

人糞便對痢疾噬菌體吸附作用的初步研究

司 穉 东 于 智 麗

(大連生物製品所)

作者在研究噬菌體分離方法的工作中，發現由人糞便中分離痢疾噬菌體時，在糞便懸液的濾液中，往往不能檢出噬菌體，而用其他方法檢查，則證明糞便中確有噬菌體存在。作者對此現象做了初步的研究，認為人正常糞便，對痢疾噬菌體有一種吸附作用。在進行本試驗時，作者對上述情形分析了幾種可能的原因：(1) 由於除菌石棉濾板的吸附，而致濾液中不能檢出噬菌體；(2) 噬菌體被濾板與糞便微粒的複合物所阻止，不能通過；(3) 噬菌體被糞便破壞或吸附。根據這幾個假設，我們進行了如下的試驗。

試 驗

(一) 用 15 個健康人的糞便標本做試驗。將糞便称重，加於約 4 倍的肉湯培養基中 ($\text{pH}=7.4-7.6$) 做成懸液 (即做成約 $\frac{1}{5}$ 的糞便懸液)，取懸液 13.5 毫升，加入本室自製的志賀氏-福氏多價痢疾噬菌體 (效價為 10^{-8} 以上) 1.5 毫升 (即噬菌體約稀釋為 $\frac{1}{10}$)。置 37°C 溫箱內一夜 (約 18 小時)，次日取出，用蔡氏 (Seitz) 濾器過濾 (用 E. K. 濾板，或日本製除菌石棉濾板)。取懸液及濾液同時在琼膠平板及肉湯培養基中做裂解試驗，檢查噬菌體。用琼膠平板檢查的方法，是先將平板適當烘乾，然後在其表面塗滿在琼膠斜面上培養 18 小時的福氏痢菌 (Fl. 46) 菌懸液 (Fl. 46 菌係製造該噬菌體所用菌株之一，噬菌體對該菌的裂解效價為 10^{-8})。俟乾後，立即在其表面滴加欲檢查的標本液，於 37°C 溫箱培養一夜，次日觀察結果。用肉湯培養基檢查的方法是於 4.5 毫升培養基中，加入標本液 0.5 毫升及菌液 (同上) 一滴，放 37°C 溫箱，於 3, 6, 18 小時後觀察結果。

經檢查後，發現以上 15 份標本 (共做了 24 次)，在濾液中有 4 份於平板上檢出噬

菌體，其他 8 份標本（共檢 16 次）在濾液中於肉湯培養基上均未檢出噬菌體。其中 12 份標本，我們將其培養後未過濾的懸液取出少許，在水浴內加熱（58°C）經 30 分鐘（目的是殺死糞便中一般革蘭氏陰性桿菌）。以此懸液直接在平板上按上述方法檢查噬菌體，並且以 6 份未加熱者用同法直接檢查，結果發現裂解試驗均呈陽性；即均能檢出噬菌體，呈現明顯的“裂解環”¹⁾。

同時並用數支 4.5 毫升肉湯管，加入 0.5 毫升噬菌體（稀釋 10 倍），同樣培養一夜。次日過濾，取濾液在平板及試管按上述二法檢查噬菌體以爲對照，發現均可檢出噬菌體。茲將結果列入表 1。

表 1 糞便與噬菌體混合培養後的濾液及懸液直接檢查噬菌體結果

檢查方法	採取標本人	司	董	劉	陳	高	胡	倪	周	周	施	劉	謝	許	趙	王
		×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×	×
糞便及噬菌體混 懸液培養一夜後 的過濾液	平板	—	—	—	—	三+	—	—	+	—	+	—	—	—	十一	—
	試管	—	—	—	—	三								—	—	—
同上懸液直接檢 查	平板						+	+	+	+	+	+	+			
	試管	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			

註：+ 檢出噬菌體，— 未檢出噬菌體，? 結果不能判別。重列符號表示試驗二次或二次以上者。

由以上對照試驗的結果，證明石棉濾板雖一般認爲可以吸附噬菌體，但在此試驗中，即肉湯中加入一定多量的噬菌體（0.5 毫升），並未顯著的或完全的將其吸着，以致在濾液中不能檢出，相反的其濾液不論在平板上或肉湯中，均呈很強的裂解現象。而糞便懸液中加入的噬菌體，則在濾液中絕大部分不能檢出，於未經過濾的糞便懸液中則全部可檢出噬菌體。

