

百日咳高價免疫血清

鍾 昆 劉雋湘

項 全 申

(中央生物製品研究所血清室, 北京)

(中國醫科大學婦嬰學院小兒科, 瀋陽)

關於百日咳的被動免疫及血清療法, 文獻所載結果雖不完全一致, 但一般是認為有效的。兒童年齡愈小得百日咳後的死亡率愈高, 據統計半歲以下的小兒患百日咳者約有四分之一死亡^[1]。自動免疫對於半歲以下的小兒不易生效, 在與百日咳患者接觸後用血清作被動免疫是避免感染的較可靠的方法。在治療方面只是最近才有數種抗生素被證明有效^[2], 在這以前免疫血清是唯一的特效劑; 即使在有了抗生素療法後, 特別是在幾種有效的抗生素能夠大量的供應及普遍使用以前, 免疫血清在百日咳的治療上也是一種重要製劑。

百日咳的被動免疫最初一個時期是使用人血, 健康人血清及恢復期人血清但沒有得到確實的效果^[3]。1933 年 Jundell^[4] 最先報告用百日咳菌苗免疫人而獲得免疫血清, 試用於五個病例, 收到相當效果, 此後十餘年間免疫人血清便逐漸發展, 至今在有的國家裏已成為一種正規的生物製品^[5, 6, 7, 8], 有普通的濃製的, 乾燥的等產品供應臨床應用。同時百日咳免疫血清也有一部份試驗室進行製造, 結果也相當有效^[9], 但缺點是免血清易於引起過敏反應, 須經濃縮純製後才比較安全, 而且家免血量有限, 大量生產有很多困難。

由於防治上的需要, 我們在 1949 年至 1950 年曾製備了一些濃縮百日咳免血清, 在少數病例中試用有顯著的功效, 但因注射後反應大, 且因受條件限制, 不能大量生產, 所以未繼續製造。1951 年又製備了一些百日咳高價免疫人血清, 試用也證明有效。關於百日咳血清之製備及應用問題仍在繼續研究, 本篇僅係初步報告。

血 清 的 製 備

1. 濃縮百日咳免血清。

(1) 免疫用抗原。

① 菌種：1931 年 Leslie 及 Gardner 報告百日咳嗜血桿菌在抗原的變異上分為四相(I, II, III, IV),用第四相的細菌製成菌苗沒有保護作用。以後許多工作者的研究都得到類似的結果。巴郎脫^[10]發現百日咳桿菌有兩種抗原構造不同的菌株,一種為[粒狀型]可產外毒素,另一種為[平滑型]只有內毒素,百日咳菌苗必須同時含有二種毒素才能產生全能的免疫作用。

我們所用的菌種有[薛]及“C”二株是自當地病例中分離,*18457 及 #40105 是來自美國衛生研究院的乾燥菌種這些菌株經過檢查都具備第一相的特性。

決定菌株是否宜於用作免疫抗原,除一般的形態、生化反應等方面的檢查外;還須經過下列三種試驗。

甲、家兔皮膚試驗：培養 24—48 小時的百日咳桿菌十億個懸於 0.1 毫升鹽水中,注射於家兔皮內,24—48 小時須呈出血性反應,最後並引起壞死;

乙、小鼠毒力試驗：四億個菌懸於 0.5 毫升含有 5% 黏液素 (Mucin) 之鹽水內,注射於體重 11—14 克小鼠腹腔,3 日的小鼠須於 96 小時內死亡;

丙、凝集反應試驗：所用菌株須與第一相百日咳血清呈高度之凝集反應,與普通血清至 1: 10,000,與濃縮血清至 1: 100,000。

② 培養基：Bordet-Gengou 馬鈴薯甘油瓊脂加 30% 羊血^[11]。

③ 細菌懸液：在 37°C 培養 48 小時之百日咳桿菌,自斜面上採入含有 0.02% 硫柳汞之生理鹽水中,放冰箱內待細菌殺滅,稀釋使每毫升含菌二百億個,即可用作免疫。

(2) 免疫程序

選體質健康重二公斤以上的家兔,每星期連行靜脈注射三次,然後休息四日,第一週每次 0.1 毫升,第二週每次 0.2 毫升,如此類推,每週增加 0.1 毫升。經五週的免疫,一般血清的凝集反應效價可達 1: 10,000 左右,即可採血。採血後休息一週,可再繼續免疫,一週後又可再次採血。家兔可以長期維持很高的凝集價,且有免疫愈久效價愈高的趨勢。

