

關於血漿瓊脂平皿測定葡萄球菌凝固酶的研討

程松高 周全義

(北京醫學院微生物學教研組)

葡萄球菌產生凝固酶與否,及其與對人致病力的關係,自 1908 年 Much 氏^[1]報導以來,歷經許多學者研究^[2-5]證明是最可靠而又實用的一種鑑定病原性葡萄球菌的方法,多年來一直為國內外臨床化驗室普遍採用。

葡萄球菌凝固酶試驗一般採用試管和玻片兩種方法。然前法不僅操作繁瑣,器材耗費較多,且需先分離成純培養,因而延遲了出報告的時間。後法雖較簡捷,但陽性率不夠高,只達試管法 85% 左右^[6],且呈可疑反應者,仍需輔以試管法作證實試驗,否則可因血漿中之天然凝集素而出現假陽性。

為了改進凝固酶的測定方法, Penfold 氏^[7], Reid 和 Jackson 二氏^[8]相繼倡用血漿瓊脂平皿試驗法。據氏等之試驗證明,此法既可鉤取多個菌落在同一平皿上進行試驗,亦可取病原材料直接劃線接種,且試驗結果與試管法所得者幾乎完全一致;因而氏等認為可兼收簡捷準確之效。最近 Lack 和 Wailling 二氏^[9]採用此法也獲得良好結果。

與此相反, Williams 和 Harper 二氏^[6]報告試用此法結果僅少數血漿樣品用來令人滿意,且個別凝固酶陰性菌株在效果不好的血漿製成之平皿上亦可出現白環。Dubos 氏^[10]也指出此法可能因葡萄球菌之其他產物而出現白環,因而認為對此法之評價尚有待進一步之觀察。

究竟血漿瓊脂平皿法實用價值如何?可能有哪些因素會影響試驗結果?這些問題促使我們進行了以下試驗。

材料和方法

一、菌株:除金黃色葡萄球菌 4 株,白色和檸檬色葡萄球菌各 1 株係本教研組保存之菌種外,其餘均係新近自患者標本中分離得到者;計金黃色葡萄球菌 55 株,白色葡萄球菌 4 株,檸檬色葡萄球菌 1 株,共 60 株。

二、血漿:

1. 兔血漿(兔_{1,2,3}):三份兔血漿係分別自 3 只正常家兔心臟一次採集者。按 4 毫升血液加 1 毫升 4% 枸橼酸鈉溶液抗凝。

2. 人血漿(人_{1,2,3}):人₁係日本(BPCJ)出品之乾燥血漿;人₂係自正常人一次採集之新鮮血漿;人₃係自一高血壓患者放出之陳舊血漿。後二者用 A.C.D. 保存液抗凝。

3. 胎盤血漿(盤_{1,2,3}):均係北京醫學院附屬醫院血庫收集貯存者。用 A.C.D. 保存液

抗凝。

每份血漿均爭取同時進行下述各種凝固酶試驗，間隔最長者亦不超過 5 天。

三、凝固酶試驗：

1. 玻片法：按 Berger 氏法^[11]試驗。

2. 試管法：按 Williams 和 Harper 二氏^[6]方法（血漿 1:10 稀釋，細菌-大白金耳）試驗。

3. 血漿瓊脂平皿法：於 45°C 溶化之肉膏湯瓊脂（pH 7.2—7.4）內加 20% 血漿，混勻後於每平皿內傾注 12—15 毫升，製成血漿瓊脂平皿。

（甲）點種法：用白金耳取 24 小時瓊脂平皿培養物在上述平皿上塗種直徑約 4 毫米大小之圓點，每皿種 9—16 個菌株，置 37°C 孵箱，分別於 4、18、44 小時後觀察結果。現著明之白環者為陽性，白環模糊不清或甚狹者為可疑，無白環者為陰性（圖 1）。



