

丙型副傷寒沙門氏菌的 Vi 抗原的研究 (二)

濱野滿雄* 趙永林 周 勵

(大連生物製品所)

緒 言

作者之一曾在第一報告^[1]中就葡萄糖琼膠培养基对 Vi 抗原,特别是对丙型副傷寒沙門氏菌 Vi 抗原產生的影响作了敘述。後來,作者在用甘油琼膠基檢查东北地區新分離的丙型副傷寒沙門氏菌菌株時,發現該培养基对 Vi 抗原的發育較通常用的改良的 Bordet 氏培养基為佳。本文除將甘油琼膠培养基对丙型副傷寒沙門氏菌 Vi 抗原的作用,並就數种理化因素对 Vi 抗原的安定性以及在家兔体内產生 Vi 抗体的能力等問題,作首次報告。

試驗方法與結果

供試菌株為 1951 年由东北地區分離的 32 株丙型副傷寒沙門氏菌;並以傷寒沙門氏菌 Watson 株 (V 型)、傷寒沙門氏菌 Vi I (X 型) 和含有 Vi 抗原的巴勒魯普菌株 (Ballerup strain) 做对照。

(一) 甘油琼膠培养基对 Vi 抗原發育的影响

1. 甘油濃度

將丙型副傷寒沙門氏菌菌株接種在甘油含量為 0.1—10% 的甘油琼膠培养基上,經 37°C 孵育 16—18 小時後,製成福馬林菌液 (凝集原) 備用。然後用 Vi 因子血清 (凝集價為 1:800) 及丙型副傷寒沙門氏菌 O 因子血清 VII (凝集價為 1:800) 進行凝集反應。血清由 1:100 稀釋到 1:3,200。凝集原与凝集素混合後,於 37°C 放置 2 小時再于室溫放置一夜,其結果如表 1 所示。

* 現在通訊處為河北醫學院。

表 1 普通琼膠及甘油琼膠培養的 Vi 及 O 凝集反應

菌 株	因 子 血 清	普通琼膠培养	甘 油 琼 膠 培 养							
			0.1%	0.2%	0.5%	1.0%	2.0%	5.0%	10%	
1137号	Vi	○	○	○	(800)	(800)	800	—	—	
	VII	3200	3200	3200	3200	1600	3200	—	—	
	Vi	○	—	—	—	—	400	400	400	
	VII	3200	—	—	—	—	3200	3200	3200	
5号	Vi	○	○	○	○	(800)	800	—	—	
	VII	3200	3200	3200	3200	3200	3200	—	—	

阿拉伯數字表示凝集價；
括弧內數字表示帶現象；
○……表示 1:100 稀釋血清為陰性；
—……表示未測定。

由表 1 得知，2% 甘油琼膠培养基对 Vi 抗原發育最為良好，以安东氏^[2] Vi 法染色時，並能明顯地見到 Vi 抗原。

2. 以普通琼膠及 2% 甘油琼膠培養物作 Vi 及 O 玻片凝集反应

將 32 株丙型副傷寒沙門氏菌接種於 2% 甘油琼膠及普通琼膠培养基上，經 37℃ 18—20 小時孵育後，用 Vi 及 O 因子血清做玻片凝集反应，結果如表 2 所示。用甘油琼膠培养基孵育的 32 個菌株，Vi 凝集反应均為陽性；但用普通琼膠培养基孵育的 32 個菌株中，僅有九株為陽性。上述兩種培養的 O 凝集反应均為陽性，兩者沒有區別。

