的分离鉴定,结合症状、临床资料、综合分析处理培养结果,以提高肠道致病菌的检出率。

## 1 临床资料

**1.1 一般资料** 收集本院 2008~2009 年腹泻、大便次数增多(每天 3 次或 3 次以上,持续时间不超过 14 d),粪便性状异常(稀便、水样便,或黏液便、脓血便及血便),伴有恶心、呕吐、食欲不振、发热、腹痛及全身不适等门诊、住院患者 200 例粪便标本。

**1.2 试剂与仪器** 常用培养基:5% 血琼脂平板、中国兰琼脂平板、SS 琼脂平板(硫代硫酸盐、枸橼酸盐、胆盐、蔗糖琼脂平板)、沙保罗琼脂平板(均由郑州安图绿科生物工程有限公司生产)、碱性蛋白胨水增菌液(自配);诊断血清:沙门菌属诊断血清、志贺菌属诊断血清、致病大肠埃希菌诊断血清(多种)、O1 诊断血清、O139 诊断血清(卫生部兰州生物制品研究所)。普通培养箱、CO<sub>2</sub> 培养箱、生物显微镜、细菌微量鉴定管(杭州天和微生物试剂有限公司)。

**1.3 标本采集** 采集时间:腹泻患者应在急性期,并尽可能在用药之前,伤寒患者在发病 2 周以后。采集方法:(1)自然排便采集法,自然排便后,挑取有性状异常部位的粪便 2~3 g,液状粪便则取絮状物盛于无菌的容器内或置于保存液或增菌液中送检;(2)直肠拭子法:对难以获得粪便或排便困难的患儿及婴幼儿,可采用直肠拭子方法采集标本,标本采集后插入灭菌试管内送检。

**1.4 涂片** 结合症状、临床资料、粪便性状,分别作如下处理,(1)霍乱弧菌:①染色检查,标本为米泔样便,取新鲜标本涂片 2 张,用乙醇或甲醇固定,分别作革兰染色及 1:10 稀释的石炭酸复红染色,用油镜检查,观察有无呈鱼群样排列杆状或弧形革兰阴性杆菌;②悬滴(压滴)检查:取粪便制成悬滴(压滴)标本,检查细菌的动力,霍乱弧菌古典生物型和 El-Tor 生物型均呈穿梭状运动,在悬滴涂片中加入 O1 群霍乱弧菌诊断血清后,在显微镜下观察,若原运动活泼的现象停止,为制动试验阳性,可初步报告为“疑似 O1 群霍乱弧菌”;(2)葡萄球菌:疑似葡萄球菌引起的伪膜性肠炎患者,可取水样便或肠黏膜样物涂片,革兰染色后镜检,当见有革兰阴性杆菌明显减少,革兰阳性球菌大量散在或成堆(葡萄状)排列,可提示诊断;(3)艰难芽胞梭菌:取患者新鲜粪便涂片,革兰染色后镜检可见大量革兰阳性粗大球菌,无荚膜,卵圆形芽胞位于菌体一端,可提示诊断;(4)空肠弯曲菌:将粪便涂片作革兰染色,镜检可见细小、长而弯曲、呈 S 形或螺旋形、海鸥状的革兰阴性弧菌,可作初步报告“疑似弯曲菌”;(5)念珠菌:将粪便制成压滴标本,用高倍镜观察时可见光亮的卵圆形孢子或假菌丝,涂片革兰染色可见革兰阳性球菌瓜子形状的孢子或假菌丝,若仅见到孢子则报“找到革兰阳性球菌卵圆形芽生真菌孢子”,同时还有假菌丝则可报告“检出念珠菌”;(6)结核分支杆菌:将粪便涂片经抗酸染色,在淡蓝色背景下,抗酸杆菌呈红色,杆状、分支状、串珠状、V 形等,菌体细长或稍弯曲,两端钝圆,其他细菌和细胞呈蓝色。