圖 1 用點種法接種之血漿瓊脂平皿，孵育 4 小時，1—3 株葡萄球菌呈凝固酶陰性反應；4—9 六株呈陽性反應，其菌苔周圍可見明顯白環

（乙）劃綫法：取幼嫩培養物或混以適量其他細菌（干擾試驗）劃綫接種於上述平皿上，37°C 孵育 18 小時後觀察結果。

四、溶血試驗：接種於 5% 羊血瓊脂平皿孵育 24 小時判讀結果。

五、甘露醇發酵試驗：孵育一週做為最終判定時間。

六、溶纖維素試驗：按 Christic 和 Wilson 二氏介紹方法^[12]。

試驗結果及對結果的分析

一、凝固酶試驗結果與比較：上述 60 株葡萄球菌對各份血漿的各種試驗方法的結果見表 1。

除盤_{1,2,3}三份血漿外，其餘各份血漿均曾同時做成 1:5 稀釋液分別與 60 個菌株進行試管法試驗。結果與上表所示者幾乎完全一樣，僅 1:10 稀釋之兔血漿凝固硬度較差；此外有極個別菌株對各別血漿之兩種稀釋液之結果不一致。

表1 凝固酶各種試驗方法的結果

血 漿	菌 株 數															平皿法 陽性菌 株白環 明顯度			
	陽 性					可 疑					陰 性								
	玻片法	試管法		平 皿 法			玻片法	試管法		平 皿 法			玻片法	試管法			平 皿 法		
		3 小 時	18 小 時	4 小 時	18 小 時	44 小 時		3 小 時	18 小 時	4 小 時	18 小 時	44 小 時		3 小 時	18 小 時		4 小 時	18 小 時	44 小 時
兔 ₁	37	38	45	41	46	10	5	1	0	4	0	0	17	21	15	15	14	50 ⁽³⁶⁾	++
兔 ₂	43	44	45	40	48	6	1	3	1	6	0	0	15	13	14	14	12	54 ⁽⁴¹⁾	++
兔 ₃	30	44	46	48	48	41	15	2	0	0	0	0	14	14	14	12	12	19 ⁽⁷⁾	+++
人 ₁	33	35	42	23	44	45	7	9	9	1	1	1	19	16	9	36	15	14	++
人 ₂	43	47	47	41	49	52	6	0	0	5	1	0	10	13	13	14	10	8	+++
人 ₃	44	47	47	48	49	50	6	0	0	0	0	0	9	13	13	12	11	10	++++
盤 ₁	35	50	50	11	48	41	7	0	0	26	0	0	17	10	10	23	12	19 ⁽⁸⁾	+
盤 ₂	38	50	50	41	48	48	6	0	0	4	0	0	15	10	10	15	12	12 ⁽¹⁾	++
盤 ₃	35	49	49	30	44	31	8	1	1	14	4	0	16	10	10	16	12	29 ⁽¹⁷⁾	+

說明：一、玻片法有一自家凝集的菌株未計在內。
二、試管法血漿為 1:10 稀釋。
三、平皿法係點種法之結果。
四、括弧內數字為由陽性轉變為陰性(白環消失)之菌株數。
五、符號：++++ 示白環非常清晰，+++ 示白環很明顯，++ 示白環相當明顯，+ 示白環不够明顯。

上述 60 菌株在人₁血漿製成的血漿瓊脂平皿上進行劃線法試驗的結果，僅有 3 株與點種法者不符，其餘完全一致。

至於凝固酶各種試驗方法結果按平均值比較，及其與甘露醇發酵及溶血性之關係如表 2 所示。

表2 凝固酶各種試驗方法結果的比較
(並示其與甘露醇發酵及溶血性之關係)

菌 種	試驗 菌株數	甘露醇 發酵 陽性 菌株數	溶血 性 菌株數	凝 固 酶 陽 性 菌 株 數*				
				玻片法	試 管 法		平 皿 法	
					3 小時	18 小時	4 小時	18 小時
金黃色葡萄球菌	55	48	41	36	42	47	36	47
白色葡萄球菌	4	2	0	0	0	0	0	0
檸檬色葡萄球菌	1	0	0	0	0	0	0	0

* 9 份血漿的平均數。

從表 2 可以看出，平皿法在 4 小時判讀結果時陽性率不及試管法 3 小時的高，但 18 小時判讀之結果二法完全相同，而平皿法能直接劃線接種之優點是試管法所不具有；至於玻片法陽性結果僅及試管法和平皿法的 77%。