表 2 普通琼膠培養及 2% 甘油琼膠培養的 Vi 及 O 凝集反应結果

培 养 基	因 子 血 清		菌 型
	Vi	O	
普通琼膠培養	9	32	W 23 VW 9
甘油琼膠培養	32	32	VW 32

3. 2% 甘油琼膠培养基对三個丙型副傷寒沙門氏菌株的 Vi 凝集原的影响

以含有 Vi, O 及 H 抗原的代表株，1137 号，5 号及 6 号与 Vi 因子血清，O 因子血清 VII, H 因子血清 C (凝集價為 1:12,000) 及 5 (凝集價為 1:6400) 作定量凝集反应。試驗方法与 (1) 相同，其結果如表 3 所示。根據凝集反应結果，証明甘油琼膠培養物的 Vi 凝集價為 1:400 或 1:800，而普通琼膠培養物則為陰性(兩種培養物的 O 及 H 凝集反应沒有特殊的區別)。

表 3 甘油琼膠培养基对 Vi、O、H 的影响

菌 株	因 子 血 清	普 通 琼 膠 培 养	甘 油 琼 膠 培 养 (2%)
1137号	Vi	○	400
	VII	3200	3200
	C	12800	12800
5号	Vi	○	800
	VII	3200	3200
	C	6400	3200
	5	6400	3200
6号	Vi	○	400
	VII	3200	1600
	C	6400	6400

4. 甘油琼膠培养基对于丙型副傷寒沙門氏菌菌型的變異作用

將 1137 号菌株接种于含有 0.1 毫升丙型副傷寒沙門氏菌家兔血清（具有 Vi, O, H 抗体）的 10 毫升肉湯培养基內。經 37℃ 孵育 15 天後,再移种于普通琼膠及甘油琼膠培养基上, 37℃ 孵育 20 小時。然後製成菌液並以福馬林或 100℃ 加熱 30 分鐘处理。該菌液与 Vi 及 O 因子血清的定量凝集反应結果如表 4 所示。由表得知,用普通琼膠培养基培养而得的菌液,不論用福馬林或 100℃ 30 分鐘加熱处理后,与 Vi 及 O 因子血清均為陰性反应,可知該菌顯然已變成為 R 型;而於甘油琼膠上培养時則不然,該菌液則与 O 因子血清為陰性反应,但与 Vi 因子血清則為陽性反应,用福馬林处理的菌液的凝集價為 1:800, 100℃ 30 分鐘加熱处理的菌液的凝集價為 1:100。由此可以証明,該菌已變為 X 型(O 抗原缺如,而具有 Vi 抗原的菌株)。

表 4 甘油琼膠培养基對於丙型副傷寒沙門氏菌菌型的變異作用

培 养 基	菌 液	因 子 血 清		菌 型 (抗原)
		Vi	O	
普 通 琼 膠 培 养	福 馬 林 处 理	○	○	R
	100℃ 30分加熱处理	○	○	(Φ)
甘 油 琼 膠 培 养	福 馬 林 处 理	800	○	X
	100℃ 30分加熱处理	100	○	(Vi, Φ)

5. 除丙型副傷寒沙門氏菌以外,作者曾將傷寒沙門氏菌 Watson 株(V 型)、傷寒沙門氏菌 Vi I (X 型) 和含有 Vi 抗原的巴勒魯普菌株分別接种於普通琼膠培养基和甘油琼膠培养基上, 經 37℃ 18—20 小時孵育後製成菌液,再用福馬林或 100℃ 30 分

表5 傷寒沙門氏菌 V 型、X 型和巴勒魯普菌的甘油琼膠和普通琼膠培養的凝集反应

菌 株	菌 液	因 子 血 清	普通琼膠培养	甘油琼膠培养
傷 寒 沙 門 氏 菌 (V型)	福 馬 林	{Vi IX	800 ○	400 ○
	100°C 30 分	{Vi IX	○ 200	○ 200
傷 寒 沙 門 氏 菌 Vi I(X 型)	福 馬 林	{Vi IX	800 ○	400 ○
	100°C 30 分	{Vi IX	800 ○	400 ○
巴 勒 魯 普 菌	福 馬 林	Vi	200	200
	100°C 30 分	Vi	○	○