每只家兔每次約可採血 20—40 毫升。血清分出後放入 -10°C 的冰箱內凍結貯存,至開始濃縮時取出溶化。

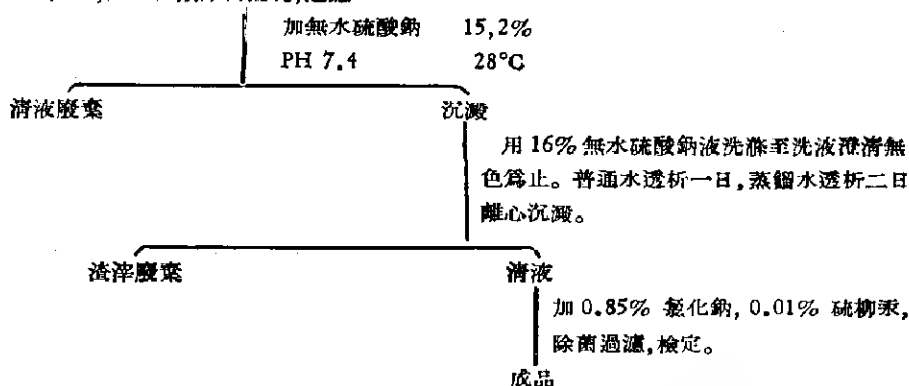
(3) 濃縮方法

用硫酸鈉鹽析法,提取免疫球蛋白,步驟略如圖解所示:

凍 結 血 清

I

放室溫中溶化，離心沉澱除去渣塊，過濾



2. 高價免疫人血清

(1) 免疫用抗原

係用中央生物製品研究所出品的百日咳菌苗^[12]。菌的濃度為每毫升 200 億個菌。製備上與免用免疫抗原不同之點為：所用菌株較多，有 P_1 , P_2 , P_3 ，是北京兒童醫院自病例中分離的， C （見前文），* 18530，* 18380 是來自美國衛生研究院的乾燥菌株；所用培養基係經何秋民大夫改良的羊肝水培養基^[13]；滅菌係用 0.125% 甲醛；防腐劑係 0.002% 硝酸汞苯。

(2) 免疫程序

選擇健康的志願供血人，最好是曾經患過百日咳者，用上述抗原進行免疫。第一程免疫每星期皮下注射一次，第一次一毫升，第二次二毫升，第三次四毫升。第四星期測定血清凝集效價一般可達 1: 1,280 以上即可開始採血，每隔二月可取 200—400 毫升。關於供血人之條件及對其健康之照顧，按照“生物製品檢定法規草案”內的規定辦理。

血 清 効 力 試 驗

1. 凝集反應

將血清稀釋為各種稀釋度，各取 0.5 毫升的加入 0.5 毫升第一相百日咳桿菌懸液使混合，放置 37°C 二小時再放於 6°C 冰箱內過夜，察看結果，以最高稀釋倍數之管仍現明確之凝集反應者為凝集效價。免血清之凝集效價在濃縮前平均為

1:12,800,濃縮後一般在1:100,000以上。人血清效價為1:1,280—1:2,560。

2. 保護力試驗,用兩種方法:

(1) 將血清用鹽水作四倍稀釋 1:4, 1:16, 1:64, 注射 0.2 毫升於體重 10—12 克的小白鼠皮下, 5 小時後在輕度乙醚麻醉下由鼻腔滴入毒菌一億個。未注射血清的小鼠分為三組分別滴入一億、五千萬及一千萬個毒菌作為對照。感染後,觀察十二日,結果見插表 1。

表 1 百日咳免疫血清保護力試驗 (1) 結果

| 血 清 | | | 菌 液 | 注射小白鼠結果 | |
|------------------|-------|--------------|--------|---------|-------|
| 種 類 | 稀 釋 | 注 射 量 毫 升 | 菌數(百萬) | 注射總數 | 死 亡 數 |
| 濃 縮 免 血 清 | 1/4 | 0.2 | 100 | 4 | 0 |
| | 1/16 | ” | ” | 4 | 1 |
| | 1/64 | ” | ” | 4 | 2 |
| 高 價 免 疫 人 血 清 | 未 稀 釋 | 0.2 | 100 | 4 | 0 |
| | 1/4 | ” | ” | 4 | 0 |
| | 1/16 | ” | ” | 4 | 2 |
| 無 | | | 100 | 4 | 4 |
| | | | 50 | 4 | 3 |
| | | | 10 | 4 | 2 |