根據這一結果，可以證明，濾液中不能檢出噬菌體，在此試驗與濾板似無關。同時也證明噬菌體並未被糞便所破壞，最可能是糞便中的有形成分或不可濾性成分將噬菌體吸附，而不能在濾液中檢出之故。爲了再證明這一點，我們先將糞便懸液過濾，取 9 毫升濾液，加入 1 毫升噬菌體（即稀釋爲 $\frac{1}{10}$ ），置 37°C 溫箱。18 小時後取出再過濾，檢查濾液中之噬菌體。發現全部 14 份標本（共檢 17 次），均可檢出噬菌體，與肉湯對照相同，證明上述推論可能是正確的。

1) 作者在研究噬菌體分離方法時，糞便懸液不過濾，直接滴於平板檢查，發現噬菌體之檢出率較過濾者高，但滴加懸液處，因有雜菌生長，或因糞便微粒等呈不透明，而於其周圍呈一圈金環狀無菌透明帶，表示懸液中有噬菌體存在，此現象作者稱爲“裂解環”或“環狀裂解現象”。

(二) 進一步証明噬菌体究竟被糞便中何種成分吸着。我們对兩種可能性進行了檢查。一种是糞便中最普遍存在的菌類，一种是糞便的渣滓（包括各種寄生蟲卵等）。首先我們从部分人的標本中分離細菌，分離出的菌株，全部接種於琼膠斜面。培養一夜，次日用肉湯洗下菌苔，做成混合的濃厚的菌懸液。取菌懸液 9 毫升，加入噬菌体 1 毫升，放 37℃ 溫箱培養，18 小時後過濾，檢查濾液中的噬菌体。發現全部 9 份標本均可檢出噬菌体，与肉湯所做对照相同。

由此可以初步認為噬菌体並不被糞便中存在的菌類所吸着，但這些菌類中，是否有对噬菌体敏感的菌株，因而使噬菌体增殖，代替了一部分吸附的噬菌体，尚待研究。

為了檢查糞便渣滓——能吸附噬菌体的物質部分——的性質及对噬菌体的作用，我們做了以下幾種試驗。

將糞便懸液加熱 60℃ 經 30 分鐘，然後按上述量 ($\frac{1}{10}$ 量) 加入噬菌体，培養 18 小時後，檢查以下四種標本中的噬菌体：(1) 濾液。(2) 不過濾之懸液。(3) 不過濾之懸液，加入在琼膠斜面上培養 18 小時的 Fl. 46 菌懸液 1 毫升，放 37℃ 溫箱再培養一夜，次日過濾，檢查濾液。(4) 取 (3) 之懸液，即經加菌再培養一夜不過濾之懸液，加熱 58℃，30 分鐘後檢查。

檢查結果如表 2。

表 2 加熱處理之糞便与噬菌体混合培養後檢查噬菌体結果

採 取 標 本 人		司 × ×	董 × ×	劉 × 榮	陳 × ×	高 ×
檢 查 方 法	平 板 法	—	—	—	—	—
	試 管 法	—	—	—	—	—
懸 液 直 接 檢 查	平 板 法	+	+	+	+	+
懸 液 加 菌 再 培	平 板 法	—	+	—	+	+
	試 管 法	—	—	—	+	—
糞 一 夜 後 之 濾 液	試 管 法	—	—	—	+	—
同 上 懸 液 加 熱 處 理	平 板 法	+	+	+	+	+

由表 2 結果可以証明，糞便中某種成分，並不因加熱 (60℃，30 分鐘) 而改變其吸附噬菌体的性質。已經被吸附的噬菌体，如加入相應的菌株培養，5 例中有 3 例可以在平板上檢出其濾液中的噬菌体。推測可能是因被吸着的噬菌体遇到相應的菌類，而發育繁殖，數量增多，超過能被吸附的飽和程度，因此在濾液中又能被檢出之故。