鐘加熱處理，並使與 Vi 及 O 因子血清 VII 作定量凝集反應。試驗結果如表 5 所示。上述各菌株和丙型副傷寒沙門氏菌不同，即普通琼膠培養的 Vi 凝集反應均為陽性，甘油琼膠培養基對上述菌株的 Vi 抗原並無增強的作用。

6. 甘油琼膠培養物及普通琼膠培養物的抗体產生試驗

將 1137 號菌株接種在甘油琼膠培養基和普通琼膠培養基上，經 37°C 18 小時孵育後，製成福馬林菌液（前一菌液的 Vi 凝集價為 1:400，O 凝集價為 1:3200；後一菌液 Vi 凝集價 < 1:100，O 凝集價為 1:3200）。然後，用該菌液各免疫體重約 2.5 公斤的家兔兩隻。免疫方法分三次靜脈注射，間隔一星期，劑量 0.1 毫克/0.5 毫升，0.2 毫克/1 毫升和 0.2 毫克/1 毫升。末次注射後第九天採血。根據血清學檢查結果證明，用甘油琼膠培養物所製備的免疫血清（17 號和 18 號混合血清），Vi 凝集價為 1:320，O 凝集價為 1:640，H 凝集價為 1:1280 以上；用普通琼膠培養物所製備的免疫血清（19 號和 20 號混合血清），Vi 凝集價為 1:20，O 凝集價為 1:320，H 凝集價為 1:1280 以上。

由此可知，甘油琼膠培養在家兔體內產生 Vi 抗体的能力較普通琼膠培養為佳。

(二) 丙型副傷寒沙門氏菌 Vi 抗原的穩定性

1. 培養日數：

將 1137 號菌株接種在甘油琼膠培養基上，孵育在 37°C 恆溫箱內，每天以 Vi 及 VII 因子血清做玻片凝集反應，以作 Vi 抗原穩定性的檢查。Vi 凝集反應於孵育第一天後為陽性，至第四天則為陰性；O 凝集反應經孵育一星期後仍為陽性。由此可知，Vi 抗原的穩定性較 O 抗原為弱。

2. 加熱及加氯化鈣：

(1) 凝集反应: 將 1137 号菌株接种在甘油琼膠培养基上, 經 37°C 孵育 18 小時後, 製成 1% 福馬林菌苗原液(每毫升含 200 毫克濕菌)。然後將該原液稀釋成每毫升 1 毫克、50 毫克和 200 毫克三種濃度的菌苗各二份。其中一份不作任何处理, 於室溫內保存; 另一份分爲加 1% 氯化鈣与未加氯化鈣二种, 並按下法加熱处理: (i) 37°C 放置 1—30 天; (ii) 60°C 加熱 30 分鐘或 1 小時; (iii) 100°C 加熱 1 小時。最後以 Vi 及 VII 因子血清做定量凝集反应檢查。

結果如表 6 所示。不加氯化鈣的菌液, 經 37°C 1—30 日, 60°C 及 100°C 加熱 30 分鐘处理後, Vi 凝集反应均爲陰性; 而加有氯化鈣的菌液, 除 100°C 加熱 30 分鐘者外, 雖於 37°C 保存一個月(一個月以上未試), 加熱 60°C 30 分鐘或 1 小時後, Vi 凝集反应均爲陽性。由此可知, 氯化鈣对 Vi 抗原有穩定作用。上述方法处理菌液的 O 凝集反应均爲陽性。

表 6 加熱及加氯化鈣对 Vi 抗原的影响(凝集反应)

因子血清	菌量 氯化鈣 加熱	200毫克/1毫升		50毫克/1毫升										1毫克/1毫升					
		+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
		37°C 1—30天	37°C 1天	室溫 2—3天	37°C 2—3天	60°C 30分	60°C 60分	100°C 30分	室溫 2—3天	37°C 2—3天	60°C 30分	60°C 60分	100°C 30分	室溫 30分	60°C 30分	100°C 30分	室溫 30分	60°C 30分	100°C 30分
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vi		400	○	200	400	200	400	○	200	○	○	○	○	200	400	○	200	○	○
VII		1,600	1,600	1,600	1,600	800	1,600	1,600	1,600	3,200	800	1,600	1,600	3,200	1,600	800	1,600	1,600	800

