

抗鼠疫噬菌體血清的研究及其應用*

鄒 浴 身

(吉林省鼠疫防治所細菌檢驗科)

在防治鼠疫工作中,爭取早期從各類被檢材料中,如病人、屍體、齧齒類動物及媒介昆蟲(蚤類、蟬類),找到鼠疫菌是極其重要的。

在實際工作中,並不是一切材料都能順利的找到鼠疫菌。屠曼斯基教授認為:在檢查齧齒類動物器官的鼠疫菌時,曾數次由齧齒類動物器官中分離出鼠疫噬菌體^[1]。另外,在檢查慢性病人時(化膿性橫痃,開放性橫痃等),屠曼斯基氏認為在檢查材料中亦能遇到有鼠疫噬菌體存在^[2]。同時在實驗室內以陳舊的鼠疫菌為研究對象時,常因這類菌種中自然發生噬菌體,而使菌種移植到培養基上時,發育非常衰弱,甚至迫使其死亡的事實^[1]。我們曾在實驗室內於長期保存的陳舊鼠疫菌種中,發現3例自然產生噬菌體的實例。由此可見,上述情況嚴重地影響了從各類含有鼠疫菌材料中早期找到鼠疫菌。因而給工作帶來很多麻煩。為了解決此類問題,茲將初步探討方向介紹如下:供同道者參考。並希指正。

(一) 抗噬血清的製備方法

免疫實驗所用的動物是家兔。實驗用抗原之溶菌效價為 10^{-10} 以上,以該抗原實行家兔耳靜脈注射免疫。

免疫分期注射;第1週期的每次免疫應間隔2—3日,其注射抗原量初次為1.0毫升,後逐漸增至1.5毫升、2.0毫升;第2、3週期則實行連續注射大量抗原,每次注射量為4.0毫升,每期之間隔為4—5日。其應用抗原全量為60毫升或更多。在最後一次注射後7日試血,當其抗體增加到一定濃度時,則實施全部採血。將析出之血清測定其抗溶菌效價。

(二) 抗噬血清凝集價及抗溶菌效價測定

將析出之免疫血清放在 56°C 溫水槽中30分鐘滅能後,將被檢血清實行倍數階段稀釋;從1:2.5倍、1:5倍……順次稀釋至1:20480倍,用正常血清及生理食鹽水做為對照。而每支試管內再加入稀釋1:20倍之抗原1.0毫升,混合後放於 30°C 之孵

* 1956年10月13日收到。

本文曾蒙中國醫科大學微生物學教研室景冠華副教授指導,特致謝忱。

表 1 抗體血清(第一次免疫動物)效價鑑定結果

動物編號	稀釋倍數	結果		1:2.5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	對 照	
		凝集反應	固體培養															正常血清	生理鹽水
6 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
7 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
8 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
9 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
11 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
13 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
18 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
19 號	凝集反應	(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
		(++)	-	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

表 2 抗噬血清(第二次電凝動物)效價鑑定結果

稀釋倍數 動物編號		凝集反應	對照															
			1:2.5	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	正常血清	生理鹽水
白四號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
灰二號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
綠零號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
一號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
黑零號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
黃號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
四號	凝集反應	(+++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(++)	(-)	(-)	(-)
	固體培養	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

註：凝集反應：(++) 凝集顯著凝集塊沉澱於管底並呈乳白色混濁。
(++) 凝集較顯著凝集塊沉澱於管底並呈乳白色混濁。
(+) 提攪時可看到微小凝集塊並呈乳白色混濁。
(±) 用凝集鏡可看到有少數微小凝集塊，並呈乳白色混濁。
(-) 無凝集塊所見並呈乳白色混濁。
固體培養：+ 證明有明顯之凝菌帶。
- 證明沒有凝菌帶。

箱內培育,經 18—20 小時後觀察其凝集現象。結果見表 1 和表 2。

爲了進一步證明被檢液中是否有噬菌體存在,可將鼠疫菌植於普通瓊脂培養基上,再將經 30°C, 18—20 小時後的定量用倍數混合稀釋液,分別滴於各個培養有鼠疫菌的培養基上,使其流成直線,再次放入原溫度孵育 24 小時視其有無噬菌現象,其結果如表 1 和表 2。證明噬菌體有無之另一方法是將鼠疫菌接種於 pH 7.2 之肉湯中,並同時分別加入上述各倍數混合稀釋液 0.5 毫升,則將其放入 30°C 溫箱中經 24 小時培養後觀察其溶菌界限。