由此結果也可初步証明噬菌體並不被這些糞便中的微粒與石棉濾板膠合面所阻止而不能濾過。

根據以上情形，我們又進行了以下的試驗：

1. 糞便懸液加入噬菌體(同上述)，同時加入在瓊膠上培養 18 小時的 Fl. 46 菌懸液 1 毫升，置 37°C 培養約 18 小時，取濾液檢查。

2. 糞便懸液加入噬菌體(同上述)，於 37°C 培養 18 小時後，再加入 Fl. 46 菌懸液 1 毫升，再培養一夜，次日取濾液檢查。

3. 取 (2) 的懸液，即培養二次的菌懸液不過濾，將懸液加熱 58°C 經 30 分鐘檢查。

檢查結果如表 3。

表 3 糞便與噬菌體混合液加相應菌培養後檢查噬菌體結果

採 取 標 本 人		司 × ×	董 × ×	劉 × 榮	陳 × ×	高 ×
檢 查 方 法	平 板 法	+	+	—	+	+
	試 管 法	+	+	+	+	+
糞便—噬菌體混懸液培養一夜後，加入菌液，培養一夜後之過濾液	平 板 法	+	—	—	—	—
	試 管 法	+	—	—	—	—
同上懸液加熱處理		+	+	+	+	+

由表 3 結果可以看出，噬菌體加入糞便懸液的同時，加入相應的菌液，經培養一夜後，全部都可在濾液中檢出噬菌體。這可能因噬菌體尚未被吸附之前，已在發育繁殖，數量增加，超過了糞便吸附的能力之故。如果噬菌體與糞便懸液已培養一夜，即噬菌體已被充分吸附之後，再加入相應的菌液培養，雖然噬菌體也有增殖，但根據此次少數幾例來看，似不如同時加入菌液者檢出機會高。

除以上試驗之外，我們還取了兩份懸液加入哥羅仿(5%)，於 37°C 一夜之後，加入噬菌體(同上量)，再培養一夜，次日過濾，在濾液中均未檢出噬菌體(平板法及試管法)。這說明糞便中能吸附噬菌體的成分，並不受 5% 之哥羅仿的破壞。我們也曾將 4 份培養後的、加有噬菌體的懸液，用低速遠心沉澱(每分鐘 2000 轉，30 分鐘)，在上清液中仍能檢出噬菌體，說明糞便中吸附噬菌體的物質的顆粒是很小的。

(三) 對用噬菌體治療的患者進行了檢查。患者經服用噬菌體後，當其糞便尚未轉為正常時，即尚為膿血粘液樣糞便時(一小部分為不成形之稀便)，採取糞便標

本。標本用約4倍的肉湯稀釋，然後過濾，取濾液及懸液在平板上檢查噬菌體。共檢查了11例（其中3例為不成形的稀便），發現在服用噬菌體後的患者的膿血粘液便中，不論在其濾液或懸液中，全部均檢查出有噬菌體（3例稀便亦同）。我們又在室溫內（當時夏季室溫約在30°C）將全部稀釋的標本保存了5日，再行過濾，用以上同樣方法覆檢一次。發見8例膿血便標本中有3例，3例稀便中有2例，於5日後標本的濾液未再檢出噬菌體，而懸液則仍可檢出，結果如表4。

表4 由膿血粘液性糞便檢查噬菌體結果

採取標本 檢查方法	丁 ×		王 × 傳		李 × 成		寧 × 平		劉 × 銀		王 × 華		顧 × 良		李 × 榮		鄭 × 義		張 × 伯		安 ×	
	檢查時間		當日		五日後		當日		五日後		當日		五日後		當日		五日後		當日		五日後	
	過	濾	液	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
懸液直接檢查			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* 糞便中粘液膿血已不顯著，為不成形的稀便。

除以上11例之外，我們又進行了另一試驗。即經噬菌體治療的患者，當其症狀已經消失，糞便已由膿血粘液便轉為正常糞便時，採取糞便標本，將糞便使用肉湯稀釋成 $\frac{1}{10}$ 的懸液，將此懸液一部分過濾，在平板上檢查濾液及原懸液中的噬菌體。共檢查了12例（其中5例曾檢查過其膿血便，1例連續採取了兩次標本檢查），在懸液中全部均可檢出噬菌體，而在濾液中則只1例在平板上有少數噬菌體裂解空斑，其他11例均未能檢出噬菌體。全部糞便濾液也都在室溫（約30°C）保存了5日，然後以同樣方法覆檢，發現全部濾液中均未檢出噬菌體，而在懸液中則均証明有噬菌體存在。