(2) 沉澱反应: 將 1137 号菌株接种於普通琼膠及甘油琼膠培养基上, 經 37°C 18 小時孵育後, 製成每毫升含 50 毫克濕菌的福馬林菌液。按前述方法分爲加有氯化鈣与不加氯化鈣的菌液二种, 並做加熱处理。然後以每分鐘 3000 轉沉澱 30 分鐘, 取出上清液, 經適宜稀釋後 (1:10, 1:20, 至 1:320, 1:640 等), 与 1:2 的 Vi 及 VII 因子血清做沉澱反应(輪環法), 於 37°C 放置 30 分鐘或 1 小時後观察結果(表 7)。

如表 7 所示: 普通琼膠培养製成的沉澱原, Vi 沉澱反应爲陰性; 而甘油琼膠培养

表 7 Vi 抗原的沉澱反应(效價)

因子血清	培养基 氯化鈣 处理方法	甘油琼膠培养								普通琼膠培养	
		+				-				-	
		福馬林	37°C 3日	60°C 60分	100°C 30分	福馬林	37°C 3日	60°C 60分	100°C 30分	福馬林	100°C 30分
		20	20	40	40	80	160	160	80	○	○
Vi		20	20	40	40	80	160	160	80	○	○
VII		40	40	40	40	40	160	160	320	40	800

製成的抗原, Vi 沉澱反應則為陽性。由此可以証明, Vi 抗原在甘油琼膠培养基上發育良好。甘油琼膠培养基加入氯化鈣後, 其沉澱反應效價較不加氯化鈣者為低。

3. 超音波振動及氯化鈣對 Vi 抗原的穩定性試驗:

將 1137 号菌株接種於甘油琼膠培养基上, 經 37°C 18 小時孵育後, 製成每毫升含 50 毫克濕菌的菌液三份。一份於超音波振動前用福馬林處理並加入氯化鈣。另份於超音波振動後(560 K. C), 再用 0.4% 福馬林處理。對照菌液不作任何處理。然後分別與 Vi 血清進行凝集反應及沉澱反應(表 8)。

由表 8 得知: 不加氯化鈣但經超音波振動 5 分鐘的菌液, 其 Vi 凝集價低於 1:100, 不作任何處理的對照菌液效價則為 1:400; 菌液經超音波振動 10 分鐘後, Vi 凝集反應變為陰性。相反的, 加有氯化鈣的菌液, 雖經超音波振動 30 分鐘, 其效價仍達 1:400。O 凝集反應和 Vi 凝集反應相似, 以加有氯化鈣的菌液的效價為高。沉澱反應結果則相反: 加有氯化鈣的菌液, 經超音波振動短時間後, 其 Vi 凝集價較不加氯化鈣者低。在上述兩種情況下, O 凝集反應沒有區別。

表 8 超音波振動及氯化鈣對 Vi 抗原的穩定性試驗

因子血清	凝 集 反 應											
	超音波振動前加福馬林及氯化鈣者						超音波振動後加福馬林					
	對照	5 分	10分	15分	20分	30分	對照	5 分	10分	15分	20分	30分
Vi	200	400	200	400	800	400	400	100	○	○	○	○
VII	3200	6400	6400	3200	3200	3200	3200	800	800	400	400	400

沉 澱 反 應												
Vi	20	40	40	40	80	80	80	80	80	160	80	80
VII	40	160	160	160	160	320	40	160	160	160	160	160

