

硫酸铜亚碲酸钾鸡蛋琼脂培养基培养白喉杆菌的实验观察*

邓 涤 夷 王 玮

(福州铁路卫生防疫站,福建)

在白喉流行季节,及早发现带菌者并查明传染源,在流行病学上具有重要意义。近年来我们用硫酸铜亚碲酸钾鸡蛋琼脂培养基(简称铜一碲培养基),进行抑制杂菌、分离白喉杆菌的试验,得到了较满意的结果,现报告如下。

材 料 与 方 法

一、供试菌种

1. 白喉杆菌 605 和 804 菌株。

2. 金黄色葡萄球菌(自咽喉标本中分离得到)。

3. “杂菌”:取自咽喉标本,经混合培养、染色、镜检,其中有阳性球菌、杆菌和链球菌。

二、分离样品

1,771 例小学生的 2,087 份咽喉标本。

三、铜一碲培养基的制备

1. 基础培养基(克): 蛋白胨(日本产)1,

* 参加本实验的还有陈毓玲同志。

豚豚 0.5, 牛肉膏 0.3, 氯化钠 0.5, 琼脂粉(日本产) 2.5, 蒸馏水 100 毫升, pH7.6。

2. 补加溶液: 20% 葡萄糖溶液, 1% 亚砷酸钾溶液; 5% 硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 溶液, 上述溶液均过滤灭菌备用。

3. 无菌操作下调匀的鸡蛋。

待基础培养基冷至 60℃ 左右, 加入 20% 葡萄糖液 10 毫升、鸡蛋 15 毫升、1% 亚砷酸钾液 1 毫升摇匀, 再加 5% 硫酸铜溶液若干毫升 (0.3、0.4、0.5、0.8、1.0 毫升), 摇匀即成铜—砷培养基。

试验结果

一、加有不同量 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基对细菌生长的影响

1. 将已稀释的菌液 (每毫升含金黄色葡萄球菌和“杂菌”各 10 亿个, 白喉杆菌 605 和 804 菌株, 每毫升各含 1 亿个), 分别接种在加有不同量的 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, 37℃ 培养 24 小时, 观察细菌生长情况 (见表 1)。

2. 取每毫升含金黄色葡萄球菌、“杂菌”各 50 亿个, 及每毫升含白喉杆菌 605 和 804 菌株各为 1 亿个的菌液, 等量混合接种在加有不同量 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, 37℃ 培养 24 小时。结果表明, 在加有 0.3 毫升 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, “杂菌”被明显抑制, 而金黄色葡萄球菌生长丰满, 其菌落数与白喉杆菌菌落数大致相等, 在加有 0.4 毫升 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, “杂菌”不生长, 金

黄色葡萄球菌减少, 白喉杆菌占优势。而在加有 0.5 毫升 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, 金黄色葡萄球菌明显被抑制, 白喉杆菌几乎成了纯培养。在加有 0.8、1.0 毫升 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上白喉杆菌显著减少。

3. 取白喉杆菌 804 菌株的培养物, 稀释为每毫升 10 亿个细菌, 再以 10 倍稀释至 10^{-7} — 10^{-8} (即每毫升含白喉杆菌 100 个和 10 个), 各取 1 毫升, 分别接种在加有不同量 5% 硫酸铜溶液的铜—砷培养基上, 每一稀释度接种 5 个, 37℃ 培养 24 小时, 计算生长菌落的平均数 (见表 2)。

表 2 说明, 培养基中加入 5% 硫酸铜溶液 0.3—0.5 毫升, 不影响白喉杆菌的生长, 当加入 5% 硫酸铜溶液 0.8 毫升时, 白喉杆菌菌落数显著减少, 当加入 5% 硫酸铜溶液 1.0 毫升时, 白喉杆菌全部被抑制。

二、铜—砷培养基对 2087 份咽喉标本的检测

在此试验的同时, 用亚砷酸钾血液琼脂培养基 (简称砷—血培养基) 和鸡蛋斜面培养基作对照, 比较白喉杆菌的阳性检出率。

1. 2087 份咽喉标本菌株分别接种在铜—砷培养基和砷—血培养基上或鸡蛋斜面培养基上, 每个培养皿上接种 8 份标本, 37℃ 培养 24 小时, 观察菌落颜色和形态, 如有可疑的白喉杆菌菌落, 可转种吕氏 (Loeffler) 血清斜面或鸡蛋斜面培养, 进行染色, 并作生化鉴定和毒力试验 (用豚鼠皮内法)。

