

# 炭疽杆菌串珠試驗的研究\* \*\*

李夏寿 过祥豹

指導者 汪美先

炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的鉴别,至今尚未完全解决。寻找簡便可靠的鉴别方法,仍是目前研究的课题<sup>[1-4]</sup>。Jensen 等<sup>[5]</sup>曾报告,炭疽杆菌在含适当浓度(0.05—0.5 单位/毫升)青霉素的培养基上,长成畸形的串珠,而其他需氧芽孢杆菌则不出現此反应,是为串珠試驗(Perlschnurtest)。其后,国外学者相繼证实此試驗的特异性<sup>[6-10]</sup>,但国内尚未見报告。由于原法是将烈性活菌在显微鏡下直接检查,有欠安全,在推广上受到一定限制<sup>[8]</sup>。为了进一步考驗串珠試驗的特异性,并探討在肉湯內进行串珠試驗的方法及条件,进行了本項研究。

## 材料及方法

### 一、試驗菌种

(一)炭疽杆菌:本校微生物学教研室保存菌种5株,兄弟单位贈与36株;另外,从皮毛厂皮毛、水、空气及土壤中分离108株,从患者、死畜及疫区皮毛、土壤等分离120株,共计269株。

(二)其他需氧芽孢杆菌:蜡样杆菌78株,根样杆菌13株,巨大杆菌4株,枯草杆菌7株,多粘杆菌1株,球形杆菌2株,短小杆菌2株,嗜热杆菌7株,未定种188株,共计302株。

上述已定种的其他需氧芽孢杆菌中,21株由中国科学院微生物研究所惠贈,82株由张孝齐同志鉴定,其余为教研室保存菌种或经我们自行分离、鉴定者。未定种菌种亦经初步鉴定証明确非炭疽杆菌,系由本市城郊区水、土壤、空气及皮毛厂标本中分离获得者。

二、青霉素鉀盐 华北制药厂出品。以中性灭菌蒸馏水稀释成50单位/毫升的储备液,小瓶分装冰冻保存。每次試驗时取出1瓶融化后稀释使用,余液即废弃。储备液冰冻保存时间最长不超过3个月。

三、青霉素琼脂平板 多蛋白胨基础琼脂, pH7.4,充分溶化冷至45℃左右,加入青霉素(1/20琼脂容量,最后浓度0.5或0.05单位/毫升),充分混和后倒平板,冰箱保存备用。

四、Tryptose 肉湯培养基 pH7.4。

### 五、串珠試驗方法

(一)琼脂法 取斜面新鮮培养物(或标本血平板分离的可疑菌落),移种肉湯,37℃水浴孵育4—12小时,取一滿接种环肉湯培养物滴于青霉素琼脂平板上,用无菌玻璃棒均匀涂布于1/2—1/4平板上,37℃孵育1—4小时(视青霉素浓度而定),取出平板,加蓋玻片后,直接用显微鏡低倍及高倍检查。

(二)肉湯法 取上述4—12小时肉湯培养物适量(接种后涂片低倍显微鏡检查,每視野含链杆菌5—10条),接种入另一1.8毫升的肉湯內,加入青霉素0.2毫升,使最后浓度为0.5或0.05单位/毫升,

\* 技术协助卓文言、陈民新。

\*\* 张孝齐同志曾提供部分菌种的鉴定结果,管德、曾铁二同志曾参加部分实验工作,謹此致謝。  
本文1964年9月17日收到。

37℃水浴孵育 1—4 小时,取出加入 20% 福尔马林 0.25 毫升(最后浓度 2%),固定 10 分钟后,涂片显微镜检查。

(三)判断标准 ++++: 菌体大而圆,均匀,排列整齐; +++: 菌体圆而均匀,排列整齐; ++: 菌体椭圆,排列整齐; +: 菌体均匀肿大,变粗; -: 形态仍为杆菌,阴性。+++ — ++++ 为典型串珠。菌体大小不一,不圆,不连续,排列不整齐者为“不典型串珠”。