(三) Vi 抗原和對小白鼠毒力的關係

如上所述, 甘油琼膠培养基對 Vi 抗原的發育較普通琼膠培养基為佳。但是, 為了該種抗原對於小白鼠的毒力關係, 於是做了以下試驗。使用菌株為 VW 型的 1137 号和 5 号。經培養後製成菌液, 然後以不同菌量做腹腔和經口感染。感染小白鼠於死亡後全部解剖, 進行心血、肝、脾培養, 檢查感染菌。

1. 1137 号菌株菌液(濃度 0.1 毫克/0.5 毫升), 經稀釋為 0.05 毫克, 0.025 毫克和 0.0125 毫克, 然後分別注射於小白鼠腹腔內。每個劑量注射 5 隻小白鼠, 並觀察 4

天。其結果如下：甘油琼膠培養物，50% 致死量在 0.0125 毫克以下，而普通琼膠培養物為 0.0125 毫克。甘油琼膠培養物的 Vi 凝集反應為陽性，毒力略較普通琼膠培養物為高；劑量為 0.1 毫克時平均生存日數，前者較後者平均短 19.2 小時，劑量為 0.05 毫克時平均短 14.4 小時，0.025 毫克短 21.6 小時，0.0125 毫克短 19.2 小時。

2. 以 1137 号和 5 号菌液 10^{-1} — 10^{-7} 毫克行腹腔和經口（每一隻小白鼠一白金耳培養物）感染，觀察 4 星期。根據試驗結果證明，用兩種培養物製成的菌液，其毒力沒有區別。在第二次經口感染試驗時，證明以甘油琼膠培養物感染後，小白鼠平均生存日數較普通琼膠培養物為短。以 1137 号甘油琼膠培養物感染後小白鼠平均生存日數為 9 天，而以普通琼膠培養物感染後則為 15 天。以 5 号甘油琼膠培養物感染後，平均生存日數為 10 天，而普通琼膠培養則為 12 天。

討 論

在普通琼膠培養基中加入 2% 甘油時，用各種方法來試驗傷寒及副傷寒 Vi 菌株時，均已證明：不但在甘油培養基上 Vi 抗原出現更明顯，產量較大，而且使全部保存的 W 菌株變為 VW 型，而在普通培養基上，祇有 28% 變成這個型。這一點對於製造菌苗時特別具有重大意義，而且在鑑別沒有 Vi 抗原的猪霍亂沙門氏菌時^[3]也可以作為有利條件之一。

再用經免疫血清處理所變成為 R 型的菌株接種於甘油培養基上，則可變為有 Vi 抗原而 O 凝集陰性的 X 菌型。這結果是和 Scholtens 氏^[4]所報告的結果相類似。

此外若將丙型副傷寒沙門氏菌接種於甘油培養基上，在 37°C 孵育超過 1 天以上即失去 Vi 抗原。因此證明甘油培養基在 37°C 條件時不宜於 Vi 抗原長期的保存，而必須置於低溫。

根據 Felix 氏及其同仁^[5]和許多其他作者的報告，傷寒沙門氏菌的 Vi 抗原，於 60°C 加溫 30 到 60 分鐘即失去其抗原性。在本試驗中已證明這個不穩定性可以用氯化鈣的加入而有所改變。加入氯化鈣之後，即使放在 37°C 而放置 30 天（更久未試）及 60°C 加溫 1 小時，Vi 抗原仍被保存，但在 100°C 加熱 30 分鐘時，則雖加入氯化鈣，Vi 抗原仍不穩定。同樣，氯化鈣可以減少 Vi 抗原在超音波作用時的不穩定性。

由上述結果得知，和傷寒沙門氏菌一樣，丙型副傷寒沙門氏菌對數種物理學因素是不穩定的；但為促使其穩定，添加氯化鈣具有很大的意義。因此，在實際製備丙型

副傷寒沙門氏菌抗原時,用这种方法处理的優越性是非常明顯的。關於氯化鈣对傷寒沙門氏菌 Vi 抗原的影响,早由岸田氏^[6]所注意;安东和中村氏^[7],Ando 和 Shimojo 氏^[8]也应用該方法製備傷寒沙門氏菌抗原。