二、不同的基礎液對平皿法結果的影響：考慮到不同的基礎液對平皿法試驗結果有影響的可能性，我們選用了人₁和人₃兩份血漿分別與肉湯瓊脂和 1% 葡萄糖肉湯瓊脂(均

含 2% 瓊脂, pH 7.2—7.4) 製成 20% 血漿瓊脂平皿, 對 60 個菌株分別進行了試驗, 藉與肉膏湯瓊脂比較。結果: 所試三種基礎液對人₃血漿均能獲得同樣良好之效果; 對人₁血漿, 雖然在 18 小時後觀察之結果彼此間無顯著之差別, 但於 4 小時觀察結果時葡萄糖由浸湯有 34 株呈陽性, 肉浸湯有 39 株呈陽性, 而肉膏湯則僅有 23 株呈陽性, 由此可見, 前兩種基礎液對用於肉膏湯結果不好之血漿具有促使陽性結果加速出現之效力。

三、血漿濃度對平皿法結果的影響: 取人₁血漿與肉膏湯瓊脂分別製成 5%、10% 和 30% 血漿瓊脂平皿分別與 60 個菌株進行試驗, 藉與上述 20% 人₁血漿瓊脂平皿的試驗結果比較, 以觀察血漿濃度對平皿法結果的影響。試驗結果: 在 5% 血漿瓊脂平皿上, 所試菌株幾乎全不出現明顯白環; 在 10% 上呈陽性反應的菌株數較少, 且白環出現較晚; 30% 者與 20% 者結果一致。

四、平皿法陽性結果的形式及其與溶纖維素試驗結果的關係: 在血漿瓊脂平皿上出現凝固酶陽性結果的菌株中, 有不少菌株, 無論用點種法或劃綫法接種者, 其菌苔或單個菌落周圍的白環, 一般經 18 小時孵育之後, 在白環的內緣出現透明帶 (圖 2)。這種陽

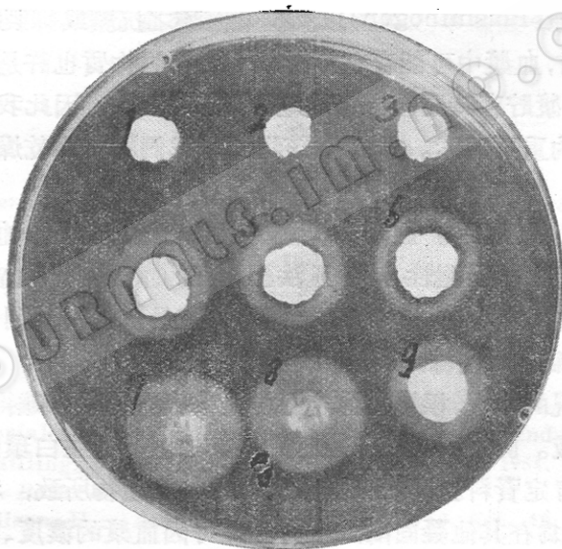


圖 2 為照片一之同一平皿, 孵育 18 小時, 1—3 三株仍呈陰性反應, 4—9 六株之白環增寬, 4—6 三株之白環內緣出現透明帶

性結果的形式也曾引起 Reid 和 Jackson 二氏^[8]的注意; 氏等並觀察到此種葡萄球菌多數具有溶血性, 但不完全一致。此點與我們所見大致相同。我們想到這種結果或許與溶纖維素的產生有關, 乃用人₁和人₂兩份血漿分別製成纖維素瓊脂平皿, 對 60 個菌株進行了溶纖維素試驗。結果即使在同一份血漿對比之下, 亦未發現兩者間的平行關係, 甚至差異很大。因此, 這種形式既不能做為溶血標準, 也不能當做產生溶纖維素的標誌。

五、關於其他細菌的生長對平皿法結果的干擾試驗: 我們用 1 株鏈球菌和 4 株凝固酶陰性葡萄球菌分別與陽性菌株適量混合後, 在人₃血漿製成的平皿上用劃綫法接種, 進行試驗。結果未見有干擾現象, 即所有陽性菌株均仍呈陽性結果, 其菌落周圍白環與純培養者同樣顯著。

