

結核桿菌培養的研究

III 本地結核桿菌對鏈黴素的敏感實驗

王鳳連

(中國協和醫學院細菌免疫學系)

一. 緒言

鏈黴素對於結核病的治療，無疑的是一種比較有效的藥品，但是我們都知道這藥的最大缺點是使第八神經中毒^[1]及使結核桿菌產生耐藥性甚至依賴性。^[2,3]神經中毒只危害到病人本身。但是，若細菌發生了耐藥性，其後果是比較嚴重的。因為，具有耐藥性的結核桿菌傳染給別人後仍具有耐藥的性質，若再用鏈黴素治療，不但無效，並且浪費金錢和使病人發生副作用，這是很不好的。所以在治療結核病人的過程中，應當測驗他體內結核菌對鏈黴素的敏感性。還有，在廣大人民中，也應測定結核菌對鏈黴素敏感的百分率。以觀察5—10年後這百分率的變化。

結核病在我國是一個重要的問題，人民蒙受的損害非常大。根據各地的統計數字推斷，平均每年每十萬人口中死於結核病的就有200—300人^[4]。此外更有許多患者因病而失去了工作能力。

現在鏈黴素在我國已經應用了數年。在國外雖然已有很多文獻，報告關於耐藥菌的問題^[5,6,7]。而在國內對這問題的注意還是不夠。本報告的目的在於：(一)介紹一個簡單的測定結核桿菌對鏈黴素敏感度的方法。(二)經過鏈黴素治療的患者痰中結核桿菌對鏈黴素的敏感度。(三)結核桿菌對鏈黴素敏感實驗的各種操作方法的討論。

二. 實驗方法和材料

本實驗中所用的材料除鏈黴素外都是自當地取材，方法也簡單。現在分別敘述於下：

1. 標本的來源與結核菌的分離法：本實驗共測定 231 株結核桿菌對鏈黴素的敏感度。在這些菌株中，11 份是本系貯藏的人型，牛型和鳥型結核菌株，其餘的是近二年來，自北京市結核病人痰中分離所得的。主要的來源是天壇華北人民醫院結核病療養院、陸軍醫院、第一衛生所、兒童醫院、本院附屬醫院和第三醫院等處。

分離結核菌的方法首先是濃縮或把菌集中，將雜菌去掉，再培養於固體培养基上。就是先將病人的痰，自痰盒中倒入無菌三號（150 毫米×20 毫米）試管內，加入等量無菌 10% 磷酸三鈉（ Na_3PO_4 ），搖勻，置 37°C 暖箱中，每天振盪一次，到第三天取出，於每分鐘 3,000 轉的離心沉降器中沉降 30 分鐘用無菌吸管吸出上清液，將沉渣接種於羅氏培养基^[8]及改良的含生物炭末的豌豆培养基中^[9]，置 37°C 暖箱中孵育之。每週觀察一次，約在接種後 3 到 6 週可有結核菌的生長。將生長的菌種保存，測定它對鏈黴素的敏感度。

2. 培养基的製備和鏈黴素的稀釋法：本實驗是採用固體豌豆培养基，這種培养基是 1945 年 Lawson 氏所首創的，經過改進成為本研究室培養菌種常用的培养基。這培养基可以供給優良之生長條件，作法簡單材料節省，現略述於下：——（1）將乾豌豆 200 克泡在 700 毫升自來水中在室溫中經過 24 小時。（2）換同量的水置 15 磅高壓蒸汽滅菌器中蒸 20 分鐘。（3）將豆水瀘出，將豌豆在乳鉢中研碎，用篩子將豆泥擠出。秤好 105 克豆泥，加入 150 毫升蒸餾水。加入第一次泡豆水及第二次蒸豆水各 30 毫升。（6）加入純甘油 7 毫升。（7）加入 2% 孔雀綠 1 毫升。（8）加入瓊脂 5 克搖勻，消毒後備用。