作者之一在第一報告中提到,对小白鼠毒力是 O 和 Vi 抗原共同作用的結果。此次則应用甘油琼膠培养和普通琼膠培养進行大量和微量的腹腔以及經口感染,進一步試驗 Vi 抗原对小白鼠毒力的影响。結果証明,用大量菌腹腔感染時,含有 Vi 抗原者較不含 Vi 抗原者毒力大。这和越后貫氏^[9]的報告是一致的。微量或經口感染者,Vi 抗原含有与否对小白鼠毒力無顯著區別。但是,經口感染時,含有 Vi 抗原者較未含 Vi 抗原者平均生存日數短。然而,由此結果尚不能完全了解 Vi 抗原对小白鼠毒力的關係。

結 論

1. 2% 甘油琼膠基較普通琼膠基对丙型副傷寒沙門氏菌 Vi 抗原發育具有良好的影响,Vi 抗原不明顯的菌株,通过該培养基後,變為 Vi 抗原明顯的菌株。

2. 用 2% 甘油琼膠培养製備抗原免疫家兔時,Vi 抗体的產生較普通琼膠培养製備的抗原為高。

3. 丙型副傷寒沙門氏菌的 Vi 抗原对温度及超音波振動是不穩定的。但加氯化鈣可使 Vi 抗原穩定。

4. 進一步試驗了甘油琼膠培养对小白鼠毒力的關係,但是,Vi 抗原对小白鼠毒力的增強意義,尚不明確。

誌謝: 本文承方景燦醫師鼓勵指導,孫盛綱醫師審閱,並承孫盛豪主任、朱文杰同志、杜阿姝同志多方協助,作者等表示謝意。

參 考 文 獻

- [1] 濱野滿雄: 丙型副傷寒沙門氏菌的 Vi 抗原的研究(一),微生物學報 3(2):111—124.
- [2] 安东洪次: 第 124 回大連衛生研究所學術集談会(1944),大連醫學雜誌, 2(1), 11, 1948.
- [3] 濱野滿雄: 大連衛生研究所彙刊, 1, 2, 14, 1951; 同誌 1, 3, 18, 1951.
- [4] Scholtens R. Th. *Zbl. Bakt. I. O.*, 139, 467, 1937.
- [5] Felix, A. Bhatnagar, S. S., and Pitt, R. M. *Brit. J. Exp. path.*, 15: 346, 1934.
- [6] 岸田正紀: 細菌誌, 535, 547, 1940; Kitasato, *Arch. Exp. med.*, 18: 1-12, 1941.
- [7] 安东洪次、中村義治: 細菌誌, 564 (41), 1943.
- [8] Ando, K. G., Shimojo, H. *Bull. World Health Organ*, 9, 4, 575, 1953.
- [9] 越后貫博: *Kitasato Arch. Exp. med.*, 17, 83, 1940.

STUDIES ON VI ANTIGEN OF *S. PARATYPHI* C, II.

HAMANO M., CHAO YUNG-LIN, CHOW LI

Vaccine and Serum Institute, Darien

1. The Vi antigen of *S. paratyphi* C could be demonstrated even better by cultivation of the organism on 2% glycerine agar (Vi positive 100 %) than on plain agar (Vi positive 28.1%), as shown by agglutination test.

2. There was a distinct immunogenic difference for the suspensions prepared by these two methods of cultivation: more Vi agglutinins were produced in rabbit on immunization with glycerine agar culture.

3. The Vi antigen of *S. paratyphi* C was shown to be labile when it was kept at 37°C for 1-3 hrs., on heating at 60°C for 30 minutes or by the action of supersonic vibration at 560 kilocycles per second for 5 minutes.

4. Data were presented to show the stabilizing effect of calcium chloride on the Vi antigen of *S. paratyphi* C.