

# 乙型溶血性链球菌分离方法的研究

诸小依 汪若峰 孙瑞鹏 夏文茹

(北京市耳鼻咽喉科研究所微生物组)

慢性扁桃体炎往往成为风湿病和肾小球肾炎的病灶,一般认为发生合并症与乙型溶血性链球菌的感染有关<sup>[1,2]</sup>。但从扁桃体炎患者分离到乙型溶血性链球菌的阳性率却不高<sup>[3,4,5]</sup>。其原因主要是大部分乙型溶血性链球菌常深居扁桃体陷窝内、在厌氧环境中繁殖,用常规的需氧血平板培养很难分离到真正致病菌。所以改进分离方法,是临床迫切需要解决的问题。为此,

我们对 665 例慢性扁桃体炎患者进行咽部乙型溶血性链球菌分离技术的研究,初步找到了比较简单实用而又能提高分离阳性率的方法,现报告如下。

## 材料与方 法

### 一、培养基

1. 牛肉汤: pH 7.4—7.6, 含绵羊血 5%, 葡

葡萄糖 0.02%,分装肉汤管,每管 6 毫升。

2. 庖肉肉汤厌氧培养基:牛肉汤培养基中加入干燥庖肉块少许,每管装 2 毫升。

3. 三氯化钠、结晶紫、庖肉肉汤厌氧选择培养基(以下简称三氯化钠培养基):在庖肉肉汤厌氧培养基中无菌操作加入三氯化钠,使浓度达 1:15000,加入结晶紫,使浓度达 1:562,500。

4. 5%兔血琼脂平板。

5. 5%绵羊血琼脂平板。

6. 血清肉汤培养基。

## 二、临床标本的采集

用两个棉拭子分别从慢性扁桃体炎患者的左右扁桃体陷窝内或脓栓部位取样,有时两侧共用一个棉拭子,标本于 4 小时内送检。

从 665 例扁桃体炎患者咽拭子中,取 207 例用绵羊血平板做厌氧及需氧培养方法的比较;68 例用不同培养基不同环境的六种综合培养方法比较;390 例用三氯化钠厌氧培养与绵羊血平板需氧培养方法比较。

## 三、标本的培养方法

### (一) 临床标本的培养

1. 血平板培养法:取一个咽拭子,接种在两个绵羊血平板上,于 37°C 培养。一个做厌氧培养\*,48 小时检定;另一个做需氧培养,24 小时检定。

2. 综合培养法:取两个咽拭子,一个接种在固体培养基上(同时接种兔血平板一个;绵羊血平板两个);另一个接种在液体增菌培养基上(同时接种在肉汤培养基、庖肉肉汤培养基及三氯化钠培养基)。具体方法是:标本编号逢单号者,取左侧扁桃体拭子接种在液体培养基中,取右侧扁桃体拭子接种在固体培养基中;逢双号者则反之。首先接种在液体培养基者,将拭子放在 6 毫升的牛肉汤培养基内充分振荡,然后取出 4 毫升,分装在两个无菌庖肉管内,每管 2 毫升,再将其中一管加入三氯化钠及结晶紫,置 37°C 培养 18—24 小时,分别将接种在肉汤培养基者转种绵羊血平板做需氧培养,接种在庖肉肉汤培养基及三氯化钠培养基者转种绵羊血平板做厌氧培养。

接种在固体培养基者,为使标本在不同培养条件下得到均等的培养机会,将标本编号被 3 除,余数为零者,先接种在兔血平板做厌氧培养;余数为 1 者,先接种在绵羊血平板做厌氧培养;余数为 2 者,先接种在绵羊血平板做需氧培养。

3. 三氯化钠培养基与绵羊血平板的培养方法:取一患者的两个咽拭子,一个接种在绵羊血平板做需氧培养;另一个接种在三氯化钠培养基,均于 37°C 培养 18—24 小时,转种做厌氧培养;若取一个咽拭子,先接种在绵羊血平板做需氧培养,再接种在三氯化钠培养基增菌,最后转种在绵羊血平板做厌氧培养。

凡接种在绵羊血平板做厌氧培养者,放在 37°C 培养 48 小时检定;凡接种在绵羊血平板做需氧培养者放 37°C 培养 18—24 小时检定。

4. 血清学分群:自 665 例慢性扁桃体炎患者中,分离获得 335 株乙型溶血性链球菌,从其中任选 210 株,用 Lancefield 氏<sup>[6]</sup>方法进行血清学分群。