**1.5 培养** (1)一般细菌培养:用无菌棉签多部位采集标本,在 5% 血琼脂平板、中国蓝琼脂平板、SS 琼脂平板上接种第一区,然后用接种环进行四区划线,因肠道标本含菌量大,每划完一区后先灼烧接种环后再划下一区,以求分离出单个菌落。置 37℃ 培养 24 h,观察结果,如粪便外观正常,有 2 种以上肠道正常菌群生长,则报告“肠道正常菌群生长”;如为异常粪便,乳糖不发酵菌落,为条件致病菌的,做纯培养、鉴定并报告。(2)致病大肠埃希菌:取样分别接种于中国蓝琼脂平板、5% 血琼脂平板、SS 琼脂平板,经 37℃ 培养 18~24 h,挑取发酵乳糖的菌落穿刺接种三糖铁(KIA),尿素—动力—靛基质(UMI)培养基进行初步生化鉴定,并进行血清学分型。(3)霍乱弧菌:将标本接种于碱性蛋白胨水增菌液培养,37℃ 培养 6~8 h 呈均匀混浊生长,表面有菌膜,转种 TCBS,37℃ 培养 16~18 h,挑取黄色可疑菌落进行相关生化试验及血清学 O1、O139 鉴定。(4)副溶血弧菌:将标本接种于碱性蛋白胨水增菌液,5% 血琼脂平板,增菌后转种 TCBS、SS 琼脂平板 37℃ 培养 18~24 h,挑取可疑菌落接种 KIA、UMI 培养基及作耐盐试验进行鉴定。(5)小肠结肠炎耶尔森菌:将标本接种 5% 血琼脂平板、中国兰平板、SS 琼脂平板,分别置 22~25℃ 及 35℃ 培养 48 h,根据溶血、菌落情况,挑取可疑菌落接种 KIA 和 MIU 培养基进行鉴定。(6)艰难芽胞梭菌:将粪便标本接种 5% 血琼脂平板、中国兰平板,作厌氧培养 48 h,挑取可疑菌落进行鉴定。(7)念珠菌:将标本接种含氯霉素的沙保罗琼脂平板和 5% 血琼脂平板,中国兰平板,置 25~30℃ 和 37℃ 培养 24~48 h,取培养物进一步鉴定。

## 2 结 果

传统方法粪便标本微生物培养,是依据 SS 平板上的细菌不发酵乳糖、菌落呈不透明或透明、无色或中央黑色的菌落性状,以检出沙门菌属和志贺菌属,对其他的肠道致病菌则可能被漏检;改用 5% 血琼脂平板、中国兰平板、SS 琼脂平板、碱性蛋白胨水增菌液、TCBS,并在培养之前,由微生物检验人员常

规做大便性状观察和涂片镜检,并填写在检验单相应的空格里,结合症状、临床资料、综合分析处理培养结果,重视条件致病菌,可提高肠道致病菌的检出。

## 3 讨 论

**3.1** 正常情况下,肠道中有多种细菌寄生,包括大量的厌氧菌属、肠球菌属,大肠埃希菌,肠杆菌属、变形杆菌属、粪产碱杆菌等各种正常菌群,含菌量甚多,仅以染色性和形态无法分辨是否为病原菌,因此,粪便标本一般不作涂片检查。只有怀疑霍乱弧菌及菌群失调所致腹泻时,才作涂片镜检<sup>[4]</sup>。但通过对 200 例腹泻患者粪便培养前的涂片镜检,发现涂片镜检对一些营养要求较高或难以培养的细菌,实验室条件又不完善时,对分析培养结果很有帮助。需注意的是难辨芽胞梭菌属于厌氧菌、空肠弯曲菌属于微需氧菌,结核分枝杆菌生长缓慢,需要特殊培养基,且难于培养。开放性肺结核患者的粪便涂片检查往往出现阳性结果,可能由于吞食了含有结核分枝杆菌的痰液所致,细菌学涂片检查对诊断肠结核有一定意义。念珠菌属粪便制成压滴标本,用高倍镜观察时可发现光亮的卵圆形孢子或假菌丝。因此,对于这类有形态特征的细菌作相应的涂片及染色是必要的。

**3.2** 肠道内有大量不同种类的微生物,粪便标本培养时,使用选择性 SS 培养基,可能使得部分肠道致病菌培养不出而漏检,因此,实验室人员应根据患者临床症状、粪便性状、涂片镜检等信息,选用培养基。5% 血琼脂平板不含任何抑菌剂,革兰阳性菌和革兰阴性菌在条件适宜时生长较好,虽然细菌生长较杂,但致病菌漏检概率可减低,并可观察菌落及其溶血性状,对细菌的初步鉴定有一定的帮助;SS 琼脂平板、中国兰平板,属于选择性培养基,这种抑菌能力强、弱配对互补,对肠道致病菌的检出是有益的;碱性蛋白胨水增菌液,TCBS 是用于霍乱弧菌和副溶血弧菌的培养,根据患者临床症状、体征及粪便性状选用。