結 果

一、串珠試驗肉湯法的探討

(一) 肉湯法与琼脂法对比試驗 曾以青霉素 0.5 单位/毫升作用 1—2 小时; 0.05 单位/毫升作用 3—4 小时,用琼脂法及肉湯法平行地检查了炭疽杆菌 22 株,其他需氧芽孢杆菌 24 株,最終結果一致(表 1)。

表 1 串珠試驗琼脂法与肉湯法的結果比較

菌 种	典 型 串 珠		“不典型串珠”		阴 性	
	琼 脂 法	肉 湯 法	琼 脂 法	肉 湯 法	琼 脂 法	肉 湯 法
炭 疽 杆 菌	20	20	2	2	0	0
其他需氧芽孢杆菌	0	0	2	2	22	22

表 1 炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的“不典型串珠”,琼脂法与肉湯法为相同的菌株,其形态与典型串珠差別明显(图 1—3)。

分析不同浓度青霉素作用不同時間后琼脂法与肉湯法的結果发现,两种方法的过程有一定差异(表 2)。

表 2 不同浓度青霉素作用不同時間后的串珠形成情况

方 法	0.5 单 位 / 毫 升		0.05 单 位 / 毫 升	
	1 小 时	2 小 时	3 小 时	4 小 时
琼 脂 法	+ — +++	+++ — ++++	+++ — ++++	明显破裂
肉 湯 法	+++	+++ — ++++(破)	+ — +++	+ — +++

从表中可以看出,青霉素浓度为 0.5 单位/毫升时,肉湯法出現典型串珠的时间較琼脂法为快。但青霉素浓度为 0.05 单位/毫升作用 3 小时后,琼脂法已出現典型串珠,而肉湯法則因細菌明显繁殖,串珠呈 + — +++ 不等; 4 小时后,肉湯法进展也不明显。故琼脂法以 0.5 或 0.05 单位/毫升青霉素作用 2—3 小时較好;肉湯法則以 0.5 单位/毫升青霉素作用 1—1.5 小时較好。后者基本上可代替前者。

(二)細菌浓度及青霉素浓度对串珠試驗(肉湯法)的影响 曾以不同数量的炭疽芽孢种入肉湯中,培养 3 小时,然后加入不同浓度青霉素于 37℃ 水浴中作用,連續观察 3 小时。

結果表明:細菌浓度对串珠試驗有明显影响。在同浓度青霉素同时間的作用下,細菌浓度愈高,串珠的形成愈不明显,形成典型串珠所需時間亦愈长。例如芽孢浓度为 5

万/毫升或更低,培养 3 小时后,0.5 单位/毫升青霉素作用 1 小时,已能形成“+++”的串珠;芽孢浓度为 20 万/毫升时,只见“++”的串珠;芽孢浓度达 100 万/毫升时,则只有“+”的串珠(图 4—6)。

同样,青霉素浓度对串珠试验的影响也很明显。在适当浓度细菌(如 5 万/毫升芽孢培养 3 小时)中,作用时间相同时,青霉素浓度愈高,串珠的形成愈明显;反之亦然(图 4, 7, 8)。

自然,由于每次的具体实验条件(如菌株差异)不同,所得结果也不完全相同。但从本结果中可以看出细菌浓度和青霉素浓度对串珠试验影响的基本规律。

(三) 串珠培养物的固定与消毒 实验中发现,串珠培养物进展至一定程度,即自行破裂,影响观察。为保持串珠的典型形态,并杀灭其中活菌,于芽孢增菌培养 3 小时、青霉素作用 1 小时的肉汤串珠培养物中加入 1/10 容量 20% 福尔马林,作用 10 分钟,可以达到固定串珠防止破裂,又有杀灭活菌保证安全的作用(表 3)。