六、血漿瓊脂平皿貯存時間問題: 我們在進行平皿法試驗時, 將每份血漿同批製就之

血漿瓊脂平皿貯存 1—2 個於 4°C 冰箱內。12—14 天後取出,用 15 個菌株按點種法進行試驗。在 4 小時判讀結果時有較多菌株不出現白環,但在 18 和 44 小時判讀之結果則與新鮮製備者完全一致。

討 論

一、關於血漿樣品對凝固酶試驗結果的影響:從上述結果可以看出,血漿瓊脂平皿法結果(陽性率、白環出現時間及其明顯程度等),誠然可因血漿樣品之不同而有差異;此點與 Williams 和 Harper 二氏^[1]所見者相似。然而此種情況同樣見於玻片法和試管法,且用於平皿法不能令人滿意之血漿、用於玻片法或試管法效果亦多半不好。因此我們認為不宜據此以貶低平皿法之實用價值。當然,我們應該同意 Williams 和 Harper 二氏意見:血漿在應用前應以相當數目的凝固酶陽性和陰性菌株進行試驗,但為求得結果準確,在玻片法和試管法對血漿似乎也有進行同樣檢驗的必要。

至於不同樣品之血漿的試驗結果所以不完全一致的原因,可能由於血漿中輔佐物(Co-factor)、血漿質原(Plasminogen)以及抗凝固酶之抗體或抑製物等因子彼此懸殊之故^[1]。然就平皿法而言,血漿中可能存在影響細菌生長的物質也許是這些因素之一。

再者,由於人血漿貯存時間較長,而其效果仍然良好,因此我們推測,血漿新鮮與否可能不是影響效果的重要因素。同時應該指出,我們所用的乾燥血漿(人₁)的效果不佳。

二、關於血漿瓊脂平皿法的“假陽性”問題:在同一菌株對同一血漿的試驗結果中,我們發現有玻片法和試管法均呈陰性,而平皿法呈陽性的情況。此種情況的出現,亦因血漿不同而有差異;在一些血漿(人₁、盤₃)並未見到,而在另一些血漿則出現率較高。最高者(人₂)約佔該血漿凝固酶陽性菌株的 7%,平均約佔 4%。

至於出現這種情況的原因,根據菌株來源均係自病人患處分離得到的情況看來,似乎可以認為此法比較敏感。固然我們沒有進行除外其他產物產生白環的試驗,但 Dubos 氏等也沒有提出有關的肯定資料。即使上述情況係由其他產物所致,我們認為亦不宜據以抹殺本法實用價值,因為在其他凝固酶試驗方法亦可因血漿的濃度、菌量以及其因素而出現相當高百分率的“假陽性”^[1]。

三、關於平皿法判讀結果的時間問題:從表 1 可以看出,較多數凝固酶陽性菌株於孵育 4 小時後即出現白環,但不少菌株需於 18 小時後始出現白環,故以孵育 18 小時作為結果的最終判讀時間較為合適。此外,胎盤血漿、兔血漿和人血漿不同之處,在於前二者經 18 小時孵育後,不少陽性菌株的白環逐漸擴散消失,尤以免血漿消失者為多,而人血漿則不然,一直保留明顯的白環直至 44 小時以後。此種現象的原因不明。由於我們試驗的每種血漿樣品為數不多,這種現象是否帶有較普遍的規律性尚不能斷言。

四、根據肉浸湯和 1% 葡萄糖肉浸湯對人₁血漿能促使陽性結果加速出現的情況看來,進一步改善培養基的基礎成分有可能克服 Williams 和 Harper 二氏所指出的、平皿法受血漿樣品限制的缺點,使平皿法收到更好的效果。當然,這還需要更多試驗來證實。

五、至於血漿瓊脂平皿點種法和劃綫法結果的一致性、陽性反應不受其他細菌生長的干擾以及血漿瓊脂平皿有效貯存時間等方面的試驗結果,與 Reid 和 Jackson 二氏所