將鏈黴素用無菌蒸餾水稀釋到 1000 微克/毫升。將豌豆培养基分作等量的 4 瓶，用高壓蒸汽滅菌器消毒後置室溫使冷到 45°C 左右時（這時瓊脂尚未凝固），將鏈黴素加入使第一瓶中鏈黴素的含量為 100 微克/毫升，第二瓶為 10 微克/毫升，第三瓶為 1 微克/毫升。第四瓶不加鏈黴素作為對照。搖勻分別分裝在無菌三號試管中並使成斜面。待培养基凝固後將棉塞去掉，換上無菌乾軟木塞，置 37°C 暖箱中 24—48 小時，觀察有無雜菌生長，若有則不能用。若無可把它保存於冰箱中備用。

3. 標本接種法及結果的觀察：將分離出的每一個結核菌菌種都接種三支含不同量鏈黴素的豌豆培养基上，另外接種一支不含鏈黴素的豌豆培养基作為對照。接種後用蠟將管口的軟木塞封固，以免培养基中水份蒸發。然後置 37°C 暖箱中孵育，

每週觀察一次，並記錄生長情況。普通 4 週後，對照管中生長甚多。而對藥敏感的菌在含藥的培養基中則無生長，對藥有耐性的菌雖在含藥 100 微克/毫升的培養基中仍生長甚多。

三. 實驗結果

在作過的 231 份標本中，在標本接種後的第四週末。對照管中的結核菌均已生長甚好。在含鏈黴素的培養基內結核菌的生長情形則詳於表 1。

表 1 自病人痰中分離出的結核桿菌對鏈黴素的敏感度

	鏈 黴 素 的 濃 度	菌 種 數 目	百 分 率
敏 感 菌	1 微克/毫升 無生長者	94	40.7
	10 微克/毫升 無生長者	77	33.3
耐 藥 菌	100 微克/毫升 無生長者	25	10.8
	100 微克/毫升 有生長者	35	15.2
	總 數	231	100.0

通常結核菌對鏈黴素的敏感度在試管中是以 10 微克/毫升中無生長的作為標準；也就是說，當鏈黴素的濃度在每毫升培養基中含 10 微克以下而無菌生長時，這菌就認為具有敏感性。若在 10 微克/毫升以上仍有菌生長者，就叫作具有耐藥性。自表 1 中可看出在所測驗的 231 份標本中，74% 的菌對鏈黴素具有敏感性，10.8% 具耐藥性。15.2% 具有高度耐藥性。

在這 231 例中有 59 例是天壇華北人民醫院的住院病人，這些病人都有詳細的病歷，所以特將這一部分病人所用鏈黴素藥量與所分離出的結核菌對這藥敏感度的關係，作下列的分析：

自表 2 可以看出菌對鏈黴素的敏感度是與病人的用藥量有關係的。在對 10 微克/毫升鏈黴素具有敏感性的菌種中，70% 以上是未經鏈黴素治療的。在具耐藥性的菌種中，可以看出患者曾使用大量的鏈黴素作過治療，而使細菌發生了耐藥性。

表 2 病人痰中分離 59 株結核桿菌對鏈黴素敏感度與注射藥量的關係

結核菌對鏈黴素 之敏感度	注射鏈黴素量		未 注 射		注射 1—20 克		注射 21—40 克		注射 41—80 克	
	數 目	百分率	數 目	百分率	數 目	百分率	數 目	百分率	數 目	百分率
敏 感 菌 敏感於 1—10 微克/毫升	40		30	75	5	12,5	3	7,5	2	5
耐 藥 菌 抵抗 100 微克/毫升	19		5	26	4	21	2	11	8	42
總 數	59		35		9		5		10	

若看一下未注射鏈黴素的 35 例中，有 30 例 (86%) 是具有敏感性，有 5 例具有耐藥性。

四. 討 論

單純豌豆培养基，用來作鏈黴素敏感實驗，方法比較簡單，材料也非常節省，所以我們曾用這方法測定中國草藥對結核桿菌的抗菌效果^[10]，以及測定白葉、異菸肼的抗菌效果等，證明這方法是有它一定的實用價值。

