

三种不同方法在临床诊断白色念珠菌的应用分析

广州第一军医大学珠江医院检验科 510282

吕苏成 柳青

提要 目的:通过三种不同试验的比较,选择一种快速、简便、准确和使用的方法,为临床白色念珠菌的确诊提供有效的依据。方法:分别用芽管法、对一硝基酚 6-N-乙酰- β -D-氨基半乳糖苷(NGL)酶法和培养显色法对 197 株酵母样真菌进行检测。结果:芽管试验阳性 113 株(57.36%),其中 8 株为类星型念珠菌;NGL 酶法阳性 122 株(61.42%),其中 16 株近平滑念珠菌阳性。培养显色法为绿色的 105 株(53.3%),只有念珠菌一种。结论:芽管法、NGL 酶法虽简便,但需两法同时使用结果才能更准确的诊断白色念珠菌;而培养显色法单一使用即较好。

关键词 芽管法 NGL 酶法 培养显色法 白色念珠菌

白色念珠菌是念珠菌菌属中最常见也是致病力最强的病原酵母菌之一。虽然临床实验室鉴定白色念珠菌有传统的手工法及各种鉴定条和全自动微生物鉴定系统,但这些都存在不同程度的缺陷,要么不准,要么费用高,同时操作繁杂。为找一种快速、准确、简便的方法,本实验室对传统的芽管法、直接测定特异性酶的 NGL 酶法及白色念珠菌直接分离培养显色法进行了比较。其鉴定方法分别介绍如下:

材料与方 法

1.材料

1.1 菌株来源

1.1.1. 白色念珠菌标准菌株(ATCC90028) 由省临检中心提供。

1.1.2. 试验菌株系本院临床送检标本分离而得,共观察 196 株计 10 种酵母样真菌。

1.2.试剂

1.2.1. 血清 本实验室自备。

1.2.2. NGL 本实验室自制。

1.2.3. 显色培养基 Albiacan ID,购置于生物梅里埃,法国。

2.方法

2.1. 芽管生成试验

2.1.1.收集正常人血清,于 60 °C10 分钟灭能,分装于小试管各 1ML 备用。将沙氏培养基 30 °C 生长 24~72 小时确诊为真菌的菌落用接种环挑取 2~3 个菌落与 1ML 血清混匀放 35~37 °C 水育箱 2 小时。

2.1.2.结果判定:先低倍镜转高倍镜发现有手镜样芽管生成者为白色念珠菌。

2.2. NGL 酶法

2.2.1.试剂配制:PH5.1, 0.1mol/L 醋酸缓冲液;0.5g/LNGL 底物液;称 NGL(分子量 342.3)50mg,溶于 PH5.1,0.1mol/L 醋酸缓冲液 100ml 中;10g/LNaOH 溶液。

2.2.2.操作:于小试管中加入 0.3g/ LNGL 底物液,将待检测的真菌悬浮其中,制成浓菌液,35~37 °C 温育 90 分钟,然后加入 10g/L LNaOH 溶液 1 滴,混匀。

2.2.3.结果判定:若出现明显黄色为阳性,初步判定为白色念珠菌或近平滑念珠菌。

2.3.培养显色法:

2.3.1.将所检测真菌直接接种于该培养基上,更为简便的是可将临床送检标本直接接种,37 °C24 小时后观察结果。

2.3.2.结果判定:白色念珠菌在此培养基上所生长菌落呈蓝色,其他念珠菌和酵母样菌为无色。

结 果

本次实验的真菌都经过 API 20 C 检测,共 10 种;其中白色念珠菌 104 株,热带念珠菌

20 株, 伪热带念珠菌 8 株, 近平滑念珠菌 20 株, 克柔氏念珠菌 10 株, 副克柔氏念珠菌 6 株, 类星型念珠菌 12 株, 皱折念珠菌 6 株, 酵母菌 6 株, 新型隐球菌 4 株, 另加标准白色念珠菌 1 株, 共计 197 株, 其鉴定结果详见表 1:

表 1 三种不同方法对 10 种真菌的反应

真菌类别	菌株数	阳性株数 (%)		
		芽管法	NGL 酶法	培养显色法
白色念珠菌	104	104 (100)	104 (100)	104 (100)
热带念珠菌	20	0	0	0
伪热带念珠菌	8	0	0	0
近平滑念珠菌	20	0	16 (80)	0
克柔念珠菌	10	0	0	0
副克柔念珠菌	6	0	0	0
类星型念珠菌	12	8 (67.67)	0	0
皱折念珠菌	6	0	0	0
酵母菌	6	0	0	0
新型隐球菌	4	0	0	0
ATCC10231	1	1 (100)	1 (100)	1 (100)
总计	197	113 (57.36)	121 (61.42)	105 (53.3)

表中显示, 197 株真菌用芽管法检测 113 株阳性, 其中白色念珠菌 104 株, 类星型念珠菌 8 株。用 NGL 酶法检测 121 株阳性, 其中白色念珠菌 104 株, 近平滑念珠菌 16 株。用培养显色法检测 105 株阳性, 均为白色念珠菌, 未见其他念珠菌阳性。

讨 论

近 30 年来随着广谱抗生素、皮质类固醇激素和免疫抑制剂的广泛应用及放射医学的不断发展, 病原菌和宿主之间的关系在不断的发展变化, 体内环境平衡紊乱, 菌群失调, 致使内脏真菌病例日渐增多, 其中尤以念珠菌发病率最高, 且主要为白色念珠菌(1);因此,如何检测念珠菌并提高阳性率,为临床提供正确的诊断依据,具有重要的临床意义。鉴定白色念珠菌的经典试验是厚膜孢子形成,需用特殊培养基并耗时较长(2)(3)。为了探讨适合于临床快速检测白色念珠菌的有效方法本文选择 3 种不同的的方法分别对 197 株真菌进行了比较。如芽管法,此为一种传统的方法,临床实验室较多采用,主要优点是简便、快速;但特异性不太高,类星型念珠菌反应阳性,于本文也得到证实。另据文献报道,热带念珠菌也可出现假芽管(3),且常有 5%常规分离的白色念珠菌芽管阳性的非白色念珠菌。

NGL 酶法,它是一种直接测定特异性酶的快速鉴定法。Perry(5)等证实白色念珠菌具有 β -一硝基半乳糖苷酶,可分解 NGL,使对一硝基苯酚游离,在碱性条件下显黄色;经我们试验,此酶在 PH5.1, 35~37 °C 时,对底物作用完全,黄色明显。这也是一种快速简便的方法。但近平滑念珠菌亦出现阳性。为了避免假阳性的出现,建议同芽管法合用,可排除近平滑念珠菌。

培养显色法(6)是一种直接分离培养鉴定方法。我们采用 Albican ID(生物梅里埃,法国),该培养基主要用于培养鉴定白色念珠菌。所含底物不详,但白色念珠菌在此培养基上生长呈蓝色菌落,其它念珠菌为无色。从本文 197 株真菌检测中得到证实。该种方法的优点为,培养、分离、鉴定一体化进行,起到了更为简便快速的效果,并且结果更为可靠,应为当前检测临床白色念珠菌的最佳方法。

从我们的实践工作中和本文所检测的结果显示,芽管法、NGL 酶法容易制备,是经济

实用的方法，但它们的共同缺点是易出现假阳性，并一定要通过分离养出纯菌落才能鉴定。为了提高检测白色念珠菌的准确率，最好两法合用。而培养显色法不存在以上问题，它不但快速，而且结果准确可靠；鉴定中也不需其它补充试验，标本接种到显色培养基上，出现蓝色菌落即可直接报告为白色念珠菌，不失为一种经济有效的好方法。

参考文献

1. 金学沫，因子抗体血清凝集法鉴定念珠菌之研究，白求恩医科大学学报，1989，3: 256
2. 中华人民共和国卫生部医政司编，全国临床检验操作规程，南京，东南大学出版社，1991: 450—451
3. 王高松，临床真菌学，上海，复旦大学出版社，1986: 22—27
4. Salkin IF, Land GA, HURD NJ, et al. Evaluation of Reast Ident and Uni-reast-Tek yeast identification systems. J clin Microbiol, 1987, 25:624
5. Perry iL, Miner GR, Carr DL. Rapid colorimetric Identification of condida albicans. J clin Microbiol, 1990,28:614
6. 周贵民，张军民，新发现的真菌病原菌及病原真菌检测，微生物检验通讯，2002春季刊