2. 用铜—砷培养基与砷—血培养基组成三

表 1 加不同量的 5% 硫酸铜溶液对试验菌株的影响

菌落生长情况 菌种名称	加入 5% 硫酸铜量 (毫升)					
	0	0.3	0.4	0.5	0.8	1.0
白喉杆菌 605	+++	+++	+++	+++	++	+
白喉杆菌 804	+++	+++	+++	+++	++	+
金黄色葡萄球菌	+++	+++	+++	++	-	-
“杂菌”	+++	+	+	-	-	-

注: “+++”菌落多数; “++”菌落在 10 个以上; “+”菌落在 10 个以下; “-”无菌落。

表 2 加不同量 5% 硫酸铜溶液对白喉杆菌 804 菌株的生长影响 (平均值)

菌落数 (个)	加入 5% 硫酸铜量 (毫升)	稀释倍数					
		0	0.3	0.4	0.5	0.8	1.0
10 ⁻⁷		80	85	84	96	26	0
10 ⁻¹		10	10	8	8	3	0

表 3 铜-碲培养基与碲-血培养基对白喉杆菌检出情况

标本数 (份)	阳性 (份)	阳性率 (%)	铜-碲培养基(+) 碲-血培养基(-)	铜-碲培养基(-) 碲-血培养基(+)	铜-碲培养基(+) 碲-血培养基(+)
1011	78	7.7	23	4	51

表 4 铜-碲培养基与鸡蛋培养基对白喉杆菌检出情况

标本数 (份)	阳性 (份)	阳性率 (%)	铜-碲培养基(+) 鸡蛋培养基(-)	铜-碲培养基(-) 鸡蛋培养基(+)	铜-碲培养基(+) 鸡蛋培养基(+)
1076	77	7.2	69	0	8

个试验组: 铜-碲培养基阳性和碲-血培养基阴性; 铜-碲培养基阴性和碲-血培养基阳性; 铜-碲培养基阳性和碲-血培养基阳性。对 1011 例 1011 份咽喉标本菌株进行培养, 发现阳性者 78 份, 阳性率为 7.7%, 每组的白喉杆菌检出情况见表 3。

3. 铜-碲培养基与鸡蛋斜面培养基组成三个试验组: 铜-碲培养基阳性和鸡蛋培养基阴性, 铜-碲培养基阴性和鸡蛋培养基阳性, 铜-碲培养基阳性和鸡蛋培养基阳性。对 1076 份咽喉标本进行了检查, 发现阳性者 77 份, 阳性检出率为 7.2%, 每种培养基上白喉杆菌检出情况见表 4。

讨 论

1. 在 100 毫升的基础培养基内加 5% 硫酸铜溶液 0.3 毫升时, 咽喉标本内的“杂菌”生长明显地被抑制, 菌落极少, 呈白色。但金黄色葡萄球菌在加入 5% 硫酸铜溶液 0.3、0.4 毫升时生长良好, 菌落很小, 呈白色或淡黄色, 当 5% 硫酸铜溶液增至 0.5 毫升时“杂菌”不能生长, 而金黄色葡萄球菌菌落显著减少, 当增至 0.8 毫升时“杂菌”和金黄色葡萄球菌均全部被抑制。

在加入 5% 硫酸铜溶液 0.3—0.5 毫升时, 白喉杆菌 605 和 804 菌株生长均很丰富, 形成黑色菌落, 无法计数, 当增至 0.8 毫升以上时, 菌落变小而稀少。

2. 对白喉杆菌在铜-碲培养基上形成的特殊菌落形态进行了观察, 从带菌检查中分离出的 77 株白喉杆菌, 在此培养基上经 37℃ 培养 24 小时观察菌落呈灰黑色隆起, 边缘整齐, 表面光滑, 无金属光泽, 可以触动, 极易与其他细菌区别。对某些使亚碲酸钾还原的细菌亦可形成黑色菌落, 但不能触动, 白喉杆菌菌落大小为 0.12—0.8 毫米, 大多数菌落为 0.3 毫米。

3. 铜-碲培养基用于带菌检查。白喉杆菌菌落呈纯培养和近于纯培养, 极易与其他细菌区别, 阳性检出率为 7.3%, 而碲-血培养基阳性检出率为 5.4%。两者经统计学处理 $p=1.70 < 2, P > 0.05$, 无显著差别。铜-碲培养基不需要动物血液, 材料易得, 操作方便, 阳性检出率高, 便于推广。

4. 所分离的 146 株白喉杆菌(因菌种保存过程中死亡 9 株未列入)经豚鼠皮内毒力试验, 其结果是: 有毒菌株 95 株, 无毒菌株 51 株, 有毒菌株与无毒菌株之比为 1.86:1。