

晚期战伤感染的細菌学檢驗观察

郭成周 王林发 赵玉梅

引 言

为了明了晚期战伤感染細菌的种类、性質及其对抗生素的敏感性，作为临床診斷、治疗和預防的参考，我們进行了晚期战伤的細菌学檢驗和观察。检查的对象包括以下六类晚期战伤感染：（1）慢性骨髓炎；（2）慢性潰瘍創面；（3）脊髓神經损伤后的膀胱炎；（4）尿道损伤后的膀胱炎；（5）体内弹片；（6）顱脑外伤炎症。为了对照观察也作了植皮术供皮区术后感染和外科手术后感染的細菌检

查。在各例中都作出了菌譜，同时将感染中主要的細菌作了对抗菌素的敏感性检查。此外，在分离出的細菌中，作了大腸桿菌产生抗青黴素酶的检查，葡萄球菌的致病性和噬菌体的作用观察，綠脓桿菌产生色素的比例，金屬反光性空斑与噬菌体关系的証明，以及噬菌体的分离和作用的观察。对分离出的一种硝酸盐还原阴性的新菌屬作了个性的观察。

标本的来源与檢驗方法

标本来源

上述的六类晚期战伤感染的标本，系采自晚期战伤伤员，負伤后約一至三年（也有更长的），經多次手术和长期藥物治疗未癒的。为作对照观察之二类感染的标本，系采自与前者在同一时期，同一医院中的外科手术后的感染。标本为用无菌棉花拭子，采自伤口分泌物或直接取用手术中的刮除或摘除的物体。膀胱炎的尿标本，則用导尿管或取自經外部消毒后的中段尿标本。

檢驗方法

（1）需氧性細菌的培养：一般接种于綿羊血球琼脂平皿及肉湯管，作初步分

离，遇有扩散性生长的变形桿菌时，則采用經96°酒精浸湿后烘干的綿羊血球琼脂平皿，重新接种分离。尽量挑选不同形态的集落，分別移种于各种糖发酵管及各种生化反应培养基作进一步的鑑定。

（2）厌氧性細菌的培养：在初一阶段，曾采用厌氧性芽胞菌的分离方法，先将标本加热至80°C 經20分鐘，然后接种于庖肉培养基，在58次的培养中（包括战伤与非战伤感染），未分离出厌氧性芽胞菌。后改将标本用稀释法接种于四至五管魏荣氏（Veillon）高层琼脂培养基，經培养生长后，挑选下层单独集落，同时移种于庖肉培养基及普通需氧培养基（肉湯管及普通琼脂斜面管），进行观察，如此可以分离厌氧性芽胞菌与厌氧性非芽胞菌。

(3) 結核桿菌的檢驗: 用抗酸抗醇性染色顯微鏡檢查及羅文士坦氏培養基作培養。動物接種, 因條件不好, 未能作到合格的統計觀察。

(4) 抗菌素敏感性試驗: 為便于大量常規檢驗, 採用了彭迪(Bondi)氏紙片法⁽¹⁾, 在某些例曾用試管法作對照, 證明結果相符。

檢 驗 結 果

細菌培養結果

(1) 慢性骨髓炎: 在43例患者經105次的培養分離出139株細菌, 計有15種不同細菌, 統計數字于下(表1):

表1

細菌	標本來源	傷口分泌物	手術中刮下物	合計	%
奇異型變形桿菌		32株	9株	41株	29.5
白色葡萄球菌		24	7	31	22.3
綠膿桿菌		11	2	13	9.4
大腸桿菌		8	4	12	8.6
副大腸桿菌		9	1	10	7.2
普通型變形桿菌		7	1	8	5.8
莫根氏變形桿菌		3	2	5	3.6
金黃色葡萄球菌		4	1	5	3.6
克氏肺炎桿菌		2	1	3	2.2
產碱桿菌		2	1	3	2.2
甲型溶血性鏈球菌		1	1	2	1.4
乙型溶血性鏈球菌		1	1	2	1.4
丙型鏈球菌		2		2	1.4
[29911]型副大腸桿菌		1		1	0.7
瑞氏變形桿菌		1		1	0.7
共計15種細菌		108株	31株	139株	

一次標本中分離出一種細菌的有74次, 占70.48%; 一次標本中分離出二種

細菌的有29次, 占27.62%; 一次標本中分離出三種細菌的有1次, 占0.95%; 一次標本中分離出四種細菌的有1次, 占0.95%。

(2) 慢性潰瘍創面: 在21例患者經46次培養分離出72株細菌, 計有14種不同細菌; 統計數字于下(表2):

表2

細菌種類	分離出的菌株數	%
白色葡萄球菌	20	27.8
綠膿桿菌	13	18.0
奇異型變形桿菌	9	12.5
金黃色葡萄球菌	8	11.1
革蘭氏陽性桿菌	5	6.9
類副大腸桿菌	3	4.1
產碱桿菌	3	4.1
甲型溶血性鏈球菌	3	4.1
大腸桿菌	2	2.8
革蘭氏陽性芽胞桿菌	2	2.8
副大腸桿菌	1	1.4
一種新菌種 (硝酸鹽還原陰性菌)	1	1.4
普通型變形桿菌	1	1.4
丙型鏈球菌	1	1.4
共計14種細菌	72	

一次標本中分離出一種細菌的有27次, 占58.70%; 一次標本中分離出二種

細菌的有 14 次, 占 30.43%; 一次标本中分离出三种細菌以上的有 5 次, 占 10.87%。

(3) 脊髓神經损伤后的膀胱炎: 在 23 例患者經 80 次培养分离出 121 株細菌, 計有 17 种不同細菌, 統計数字于下(表 3):

表 3

細菌种类	分离出的菌株数	%
大腸桿菌	18	14.9
[29911]型副大腸桿菌	17	14.1
奇异型变形桿菌	16	13.2
副大腸桿菌	11	9.1
莫根氏变形桿菌	10	8.3
瑞氏变形桿菌	9	7.4
綠膿桿菌	9	7.4
丙型鏈球菌	8	6.6
普通型变形桿菌	7	5.8
白色葡萄球菌	4	3.3
甲型溶血性鏈球菌	3	2.5
革兰氏阳性杆菌	3	2.5
产碱杆菌	2	1.7
金黄色葡萄球菌	1	0.8
乙型溶血性鏈球菌	1	0.8
类副大腸杆菌	1	0.8
克氏肺炎杆菌	1	0.8
共計 17 种細菌	121	