表 3 2% 福尔马林对串珠培养物的消毒效果

炭疽芽孢浓度 (个/毫升)	青霉素浓度 (单位/毫升)	培养物中串珠 %	分 离 培 养		
			消 毒 前	消毒 10 分钟	消毒 20 分钟
100 万	0.05	0	+	—	—
100 万	0.5	50 <sup>±</sup>	+	—	—
5 万	0.5	100	—	—	—

二、串珠试验的特异性

为了观察串珠试验检查炭疽杆菌的阳性率及其他需氧芽孢杆菌的假阳性情况,曾应用肉汤法串珠试验(青霉素 0.5 单位/毫升,37℃ 水浴作用 1 小时),共检查了炭疽杆菌 269 株,其他需氧芽孢杆菌 302 株,结果如表 4。

表 4 炭疽杆菌及其他需氧芽孢杆菌的串珠试验结果

菌 种	检查株数	串 珠 试 验 (株)		
		典型串珠	“不典型串珠”	阴 性
炭 疽 杆 菌	269 (100%)	256 (95.17%)	13 (4.83%)	0
其他需氧芽孢杆菌总计	302 (100%)	0	23 (7.62%)	279 (92.38%)
蜡样杆菌	78	0	16	62
根样杆菌	13	0	1	12
其他需氧芽孢杆菌*	23	0	0	23
其他(未定种)	188	0	6	182

\* 包括巨大杆菌 4 株,枯草杆菌 7 株,多粘杆菌 1 株,球形杆菌 2 株,短小杆菌 2 株,嗜热杆菌 7 株。

从表中看出,269 株炭疽杆菌呈典型串珠者 256 株,占 95.17%;302 株其他需氧芽孢杆菌中,串珠试验阴性者计 279 株,占 92.38%。23 株“不典型串珠”中,除 1 株形态较典型(图 9)不易区别外,22 株均可与典型串珠鉴别(图 3)。故说明串珠试验有很高的特异性,可作为鉴别炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的有效方法之一。

有 13 株炭疽杆菌 (4.83%) 呈“不典型串珠”。这些炭疽杆菌均是从皮毛厂标本中分离获得,經鉴定: 菌落典型,革兰氏阳性鏈杆菌,肉湯中呈絮状沉淀生长,不溶血,无动力,青霉素琼脂平板 (10 单位/毫升) 上不生长,重碳酸鈉平板二氧化碳培养生长成粘液型菌落。其中 7 株經作噬菌体裂解試驗及荚膜肿胀試驗均阳性,証明均是有毒力的炭疽杆菌。但串珠試驗結果不典型,其形态特征为圓珠与杆菌相間,珠不成串(图 2)。其中 7 株經用琼脂法(青霉素 0.05 单位/毫升,作用 3 小时)試驗,結果与肉湯法同,証明不是肉湯法的原因。

23 株(7.62%)呈“不典型串珠”的其他需氧芽孢杆菌中,計蜡样杆菌 16 株,根样杆菌 1 株,未定种 6 株。其形态特征是不圓,不均匀;也有不圓的珠与杆菌相間或細胞近方形者,壁似較厚(图 10)。此 23 株需氧芽孢杆菌經以青霉素 0.5、0.05 单位/毫升,分別作用 1、3 小时,同时以琼脂法及肉湯法复試。結果发现: 青霉素浓度为 0.5 单位/毫升时,肉湯法及琼脂法均重現“不典型串珠”;青霉素浓度为 0.05 单位/毫升时,除 5 株外,余均保持杆菌形态(图 11),而炭疽杆菌則未見此現象。可見,其他需氧芽孢杆菌出現“不典型串珠”部分地与青霉素浓度有关,而与肉湯法无关。对“不典型串珠”的其他需氧芽孢杆菌,如降低青霉素浓度,其中大部分菌株 (18/23) 可以排除。同时发现,若将观察時間延長至 3—5 小时 (0.5 单位/毫升青霉素,肉湯法),則 23 株出現“不典型串珠”的其他需氧芽孢杆菌中,有 11 株恢复为杆菌形态,而炭疽杆菌則繼續发展,最終破裂。