可惜過去與臨床醫師的合作不夠密切，未能繼續觀察病人在不同治療時期中結核菌對鏈黴素敏感度的改變，並且這方法得到的結果較慢，主要是找出耐藥菌的百分率，對單個病人來說意義不大。所以願趁這機會將下述問題加以討論：

(1) 研究結核桿菌對鏈黴素敏感實驗的各種操作方法。(2) 體外結核菌對鏈黴素敏感度的影響因素。

(一) 測驗結核桿菌對鏈黴素敏感度的方法

測驗結核桿菌對鏈黴素敏感度的方法，可以分為三種：

1. 固體培养基法：不同的作者曾用固體培养基測驗結核桿菌對鏈黴素的敏感度。Pyle, Karlson 及 Youmans 諸氏，曾利用卵黃瓊脂培养基^[11,12]，Hauduroy 氏等曾利用羅氏 (Lowenstein) 培养基，而 Anderson 氏曾利用土豆卵黃培养基。操作時將不同量的鏈黴素與培养基混合，然後將處理過的病人的痰或其他標本直

接接種於其上，在 37°C 培養 2—4 週後即可得到結果。

2. 液體培養法：常用的培養基^[13]有 Dubos 氏培養基，Youmans 氏培養基及血清綜合培養基。先將培養基製備好然後分裝於燒瓶內。將鏈黴素用無菌手續稀釋到培養基中，使成不同稀釋度，搖勻、分裝到無菌試管內。接種時有的研究者用原培養於 Dubos 氏培養基中 7 天的菌液，也有人用自固體培養基中，刮下的菌再作成鹽水的懸液。接種後培養在 37°C 暖箱經 7—14 天後可觀察生長情形。觀察結核菌有無生長時是用液體培養基的混濁度作標準。這個方法比較快，但混濁有時可能是雜菌所致，還需要作塗片染色去證明，這是這方法的缺點。

(3) 玻片培養法：這法^[11,14]是將病人的痰塗勻在無菌玻片上，置於無菌雙碟內，在室溫或 37°C 暖箱中乾燥後將玻片浸入 6% 硫酸中 10 分鐘，再用無菌蒸餾水沖洗 10 分鐘，共沖洗二次，以去掉硫酸。用一無菌鑷子將玻片夾起裝入於含有不同稀釋度的鏈黴素液體培養基及不含藥的對照管內。將試管斜放於 37°C 暖箱內，玻片帶痰面向上，培養 5—7 天後，用萋耳氏染色法染對照管中之玻片，用顯微鏡檢查，若無結核桿菌，2—3 日後再染。若對照管中的玻片上已經有結核桿菌出現則可將其餘含不同稀釋度鏈黴素培養基中的玻片一一染色檢查。結核菌在那一稀釋度鏈黴素不生長時，就是他的敏感度。這個方法比較快，在臨床上檢查正在治療的結核病患者最為合適，但含菌較少的標本往往作不成功。

除上述三種方法外，還有人^[15]先用羅氏培養基或其他培養基，先自病人分離出結核菌，然後再用液體培養基或玻片法測定對鏈黴素的敏感度，這方法需 6—8 週得到結果，不合臨床治療時之應用。

總之，要選擇那一種方法，還需依據當時的情形，若是標本為痰而其中含結核菌較多時，就可用直接的玻片培養測定法；若標本是腦脊液、胸水、腹水、尿等，其中所含結核菌本來很少，若直接測定恐遭失敗，還是先分離出菌種然後再測定，比較可靠些。又根據以往研究者們的經驗，所有用液體培養基作鏈黴素敏感實驗時，都不能測出同一培養物中的敏感菌及耐藥菌。還有一點，就是液體培養基初次分離菌時比較容易受雜菌污染，不適宜於在初次分離菌時就作敏感實驗。固體培養基是可以避免以上這二點缺點的。