一次标本中分离出一种細菌的有 52 次, 占 65%; 一次标本中分离出二种細菌的有 19 次, 占 23.75%; 一次标本中分离出三种細菌以上有 9 次, 占 11.25%。

(4) 尿道损伤后的膀胱炎: 在 22 例患者經 118 次的培养分离出 165 株細菌, 計有 17 种不同細菌, 統計数字于下(表 4):

表 4

細菌	尿	分泌物	前列腺液	脓	合計	%
綠膿桿菌	24株	2株	1株	1株	28株	16.9
白色葡萄球菌	16	2	6		24	14.5
[29911]型副大腸桿菌	16	2			18	10.9
副大腸桿菌	14	1		1	16	9.7
普通型变形桿菌	13	1		2	16	9.7
大腸桿菌	11		1	2	14	8.5
莫根氏变形桿菌	8	2			10	6.1
瑞氏变形桿菌	8				8	4.8
奇异型变形桿菌	4	2		1	7	4.2
丙型鏈球菌	6		1		7	4.2
革兰氏阳性桿菌	3	1		1	5	3.0
革兰氏阳性芽胞桿菌	4				4	2.4
类副大腸桿菌	2	1			3	1.8
一种新菌种 (硝酸盐还原 原阴性菌)	1	1			2	1.2
金黄色葡萄球菌	1				1	0.6
甲型溶血性鏈球菌			1		1	0.6
产碱桿菌	1				1	0.6
共計 17 种細菌	132株	15株	10株	8株	165株	

一次标本中分离出一种細菌的有 79 次, 占 66.95%; 一次标本中分离出二种細菌的有 31 次, 占 26.27%; 一次标本中分离出三种細菌的有 8 次, 占 6.78%。

(5) 体内膿片: 在 24 例患者經 26 次培养(需氧性及厌氧性培养), 結果培养有細菌的計 12 次, 占 46.16%, 共分离出

13株細菌，計有 8 种不同細菌，統計數字如表 5：

表 5

細菌種類	分离出的菌株数	%
白色葡萄球菌	3	23.0
大腸桿菌	2	15.4
革兰氏阳性桿菌	2	15.4
革兰氏阳性芽胞桿菌	2	15.4
普通型变形桿菌	1	7.7
甲型溶血性鏈球菌	1	7.7
四联球菌	1	7.7
厌氧性非芽胞桿菌	1	7.7
共計 8 种細菌	13	

一次标本中分离出一种細菌的有 11 次，占 42.31%；一次标本中分离出二种細菌的有 1 次，占 3.85%；标本中未分离出細菌的有 14 次，占 53.84%。

(6) 顱脑外伤炎症：在 13 例患者經 14 次培养分离出 16 株細菌，計有 7 种不同細菌，統計數字于下(表 6)：

表 6

細菌種類	分离出的菌株数	%
白色葡萄球菌	8	50.0
金黄色葡萄球菌	3	18.8
甲型溶血性鏈球菌	1	6.2
乙型溶血性鏈球菌	1	6.2
卡他双球菌	1	6.2
克氏肺炎桿菌	1	6.2
革兰氏阳性桿菌	1	6.2
共計 7 种細菌	16	

一次标本中分离出一种細菌的有 12 次，占 85.71%；一次标本中分离出二种細菌的有 2 次，占 14.29%。

(7) 供皮区术后感染：在 12 例患者經 40 次培养分离出 53 株細菌，計有 9 种不同細菌，統計數字于下(表 7)：

表 7

細菌種類	分离出的菌株数	%
白色葡萄球菌	14	26.4
金黄色葡萄球菌	14	26.4
綠脓桿菌	7	13.2
一种新菌种 (硝酸盐还原阴性菌)	6	11.3
革兰氏阳性桿菌	4	7.5
奇异型变形桿菌	3	5.7
副大腸桿菌	3	5.7
大腸桿菌	1	1.9
革兰氏阳性芽胞桿菌	1	1.9
共計 9 种細菌	53	

一次标本中分离出一种細菌的有 27 次，占 67.5%；一次标本中分离出二种細菌的有 13 次，占 32.5%。

(8) 外科手术后的感染：在 50 例患者經 95 次培养分离出 124 株細菌，計有 17 种不同細菌，統計數字于下(表 8)：

表 8

細菌種類	分离出的菌株数	%
白色葡萄球菌	37	29.8
奇异型变形桿菌	12	9.7
副大腸桿菌	11	8.9
普通型变形桿菌	9	7.3

接表 8

細菌种类	分离出的菌株数	%
金黄色葡萄球菌	8	6.5
綠脓桿菌	8	6.5
克氏肺炎桿菌	7	5.7
大腸桿菌	6	4.8
产碱桿菌	6	4.8
莫根氏变形桿菌	5	4.0
一种新菌种 (硝酸盐还原阴性菌)	4	3.2
革兰氏阳性桿菌	4	3.2
乙型溶血性鏈球菌	3	2.4

(接左表)

細菌种类	分离出的菌株数	%
[29911]型副大腸桿菌	1	0.8
类副大腸桿菌	1	0.8
四联球菌	1	0.8
酵母菌	1	0.8
共計 17 种細菌	124	

一次标本中分离出一种細菌的有 72 次, 占 75.79%; 一次标本中分离出二种細菌的有 18 次, 占 18.95%; 一次标本中出三种細菌以上的有分离 5 次, 占 5.26%。

按照以上八类感染檢驗材料統計于表 9:

表 9

晚期战伤感染之菌譜統計表

組 別 菌 名	慢性 骨髓炎 %	慢性潰 瘍創面 %	膀 胱 炎		体 內 彈 片 %	顱腦外 傷炎症 %	对 照 組	
			脊 髓 損 傷 %	尿 道 損 傷 %			供皮区 感 染 %	外科手 术后的 感染%
白色葡萄球菌	22.3	27.8	3.3	14.5	23.0	50.0	26.4	29.8
金黄色葡萄球菌	3.6	11.1	0.8	0.6		18.8	26.4	6.3
甲型溶血性鏈球菌	1.4		2.5	0.6	7.7	6.2		
乙型溶血性鏈球菌	1.4	4.1	0.8			6.2		2.4
丙型鏈球菌	1.4	1.4	6.6	4.2				
奇异型变形桿菌	29.5	12.5	13.2	4.2			5.7	9.7
普通型变形桿菌	5.8	1.4	5.8	9.6	7.7			7.3
莫根氏变形桿菌	3.6		8.3	6.1				4.0
瑞氏变形桿菌	0.7		7.4	4.8				
綠脓桿菌	9.4	18.0	7.4	17.0			13.2	6.3
大腸桿菌	8.6	2.8	13.9	8.5	15.4		1.9	4.8
副大腸桿菌	7.2	1.4	9.1	9.7			5.7	8.9
[29911]型副大腸桿菌	0.7		14.1	10.9				0.9
类副大腸桿菌		4.1	0.8	1.8				0.9
硝酸盐还原阴性的一种新菌种		1.4		1.2			11.3	3.2