**3.3** 金黄色葡萄球菌、蜡样芽胞杆菌、白色念珠菌在 SS 平板上不生长,因此若分离粪便中的致病菌时,未能提供适宜的培养基及必要条件,培养阴性结果不应报告“无致病菌”或“未检出致病菌”,而应以分离目的菌种的方式报告。金黄色葡萄球菌引起的食物中毒是由于摄入含有葡萄球菌肠毒素的食物所致。因为被污染的食物在加热后葡萄球菌可能因死亡而培养为阴性,但肠毒素受热后其毒力并不被破坏,该病的诊断主要依靠检测粪便及食物中的肠毒素。

**3.4** 志贺菌属是肠杆菌科中引起人类感染性腹泻的病原菌之一。菌痢以结肠的化脓性溃疡为基本病理变化,故急性期患者粪便中带有脓血,慢性和治疗后的患者粪便带黏液。志贺菌很少进入血流,临床上常常以粪便和肛拭子作分离培养。

**3.5** 沙门菌属细菌在自然界中广泛存在,是肠杆菌科细菌中最复杂的菌属,现已达 2 200 种以上的血清型,一些血清型对人致病,临床上表现为 3 种类型:肠热症、败血症和食物中毒<sup>[5]</sup>。食源性疾病是指通过摄食而进入人体的病原物质所引起的疾病,通常是指感染性或中毒性疾病,每年因食用不洁食物引起的食源性疾病屡见报道<sup>[6]</sup>。沙门菌是重要的肠道病原菌,在世界各地引起食源性疾病的沙门菌的血清型很多,一般以鼠伤寒、肠炎沙门菌为主<sup>[7]</sup>。

**3.6** O1 群霍乱弧菌包括霍乱弧菌古典生物型与埃尔托生物型,二者均可引起霍乱。非 O1 群霍乱弧菌引起的感染性腹泻,自 1992 年 10 月起分离到的非 O1 群霍乱弧菌比 O1 霍乱弧菌多,因此近年来也不断被人们所关注,有(下转第 927 页)

检结果不一致,在基层没有尿液沉渣分析仪的情况下,即使尿液干化学法检测阴性,也不可忽视尿液沉渣的检测<sup>[2]</sup>。

**3.1 干化学法检测尿液隐血和与 RBC 的关系** 干化学法测定细胞既可测定完整的 RBC 又可检测游离血红蛋白及有过氧化酶作用的其他物质(如肌红蛋白、菌尿)<sup>[3]</sup>。尿液的新鲜程度,肾脏或泌尿道疾病患者尿液中 RBC 破坏释放出血红蛋白,造成所谓 RBC 干化学法检查“假阴性”现象。另外,尿试纸浸取尿液时间过长均可导致假阳性。还有干化学法检测的原理是呈色反应,尿液标本如果含有干扰呈色反应的物质可使结果呈现假阳性或者假阴性,如 VitC 可以使结果呈现假阴性,所以当尿液分析仪报告阴性和微量的标本时,一般可以省略镜检。如尿液分析仪报告阳性结果时,须镜检。并要结合临床具体情况综合分析,找出引起尿液 RBC 阳性的真正原因。

**3.2 干化学法检测尿 WBC 与沉渣镜检法的关系** 干化学模块中检测 WBC 只属于间接反应,具有中性粒细胞浆中酯酶反应的特异性,其颜色深浅与中性粒细胞的多少呈比例关系,但它不与淋巴细胞、单核细胞起反应,故某些以淋巴细胞、单核细胞感染为主的疾病可以出现尿检与临床不符的现象<sup>[4-6]</sup>。本实验观测到 58 例标本,WBC 试纸模块阴性而镜检阳性的现象,约占总标本的 10.0%,若不镜检,易造成漏检。此外,WBC 的影响因素较多,在 786 份标本中,共检测到 26 例干化学阳性,镜检阴性的标本约占总标本的 12.7%。尿液白细胞出现假阳性的原因可能是:(1)由于尿液在膀胱贮存时间过长或标本放置时间过长,导致 WBC 破坏,酯酶释放到尿液中,造成干化学阳性,镜检阴性;(2)尿液中污染甲醛或高浓度胆红素或使用某些药物(如呋喃唑啉)时,可产生假阳性;(3)女性分泌物污染,含有大量扁平上皮细胞、小圆上皮细胞、鳞状上皮细胞污染可造成干化学法呈阳性而镜检呈阴性。尿液 WBC 出现假阴性的原因可能是:(1)温度偏低;(2)高比重尿、高糖尿;(3)尿液中含有某些大剂量药物(如头孢氨苄、先锋霉素);(4)大量尿蛋白(清蛋白大于 5 g/L)和胆红素;(5)尿液中 WBC 是以淋巴细胞