(二) 體外結核菌對鏈黴素敏感度的影響因素

據 Corper 氏^[16]的研究，試驗時所用的培養基影響甚大。營養充足的培養基

特別是含有卵黃者，可以抑制抗生素的效能，但 Schoenbach^[17] 發現血清或全血並不影響鏈黴素的作用。新鮮全血及免疫血清加於培养基內亦不能增加鏈黴素的效用。

另外有二種液體培养基即 Dubos 氏與 Youmans 氏培养基，是常用來測定結核菌對鏈黴素敏感度者，可是在 Fisher 氏^[8] 的研究中，發現同樣的菌種用上述不同的二種培养基測定對鏈黴素的敏感度時，結果不太一致，往往在 Youmans 氏培养基中含有較高濃度的抗生素時，結核菌能夠生長，而在 Dubos 氏培养基中則無生長。考察培养基之不同，發現在 Dubos 氏培养基中含有一種未飽和的脂肪酸叫作 Tween 80。少量 Tween 80 是結核菌的生長因素，可是他確能增強鏈黴素的效用。在 Fisher 氏的試驗中發現若只用基礎培养基時，菌種可以在含 1,000 微克/毫升的管中生長，若將基礎培养基中加入 0.05% Tween 80 時，則在含 1 微克/毫升鏈黴素的管中結核菌的生長就完全被抑制。所以 Tween 80 可以增強鏈黴素的制菌作用 1,000 倍。甘油也是培养基中不可缺的營養素之一，當它的含量為培养基的 2% 時，它的作用有些像 Tween 80，也可以增強鏈黴素的作用。此中原因可能是由於 Tween 80 及甘油的物理性質相近之故。此兩種物質均有降低表面張力的作用，故如將它們加入殺菌藥物內後，雖其本身無抗菌作用，但可增加藥物的殺菌力及穿透力。

百分之十的血漿及 0.2% 血清白蛋白在培养基中不影響鏈黴素的作用，且有中和一部分 Tween 80 及甘油的作用。

由上述事實看來，可知作鏈黴素敏感實驗時，培养基的選擇是要緊的，否則便會影響實驗的結果。

摘 要

本報告介紹了一種用豌豆培养基測定結核桿菌對鏈黴素敏感度的簡單方法，實驗的結果發現，自病人痰中分離所得的 231 株結核桿菌中，對鏈黴素敏感的共有 171 株 (74%)，中度耐藥的有 25 株 (10.8%)，而呈高度耐藥的有 35 株 (15.2%)。

根據對 59 例住院病人的治療情況的分析，發現應用鏈黴素劑量較多者，發生耐藥菌的機會也隨之加大，在 35 例未用鏈黴素治療的病人中，有 30 例 (86%) 具有敏感性。5 例雖未經治療而有耐藥的情形，可能是病人感染了耐藥菌或者是天然耐藥菌的關係。

在討論中對於各種測定鏈黴素敏感實驗的方法作了一個簡略的介紹及評價，關於影響實驗結果的因素，主要是培养基中 Tween 80 或甘油可增強鏈黴素的作用，而卵黃因增加結核菌的生長，間接地輕度降低了鏈黴素的作用。