### (二) 人工标本的培养

从分离获得的乙型溶血性链球菌中任选两株兼性厌氧菌(编号为 200 号和 258 号),各取其菌落 20 个,接种在 2 毫升血清肉汤内,放 37°C 培养 18 小时后,用无菌生理盐水稀释至  $10^{-4}$ — $10^{-10}$ ;另取甲型溶血性链球菌、四联球菌和卡他双球菌的混合肉汤培养物,用无菌盐水稀释至  $10^{-2}$ ;最后将不同稀释度的乙型溶血性链球菌悬液(各 0.2 毫升),与三种细菌稀释悬液(0.2 毫升)混合,取一白金环(固定使用一个)混合菌液,用综合培养方法(兔血平板法除外)进行培养。

## 试验结果

### 一、临床标本的乙型溶血性链球菌分离结果

1. 血平板直接划线厌氧及需氧培养的比较:207 例患者的咽标本直接在绵羊血平板上划线做需氧及厌氧培养,分离乙型溶血性链球

\* 血平板厌氧培养采用焦性没食子酸法。

菌。其结果表明厌氧培养可使乙型溶血性链球菌的阳性率提高3倍 ( $P < 0.01$ )。若需氧培养和厌氧培养同时使用,其阳性率提高更多(见表1)。

表1 207例患者咽标本用绵羊血平板分离乙型溶血性链球菌的结果

方 法	阳性例数	阳性率(%)
绵羊血平板需氧培养	16	7.7
绵羊血平板厌氧培养	59	28.5
绵羊血平板需氧及厌氧培养	70	33.8

2. 综合培养法的比较: 对68例患者咽拭子,用六种培养方法进行培养,结果表明绵羊血平板厌氧培养及庖肉肉汤厌氧培养,比绵羊血平板需氧培养及肉汤增菌培养效果好(见表2)。绵羊血平板厌氧培养分离乙型溶血性链球菌阳性率相当于需氧培养的3倍多,二者有较明显差异 ( $P < 0.01$ ); 庖肉肉汤增菌培养分离乙型溶血性链球菌的阳性率比肉汤增菌培养高3倍半,二者也有明显差异 ( $P < 0.01$ )。六种培养方法中的三种培养基比较,以三氯化钠培养基和庖肉肉汤培养基对乙型溶血性链球菌分离的阳性率为最高,相当常规法的4—5倍,这两种方法相比,无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

3. 三氯化钠培养基厌氧培养与绵羊血平板需氧培养的比较: 对390例慢性扁桃体炎患者

咽拭子用三氯化钠培养基培养,可使乙型溶血性链球菌的分离阳性率提高5倍,与绵羊血平板需氧培养比较,  $P < 0.01$ , 有显著差异(见表3)。

表2 68例患者咽拭子用六种方法分离乙型溶血性链球菌的结果

方 法	阳性例数	阳性率(%)
绵羊血平板需氧培养	9	13.2
绵羊血平板厌氧培养	30	44.1
兔血平板厌氧培养	24	35.3
牛肉汤培养转种绵羊血平板需氧培养	11	16.2
三氯化钠培养转种绵羊血平板厌氧培养	44	64.7
庖肉肉汤培养转种绵羊血平板厌氧培养	39	57.4
以上六种培养方法同时应用	50	73.5

表3 三氯化钠培养基与绵羊血平板分离乙型溶血性链球菌结果

方 法	阳性例数	阳性率(%)
绵羊血平板需氧培养	43	11.0
三氯化钠培养	215	55.1

从以上三部分实验结果看,乙型溶血性链球菌的分离阳性率,以应用庖肉肉汤及三氯化钠培养基厌氧增菌培养,再转种绵羊血平板厌氧培养为最高。

4. 血清学分群: 210株乙型溶血性链球菌血清学分群结果,有195株分群阳性,占92.9%,

表4 200号乙型溶血性链球菌的分离结果\*

乙链稀释度 菌种	绵羊血平板				增菌培养后转种绵羊血平板															
	需氧培养				厌氧培养				肉汤 (转种需氧培养)				三氯化钠 (转种厌氧培养)				庖肉肉汤 (转种厌氧培养)			
	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他
$10^{-5}$	++	++	++	++	30	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	--	--	+++	++	++	++
$10^{-5.5}$	3	++	++	++	14	++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	--	--	+++	++	++	++
$10^{-6}$	-	++	++	++	1	++	++	++	-	+++	+++	+++	-	+++	--	--	+++	++	++	++
$10^{-7}$	1	++	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	-	+++	--	--	+++	++	++	++
$10^{-8}$	-	++	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	-	+++	--	--	-	++	++	++
$10^{-9}$	-	++	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	-	+++	--	--	-	++	++	++