为主;(6)尿液大量脓细胞时,可使结果偏低或出现假阴性。

所以日常工作中必须结合临床综合分析,并正确理解干化学和沉渣镜检结果间的矛盾。特别对女性人群建议采用新标准,即尿液 WBC 正常范围(尿沉渣计数板)0~8 个/HP,红细胞正常范围 0~3 个/HP<sup>[6-8]</sup>。

综上所述,尿液干化学分析法在检测尿液白细胞、红细胞时作为过筛试验是一种简便快捷的好方法,但无法替代沉渣镜检法。两种方法相互补充,做到不误诊、不漏诊,为临床提供及时准确的数据。

#### 参考文献

- [1] 卫生部医政司. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:295-296.
- [2] 董德才,金大鸣. 尿液沉渣检查不可忽视[J]. 上海医学检验杂志,2000,15(2):65-67.
- [3] 丛玉隆,马俊龙,邓新兰. 尿液常规分析质量控制及临床应用体会[J]. 临床检验杂志,2001,19(4):241-243.
- [4] 袁玉德,张显达,张文陆. 两种尿沉渣定量检测结果差异原因分析[J]. 中华医学检验杂志,2005,28(7):753-754.
- [5] Brunzel NA. Fundamentals of urine and body fluid analysis[M]. Philadelphia:Saunders,2004:187.
- [6] 丛玉隆,马俊龙,岳秀玲,等. 中国健康人尿液显微镜检测法有形成分结果调查[J]. 临床检验杂志,2006,24(2):83-85.
- [7] 顾可梁. 尿有形成分分析几个问题[J]. 临床检验杂志,2006,24(1):74-76.
- [8] 沈强,施新颜. 尿液干化学法检测女性尿液白细胞与沉渣镜检结果比较分析[J]. 浙江临床医学,2007,9(6):842-844.

(收稿日期:2010-12-09)

(上接第 925 页)

的学者认为非 O1 群霍乱弧菌有引起霍乱大流行的潜在可能。因此,应重视非 O1 群霍乱弧菌的培养及检测。

**3.7 大肠埃希菌**虽是肠道内正常菌群之一,在机体抵抗力降低或发生定位转移时可造成感染,近年来由于广谱抗菌药物广泛应用和细菌耐药因子相互传递,耐药菌株明显增加,在临床上由大肠埃希菌所致的感染有所上升,并给治疗带来困难。致腹泻性大肠埃希菌种类很多,在发达国家或发展中国家均为腹泻的重要病原。在国内,其微生物学诊断技术长期滞后,常规应用的细菌培养和鉴定手段难以鉴别多种致腹泻性大肠埃希菌,故国内大多数腹泻患者的病原尚不能明确,尤其是儿童腹泻的病原<sup>[8]</sup>。因此,实验室检验人员应该高度重视致病性大肠埃希菌的检测。

长期以来,粪便标本细菌学检验主要是以分离沙门菌属和志贺菌属细菌为目的。但随着新的病原菌不断被发现以及各种因素造成菌群失调引起的腹泻不断增多,传统的粪便细菌学检验方法和内容已不能满足现代医学诊治的要求,通过用 5% 血琼脂平板、中国蓝平板、SS 琼脂平板、碱性蛋白胨水增菌液培养,且培养之前,由微生物检验人员常规做大便性状观察和涂片镜检,并填写在相应的检验栏,结合症状、临床资料、综合分析处理培养结果,可提高肠道致病菌的检出,为临床提供真

实可靠的病原学诊断依据。

#### 参考文献

- [1] 叶任高. 慢性腹泻. 内科学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2002:445-450.
- [2] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:746.
- [3] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:729.
- [4] 周庭银,倪语星. 临床微生物检验标准化操作[M]. 2 版. 上海:上海科学技术出版社,2010:275-277.
- [5] 张卓然,倪语星. 临床微生物学和微生物检验[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2006:111-118.
- [6] 李晓,罗山. 云南省食品中食源性致病菌污染调查[J]. 中国卫生检验杂志. 2005,15(7):846-848.
- [7] 张彩虹,林波,李罗少,等. 珠海市沙门菌食源性疾病情况分析[J]. 实用预防医学,2005,12(4):855-856.
- [8] 王金良. 致腹泻性大肠埃希菌感染的快速检验诊断[J]. 传染病信息,2004,4(2):204-207.

(收稿日期:2010-12-26)