(接上表)

菌 名	组 别	慢 性 骨髓炎	慢性潰 瘍創面	膀 胱 炎		体 内 弹 片	顱腦外 伤炎症	对 照 组	
		%	%	脊 髓 損 伤	尿 道 損 伤	%	%	供皮区 感 染	外科手 术后的 感染%
克 氏 肺 炎 桿 菌		2.2		0.8			6.2		5.6
产 碱 桿 菌		2.2	4.1	1.7	0.6				4.8
四 联 球 菌						7.7			0.9
卡 他 双 球 菌							6.2		
酵 母 菌								7.5	0.9
需氧性革兰氏阳性桿菌			6.9	2.5	3.0	15.4	6.2	1.9	3.2
需氧性革兰氏阳性芽胞桿菌			2.8		2.4	15.4			
革兰氏阴性厌氧性非芽胞桿菌						7.7			
菌 株 数		139	72	121	165	13	16	53	124

表10

晚期战伤感染一次标本檢驗中所分离出的細菌数字統計表

炎 症 种 类	一 种 菌		二 种 菌		三 种 菌		四种菌以上		未分离出菌		檢 驗 次 数
	次数	%	次数	%	次数	%	次数	%	次数	%	
慢 性 骨 髓 炎	74	70.5	29	27.6	1	0.9	1	0.9			105
慢 性 潰 瘍 創 面	27	58.7	14	30.4	4	8.7	1	2.2			46
腎髓神經损伤后的膀胱炎	52	65.0	19	23.7	7	8.7	2	2.5			80
尿道损伤后的膀胱炎	79	66.9	31	26.3	8	6.8					118
体 内 弹 片	11	42.3	1	3.9					14	53.8	26
顱 腦 外 伤 炎 症	12	85.7	2	14.3							14
对 照 组	供 皮 区 感 染	27	67.5	13	32.5						40
	外科手术后的感染	72	75.8	18	19.0	4	4.2	1	1.0		95

	一 种 菌	二 种 菌	三 种 菌	四种菌以上
六类晚期战伤感染中分离出的細菌 共計	255 次	96 次	20 次	4 次
	68 %	32 %		
对照组内二类术后感染炎症中分离出的細菌 共計	99 次	31 次	4 次	1 次
	73.3%	26.7		

根据上表統計材料,說明六类晚期战伤炎症的菌譜与对照組供皮区术后感染及外科手术后的感染菌譜差別不大,在375次标本檢驗中,有120次标本(占32%)可以分离出一种以上的菌种,在对照組的135次标本檢驗中,有36次标本(占26.7%)分离出一种以上的菌种,說明部分的炎症是由多种細菌混合感染的。

又根据我們在同一病員的炎症中,經不同時間重复檢驗的結果,是可以分离出不同种类的細菌,又可以說明炎症中的細菌是反复感染的。

按照所分离出細菌的种类与性質,可能是經多次手术后的感染及由空气、皮肤、腸道中的細菌所感染。

經62次厌氧性培养,其中20次为用芽

胞性厌氧菌培养法(将标本加热至80°C 20分鐘,然后培养于庖肉培养基);計檢驗骨髓炎标本15次,体内彈片5次,均未分离出芽胞性厌氧菌,另42次为用不加热的稀释法厌氧培养(将标本稀释后接种于魏荣氏高层琼脂培养基),計檢驗骨髓炎标本30次,体内彈片9次,顱脑外伤3次,結果在体内彈片培养中分离出非芽胞性厌氧桿菌一株。

經21次的骨髓炎标本的結核桿菌培养及显微鏡检查,均未找到結核桿菌。

抗菌素敏感性試驗結果:本組的統計材料,系包括与晚期战伤有关的及在同一时期中在同一医院手术后感染的16种主要細菌。检查結果列于表11:

表 11

抗菌素敏感性試驗(紙片法)檢驗結果

菌 名	試驗 次 数	对 青 黴 素 有敏感性的%	对 鏈 黴 素 有敏感性的%	对 氯 黴 素 有敏感性的%	对 金 黴 素 有敏感性的%
白色葡萄球菌	210	35.7	52.85	95.2	94.28
金黄色葡萄球菌	73	16.4	50.68	97.26	97.26
甲型溶血性鏈球菌	68	54.4	41.2	85.3	72.05
乙型溶血性鏈球菌	17	94.1	11.76	94.1	88.23
丙型鏈球菌	20	0	0	60	55
奇异型变形桿菌	130	0	63.07	17.6	0
普通型变形桿菌	33	0	57.57	33.33	48.48
莫根氏变形桿菌	33	0	72.72	66.66	60.6
瑞氏变形桿菌	20	0	20	40	15
大腸桿菌	95	0	46	88.42	52
副大腸桿菌	73	0	67.12	93.15	57.53
[29911] 型副大腸桿菌	33	0	18.18	66.66	0
一种新的菌种 (硝酸盐还原阴性菌)	25	0	4	4	68
产碱桿菌	22	0	18.18	86.36	36.36
克氏肺炎菌	14	0	35.71	78.57	35.71

綠脓桿菌用以上方法（紙片法）得不到滿意結果，后用10株綠脓桿菌作試管法試驗，檢驗結果：以每毫升含0.05毫克的金黴素或0.2毫克的氯黴素的水溶液，可对10株細菌的全部有制菌作用；每毫升含0.2毫克的鏈黴素水溶液，仅对10株細菌的3株有制菌作用。按照此三種抗菌素的浓度，仅能适合于外用。

为了証明紙片法与試管法的关系，曾选用10株对青黴素有耐藥性的葡萄球菌及10株对青黴素有高度敏感性的葡萄球菌，作試管試驗，其結果相符合。

根据上表的統計，說明青黴素在炎症中常見的16种細菌中仅对甲、乙型溶血性鏈球菌有比較高的藥效，对葡萄球菌藥效較低，对革兰氏阴性桿菌均无作用。鏈黴素对炎症中常見的16种細菌中的6种細菌有較高的藥效，氯黴素可以对16种細菌中的11种細菌有比較高的作用，特别是对其他抗菌素敏感度低的大腸桿菌、副大腸桿菌、产碱桿菌、克氏肺炎桿菌有較高的作用。金黴素对16种細菌中的9种有比較高的作用，特别是对硝酸盐还原阴性的一种新菌种有比較高的作用。

