

中國地鼠接種結核桿菌的研究

III. 用培養法和地鼠接種法分離結核桿菌的觀察比較

金啓桓 王鳳連

(北京中國協和醫學院細菌免疫學系)

關於中國地鼠接種結核桿菌的研究，在前兩篇報告中^[1,2]已經觀察到地鼠對於結核桿菌是相當敏感的，可以用來代替價值昂貴的荷蘭豬在實驗室中作結核病的診斷。並曾與羅氏、碗豆、卡介苗、錳化鉀等四種培養基的培養結果作比較，地鼠的陽性率是 69.3%，而四種培養法的總陽性率是 57.3%。這結果我們認為並不太滿意，因為當時每份標本只注射了一隻地鼠，而地鼠有時會因其他原因，在結核病變尚未顯出前死去；並且因為只有一隻地鼠，注射後，也不可能在短期內殺死作解剖，因為怕殺死過早而動物尚未顯示結核病變，以致影響了陽性率。在四種培養基中，羅氏培養基雖較好，但是材料複雜，操作麻煩，而且污染率較高，我們總希望能進一步改良價值便宜，易於操作的碗豆培養基，來供化驗室的普遍應用。此外，為了早期診斷，迅速得到結果，對玻片培養法也應進一步觀察其效果。

本實驗的目的，是將玻片培養法，固體培養基培養法與地鼠接種法，對初次分離結核桿菌，作進一步的觀察比較。每份標本接種了四隻地鼠，三種固體培養基及兩片玻片。

實驗方法和材料

1. 材料

(1) 標本來源：取自天壇華北人民醫院結核病療養院，為已知為肺結核病病人的痰，但直接塗片結果不全是陽性的。

(2) 玻片培養法：採用王氏培養^[3]。

(3) 固體培養：①羅氏培養^[4]。

②碗豆培养基甲：一將原來碗豆培养基^[5]經 15 磅 15 分鐘消毒後，冷到 45°C 左右，用無菌手續將血清及卵黃加入培养基中，使含量各成 5%。搖勻，分管，作成斜面備用。

③碗豆培养基乙：一將 1:400 動物炭末 (animal charcoal) 加入原來培养基中，然後消毒。再加入血清及卵黃，使含量各成 5%，作成斜面。

(4) 地鼠選擇：自市上買來，經本校動物室喂養三個月的健康地鼠。

2. 作法

標本取到後，分別置入無菌管內，加入等量無菌 10% 磷酸化三鈉，振動後，放入 37°C 暖箱中，經過 3 日 (每日取出振盪一次，以免濃痰不溶解而易致污染。) 取出後，放於每分鐘 2,000 轉的離心器內沉降 30 分鐘，以無菌吸管吸去浮液，用特製白金耳 (約是普通白金耳的兩倍量) 取沉渣分別接種於三種培养基，每一培养基接種一白金耳。然後放入 37°C 暖箱培養，每隔一星期觀察一次，並且記錄結核菌的生長情形。

再取沉渣，塗在二片無菌小玻片上 (因為是已經除去雜菌且經濃縮的標本，無需再用硫酸處理)，待乾後，用無菌鑷子，放入王氏培养基中，斜置暖箱內。培養 5 日後，取出一片作耐酸染色後鏡檢。再過 10 日後，取出另一片，作同樣染色鏡檢，記錄結果。

取剩餘標本，以無菌手續加入 2% 卵黃食鹽水約 1 毫升^[6]，搖勻後，每一標本接種四隻地鼠，每隻 0.2 毫升，作腹腔內注射。注射後，每隔一個月解剖一隻，觀察脾、肝、肺、淋巴腺有無病變，並作塗片用耐酸染色法染色，置顯微鏡下檢查。

實驗結果

現在將實驗結果分述於下：

1. 玻片培養法：三種固體培养基培養法與地鼠接種的結果比較：

本實驗在進行中途，因為動物室遷移，天氣較涼，所以有一小部份動物死亡，因而陽性率稍受影響。地鼠接種的結果，與培养基和玻片法的比較見表 1。

表 1 地鼠，培基和玻片培養陽性率的比較

種 類	結 果	標 本 總 數	陽 性 結 果	
			數 目	%
地鼠接種		106	82	77.3
玻片培養		106	47	44.3
三種培基		106	72	67.9

