

痢疾傷寒及副傷寒乙噬菌體 分離方法的研究

司穉東 于智麗

(大連生物製品所)

痢疾或傷寒噬菌體一般分離的方法，是將標本（如污水、土壤、糞便或其他材料）用肉湯培養基做成一定稀釋濃度的懸液，不經培養或經培養一日後，用除菌濾器（蔡氏、麥克非氏或張伯朗氏濾器）過濾，然後檢查濾液中的噬菌體。這種方法我們認為有很多缺點：第一，如果標本中噬菌體量不多，很可能被濾板吸附而不能檢出；第二，某種標本（如正常糞便的不可濾性成分）可將噬菌體吸附，在濾液中則不能檢出噬菌體^[1]；第三，需有一定的設備（如濾器及抽氣裝備等），而且濾器的準備和處理都是很麻煩的，尤其檢查大量標本時，很不方便。為了這種原因，即為了尋求分離率較高而且方便的方法，作者對痢疾、傷寒及副傷寒乙噬菌體，主要是對痢疾噬菌體的分離方法，做了初步的研究，今謹介紹如下，以為同道參考。

一、各種噬菌體分離方法的比較

首先我們從污水溝、小河、池塘採取標本，由水中分離噬菌體。我們在大連市及郊區各地共採取了180份水標本，標本一般都有污穢雜質，但濃度不大，大體還都透明。標本取來後，我們用三種方法處理：

1. 原標本不加任何處理，直接用蔡氏濾器過濾（用E. K. 濾板或日本製除菌石棉濾板）。

2. 取標本10—15毫升加於40毫升肉湯中，在37°C溫箱中培養一夜，次日過濾。

3. 取標本10—15毫升加於40毫升肉湯之同時，分別加入在瓊膠上培養18小時的，欲分離某種噬菌體的相應菌株的菌懸液1毫升，培養一夜，次日過濾。我們此次共用了福氏及志賀氏痢菌（Fl. 46, Sh. 2）及傷寒菌（Ty 2）和副傷寒乙菌（No. 3）等四個菌株。

以上三份濾液，同時在琼膠平板上及肉湯試管中，分別用以上菌株檢查其中的痢疾、傷寒及副傷寒乙噬菌體。在平板上檢查的方法：先將琼膠平板適當烘乾（琼膠含量為2.5—3%），然後分別用“L”形曲玻棒，塗佈曾在琼膠斜面上培養18小時的上述各菌株之菌懸液於平板表面；俟乾後，滴加0.5毫升濾液，放溫箱培養，次日仔細觀察結果。如果滴加濾液處，菌完全不發育，或出現孤立的裂解空斑，則為陽性結果，證明濾液中有噬菌體。在肉湯試管中檢查的方法：取4.5毫升肉湯培養基（pH=7.4—7.6），加入0.5毫升濾液，同時加入在琼膠斜面上培養18小時的菌懸液1滴，放溫箱培養，於3、6、18小時觀察結果。如果培養基透明，或雖不完全透明，但較對照管的菌發育程度仍有顯著不同者，為陽性結果。經過上述三種處理方法的標本，用平板法檢查的有180份，用試管法檢查的共176份。結果總結於表1。

表1 由水中分離噬菌體各種分離方法的比較

噬菌體種類*	檢查方法	直接濾液		培養一夜後濾液		加菌培養一夜後濾液	
		平板法	試管法	平板法	試管法	平板法	試管法
志賀氏痢疾噬菌體	分離數目	10	9	24	20	82	67
	分離率(%)	5.6	5.1	13.3	11.4	45.6	38.1
福氏痢疾噬菌體	分離數目	2	5	30	18	77	61
	分離率(%)	1.1	2.8	16.7	10.2	42.8	34.7
傷寒噬菌體	分離數目	0	1	3	4	25	17
	分離率(%)	0	0.6	1.7	2.3	13.9	9.7
副傷寒乙噬菌體	分離數目	2	1	12	2	36	8
	分離率(%)	1.1	0.6	6.7	1.1	20.0	4.5

* 係指能裂解在試驗中所用菌株之噬菌體，是否為多價噬菌體，擬於另文討論，以後同此。

由以上結果可以看出，標本之直接過濾液，檢出的陽性率，不如在肉湯中培養後過濾者高；三種方法中，以加入相應菌液而培養後再過濾者，檢出陽性率最高。平板法及試管法比較，我們認為試管法比較麻煩，因為需每隔較短時間就要觀察一次，否則裂解現象因再生菌發育，很易被混過，同時如呈輕度的不完全裂解時，有時結果很不易判定。此外由表1也可看出，用試管法的檢出率，不如平板法高。

二. 過濾方法和不用過濾方法從大便中分離檢出率的比較

我們從臨床診斷患桿菌痢疾的成年及小兒的糞便分離噬菌體。共用了三組8種方法以為比較。裂解試驗我們都是在琼膠平板上進行的，檢查時用志賀氏(Sh. 2)、福氏

(Fl. 46)、宋內氏 (No. 51334) 及施密斯氏 (No. 11) 4 株痢疾菌株, 各種檢查的方法如下:

第一組方法: 取標本約用 5—10 倍的肉湯做成懸液, 將懸液靜置片刻, 使糞便渣滓略下沉後, 取上清液直接檢查; 另取出一部分懸液, 置 58°C 水浴內經 30 分鐘 (加熱的目的是將糞便中之一般革蘭氏陰性桿菌殺死, 以便易於觀察結果), 然後取上清液檢查。