个别細菌的观察

大腸桿菌产生抗青黴素酶的調查：由于大腸桿菌在战伤炎症中，混合感染的机会甚多，是否可以因为它所产生的抗青黴素酶而影响青黴素对其他球菌的疗效，特进行了大腸桿菌产生青黴素酶性能的調查。

（1）檢驗方法：用大腸桿菌在37°C培养4日的普通肉湯培养液，經离心后取上清液，在每毫升內加青黴素5单位（作定量时可分別加50、500及5000单位），在室温接触6小时使酶与青黴素发生破坏作用，然后用6毫米直径的灭菌圆形滤紙片（即用釘書打孔机軋下的圆形紙片）浸湿于此液中，再用无菌鑷子取出紙片粘貼于已接种金黄色葡萄球菌的琼脂平皿，經培养12小时后观察的結果是：有酶的产生时

紙片四周无青黴素的抑制圈；无酶的产生时紙片四周有青黴素的抑制圈。

在測驗液中，虽然还有大腸桿菌的存在，但經紙片在琼脂平皿上粘貼后，大腸桿菌仅在紙片边缘生长，并不影响抑制圈的观察。

用此方法可以省除因处理大腸桿菌的許多繁杂手續，尤适用于大量标本的檢驗，并可节省時間及簡化仪器供应。

（2）檢驗結果 用以上方法，我們調查了此次由炎症中分离出的90株大腸桿菌。其中有73株可以产生破坏5个单位青黴素的酶（占81.11%），并有3株（占3.33%）可以产生破坏5000个单位青黴素的酶，統計見表12：

表 12

在90株大腸桿菌中能产生破坏	5	单位青黴素酶的有	73株	占	81.11%
在90株大腸桿菌中能产生破坏	50	单位青黴素酶的有	43株	占	47.77%
在90株大腸桿菌中能产生破坏	500	单位青黴素酶的有	13株	占	14.44%
在90株大腸桿菌中能产生破坏	5000	单位青黴素酶的有	3株	占	3.33%

根据表12的数字，我們認為有大腸桿菌混合感染的炎症，青黴素的疗效将可能受到一定影响。

葡萄球菌致病性的檢驗与噬菌体作用的观察

(1) 致病性能的检查： 葡萄球菌在以上八类感染中均占首要数字，为了解該菌

的致病性能，特进行了檢驗；根据葛氏(Knott)、普氏(Blaikley)及戶田氏(2)的試驗与观察，認為凡能溶解羊血球，发酵甘露醇，液化明胶及凝固血浆的菌株，为致病性菌。我們用41株金黄色葡萄球菌及40株白色葡萄球菌进行了以上的試驗。結果如表13：

表13 葡萄球菌致病性能測驗 (根据生化特性的統計)

菌 别	生化性能	溶 羊	甘 发	明 液	兔 凝	四 能	三 能	二 能	一 能	四 能
		解 血	露 酵	胶 化	血 固	种 性	种 性	种 性	种 性	种 性
金黄色葡萄球菌	阳性比例	25/41	41/41	24/41	36/41	14/41	17/41	8/41	2/41	
	%	60	100	60	88	75		25		•
白色葡萄球菌	阳性比例	2/40	21/40	10/40	16/40	1/40	4/40	13/40	7/40	15/40
	%	5	50	25	40	12		50		38

溶解羊血球的观察，我們是根据細菌在羊血球琼脂平皿上培养24小时后，在集落四周产生乙型溶血现象而记录的。明胶液化試驗，是根据細菌在明胶中培养72小时所得的阳性結果。甘露醇发酵試驗，系根据細菌經培养5日的阳性結果。結果如表14：

表14 甘露醇发酵統計表 (以发酵時間計算)

发 酵 时 間	金黄色葡萄球菌	白色葡萄球菌
16—18小时	36(88%)	14(35%)
48小时	2 (5%)	1(2.5%)
72小时	3 (7%)	6(15%)
阴性(观察五日)	0	19(47.5%)

根据葛氏及普氏意見認為甘露醇发酵時間与致病性强弱有关。兔血浆凝固試驗，系采用0.3毫升經草酸鉀处理后的兔血浆加0.3毫升葡萄球菌48小时肉湯培养液，在37°C中观察6小时所得的阳性結果。

由本試驗的观察，說明炎症中的金黄色葡萄球菌75%均有致病性能，白色葡萄球菌仅12%有致病性能。

(2) 噬菌体作用試驗： 为了准备临床在必要时的应用，曾作了噬菌体对炎症中所分离出的葡萄球菌的作用观察。我們曾用中国协和医学院細菌科 K.P₁ 号金黄色葡萄球菌噬菌体，对分离出的36株金黄色葡萄球菌及33株白色葡萄球菌在琼脂平皿上进行了噬菌作用的試驗。試驗方法：将

葡萄球菌分別划种于琼脂平皿上(橫綫划法),然后将噬菌体(效价为 10^{-8})划一直痕于已划种的葡萄球菌的琼脂平皿上,經培养24小时观察結果。阳性結果时,在噬菌体的划痕上无葡萄球菌生长。試驗結果:在36株金黄色葡萄球菌中,上項噬菌体对其中的27株有噬菌作用,占75%;在33株白色葡萄球菌中,該噬菌体对其中18株有噬菌作用,占54%。噬菌作用阴性的菌株,曾反复試驗二次仍为阴性。

金黄色葡萄球菌噬菌体对炎症中分离出的葡萄球菌的噬菌作用見表15:

表15

噬菌試驗結果 噬菌体	細菌	金黄色葡萄球菌	白色葡萄球菌
		金黄色葡萄球菌 中国协和 K.P ₁ 号 效价 10^{-8}	
	阳性比例	27/36	18/33
	%	75	54

以上試驗說明, K.P₁ 号金黄色葡萄球菌噬菌体,可以同时对白色葡萄球菌起作用,但不能适合于全部葡萄球菌菌株。

綠膿桿菌的观察

綠脓桿菌在慢性炎症中的感染甚为普遍,往往使伤口扩大感染,延迟癒合時間,有时更能蔓延传染于众多的患者。我們在綠脓桿菌产生色素方面,集落上的金屬反光性空斑及噬菌的作用方面进行了观察。

(1)产生色素的观察: 在战伤感染之細菌檢驗工作中,常見有不产綠脓素而仅产生螢光素的菌株,在个别标本诊断困难。經統計調查及复驗,发现在分离出的131菌株中,有30株(占23%)不产綠脓素,仅产螢光素(溶于水,不溶于氯仿),虽經 37°C 培养24小时,在室温放