此外,曾試驗过不同来源的炭疽菌苗株 8 株。結果也发现有 3 种反应类型,即典型串珠(如 CTN<sub>1</sub>)、“不典型串珠”(如苗 I)及串珠阴性(如兽用 II 号苗)(图 12)。

## 討 論

串珠試驗是炭疽杆菌在青霉素作用下所引起的形态学改变。通过連續观察(包括用相差显微鏡直接連續观察),发现串珠形成的基本过程是: 杆菌肿胀、变粗(+) → 繼續肿胀成椭圆形(++) → 形成圓形串珠(+++) → 圓珠增大,大者可达人紅血球大小(++++) → 破裂。在含 0.5 单位/毫升青霉素的肉湯中,此一过程約为 1.5 小时。不同菌株炭疽杆菌串珠形成的速度及程度有一定差异;在同一菌株培养物的同一視野內,有时也可見到变形程度不同的串珠。

串珠試驗的特异性,已为各学者的报告一致証实<sup>[5-10]</sup>(表 5)。Leise<sup>[9]</sup>的报告表明,串珠試驗的結果与两种噬菌体裂解試驗一致。Seidel<sup>[10]</sup>将它列为炭疽杆菌与蜡样杆菌快速鉴别的主要指标之一。Kielwein<sup>[8]</sup>亦認为串珠試驗是炭疽杆菌鉴定的可靠方法之一。

我們利用串珠試驗(肉湯法)检查了 269 株炭疽杆菌及 302 株其他需氧芽孢杆菌。結果可明显鉴别者共 557 株,准确度达 97.55%。269 株炭疽杆菌中,出現典型串珠者計 256 株(95.17%); 302 株其他需氧芽孢杆菌中,呈阴性結果者 279 株(92.38%),也証实串珠試驗有很高的特异性,具有鉴别的意义。本試驗操作并不复杂,出現結果也較快,可以作为炭疽杆菌的有价值的鉴定方法之一。

269 株炭疽杆菌中,13 株未出現典型串珠。在 8 株菌苗株中,“不典型串珠”1 株,阴性 2 株。文献中亦曾报告炭疽杆菌深刻变异株或耐青霉素株的串珠試驗可为阴性<sup>[5,7]</sup>,但 Leise<sup>[9]</sup>报告两株耐青霉素炭疽杆菌的串珠試驗均阳性。上述 13 株均是自皮毛厂标本中

表 5 串珠試驗特异性的文献資料

报 告 者	菌 种	株 数	阳 性	阴 性
Jensen 等 <sup>[5]</sup> (1953)	炭 疽 杆 菌	50	50	0
	其他需氧芽孢杆菌	43	0	43
Weidermuller <sup>[6]</sup> (1954)	炭 疽 杆 菌	12	12	0
	其他需氧芽孢杆菌	28	0	28
Gustafson 等 <sup>[7]</sup> (1956)	炭 疽 杆 菌	44	43	1*
	其他需氧芽孢杆菌	0	0	0
Kielwein <sup>[8]</sup> (1957)	炭 疽 杆 菌	48	48	0
	其他需氧芽孢杆菌	122	0	122
Leise <sup>[9]</sup> (1959)	炭 疽 杆 菌	66	66**	0
	其他需氧芽孢杆菌	61	0	61
Seidel <sup>[10]</sup> (1959)	炭 疽 杆 菌	80	80	0
	其他需氧芽孢杆菌	50	0	50
合 计	炭 疽 杆 菌	300	299	1
	其他需氧芽孢杆菌	304	0	304