討 論

根據以上初步檢查結果，我們認為，人正常糞便对痢疾噬菌體有一種吸附作用。

我們也曾考慮到在糞便的懸液中，確有噬菌體可檢出，而在用石棉濾板過濾後的濾液中則不能檢出噬菌體，是否由於糞便中細微的或膠狀物質，附於石棉濾板表面，以致噬菌體不能通過而不能檢出。但在我們的實驗結果可看出，即加有噬菌體的糞便懸液，其濾液固不能檢出噬菌體，但同一懸液加入相應的菌液經培養之後，同樣方法過濾的濾液，則大部分甚至全部標本又可以在濾液中檢出噬菌體。由此可以証明

噬菌体仍可通过滤板,並未受到阻滯。因此我們認為噬菌体最可能是被糞便所吸附。有此吸附作用的物質,証明是不能通过除菌濾板的有形物質。初步試驗証明,这种物質可能不是糞便中的菌類,並且不因加熱(60°C 經 30 分鐘)而失去这种吸附的能力。

至於膿血粘液樣糞便是否也有吸附的作用,还需進一步証明。曾發現數例含有噬菌体的膿血粘液便,放置一定時間後(5 日),在濾液中未能檢出噬菌體。在成形的糞便濾液中,檢出噬菌体的例數遠低於直接檢查懸液的方法;但在尚未成形的稀便中,則由濾液能檢出的机会顯著增高,而在膿血粘液便,則檢出机会更增高。可以認為这种性質的糞便,对噬菌体吸附的作用減弱。雖然如此,在膿血粘液樣便的濾液中,檢出數目仍略低於直接檢查法,或者因膿血粘液性質的糞便,在某种情形下(如時間,糞便中的成分如血球等)也有吸附噬菌体的作用(雖然不顯著),似还有考慮和証实的必要。

正常糞便中某种物質,既可吸附噬菌体,这种現象对噬菌体的治療和預防的效果有何影响,似有進一步研究的必要。尤其是对恢復期患者、慢性病例、或帶菌者的治療,似更為重要。因為急性期患者糞便,多為膿血粘液便,而前述这些人糞便一般都是正常的。服用的噬菌体被糞便吸附後,对細菌的裂解作用上有何影响,需要加以檢查。

由糞便中分離痢疾噬菌体,最原始和最常用的方法,是將糞便做成懸液,然後用濾器過濾,檢查濾液中是否有噬菌体。正常糞便的不可濾性成分,既然对噬菌体有此种吸附作用,顯然这种由正常糞便分離噬菌体的方法,是不恰当的。

結 論

發現人正常糞便中的某种不可濾過的物質,对痢疾噬菌体有一种吸附作用,本文对这种現象進行了初步的檢查和討論。

PRELIMINARY REPORT ON THE ADSORPTION OF DYSENTERY PHAGE BY FECAL MATTER

SZE, C. T. AND YU, C. L.

Vaccine and Serum Institute, Darlen

Owing to the difficulties encountered in detecting dysentery phage in the filtrates prepared from human feces, which by other methods have been shown to contain this bacteriophage, the authors made a detailed study of the ability of normal and dysentêric feces to adsorb dysentery phage. In the first part of the experiment, standard bacteriophage preparations were added to stool specimens of normal persons, and phage activity was measured of the filtrates and of the unfiltered specimens. It was clearly shown that whereas unfiltered suspensions contained active phage, the filtrates lost this activity practically in all the cases. This loss was demonstrated not to be due to adsorption on to the filter pads, and was also not related to the organisms that were present in the normal fecal suspension.

In the second part of the experiment, feces from dysentery patients, who had been given phage as a part of therapeutic regime, were examined for the presence of phage activity. It was found that shortly after passing, stools of mucus and blood did not interfere with the filter-passing of the dysentery phage, although they lost part of the activity after being kept at room temperature for 5 days. Filtrates of normal stools again failed to show phage activity. It was concluded that some substances in the normal feces adsorb dysentery phage and interfere with its detection.