置48小时仍为阴性,但培养基中所产生的香气与产綠脓素的菌株相同。后經用产綠脓素菌株增殖多次的噬菌体与产螢光素菌株作噬菌試驗,发现有同样的噬菌作用。

(2)綠脓桿菌噬菌体的作用观察: 为了准备綠脓桿菌噬菌体在临床的試用,我們从所在医院阴沟泥汁中,分离出噬菌体一株,先就在炎症中分离出的菌株进行試驗。噬菌体經蔡氏滤器过滤分离出后,我們选用产綠脓素显著的单独純菌落菌株,經多次增殖,最后效价提高达 10^{-8} ,与33株产綠脓素的菌株及19株产螢光素的菌株用平皿划痕法,作了噬菌作用試驗。噬菌作用阴性的菌株,虽然再度分离純菌落作試驗仍为阴性,結果如表16:

表16

噬菌作用結果 噬菌体	菌別	产綠脓素菌株	产螢光素菌株
		产綠脓素菌株 增殖多次的噬菌体	
	阳性比例	18/33	16/19
	%	54	84

本試驗說明,用产綠脓素菌株增殖的噬菌体,也能适用于产螢光素的菌株,但不能适合于綠脓桿菌的全部菌株。

(3)綠脓桿菌集落的金屬反光空斑与噬菌体关系的証明: 在檢驗工作中,曾发现在部分的綠脓桿菌菌株的集落表面,有小形凹陷空斑形成,极似噬菌体的噬斑。为了解炎症中綠脓桿菌伴有噬菌体存在的問題,特进行了試驗:将有空斑处的培养物,用白金耳挑下,移种于琼脂平皿,經培养后,可以看到集落上有更多的空斑,随着培养的时间而增多及扩大,互相連接成条状或块状,培养愈陈旧空斑愈多愈显明,并可看到有銀灰色金屬反光膜复盖在空斑的上

面。如在此琼脂平皿培养物上加水(蒸餾水,生理食盐水均可),金屬反光性薄膜立即浮于水面。若将含較多空斑的培养物用无菌肉湯洗下,經蔡氏石棉板过滤器过滤后的液体与含有空斑的綠脓桿菌菌株,用試管法作多次的噬菌体增殖,均未分离出噬菌体。本試驗會同含空斑的三个不同菌株,重复作試驗,其結果相同。

本試驗說明,綠脓桿菌集落上含有金屬反光性的空斑可能与噬菌体无关。

一种新菌种的特性观察

我們在火器性慢性骨髓炎、烧伤潰瘍創面、供皮区感染創面及尿道损伤性膀胱炎,先后分离出26株革兰氏阴性双球状菌,其生化特性一致。主要生物特性:对1%乳糖分解迟緩(3—19日)或不分解,但对

10%乳糖琼脂斜面一天即分解,可分解葡萄糖,但不产气,对麦芽糖,甘露醇、蔗糖不分解,尿素酶阳性,檸檬酸盐試驗阳性,不产生胨基質,硝酸盐还原阴性,該菌有高度需氧性(但在厌氧培养基仍能生长),葡萄糖分解时先由上部开始,并在液体培养基表面形成菌膜,內管(观察产气用的倒置試管)則分解更迟緩。在現有的細菌分类学(如1948年版 Bergey 氏細菌学鑑定)等書,未能找到鑑定資料,同1948年蕭勃(Schaub)氏⁽³⁾及1949年福格生(Ferguson)氏⁽⁴⁾在細菌学杂志所发表的一种未能作鑑定的硝酸盐还原阴性的細菌,称为“硝酸盐还原阴性菌”(B.Anitratum)及“B5W”菌的特性相类似,检查所見如表17:

表17

菌名	生化特性	动力	10%乳糖斜面	1%乳糖	葡萄糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	木糖	阿拉伯糖	分解乳糖	鼠李糖	尿素	胨基質	硫氢化	甲紅	V.P.試驗	檸檬酸盐	硝酸盐还原	溶血	明胶液化	形态	来源
本組分离出的一种硝酸盐还原阴性菌(1954—1955)	—	+	3—19日 +/-	+	—	—	—	—	+	+	+	4—23日 +/-	+	—	—	—	—	+	—	—	—	革兰氏阴性双球状或短桿状菌	骨髓炎,尿,潰瘍創面及肺脓肿
B5W 福格生(Ferguson) (1949)	—	—	+迟緩	+	—	—	—	—	+	+	+	+迟緩	—	—	—	—	—	+	—	+20%	—	革兰氏阴性产荚膜双球状或短桿状菌	尿,痰,脓,血,胃液,喉,骨髓液,肺脓肿
硝酸盐还原阴性菌(B.Anitratum) 蕭勃(Schaub) (1948)	—	+	—	+	—	—	—	—	—	+	+	—	+	—	—	+	+	—	—	—	—	革兰氏阴性双球状或兩极浓染桿状菌	骨髓炎,肺,心血,子宫炎

我們仅将所观察的材料提供作为細菌学鑑定分类的参考。

总 結

(1)为了解晚期战伤感染細菌的种类与性質,我們根据在本工作階級中的細菌

檢驗材料,整理出六类晚期战伤感染的菌譜和二类在同一时期及同一医院中的供皮

区感染及外科手术后的感染,作比較对照。发现此两种菌譜无甚差别,并証明晚期战伤部分炎症是由多种細菌混合感染的及反复感染的。根据所分离出的細菌性質,可能是由空气、皮肤及腸道細菌所感染。

(2) 根据在晚期战伤感染中常見的16种細菌,876次的抗生素敏感性試驗,說明:①青黴素除对鏈球菌有比較高的作用外,对葡萄球菌的作用較低。②氯黴素有比較广泛的作用。③各种細菌与各种抗菌素有不同适应性,同一种类的細菌也有不同的敏感性。

(3) 在分离出的葡萄球菌及綠脓桿菌中,作了噬菌体的作用試驗,証明金黄色葡萄球菌的噬菌体,也能适合于白色葡萄球菌;用产綠脓素菌株增殖的噬菌体,也

能适合于产螢光素的菌株;但两种噬菌体都不能完全适合于两类細菌的全部菌株。

(4) 在分离出的90株大腸桿菌中,检出81%的菌株可以产生抗青黴素酶。根据此数字,我們認為在有大腸桿菌混合感染的炎症,对青黴素的疗效可能受到一定影响。

(5) 在分离出的81株葡萄球菌中,作了致病性能的观察,发现75%的金黄色葡萄球菌及12%的白色葡萄球菌有致病性能。

(6) 在慢性骨髓炎,烧伤后潰瘍,供皮区創面及尿道损伤性膀胱炎中,分离出26株生化特性一致的革兰氏阴性双球菌属于硝酸盐还原阴性菌,为一新菌种,供作細菌学整理分类的参考。

参 考 文 献

- (1) 萧勃、福萊著:“诊断細菌学” 陈忠、张联壁譯,1954年,宏文書局版。
- (2) 第二軍医大学:“微生物学各論講义”,第18頁及第20頁。
- (3) I. Schaub and F. Hauber: *Bacterium Anitratum*, *J. Bact.*, 56:379, 1948.
- (4) W. W. Ferguson and L. F. Roberts: A Bacteriological and Serological Study of Organism B5W. (*Bacterium Anitratum*) *J. Bact.*, 59:171, 1950.