\* 耐青霉素株; \*\* 包括耐青霉素株。

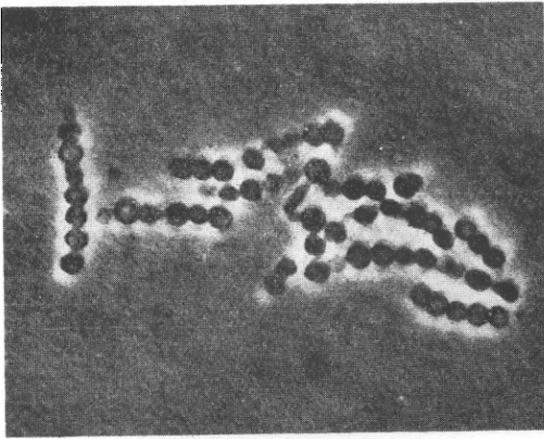
新分离得到的炭疽杆菌毒株,其串珠試驗不典型的原因,尙待今后研究。

302 株其他需氧芽孢杆菌中,呈现“不典型串珠”者 23 株(文献中亦有类似报告<sup>[5]</sup>)。但其中除 1 株与典型串珠較相似外,余 22 株均可明显区别,故若能正确掌握标准(+++—++++),則一般不致影响鉴定結果。

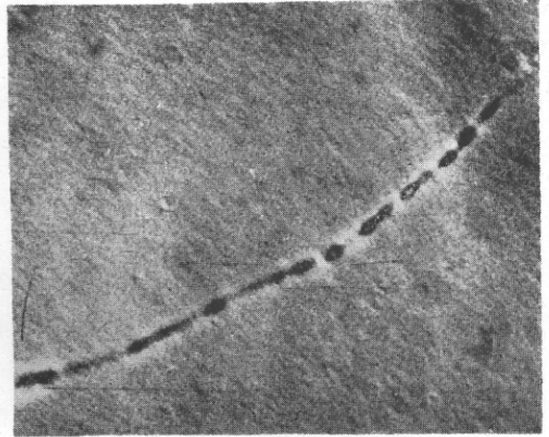
关于“不典型串珠”,文献中尙未見詳細描述。Jensen 等<sup>[5]</sup>文章的附图中,曾看到某些其他需氧芽孢杆菌在青霉素作用下,也可引起一定形态改变,但作者将它归之阴性。也有报告<sup>[5,7]</sup>謂个别炭疽杆菌深刻变异株或耐青霉素株串珠試驗呈阴性,但形态特征如何?未見报告。我們发现不仅某些其他需氧芽孢杆菌在青霉素作用下能形成“不典型串珠”,某些炭疽杆菌也有此現象,故須慎重处理。炭疽杆菌的“不典型串珠”与其他需氧芽孢杆菌的“不典型串珠”,从形态上一般不易区别。但降低青霉素浓度或延长观察時間,則可鉴别其中的大部分。然最終仍有极少数菌株难以区别。犹如 Kielwein<sup>[8]</sup>所指出的,不宜单凭串珠試驗作出鉴定。結合其他方法,如噬菌体裂解試驗,是必要的。

关于影响串珠試驗的主要因素, Jensen 等<sup>[5]</sup>早就指出青霉素浓度的作用。我們在实验中发现:当青霉素浓度在 0.05—0.5 单位/毫升范围内,接种一定量的細菌时,串珠形成的程度和速度与青霉素浓度成正比。肉湯法中以 0.5 单位/毫升青霉素作用 1—1.5 小时較好。青霉素浓度再高,則串珠破裂过速,并有增加其他需氧芽孢杆菌出現“不典型串珠”的可能。实验中并发现,接种的細菌量对串珠形成也有相当影响。在琼脂法中,曾发现細菌密集处的串珠不大圓。在肉湯法中,此种影响更为明显。因此,掌握适当細菌量很重要。一般以接种后涂片检查每一低倍視野含 5—10 条杆菌鏈为宜。