\* “乙链”——乙型溶血性链球菌,“甲链”——甲型溶血性链球菌。

“四联”——四联球菌,“卡他”——卡他双球菌。

“++”示菌落100—200个。“+++”示菌落200个以上。菌落<100个以数字表示。

表 5 258 号乙型溶血性链球菌的分离结果\*

乙链 稀释度 菌种	方法		绵羊血平板				增菌培养后转种绵羊血平板															
			需氧培养		厌氧培养		肉汤 (转种需氧培养)				三氯化钠 (转种厌氧培养)				庖肉肉汤 (转种厌氧培养)							
	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他	乙链	甲链	四联	卡他		
10 <sup>-4</sup>	-	++	++	++	++	++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	++	++	++	++
10 <sup>-5</sup>	-	++	++	++	12	++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	++	++	++	++	
10 <sup>-6</sup>	-	++	++	++	2	++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	++	++	++	++	
10 <sup>-7</sup>	-	++	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	++	++	++	++
10 <sup>-8</sup>	-	++	++	++	-	++	++	++	-	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	-	++	++	++	++

\* 同上表。

对 7.1% 分群阴性菌株重新作形态学鉴定, 仍属典型乙型溶血性链球菌。

## 二、人工标本的乙型溶血性链球菌分离结果

将混有甲型溶血性链球菌、四联球菌及卡他球菌的不同稀释度的 200 号和 258 号乙型溶血性链球菌悬液, 接种在五种培养基上进行比较, 结果见表 4、5。

人工标本分离结果表明, 绵羊血平板厌氧培养及庖肉肉汤厌氧培养对乙型溶血性链球菌的分离, 比相应的绵羊血平板需氧培养及牛肉汤需氧增菌方法效果要好, 比三氯化钠培养基的效果更好。

## 讨 论

对 68 例慢性扁桃体炎患者咽拭子利用庖肉肉汤厌氧增菌培养及三氯化钠庖肉厌氧培养分离阳性率可提高 57.4—64.7%, 较常规需氧培养法提高 5 倍左右, 对 207 例慢性扁桃体炎患者咽标本用直接绵羊血平板厌氧培养可使阳性率提高 28.5%, 较直接绵羊血平板需氧培养提高 3 倍左右。对人工标本的分离亦获类似结果。从上述实验说明分离乙型溶血性链球菌较理想的方法是厌氧培养法。

对分离方法的研究, 曾有人<sup>[7,8]</sup>重视营养选择培养基, 我们认为该法较繁琐, 不易推广。现

试用的庖肉肉汤厌氧增菌培养, 使扁桃体陷窝内厌氧生存的乙型溶血性链球菌在体外有了繁殖生长环境, 再转种厌氧绵羊血平板, 乙型溶血性链球菌就较易分离得到, 方法也易推广。至三氯化钠培养基的分离阳性率与庖肉肉汤厌氧培养结果相近, 但毒性较大, 在应用时有一定局限性。所以在实际应用中以庖肉肉汤厌氧培养法易于推广。

从厌氧培养和需氧培养中所分离到的乙型溶血性链球菌在形态上是相同的, 菌落均呈灰白色、半透明或不透明, 表面光滑或有乳白色之光泽的小菌落 (在厌氧培养时, 溶血环往往较大), 涂片染色均为典型链状排列之革兰氏阳性球菌 (厌氧者偶见短链或呈簇状分散排列, 但接种血清肉汤培养后, 又可出现典型链状排列)。

## 参 考 文 献

- [1] 侯淑英: 国外医学(耳鼻咽喉科学分册), 1: 1, 1980.
- [2] Paradise, J. L. et al.: N. Eng. J. Med. 298 (8): 409, 1978.
- [3] 顾友梅等: 中华儿科杂志, 4: 288, 1955.
- [4] 章谷生等: 中华医学杂志, 11: 635, 1962.
- [5] Стовбун, Ф. И. др.: Журнал ушных Носовых и Горловых Болезни. 22(6): 24, 1962.
- [6] 刘秀湘等: 微生物学报, 9: 284, 1963.
- [7] William, A. et al.: J. Clin. Path. 26: 154, 1973.
- [8] Nakamizo, Y. et al.: Am. J. Clin. Path. 57: 228, 1972.