(本文曾載“人民軍医”1955年9,10月号)

溶纖維蛋白激酶及溶核蛋白酶 試制的初步报告

郭成周 戴景林 刘義午

引 言

在胸部战伤中，有一部分发生“凝固血胸”或脓胸，需要进行手术治疗（如肺包膜切除术，引流术等），如此不但增加伤病員痛苦，延长治疗日期，甚至形成慢性脓胸，造成呼吸机能的严重損害。

在細菌学方面，曾发现某些乙型溶血性鏈球菌能产生溶解血块的溶纖維蛋白激酶⁽¹⁾（以下简称激酶）及液化粘稠脓汁的溶核蛋白酶⁽²⁾。慢性脓胸包膜形成的初期，包膜的主要固体成分是由滲出液的纖維蛋白及脓汁中核蛋白所組成，如利用这二种酶的注入，使包膜液化，便可用穿刺法或引流法取出；在血胸的血块形成时，亦可注入激酶，使血块液化后，用穿刺法吸出，既可預防脓胸的形成，且可代替外科手术。

根据近年文献記載，在国外临床試用中，已証实該二种酶在此二症中的效用⁽³⁾。在个别病例中，还报导了这二种酶在慢性化脓性竇炎⁽⁴⁾、結核性脑膜炎^(5,6,7,8)、結核性脓肿⁽⁹⁾、慢性支气管炎⁽¹⁰⁾、膀胱内血凝块⁽¹¹⁾、骨髓炎、一般潰瘍及鼻竇炎等症⁽¹²⁾的应用。

关于这两种酶的制造过程，在文献中还缺乏具体的报导。我們在战伤外科医疗研究的工作中，就現有的設備进行了这二种酶的試制，并已制成了小量部分提純的酶粉，在實驗室中証明了它們的效能；但其有效成分的含量尚不高，純度亦不够，有待第二阶段与生物化学家合作，作进一步改进。

試 制 过 程

菌种的來源与选择

我們用上海第一医学院及在第201医院所分离出的乙型溶血性鏈球菌15株，进行試驗，发现其中有6株能产生激酶，在这6株中有4株能同时产生溶核蛋白酶，另外有一株不能产生可以测出的激酶，但能产生溶核蛋白酶，所以在这15株中有6株能产生激酶，5株能产生溶核蛋白酶，能

同时产生激酶及溶核蛋白酶者有4株，其中尤以070209号菌，在培养过程中对外界酸鹼度及滲透压的变化，具有較强的耐受力，并能同时产生激酶与溶核蛋白酶，比較适合于酶的生产。

上述15株菌曾作一般生物化学鑑定，发现能产生激酶的菌株均不分解乳糖，其結果見第1表。

第1表 乙型溶血性鏈球菌生化个性与产生激酶糖酶的关系

結果 菌种号	培养基	羊脂 血平 琼血	葡 萄 糖	麦 芽 糖	甘 露 醇	蔗 糖	阿 拉 伯 糖	菊 糖	乳 糖	溶 血 纖 維 蛋 白	溶 血 核 蛋 白
70201	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
70207	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
70209	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
201460	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
201570	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-
2011288	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+
70205	乙型溶血	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
201401	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
70202	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
70201	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
70204	乙型溶血	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
70206	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
70208	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
201426	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
201592	乙型溶血	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
MG...鏈球菌	不溶血	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

产生激酶和溶核蛋白酶的培養条件

我們所用的基本培养方法，是参照蒂氏 (Tillett, W.S.)⁽¹³⁾ 及克氏 (Christensen, L.R.)⁽¹⁾ 的，即将菌种接种于含酚紅指示剂的肉湯中，經培养12小时后，再加入50%葡萄糖一定量，此后并需及时将由于細菌分解葡萄糖而产生大量的酸，用 $\frac{1}{2}$ N氢氧化鈉溶液中和。

但为了了解我們选出的菌株在何种培养条件下能够产生最大量的激酶和溶核蛋白酶，我們进行了以下的試驗。試驗中所用菌株，除已特別指出的外，均为070209号；所用培养基为用新鮮肉浸汁制成的普通肉湯，內加0.05%葡萄糖，并于每百毫

升培养基中加入1毫升0.4%酚紅指示剂。

1. 激酶及溶核蛋白酶測定方法

在述及各試驗之前，先将酶的測定方法介紹如下：

(1) 激酶的測定方法⁽¹³⁾：

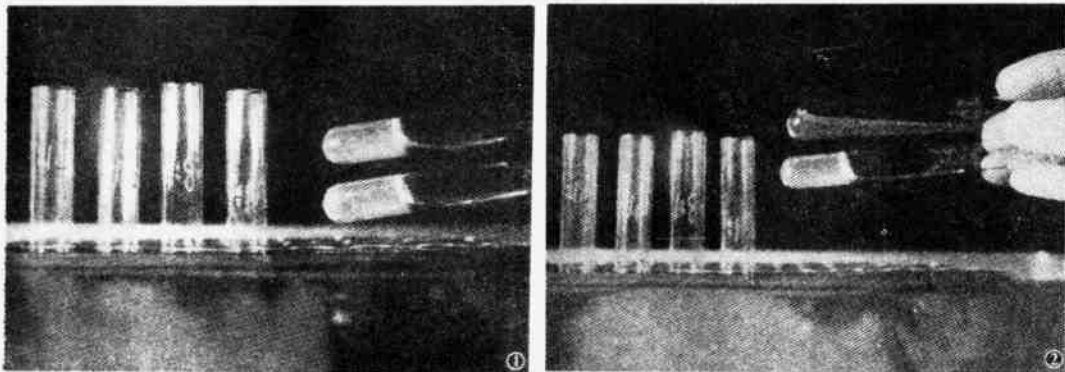
于二支华氏試管中（一为試驗管，一为对照管），各加入經草酸鈉防凝处理后的人血浆0.2毫升、生理盐水0.5毫升，再于試驗管加入需要測定的激酶培养液0.5毫升，于对照管則加无菌肉湯0.5毫升，混合均匀，最后各加入 $\frac{1}{10}$ 克分子量的氯化鈣水溶液0.5毫升，放摄氏37度水浴箱，每半分鐘观察一次，以記錄其凝固时间及凝固后重新完全液化所需時間。如有激酶存在，一般在凝固后30分鐘內又可液化，对照管則凝固如故（第1图）。