前述進一步證明被檢液中有無噬菌體,是補助定量凝集反應最確實的辦法。前者在操作中簡便、確實、容易掌握,其結果表現明顯,因之該法較爲實用。後者,則因在操作上較前法繁雜,在觀察其溶菌現象亦有某些困難。這是因爲有少部分細菌對噬菌體具有抵抗能力,該部分細菌在一定時間內還要繼續繁殖^[3],使其培養混濁,而造成觀察溶菌界限上的困難,因此,此法在實際應用上很不適用。

從上述(表 1、表 2)之結果證明了鼠疫噬菌體是良好的抗原,並有較高的免疫能力。但因實驗動物個體之差,其所形成之免疫力,亦有不同,高者可達兩萬倍以上;多數都在兩千倍以上。從定量反應所呈現之現象可知抗原與抗體的反應,和其它抗原與抗體之間的反應很相似,並有高度的特異性,用特殊的抗體(抗噬血清),它對抗原(噬菌體)呈現一種中和或消滅其活動能^[4,5]。當免疫血清和相應噬菌體混合後,便呈現凝集和沉澱現象。當然確實證明噬菌體的有無還需要其他的方法才能達到目的。

(三) 抗噬血清性狀之鑑定

1. 抗噬血清對特異之噬菌體呈現中和作用時,可表現出凝集現象而沉澱,同時被檢液呈現乳白色混濁。此外,抗噬血清對特異之噬菌體所發生之中和作用與時間、溫度有密切關係。我們在實驗室曾作過這樣一個實驗,其方法是以 1:20 倍的抗噬血清和 1:20 倍的特異噬菌體做成等量混合液;並分別以 25°C, 37°C, 45°C 之溫水槽加溫分別於不同的時間內,將該混合液,分別加 1 滴於培養有鼠疫菌的普通瓊脂培養基上,使其流成直線後,放入 30°C 之孵箱內孵育 24 小時,觀察有無噬菌現象。其結果如表 3。

表 3 抗噬血清對特異噬菌體發生中和作用的時間與溫度關係

實驗 溫度 (°C)	實驗時間 (小時)												
	立刻	1	2	3	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8
25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
45	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

註: + 表示有噬菌帶; - 表示無噬菌帶。

從表 3 可看出,抗噬血清對特異噬菌體所發生中和作用的時間與溫度有很大關係。將抗噬血清和特異噬菌體混合液置於 25°C 的溫水槽中於 8 小時內還未發生中和作用,而噬菌體的活動能力還很強;置於 39°C 溫水槽者,則於 7 小時內抗噬血清即將特異之噬菌體中和消滅其活動能力;而置於 45°C 溫水槽者則於 4.5 小時內特異噬菌體即失去了活動能力。根據上述實驗結果可得出這樣一個結論;抗噬血清對特異噬菌體發生中和作用而消滅其活動能力,在較高的溫度比低溫要快得多。

根據使用方法不同,抗噬血清持續有效時間有所不同。我們在實驗過程中,曾注意到屠曼斯基氏的鼠疫細菌學中引用了馬利娜瓦在研究此項工作中得到這樣一個結果:“血清可以在培養前 15—20 分鐘添加,因為培養前 3 小時所添加之抗噬血清,對噬菌體幾乎不發生應有的作用”^[7]。我們也曾作了類似有關這些問題的實驗,在實驗中採取兩種不同的使用方法;第一種方法是將抗噬血清均勻的以特製小耙分佈於培碟普通瓊脂培養基表面上。在不同的時間分別培養事先製好的特殊細菌浮游液(將被噬菌體作用後選擇其將要被溶解或近似溶解的鼠疫菌菌落或菌苔,或者是將製成之菌游液再加入適量特異之噬菌體)。經這樣處理後將其放入 30°C 孵箱內,經不同的時間分別觀察其發育結果,其結果如表 4。另一方法,是以 2% 濃度的抗噬血清加入事先溶解好的普通瓊脂培養基內(在加入抗噬血清時應注意在 55°C 左右加入之),澆注平碟經無菌實驗後,保存於室溫中,則將其上述製成之特殊的菌浮游液,按其不同時間分別培養之,將培養之培碟放入 30°C 孵箱內培育之,經不同時間分別觀察,其結果如表 5。