由上表知陽性率最高的是地鼠，三種固體培基的總陽性率仍較地鼠差，而玻片培養法又次之。

2. 地鼠接種法：地鼠接種法效果最好，呈現陽性結果的多在二個月內見表 2；死鼠解剖後病變所發生的部位見表 3。

表 2 地鼠接種陽性結果出現所需日期

標 本	陽 性	陽 性 結 果 出 現 所 需 日 期							
		一 個 月		二 個 月		三 個 月		四 個 月	
		陽性數	%	陽性數	%	陽性數	%	陽性數	%
總 數	結 果								
106	82	37	45	34	42	9	11	2	2

表 3 死鼠解剖病變的部位

病 變	數 目	脾	肝	肺	淋 巴 腺
		82	57	41	46
%		77.3	53.7	38.6	43.3

表 3 的解釋：

(1) 脾：74個病變者的脾上都有或多或少肉眼可見的結核存在，其餘 8 個僅有可疑病變，經鏡檢發現有結核菌。

(2) 肝、肺：有肝、肺病變者，在脾臟上都有較明顯的結核存在。

(3) 淋巴腺：在 40 個有淋巴腺病變的標本中，有的脾上也有顯著病變或鏡下檢出結核菌，另外有 6 個淋巴腺顯有腫大，但脾沒有病變，且細菌培養為陰性。

3. 固體培基培養法：在三種培基中，陽性結果以羅氏培基為最高，碗豆培基

乙次之,碗豆培养基甲又次之,但其污染率也是羅氏培养基最大,而碗豆培养基甲最小,結果見表 4。分析三種培养基生長結核菌平均所需日數,以羅氏培养基為最短(25天),碗豆培养基乙次之,但這差別是沒有統計學上的意義的;而碗豆培养基甲上生長最慢,見表 5。

表 4 三種培养基陽性結果的比較

培养基 \ 結果	標本總數	陽性結果	陽性率	污染數目	污染率
羅氏培养基	106	62	58%	16	15%
碗豆培养基甲	106	30	28%	4	4%
碗豆培养基乙	106	48	45%	13	12%

表 5 三種培养基培養陽性所需時間

時間 \ 種類	羅氏培养基	黃豆培养基甲	黃豆培养基乙
平均所需日數	25	38	27
最長日數	63	85	89
最短短日數	12	12	12

4. 玻片培養法: 因為污染較多,結果不太成功,在培養後的第 5 天及第 15 天,觀察結果,其陽性率出現所需日數見表 6。

表 6 玻片培養法陽性結果所需日數

標本	陽性	陽性結果所需日數			
		第 5 天		第 15 天	
總數	結果	陽性數	%	陽性數	%
106	47	37	80	10	20

討 論

為了尋求一種操作簡便;價值低廉的結核菌培养基,對於改進碗豆培养基,曾作連

續的努力。最初採用原來碗豆培养基^[7]，結果 90 份標本作分離結核菌，只有 24 份呈陽性。後來在原來碗豆培养基中，分別增加了卡介苗菌體，卵黃，及銻化鋅等，企圖改進這培养基的價值^[8]。結果發現在 100 份標本中，與羅氏培养基比較的結果，只有加卵黃的還比較好，但仍不如羅氏培养基。

本實驗在碗豆培养基中除加卵黃外，並加血清，企圖增進營養價值。本實驗中碗豆培养基甲和碗豆培养基乙唯一的不同點，就是在碗豆培养基乙中又加入了 1:400 的動物炭末。動物炭末的加入最初是應用在淋病球菌及腦膜炎球菌培养基中，原理是動物炭末可以將培养基中不利於細菌生長的不飽和脂肪酸吸走。本實驗也確證明了這一點。如表 4 中的結果，碗豆培养基甲的陽性率只 28%，而碗豆培养基乙的陽性率却是 45%。這個結果的差別是有統計上的意義的。

從三種培养基陽性結果的比較中，發現羅氏培养基的陽性率是 58% 而碗豆培养基乙只 45%，但是在分析實驗結果時，發現碗豆培养基乙在先作的 60 份標本中陽性率很高，且超過羅氏培养基，而在後作的 46 份標本中陽性率大減，見表 7。推其原因，可能與培养基製備後的放置時間有關。本實驗自接種第一份標本到接種末一份