(2) 將血清稀釋 1:4……1:256, 與等量的毒菌懸液混合, 使每 0.05 毫升含五萬億個菌, 即時滴入小鼠鼻腔。另取對照小鼠三組, 分別滴入未與血清混合之菌懸液 0.05 毫升, 內含菌數各為五億、五千萬及一千萬。觀察十二日。結果見表 2。

表 2 百日咳免疫血清保護力試驗(2)結果

| 血 清 | | 菌 數 | 滴入總量 | 注射小白鼠結果 | |
|------------------|-------|------|------|---------|-------|
| 種 類 | 稀 釋 | (百萬) | 毫 升 | 注射總數 | 死 亡 數 |
| 濃 縮 免 血 清 | 1/16 | 500 | 0.05 | 4 | 0 |
| | 1/64 | ” | ” | 4 | 0 |
| | 1/256 | ” | ” | 4 | 0 |
| 高 價 免 疫 人 血 清 | 1/4 | 500 | 0.05 | 4 | 0 |
| | 1/16 | ” | ” | 4 | 0 |
| | 1/64 | ” | ” | 4 | 3 |
| 無 | | 500 | 0.05 | 4 | 4 |
| | | 50 | ” | 4 | 3 |
| | | 10 | ” | 4 | 1 |

由此二表可以看出血清之保護作用是很明顯的。

血清臨床應用的結果

1. 濃縮兔血清

因產量不多，僅在少數病例中試用。有的病例的治療經過未能作系統的觀察，結果不能判明，但由所治病例的臨床症狀及病程看來，如早期應用濃縮兔血清，似有減輕症狀及縮短病程的效果。缺點是注射後反應較大，局部反應為紅腫疼痛及機能障礙一至二日消退。全身反應為發熱頭痛。茲將比較典型的三個病例簡述如下：

第一例：男孩，四歲，於發熱病後之第四、五日開始治療，治療前每日陣咳八、九次，每次二、三分鐘，夜間不能安眠，有嘔吐。共注射血清三次，第一次、第二次各10毫升，第三次5毫升，每次間隔二天，均為肌肉注射。第一次注射後咳嗽即開始減少且每陣時間縮短。第二次注射後每日祇咳三、四次，每次僅十數秒鐘，夜間已

能安眠。第三次注射後症狀逐漸減退，約 20 日痊愈。

第二例：男孩，二歲，為上述病例之弟，與哥哥先後感染，治療前每日陣咳三、四次，每陣十餘秒，有嘔吐，發熱， $38-39^{\circ}\text{C}$ ，於發病後的第三、四日開始治療，第一次肌肉注射血清 10 毫升後，症狀減輕一些，但因局部反應較大，第二次停止注射，

表 3 百日咳高價免疫人血清臨床應用結果

| 病案 號數 | 年 齡 | 已咳 日數 | 治 療 前 陣咳次數 | | 治療前 每次陣 咳時間 (秒) | 注 射 血 清 次 數 | 血 清 總 量 (毫升) | 治 療 後 陣咳次數 | | 治療後 每次陣 咳時間 (秒) |
|----------|--------|----------|---------------|----|--------------------------|-------------------|--------------------|---------------|----|--------------------------|
| | | | 日 | 夜 | | | | 日 | 夜 | |
| 1 | 4 歲 | 7 | 4 | 4 | 60 | 2 | 30 | 2 | 1 | 10 |
| 2 | 1歲6月 | 7 | 6 | 4 | 180 | 3 | 60 | 1 | 2 | 10 |
| 3 | 1歲4月 | 10 | 8 | 9 | 90 | 3 | 40 | 1 | 0 | 3 |
| 4 | 7 月 | 10 | 2 | 3 | 120 | 1 | 10 | 1 | 0 | 3 |
| 5 | 2 歲 | 7 | 3 | 5 | 120 | 3 | 50 | 1 | 2 | 3 |
| 6 | 2歲2月 | 7 | 2 | 3 | 60 | 1 | 20 | 0 | 1 | 4 |
| 7 | 2 歲 | 20 | 7 | 10 | 90 | 3 | 35 | 2 | 1 | 3 |
| 8 | 3 歲 | 20 | 6 | 7 | 60 | 3 | 50 | 1 | 1 | 4 |
| 9 | 3 歲 | 20 | 6 | 5 | 90 | 2 | 25 | 1 | 2 | 4 |
| 10 | 5歲3月 | 14 | 3 | 3 | 60 | 3 | 45 | 1 | 2 | 4 |
| 11 | 1歲2月 | 14 | 5 | 4 | 120 | 3 | 50 | 2 | 1 | 6 |
| 12 | 3 歲 | 20 | 6 | 5 | 90 | 2 | 40 | 2 | 1 | 10 |
| 13 | 1歲半 | 20 | 5 | 3 | 60 | 3 | 30 | 2 | 2 | 10 |
| 14 | 1歲半 | 14 | 10 | 6 | 120 | 2 | 40 | 1 | 2 | 10 |
| 15 | 1 歲 | 20 | 7 | 4 | 180 | 3 | 30 | 2 | 2 | 10 |
| 16 | 5 歲 | 20 | 7 | 10 | 180 | 3 | 30 | 2 | 2 | 15 |
| 17 | 10月 | 20 | 6 | 5 | 90 | 2 | 30 | 2 | 3 | 20 |
| 18 | 5 月 | 10 | 10 | 10 | 120 | 3 | 30 | 12 | 10 | 120 |
| 19 | 4 歲 | 14 | 4 | 2 | 60 | 5 | 55 | 7 | 7 | 60 |
| 20 | 9 歲 | 14 | 6 | 5 | 90 | 3 | 30 | 6 | 3 | 40 |