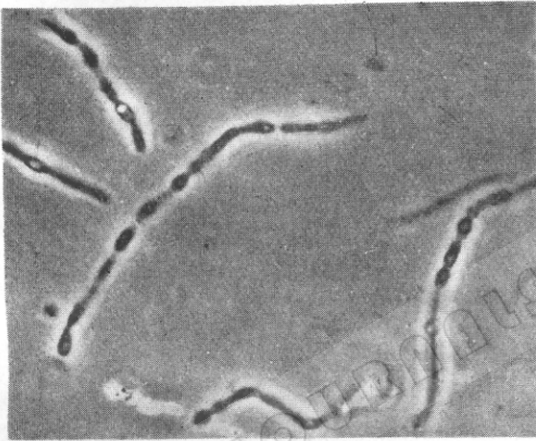
Jensen 等<sup>[5]</sup>的原法与 Seidel<sup>[10]</sup>的改进方法均系用固体培养基在“小平板”或盖玻片琼脂上进行。虽然琼脂法的結果一般較典型,但青霉素培养基的准备手續較繁,高倍鏡檢不



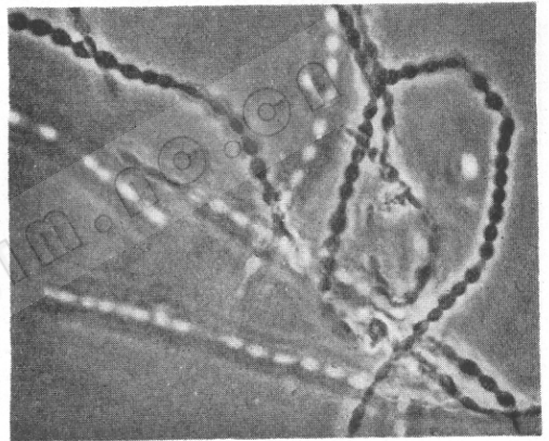
1



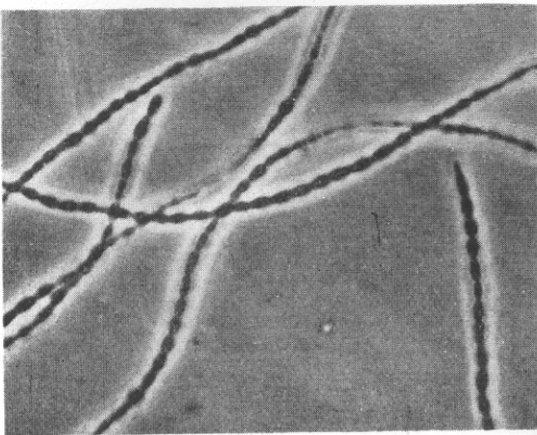
2



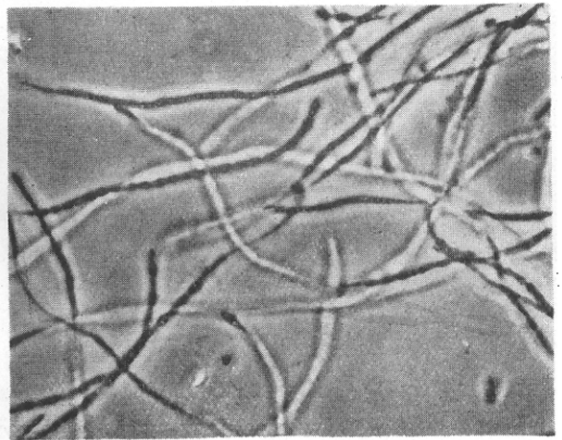
3



4

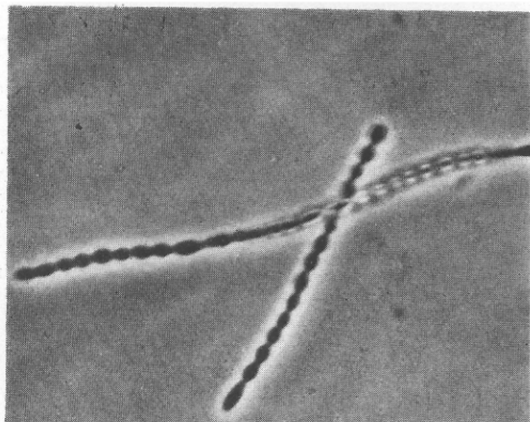


5

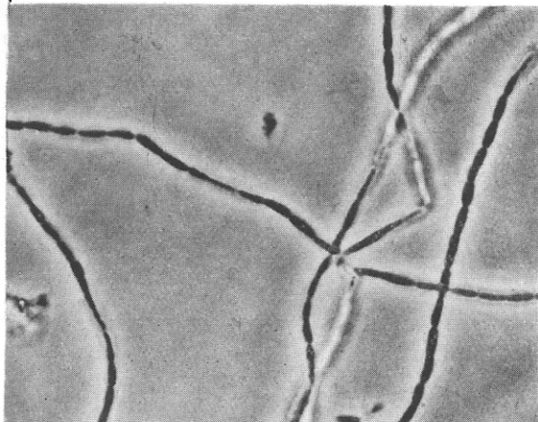


6

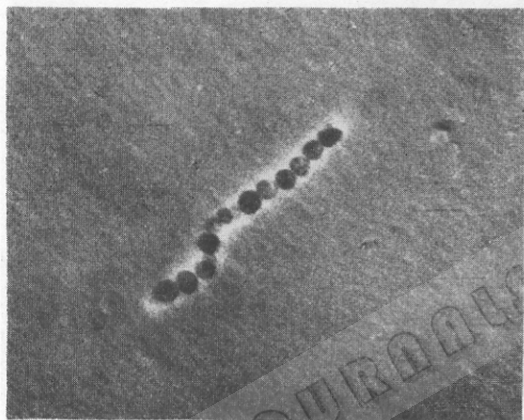
- 图1 炭疽杆菌典型串珠。  
图2 炭疽杆菌“不典型串珠”。  
图3 蜡样杆菌“不典型串珠”(皮40)。  