表 7 碗豆培养基乙先後操作對結果的影響

標 本 總 數	60 (先作)		46 (後作)		106 總 數	
	羅氏培养基陽性數	31	51%	31	67.3%	62
碗豆培养基乙陽性數	36	60%	12	26%	48	45

標本中間歷時三個月，所用的羅氏培养基是每次用前新製備的，而碗豆培养基是一次製備出，所以當後來 46 份標本接種時，碗豆培养基已很陳舊，雖未污染，但是其中可能起了不利於結核桿菌生長的化學變化，而影響了陽性結果的出現。所以培养基的新鮮可能是一個很要緊的條件。

玻片培養法陽性率較低，可能這個方法不太敏感，也因為操作時污染較多；但其優點是培養所需時間短，在臨床早期診斷上仍有其實用價值。

在 400 餘隻地鼠的屍體解剖中。結核病變多見於脾臟，所以在常規中以地鼠分離結核菌時，應以觀察脾臟的結核病變為主。

本實驗 106 份病人標本中有 10 份是用玻片培養，固體培养基培養及動物接種等三法均呈陰性，可能這十份標本中根本無結核桿菌，則標本總數若按 96 份計算

時,玻片培養法陽性率是 49% 固體培养基培養法陽性率是 75%,而地鼠接種法的陽性率是 85%。

摘 要

1. 本實驗取 106 份結核病病人的痰,分別用固體培养基培養法,玻片培養法,及地鼠接種法作分離結核桿菌的比較,發現以地鼠接種法陽性率最高。

2. 碗豆培养基乙價格較羅氏培养基低的多,污染情形較少,且分離結核桿菌的陽性率與羅氏培养基差不太多,是值得再改進後而推廣應用的。

3. 因為地鼠接種法分離結核桿菌的陽性率較高,在設備較簡陋的化驗室中,製備培养基不容易,可採取地鼠接種法以分離結核桿菌。

誌謝: 本項工作承謝少文大夫指導,實驗標本係取自華北人民醫院並承郭鈞大夫協助,特此一併致謝。

參 考 文 獻

- [1] Wang, F. L., Meng, C. H., *Chinese Med. J.* 1951, **69**, 80.
- [2] Wang, F. L., *Chinese Med. J.* 1951, **69**, 155.
- [3] 王叔成、孫慧民,中華新醫學報,1950, **1**, 560.
- [4] 謝少文、周輯五,林氏細菌學檢驗法第 52 頁,1951。
- [5] Evan, F. L., *Pub. Health Rep. Wash.* 1946, **60**, 868, (Abs. from *Bull. Hyg.* 21, 196, 1946).
- [6] Pierce, C. et al., *J. Exp. Med.* 1947, **86**, 159.
- [7] Meng, C. H. and Wang, F. L., *Peking Natural History Bulletin*, 1949, **18**, 95.
- [8] Meng, C. H. and Kuo, C., *Chinese Med. J.* 1950, **68**, 383.

III. COMPARATIVE STUDY OF ISOLATION OF TUBERCIE BACILLI BY CULTURE AND HAMSTER INOCULATION

CHIN C. H. and WANG F. L.

*Department of Bacteriology and Immunology, China Union
Medical College, Peking, China*

In this report, 106 specimens of sputa from patients known to be suffering from pulmonary tuberculosis were inoculated on to three kinds of solid media, examined by slide culture method and also by hamster inoculation for comparative study in the relative efficiency for the isolation of tubercle bacilli for diagnosis. It was found that animal inoculation yielded the highest percentage of positive result. The percentage of positive result was 44.3 with slide culture; 67.9% with solid media and 77.3% by hamster inoculation. Among the culture media employed, it was found that modified Lawson's bean medium enriched with 5% egg yolk, 5% serum and 1:400 animal charcoal yielded about the same percentage of positive result as Lowenstein's medium, but it was much cheaper and had fewer contamination. It was suggested that by further improvement, it may be suitable for more general use.

Since it was found that Chinese hamsters are very useful in the isolation of the tubercle bacilli, from materials from clinical cases, it may be usefully employed in laboratories where facilities for the preparation of media are limited.