誌謝：本項工作承謝少文大夫指導，及郭鈞大夫協助，特此一併致謝。

參 考 文 獻

- [1] Fowler, E. P., et al Toxicity of Streptomycin for the Auditory and Vestibular Mechanisms, *Am. Rev. Tuberc.*, 1949, **60**: 39.
- [2] Owen, C. R., et al Susceptible, Resistant and Dependent Tubercle Bacilli Isolated from Patients Treated with Streptomycin *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, **61**: 705.
- [3] Doane, E. A., et al Transmission of Streptomycin Resistant Tubercle Bacilli in man, *J.A.M.A.*, 1949, **140**: 1274.
- [4] 譚禮智：中國結核病問題管見，湘雅醫刊 1950, **1** (3): 1.
- [5] Sadusk, J. F. Sensitivity of Tubercle Bacillus to Streptomycin *Yale. J. Biol. Med.*, 1947, **19**: 890.
- [6] Школьникова, Е. А., Определение Стрептомициноустойчивости Туберкулезных Бацилл-глубинным Методом Проблемы Туберкулеза 1952, **5**: 31.
- [7] Wolinsky, E. et al Drug-Resistant Tubercle Bacilli in Patients under Treatment with Streptomycin *Am. Rev. Tuberc.* 1948, **58**: 335.
- [8] Jensen, K. A. Reinzuckung and Typenbestimmung von Tuberkel Bazillenstämmen, *Zentralblatt für Bakteriologie*, 1932, **125**: 222.
- [9] 金蔭桓，王鳳運，用培養法和地鼠接種法分離結核桿菌的觀察比較，微生物學報 1953, **1**: 91.
- [10] Wang, Fung Lien, In vitro Antibacterial Activity of some Common Chinese Herbs on Mycobacteria Tuberculosis, *Chinese Medical Journal*, 1950, **68**: 169.
- [11] Rubbo, S. D., A Slide-Culture Technique for Determining Streptomycin Sensitivity of M. Tuberculosis in Sputum, *J. Clin. Path.*, 1951, **4**: 173.
- [12] Youmans, G. P. et al. A Direct Method for the Determination of the Sensitivity of Tubercle Bacilli to Streptomycin, *Am. Rev. Tuberc.*, 1950, **61**: 569.
- [13] Fairbrother, R. W., et al. The Determination of the Sensitivity of M. Tuberculosis to Streptomycin, *J. Clin. Path.*, 1951, **4**: 183.
- [14] Cummings, M. M., A Slide Culture Method for Streptomycin Sensitivity Testing, *Diseases of Chest*, 1950, **17**: 202.
- [15] Medical Research Council Report by Pathological Sub-committee of the Streptomycin in Tuberculosis Trials Committee *Lancet* 1948, **2**: 862.
- [16] Corper, H. J., et al. *Yale J. Biol. Med.*, 1949, **21**: 181.
(錄自謝少文、趙家琪：耐鏈黴素結核桿菌對於治療肺結核之研究，內科學報，1950, **2**: 258.)
- [17] Schoenbach, E. B. et al. The Activity of Streptomycin in the Presence of Serum and Whole blood, *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1947, **66**: 493.

STUDIES ON THE CULTIVATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

III. *Experiments for the determination of sensitivity of local strains to streptomycin*

WANG FENG-LIEN

Department of Bacteriology and Immunology, Chinese Union Medical College, Peking

In the present report, the use of a simple bean medium for the determination of sensitivity of tubercle bacilli to streptomycin was introduced. By this method, it was found that among 220 strains of organisms locally isolated, and 11 stock cultures, 171 or 74% showed a sensitiveness to 10 ug/ml or less, 25 or 10.8%, to 100 ug/ml, while 35 or 15.2% were resistant to 100 ug/ml or more.

Analysizing 59 cases of hospitalized patients in whom details of treatment were available, it was found that drug resistance of organisms ran parallel with the amount of streptomycin given for therapeutic purpose. In 35 cases from which the organisms were isolated before treatment, 86% of the strains were sensitive. The cause for the resistance of the remaining five cases remained obscure; it is possible they were infected from patients whose organisms were rendered resistant by treatment, or the organisms were naturally resistant.

Because of the importance of the influence of methodology on the result of test for during sensitivity of Mycobacterium, various published methods were briefly reviewed and their value compared. It is especially pointed out that Tween 80 and glycerine have enhancing action, while egg yolk adminishing action on the activity of streptomycin on tubercle bacilli in culture media, and these must be taken into consideration in the evaluation of the result in such studies.