图4 炭疽芽孢 5 万/毫升, 培养 3 小时, 青霉素 0.5u/毫升, 作用 1 小时。  
图5 炭疽芽孢 20 万/毫升, 培养 3 小时, 青霉素 0.5u/毫升, 作用 1 小时。  
图6 炭疽芽孢 100 万/毫升, 培养 3 小时, 青霉素 0.5u/毫升, 作用 1 小时。



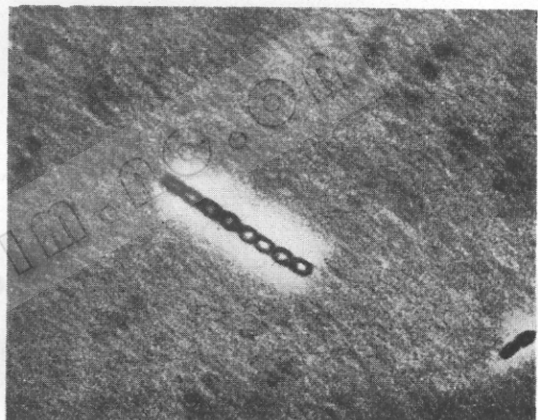
7



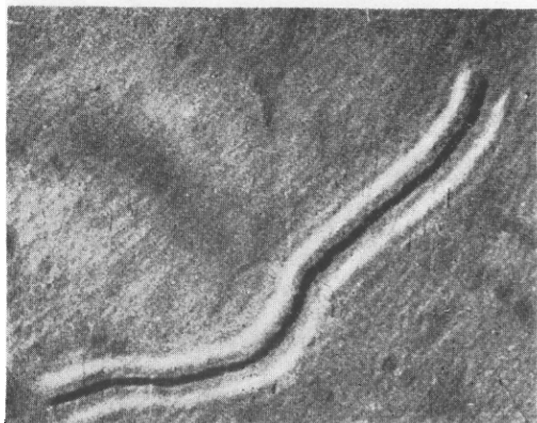
8



9



10



11



12

- 图7 炭疽芽孢 5 万/毫升, 培养 3 小时, 青霉素 0.2u/毫升, 作用 1 小时。  
 图8 炭疽芽孢 5 万/毫升, 培养 3 小时, 青霉素 0.05u/毫升, 作用 1 小时。  
 图9 蜡样杆菌(临: 痢), “不典型串珠”(与典型串珠不易区别)。  
 图10 蜡样杆菌(临: 痢), 0.5u/毫升, 青霉素作用 1 小时, 呈“不典型串珠”。  
 图11 蜡样杆菌(临: 痢) 0.05u/毫升, 青霉素作用 3 小时, 仍为杆菌。  
 图12 炭疽杆菌疫苗株(苗II), 串珠试验阴性。