至八、九日症狀加劇，每日陣咳次數增為七、八次，每次一分多鐘，有嚴重嘔吐，乃又注射免血清 10 毫升，一日後陣咳次數開始減少，陣咳時間開始縮短，三日後又

注射 10 毫升，以後症狀漸輕，約二十五日痊癒。

第三例：男孩，二歲，治療前每日陣咳四、五次，每次約半分鐘，於發病之第二十五日開始治療，肌肉注射血清二次，每次 10 毫升，未見明顯效果。約四十日痊癒。

2. 高價免疫人血清

係在瀋陽中國醫科大學婦嬰醫院小兒科試用。第一批試用於二十個病例。原計劃劑量為每人 60 毫升分三次注射，每次間隔二、三日，每次 20 毫升，均為肌肉注射，因反應較大，未照原計劃劑量使用，但效果仍然明顯。絕大多數病例於開始血清治療後二天至二天半症狀即大減。

由表 3 可以看出用血清治療二十例中，有十七例收到顯著的效果。

第二批試用於三十八例，年齡自七個月至五歲，開始治療時間為發病之第四天至第二十五天，多數病例為第十至二十天。多數病例注射三次，每次十至二十毫升，每隔二、三日注射一次，均係肌肉注射。據初步統計除有八例因注射一次後未來復診結果不明外，其餘三十例有顯著效果者二十一例（70%），有微效者二例（7%），不見效者七例（23%）。

兩批試用結果均有反應。發生局部反應者幾佔 100%，局部反應為注射部位紅腫疼痛，重者有機能障礙，持續一至二天。有全身反應者約為 30%，且體溫上升至 38--39°C。

因反應關係在治療時許多病例未敢大量注射，對於治療效果可能有相當影響。

討 論

1. 關於百日咳免疫血清的用量文獻所載不一致 [5, 6, 7, 14, 13, 16, 17, 18]，我們的工作也未得到規律，還須繼續研究。我們試用高價免疫人血清時，原計劃每例注射三次，每次 20 毫升，共 60 毫升，但因試驗所用血清注射後，普遍有反應，未按原計劃注射，大半只注射 30—40 毫升。但由我們試驗的結果看來雖用量較小，效果仍然顯著，且用量大的與用量小的似乎並無區別。有兩個病例只注射了一次，一個注射了 10 毫升，一個注射 20 毫升。有四例注射兩次總量由 25 至 40 毫升也同樣得到效果。

2. 試驗所用血清注射後引起反應，對於臨床應用有不良影響。反應的原因

據我們的分析是由於製造過程中存在着缺點,並非由於血清本身的緣故。據我們檢查的結果發現有兩個原因:

(1) 製造手續不夠嚴格,產生了較多的熱原質,注射後可引起發燒、頭痛等全身反應。

(2) 血清在最後用賽氏濾過器 (Seitz filter) 除菌過濾時,因濾過困難,過濾時間太長,又因濾過器是銅製的,所鍍的防銹層過薄,產生銅銹混入血清中,量雖極微,但是可以刺激局部,使發生腫痛等反應。