從表 4、表 5 可看到,根據使用方法不同,抗噬菌血清持續有效時間亦有所不同。利用第一個方法,其持續有效時間為 3 小時,如超過此限者,抗噬血清就基本上失去了有效作用。此法一般不適於目前所担负的繁重工作任務。而第二個方法則抗溶菌效能持續有效時間為 5 日以上,如將其保存於冰箱內其持續有效時間將更長。我們認為此

表 4 添加抗噬血清於普通瓊脂平碟培養基表面上的持續時間與效果的關係

添加時間 觀察時間	30 分	1 小時	1.5 小時	2 小時	2.5 小時	3 小時	3.5 小時	對照
24 小時	有數在的菌落分散在全培養基上面	發育之菌落分佈於培養基上 $\frac{1}{2}$ 處	發育之菌落分佈上 $\frac{1}{3}$ 處	菌落散在的分佈於培養基上	全部培養基上有瀰漫及散在的菌落分佈	在培養基有集結之菌落 10 餘個	沒有菌落生長	沒有菌落生長
48 小時	視有 R 型菌落並有少數菌落呈衰退型	R 型菌落分佈於全培養基上面	全部培養基上皆可看到 R 型菌落	全部培養基上皆可看到 R 型菌落	R 型菌落連結及分散於培養基上面	有成熟的 R 型菌落 10 餘個	肉眼看不清晰之幼小菌落	沒有菌落生長
72 小時	同 上	同 上	同 上	同 上	同 上	同 上	同 上	同 上

表 5 2% 抗噬血清與瓊脂培養基混合後持續效果與時間關係

觀察時間	添加抗噬血清日期		1 日	2 日	3 日	4 日	5 日	6 日	7 日	8 日	10 日
	※										
24 小時	微弱透明之小菌落分佈培養基表面 $\frac{1}{4}$		透明灰白色小菌落分佈培養基一端均佔培養基表面全部 $\frac{1}{2}$	呈灰白色微小菌落分佈培養基表面的 $\frac{1}{5}$	呈灰白色微小菌落分佈培養基表面 $\frac{1}{5}$	未發育	未發育	未發育	未發育		
48 小時	呈灰白色透明菌落分佈培養基顯微鏡所見：呈 R 型菌落		菌落呈散在分佈培養基表面之 $\frac{1}{2}$ 呈灰黃色透明菌落顯微鏡觀察呈 R 型菌落	菌落呈散在分佈培養基表面顯微鏡觀察呈 R 型菌落	透明弱小菌落分佈培養基表面之 $\frac{1}{2}$ 顯微鏡觀察呈 R 型菌落	呈透明灰白色弱小菌落顯微鏡觀察呈 R 型菌落	呈透明灰白色弱小菌落分佈培養基表面的 $\frac{1}{4}$	未發育	未發育		
72 小時	成熟菌落散在分佈於培養基全部菌落呈黃褐色		菌落呈散在分佈於培養基表面之全部	菌落滿散培養基全部表面上	呈散在分佈培養基全部呈黃褐色顯微鏡觀察呈 R 型	均勻分佈在培養基表面上的 $\frac{1}{2}$	呈散在分佈培養基表面上 $\frac{1}{2}$ 顯微鏡觀察呈 R 型菌落	呈微弱透明小菌落分佈於培養基表面的 $\frac{1}{2}$	呈灰白色菌落分佈於培養基表面 $\frac{1}{4}$	呈弱小菌落分佈於培養基表面 $\frac{1}{5}$	
96 小時	同 上		同 上	同 上	同 上	呈散在分佈培養基表面全部 (部分有噬菌斑) 菌落呈 R 型	菌落分佈於培養基之全部有噬菌斑	呈灰白色菌落分佈於培養基上 $\frac{1}{2}$ 顯微鏡觀察呈移型 (R) 部分有噬菌斑	呈灰黃色透明之小菌落。顯微鏡觀察呈 R 型部分有噬菌斑	同 上	
對 照	沒發育		沒發育	沒發育	沒發育	沒發育	沒發育	沒發育	沒發育		