酶的强度可用稀释度的大小及完全液化所需的时间的长短来比較；即稀释度越大，完全液化所需的时间越短，則酶的强度越大。本报告中酶的强度大小的比較，均根据在相同的稀释度下完全液化所需的时间（分鐘）的长短来定。我們暫規定以能在10分鐘內溶化0.8毫克纖維蛋白（即正常人血浆0.2毫升）的激酶量为一激酶单位。

山羊、綿羊及家兔的血浆均不能为激酶液化。

(2) 溶核蛋白酶的測定方法：

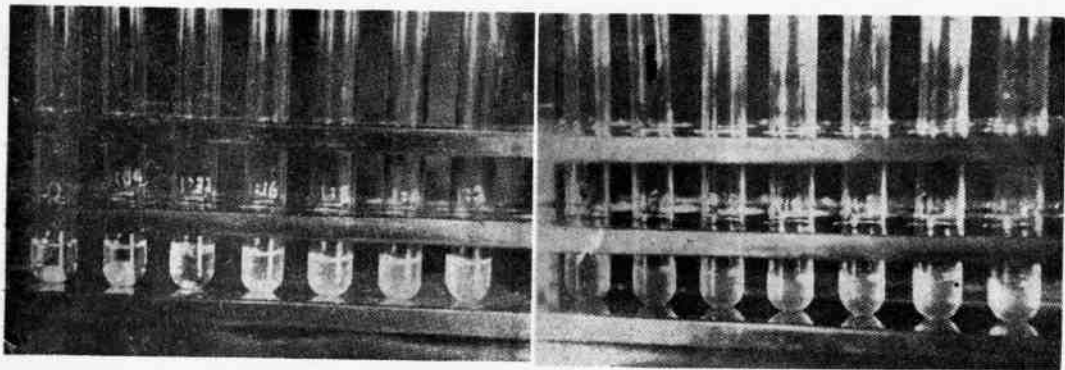
在二支华氏試管（一为試驗管，一为对照管）中，各加入核蛋白0.5毫升，0.75%硫酸鎂($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)水溶液0.1毫升，然后于試驗管加入待测定的溶核蛋白酶液0.1毫升，对照管則加无菌肉湯0.1毫升，二管同时搖动均匀后，放置摄氏37度水浴中，20分鐘后取出，各加3%盐酸0.1毫升，如有溶核蛋白酶存在时，則試驗管中原来粘稠的核蛋白，变为乳糜狀液或細小



① 放 37°C 水浴中后5分鐘, 試管与对照管均凝固。

② 凝固後10分鐘內, 試驗管(1: 320稀釋) 完全溶化, 对照管仍然凝固。

第1图 激酶的測定



第2图 溶核蛋白酶的測定

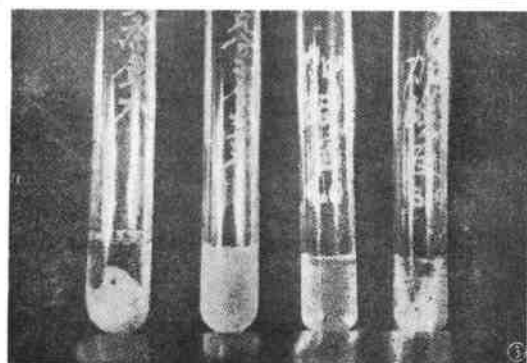
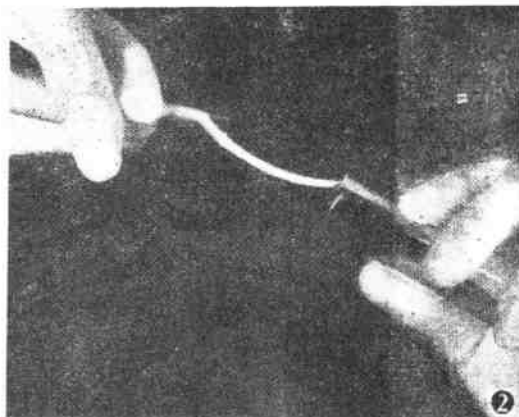
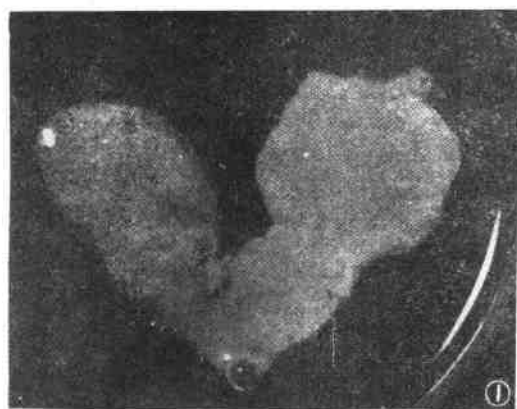
顆粒狀沉澱, 而对照管則形成囊球狀沉澱。酶的强度与稀釋度成正比, 与加酸后管中形成顆粒的大小成反比, 即顆粒大的酶量少(第2图)。

本报告中均以“-”“+”“卅”“卅”来表示溶核蛋白酶的强度, “-”表示阴性, 如第2图中呈囊球狀沉澱者, “+”表示含少量酶, 加酸后管中形成粗顆粒, “卅”表示含酶量最高, 加酸后管中形成細小顆粒呈乳糜狀, 如第2图中右第一管。我們并暫規定能于20分鐘內消化4.8毫克粗制核蛋白的酶量为溶核蛋白酶的一个单位。

上述測定法中所用核蛋白, 是由創口腺汁提炼而得⁽¹⁴⁾, 經生物化学鑑定其加

酸水解后产物中, 含有嘌呤基、磷酸盐和糖, 确为核蛋白。其物理性能为粘稠胶团(第3图); 溶于1克分子量食盐水溶液中, 在0.14克分子量食盐水溶液或蒸餾水中呈薄膜狀沉澱, 加鹼至氫离子浓度9.0以上时成透明清澈液体, 加酸至氫离子浓度3.0—4.0时凝成囊球狀物(第3图)。此核蛋白液經加抗生素后, 可放摄氏4度冰箱儲存备用。