這些原因都是可以避免的,以前作者之一^[19]曾製備出濃製百日咳兔血清注射於動物及人體並沒有發生副作用,亦無熱原質。最近我們製造了大量的流行性乙型腦炎免疫人血清,改善了過濾方法,避免了產生銅銹及熱原質,所製出之成品也幾乎完全沒有副作用,所以祇要注意製造方法,則除了兔血清的過敏性反應不易完全避免外,一般全身及局部反應是可以避免的^[20]。

總 結

1. 本文報告百日咳免疫人及兔血清之製備方法與臨床應用之初步結果。
2. 我們對於兔血清臨床應用經驗尚不多,還不能下肯定的結論,但人血清的效果據文獻所載,一般認為有效。我們的工作也證實了這結論。百日咳免疫血清之製備應當引起各生物製品廠、所의 注意。
3. 關於預防及治療用的劑量,文獻所載不一致,我們的工作也未得到規律,還須繼續研究。

參 考 文 獻

- [1] Lapin, J. H. Whooping Cough Springfield, Ill. Charles C. Thomas, p. 17, 1934.
- [2] 徐和榮,中華新醫學報, 1951, **2**, 285.
- [3] Bradford, W. L., *Am. J. Dis. Child*, 1935, **50**, 918.
- [4] Jundell, I. *Act. Pediat*, 1933, **15**, 1.
- [5] Kendrick, P., *J. Pediat*, 1936, **118**.
- [6] McGuinness, A. C.; Stokes, J., Jr., & Mudd, S., *J. Clin. Invest*, 1937, **16**, 185.
- [7] Cohn, P. & Lapin, J. H., *J. Pediat*, 1939, **15**, 78.
- [8] Flosdorf, E. W., McGuinness, A. C.; Kimbell, A. C., *Am. J. Dis. Child*, 1941, **62**, 492.
- [10] 巴耶脫,蘇聯醫學,1952,第七年第八期,23頁(原載蘇聯兒科學1951年第二期)
- [11] 生物製品製造程序,第一版,北京,第115頁,1951。
- [12] 同上,第8頁
- [13] 何秋民,未發表材料
- [14] Katsampes, C.; McGuinness, A. C. & Bradford, W. C., *Am. J. Dis. Child*, 1939, **58**, 1234.
- [15] Cohn, P., Weichsel, M., & Lapin, J. H., *Pediat*, 1940, **16**, 30.
- [16] McGuinness, A. C.; Bradford, W. J., & Armstrong, J. G., *J. Pediat*, 1940, **16**, 21.

- [17] McGuinness, A. C., Armstrong, J. G. & Felton, H. M., 1944, *J. Pediat.* **24**, 249.
[18] Scheinblum, I. E. & Bullowa, J.G.M., 1944, *J. Pediat.* **25**, 49.
[19] 劉雋湘, 未發表材料
[20] 鍾 昆, 未發表材料

THE PREPARATION AND CLINICAL USE OF PERTUSSIS IMMUNE SERUM

CHUNG K. and LIU C. H.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

C. S. HSIAN

National Medical College of China, Shenyang

The prophylactic and therapeutic use of hyperimmune serum in pertussis has been reported previously by several workers with favorable results. The present report presents our experience on the preparation and clinical trial of anti-pertussis human and rabbit sera.

Rabbits were immunized by intravenous injections of merthiolate-killed phase I *Haemophilus pertussis*-suspension. Serum with an agglutination titre of over 1:10,000 has been obtained. The immune rabbit serum was concentrated by salting out with 15.2% anhydrous sodium sulfate at pH 7.4 and 28°C. The agglutination titre of the concentrated serum was over 1:100,000.

Hyper immune human serum was obtained by immunizing healthy adults with phase I pertussis vaccine produced by the National Vaccine and Serum Institute, following the schedule recommended by Flosdorf. Blood was collected after agglutination titre of over 1:1,280 has been reached.

Both rabbit and human sera were tested for their protective power on white mice and were found to be satisfactory.

Owing to the limited amount available, rabbit serum was only tried on a few clinical cases. Although far from being conclusive, the results obtained have been fairly encouraging.

Human hyperimmune serum has been tried on 2 groups of clinical cases. A total of 58 children from 7 months to 5 years of age, have been treated. Most of them received 2 to 3 intramuscular injections of 10 to 20 ml. each at 3 to 4 days intervals. Ambulatory cases failed to return after the first injection and were thus eliminated from the data. The results obtained from the remaining cases were as follows: 38 cases (76%) with good response, 2 cases (4%) with slight response and 10 cases (20%) with poor or no response. The great majority of cases with good response showed marked improvement 2 to 2½ days after the beginning of the serum treatment and recovered in less than one month.