法在現實工作的應用上是有其極大意義的。

(四) 抗噬血清之效果及其應用

上述實驗資料,足能證明抗噬血清的實際效果。但爲了更能使結果接近於實際,我們又作了如下一個實驗,方法是:取 60 個小白鼠,在每個小白鼠的皮下注射鼠疫菌菌游液 0.2 毫升,同時將特異之 10^{-10} 噬菌體 0.1 毫升注入腹腔內,待動物死亡後,以含 2% 抗噬血清之培養基行細菌學檢查,並以普通瓊脂培養基做爲對照,所得結果是:除 14 例由於有其它微生物之生長未觀察,6 例未培養出鼠疫菌外,在含有 2% 抗噬血清瓊

脂培養的其餘 40 例都獲得陽性的結果。這 40 個陽性例分離出的是富有活力的典型鼠疫菌菌落。而作對照用之普通瓊脂培養基則未獲得到 1 例有鼠疫菌的生長。據上述實驗可得出這樣一個結果,凡鼠屍含有鼠疫噬菌體時,如應用抗噬血清處理後之培養基作培養時,其中絕大多數都能獲得陽性結果,不難推知在實際應用上是有極高價值。

除此之外,在我們實驗室內有 3 例陳舊之菌種,曾因自然產生噬菌體而使其發育衰弱,當即應用含有 2% 抗噬血清瓊脂培養基分離,結果使將要死去之菌種得到重新復活,但我們亦曾應用普通瓊脂培養基分離過,結果皆告失敗。從這實例,更進一步證明了抗噬血清的效果及其實際使用價值。

前述兩種使用方法,從實用來看我們推荐使用第二種方法,它不但持續有效時間長,而且最適於現實繁重的工作任務,同時對設備差、工作環境不良的條件下更為適用。從我們的工作經驗證明:在使用抗噬血清處理過之培養基,有時一次分離被噬菌體作用後的病態菌種;尤其是時間長者成功較難,最好實行返復 2—3 次遞次移植,這樣一般容易獲得良好結果。而抗噬血清對已被噬菌體完全溶解之菌體是無效的。

至於使用範圍應根據具體情況決定,一般來講在分離含有鼠疫菌之材料都可以應用。不過在下列幾種情況下應用更有實際意義:(1) 檢查齧齒類動物鼠屍,特別是腐亂之屍體(包括人的屍體);(2) 檢查慢性病人的腺穿刺液,淋巴腺腫潰瘍、皮膚潰瘍及肺型鼠疫病人之痰液等;(3) 對檢查齧齒類動物體外寄生蟲如蚤類、蟬類時皆可應用。

(五) 結 語

1. 抗噬血清由於使用方法不同,其持續對特異噬菌體的有效時間也有所不同;將抗噬血清塗佈於普通瓊脂培養基表面時,於 3 小時後即失去效果。將抗噬血清加於溶解後 55°C 左右之瓊脂培養基內保持於室溫中,而持續有效時間為 5 日以上,如若保存於低溫,其持續時間會更長。

2. 一切被檢材料在應用抗噬血清時,應爭取時間;被噬菌體作用的時間愈長愈不易成功,有時須反復 2—3 次,方可成功。

3. 凡被檢材料含有噬菌體時,如果及時的應用含有抗噬血清之培養基作分離培養時,一般都能得到滿意的結果。

參 考 文 獻

- [1] 屠棧斯基: 鼠疫細菌學,東北人民政府衛生部出版,1951 年,72 頁。
- [2] 屠棧斯基: 鼠疫細菌學,東北人民政府衛生部出版,1951 年,69 頁。
- [3] 陳少伯: 醫用細菌學下冊,龍門聯合書局出版,1954 年,690 頁。
- [4] 陳少伯: 醫用細菌學下冊,龍門聯合書局出版,1954 年,689 頁。
- [5] 榮氏細菌學,中華醫學會出版,1953 年,309 頁。

STUDY OF THE ANTISERUM TO THE PLAGUE BACTERIOPHAGE

CHOW YU-SHEN

Plague Prevention Institute, Kirin

(ABSTRACT)

The author utilized the agglutinating reaction between the antiphage serum and the broth filtrate from lysed culture containing high titre phage as an indication of the titre of the antiserum. It was found to correspond to the neutralization test on agar, and the author considered the method to be reliable and much more simple. Having obtained a high titre serum, it was applied in the diagnosis of plague with decayed materials, with clinical materials, and with ectoparasites with success.