得者相符。

總的講來，我們認為平皿法具有不少的優點，值得推廣試用。

總 結

一、不同樣品之血漿對平皿法結果有一定的影響，但對玻片法和試管法亦有相應的影響。一般而言，人血漿對各種方法效果較好。從平均數字看，平皿法結果幾與試管法者完全一致，而玻片法陽性率僅及它們的 77%。

二、在凝固酶陽性的菌株中約有 4—7% 菌株對 7 份血漿呈玻片法和試管法陰性而平皿法陽性之結果；但這些菌株均係自病人患處直接分離得到。

三、比較肉膏湯、肉湯及 1% 葡萄糖肉湯三種基礎液對平皿法結果的影響，發現後二者對個別效果不好（以肉膏湯為基礎液）的血漿，具有提加速陽性結果出現的作用。

四、用點種法或劃綫法接種血漿瓊脂平皿可獲得幾乎相同的結果，且陽性結果不受其他細菌同時生長的干擾。

五、血漿瓊脂平皿以含 20% 血漿為最合適。製就之平皿置 4°C 冰箱中至少可貯存二週不變質。

參 考 文 獻

- [1] Much, H.: *Biochem. Ztschr.* **14**: 143, 1908. 引自 Blair, J. E.: *Bact. Rev.*, **3**: 97, 1939.
- [2] Chapman, G. H., Berens, C., Peter, A., & Curcio, L.: *J. Bact.* **20**: 343, 1934.
- [3] Cruickshank, R.: *J. Path. & Bact.*, **45**: 295, 1937.
- [4] Fairbrother, R. W.: *J. Path. & Bact.* **50**: 83, 1940.
- [5] Moss, E. S., Squires, G. V., & Pitts, A. C.: *Am. J. Clin. Path.*, **11**: 857, 1941.
- [6] Williams, R. E. O., & Harper, G. J.: *Brit. J. Exp. Path.*, **27**: 72, 1946.
- [7] Penfold, J. B.: *J. Path. & Bact.*, **15**: 247, 1944.
- [8] Reid, J. D., & Jackson, R. M.: *J. Lab. Clin. Med.*, **30**: 155, 1945.
- [9] Dubos, R. J. *Bacterial and Mycotic Infection of Man*, p. 372, 2nd ed. 1952.
- [10] Lack, C. H., & Wailling, D. G.: *J. Path. & Bact.*, **68**: 431, 1954.
- [11] Berger, F. M.: *J. Path. & Bact.*, **55**: 435, 1943.
- [12] Christie, R., & Wilson, H.: *Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **19**: 329, 1941.

STUDIES ON DETERMINATION OF STAPHYLOCOCCAL COAGULASE BY MEANS OF PLASMA-AGAR PLATE

CH'ENG SUNG-KAO and CHOW CHÜAN-YI

(Department of Bacteriology, Peking Medical College, Peking)

Sixty strains of staphylococcus were used for the study of coagulase-producing ability by plasma-agar plate and compared with slide and tube methods with samples of human, rabbit and placenta plasma separately. Certain factors which effected the results of plasma-agar plate were also observed. The results are as follows.

1. Different samples of plasma not only effected the results of plasma-agar plate, but also effected those of slide and tube methods correspondingly. In general, human plasma was more satisfactory in all of the tested methods. In general, the results of plate method were in complete agreement with those of tube method, but the positive percentage of slide method only reached 77% that of other two methods.

2. There were 4—7% in coagulase positive strains isolated directly from pathogenic materials showing positive reaction in plate method but negative in tube and slide method against 7 samples of plasma.

3. Veal infusion and 1% glucose veal infusion were compared with beef extract as the basic medium for the plate method. The former two media showed accelerating effect, the positive reaction with the samples of plasma, while the latter was unsatisfactory.

4. The results obtained from plasma agar-plate by spot-inoculation were identical with those by streak-inoculation, and the growth of other bacteria did not interfere the positive reaction.

5. 20% plasma using for making plate was found to be most satisfactory. Prepared plates may be kept in refrigerator without deterioration as long as two weeks.

Finally, the evaluation of plasma agar-plate for practical purpose was discussed.