便,不够安全。Jensen<sup>[11]</sup> 利用炭疽芽孢测定青霉素浓度的试验是在肉汤中进行。我们将串珠试验改在液体培养基中进行,得到与琼脂法基本一致的结果,并且解决了串珠固定及活菌消毒问题。肉汤法串珠试验也能解决某些特殊试验的需要,如炭疽杆菌增代时间的测定。对于少数出现“不典型串珠”的菌株,可延长观察时间或降低青霉素浓度鉴别之。

## 小 结

本文报告了串珠试验肉汤法,细菌浓度及青霉素浓度对串珠形成的影响,并比较了肉汤法与琼脂法串珠试验鉴定炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的结果,证明两种方法的结果基本相同。但肉汤法较为简便、安全。

269 株炭疽杆菌的试验结果,呈典型串珠者 256 株 (95.17%),“不典型串珠”者 13 株 (4.83%)。302 株其他需氧芽孢杆菌中,串珠试验阴性者 279 株 (92.38%),呈“不典型串珠”者 23 株 (7.62%),但其中除 1 株外,均可与典型串珠区别,证明串珠试验有很高的特异性。文中对串珠的形成过程、串珠试验对鉴别炭疽杆菌与其他需氧芽孢杆菌的意义,以及“不典型串珠”的鉴别方法,作了讨论。

## 参 考 文 献

- [1] Brown, E. R. & Cherry, W. B.: *J. Inf. Dis.*, **96**:34, 1955.
- [2] Burdon, K. L.: *J. Bact.*, **71**:24, 1956.
- [3] Brown, E. R. et al.: *J. Bact.*, **75**:499, 1958.
- [4] Burdon, K. L. & Wende, R. D.: *J. Inf. Dis.*, **107**:224, 1960.
- [5] Jensen, J. & Kleemeyer, H.: *Zbl. Bakt. (Orig.)*, **159**:494, 1953.
- [6] Weidmuller, H.: *Mh. Tierheik.*, **6**:186, 1954.
- [7] Gustafson, B. A. & Avchag, S. E.: *Nordisk Vet. Med.*, **11**:902, 1956.
- [8] Kielwein, G.: *Tierarztliche Umschau.*, **6**:183, 1957.
- [9] Leise, J. M.: *J. Bact.*, **77**:655, 1959.
- [10] Seidel, G.: *Zbl. Bakt. (Orig.)*, **175**:433, 1959.
- [11] Jensen, J.: *Zbl. Bakt. (Orig.)*, **155**:112, 1950.

## A STUDY ON “STRING-OF-PEARLS TEST” OF *B. ANTHRACIS*

LI LIANG-SHU AND KUO SHIANG-BAO

In this paper, the authors report a broth method to demonstrate the string-of-pearls reaction, the influence of concentration of bacterial suspension and of penicillin on this reaction, and the specificity of this test.

The results of broth method and agar method have been compared. Data indicate that, the results of both methods are mainly identical, but the broth method is more convenient and gives less risk to laboratory personnel.

Using the broth method, results from 269 strains of *B. anthracis* and 302 strains of other aerobic sporeformers were reported. 256 strains (95.17%) of *B. anthracis* showed typical string of pearls; 13 strains (4.83%) showed “atypical string of pearls”. Among the other aerobic spore formers, 279 strains (92.38%) were negative; the “atypical” reaction was found in 23 strains (7.62%) which, except one, could readily be differentiated from those showing typical reaction. The high specificity of the string-of-pearls test thus was confirmed.