上述溶核蛋白酶的簡便測定方法, 是我們在提炼核蛋白时发现的, 当时由于缺乏粘度計, 而总蛋白量及非蛋白氮的測定, 又因費时較多, 因此对溶核蛋白酶的測定感到困难。在核蛋白提炼时, 发现核蛋白在氫离子浓度3.0—4.0时, 有形成囊



第3图 核蛋白的物理性能

- ① 粘稠胶团
 ② 具有高度粘稠性
 ③ 左起第一管为核蛋白于蒸馏水中
 第二管为核蛋白于1克分子量食盐水溶液中
 第三管为核蛋白于氢离子浓度 9.0 时情形
 第四管为核蛋白于氢离子浓度 3.0 时情形

球状的性能，于是想到如果核蛋白为溶核蛋白酶消化后，可能就失去形成此囊球状的性能，如此，便可用加酸后形成囊球状与否，来作为酶的定性测定；经试验结果，证实了此种推想，同时并证明酶的稀释度越高，即酶量越小，加酸后管内所形成的颗粒越粗，反之，则越小，因此这种方法可以作为溶核蛋白酶的定性测定，作为定量测定，仅能达到大致的比较，尚属不够精细，其优点为简便实用。

本报告中激酶及溶核蛋白酶的测定均按上述二法。

2. 葡萄糖与激酶及溶核蛋白酶产生的关系：

将同一浓度同一量的同一菌株的12小时培养物，接种于含同量（5毫升）培养基的二试管中，放摄氏37度培养12小时后，一管加入0.15毫升50%葡萄糖，另一

管则不加葡萄糖，继续培养12小时，随时矫正其氢离子浓度至7.6，将培养液离心，取上清作激酶及溶核蛋白酶测定，结果：未加葡萄糖者，激酶及核蛋白酶均为阴性，或仅产生极微量的溶核蛋白酶，而加葡萄糖者，激酶及溶核蛋白酶的产量均相当高（第2表）。

第2表 葡萄糖与激酶及溶核蛋白酶产生的关系

試驗次	結果	標本	未加葡萄糖		加葡萄糖	
			激酶	溶核蛋白酶	激酶	溶核蛋白酶
第一次	—	—	—	±	*5'	+++
第二次	—	—	—	—	*5'	+++

*5'表示血漿凝塊完全液化時間為5分鐘

3. 葡萄糖加入時間與激酶及溶核蛋白酶产生的关系：

按試驗2之方法接种三支培养管，但

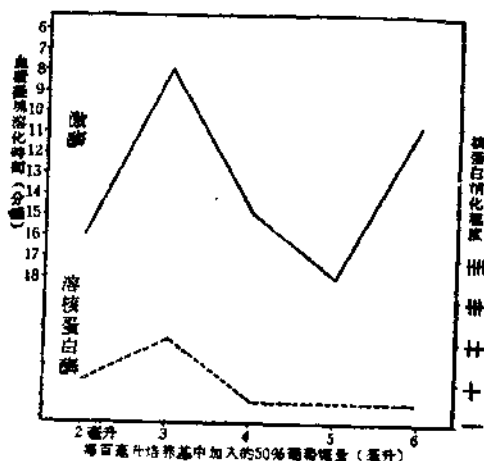
加入0.15毫升50%葡萄糖液的时间不同, 分别为培养后的第12小时, 第14小时以及于第12、第14、第16小时分三次加完, 每次0.05毫升; 均經24小时培养后, 取培养液离心后的上清液, 作二种酶的测定, 結果見第3表:

第3表 葡萄糖加入时间与激酶及溶核蛋白酶产生的关系

試驗次	結果	標本	第12小时		第14小时		分三次加入	
			激酶	溶核蛋白酶	激酶	溶核蛋白酶	激酶	溶核蛋白酶
第一次	5'	冊	7'	卅	5'	冊		
第二次	5'	卅	7'	卅	5'	冊		

由上表可見于培养后第12小时及分次加入葡萄糖者均比較好, 但就方便來說, 于第12小时加入为佳, 此时培养管細菌的浓度, 約等于麦氏 (McFarland) 比浊管第三管, 每毫升約含9万个細菌。

4. 葡萄糖加入量与激酶及溶核蛋白酶产生的关系:



第4图 葡萄糖加入量与激酶及溶核蛋白酶产生的关系

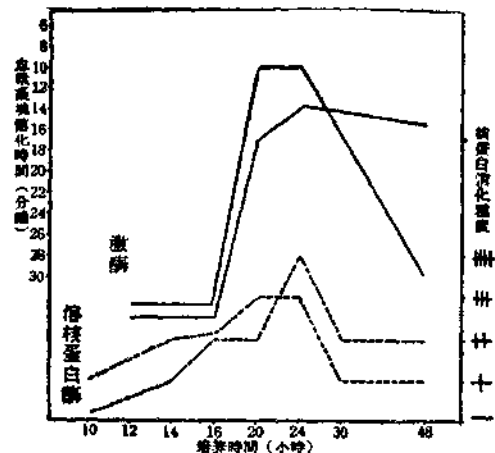
接种物經培养12小时后, 于各培养管分别加入不同量的葡萄糖, 以每百毫升培

养基計, 各加入葡萄糖2、3、4、5或6毫升。繼續培养12小时后, 取培养液上清作二种酶的测定, 其結果見第4图。

由第4图可見以每百毫升培养基中加3毫升50%葡萄糖液为最好, 但可因菌种不同而有差异。

5. 培养时间与激酶及溶核蛋白酶产生的关系:

用相同方法接种八支培养管, 在相同环境下培养不同时间: 10, 12, 14, 16, 20, 24, 30, 48小时后, 取出培养液离心后上清作二种酶的测定, 結果以培养20—24小时者为最好, 詳見第5图。



第5图 培养时间与激酶及溶核蛋白酶产生的关系

6. 培养基的氢离子浓度与激酶及溶核蛋白酶产生的关系:

七支相同接种物培养管經培养12小时后, 各加入3%量的50%葡萄糖液, 然后分别滴定成不同氢离子浓度: 4, 5, 6, 7, 7.6, 8, 9, 再繼續培养12小时, 在培养过程中經常保持上述各自的氢离子浓度。培养完毕后, 各管均滴定成氢离子浓度7.6, 然后离心取上清作二种酶的测