第二組方法: 取同上標本懸液, 於 37°C 溫箱培養一夜 (約 18 小時), 次日取出, 其中一份取上清液直接檢查, 一份經加熱後檢查 (同上述), 另一部分懸液則用蔡氏濾器過濾, 檢查濾液。

第三組方法: 標本懸液中加入在瓊膠斜面上培養 18 小時的不含噬菌体的上述四株菌懸液各 1 毫升。然後在 37°C 溫箱培養一夜, 次日取出, 按第二組中三種方法, 即直接檢查懸液上清液, 加熱後檢查上清液及檢查濾液中之噬菌体。

用以上三組方法, 共檢查了 52 例患者的糞便 (其中用福氏菌檢查 39 例), 茲將用各方法處理之標本, 噬菌体檢出的結果, 列出如表 2。

表 2 由痢疾患者糞便檢查噬菌体各種方法的比較

噬菌体種類	檢查方法	直接檢查		培養一夜後檢查			加菌培養一夜後檢查			標本數
		不加熱	加熱	不加熱	加熱	過濾	不加熱	加熱	過濾	
福氏痢疾噬菌体	檢出數	18	18	17	19	20	27	31	23	39
	檢出率(%)	46.2	46.2	43.6	48.7	51.3	69.2	79.5	59.0	
志賀氏痢疾噬菌体	檢出數	20	21	14	23	21	36	39	25	52
	檢出率(%)	38.5	40.4	26.9	44.2	40.4	65.4	75.0	48.1	
宋內氏痢疾噬菌体	檢出數	8	11	6	12	11	9	15	11	52
	檢出率(%)	15.4	21.2	11.5	23.1	21.2	17.3	28.8	21.2	
施密斯氏痢疾噬菌体	檢出數	4	4	3	4	5	6	8	6	52
	檢出率(%)	7.7	7.7	5.8	7.7	9.6	11.5	15.4	11.5	

由表 2 可以初步看出, 直接檢查糞便懸液與經培養一夜之後者, 檢出噬菌体的結果, 並沒有顯著的差別。但加入相應菌液而培養後, 則噬菌体的檢出率顯著增高。懸液過濾與直接檢查, 其檢出情形, 在第二組中沒有顯著差別, 而在第三組中可看出過濾之後, 顯然不如直接檢查的方法檢出率高 (施密斯氏菌則不太顯著)。懸液加熱

處理和不加熱處理者，第一二組結果雖加熱者似較好，但差別不大；而第三組中，即加入痢菌液培養一夜後之懸液，不加熱者遠不如經加熱將菌殺死後的結果容易檢查。有趣的是雖然加入菌液培養的方法噬菌體檢出機會增高，但用過濾的方法，並無非常顯著的差別。這個結果已被再次用直接檢查及加菌培養各方法，檢查了 76 例（用福氏菌者 58 例）的結果所証實。

最後，我們又繼續在較多例中比較了加入菌液培養的方法中，不加熱、加熱及過濾三法的檢查情形，進一步證明由表 2 推論的結果是可靠的。

人正常糞便的不可濾性成份，對痢疾噬菌體有一種吸附作用，也是使在濾液中不易檢出噬菌體的原因^[1]。此次採取之糞便標本雖大部分是在患病初期，因此大多是膿血粘液樣糞便，但也有一部分是已近恢復者，因此，標本一部分是肉眼檢查已不見膿血粘液的、稀的、也不成形的糞便，也有一小部分則為成形的。正常糞便，如果分析糞便的種類與分離方法，可以得出如表 3 的結果。

表 3 糞便性質與噬菌體檢出的關係

噬菌體種類	標本種類與檢查方法		正常成形糞便				不成形稀便				膿血粘液樣便				
	標本數	懸液加溫 檢出數	過濾		標本數	懸液加溫		過濾		標本數	懸液加溫		過濾		
			檢出數	檢出率%		檢出數	檢出率%	檢出數	檢出率%		檢出數	檢出率%	檢出數	檢出率%	
福氏痢疾噬菌體	15	13	86.7	4	26.7	60	44	73.3	30	50.0	50	47	94.0	40	80.0
志賀氏痢疾噬菌體	15	10	66.7	1	6.7	60	41	68.3	23	38.3	50	40	80.0	32	64.0

由表 3 可以看出，正常成形糞便標本的懸液，加溫後直接檢查，遠比過濾後檢出率為高，證明糞便的不可濾性成分對噬菌體的吸着作用，此種標本，不宜用過濾的方法分離噬菌體。不成形的稀便也有這種現象，但程度較成形正常糞便為弱，膿血粘液便在濾液中檢出噬菌體的機會顯著增高，但雖然如此，與用加熱直接檢查的方法所得結果仍不相同，故除濾板的吸附的原因之外，膿血便在某種情形下，是否也有某種程度吸附噬菌體的作用，還應進一步証實。

討 論

由以上檢查水或糞便標本的結果，可以認為標本中加入相應的菌株培養之後，噬菌體的檢出率顯著增高。由水中分離噬菌體時，如將水標本於肉湯中培養一夜後，其

檢出率增高。這次工作中我們沒有將水中的細菌同時進行分離檢定，未能了解水中是否有其相應菌類存在，因此，水標本經培養，噬菌體檢出率增高的原因，還須進一步探討。

由檢查糞便的結果可以證明，用石棉濾板過濾的方法，不如直接檢查標本懸液的方法，而直接檢查懸液的方法，經加熱處理者，又比不經加熱者檢出機會多。因為不加熱者有菌生長，不易看出裂解現象，尤其是孤立的空斑，往往被其掩蓋。但即使已加熱之懸液，有時因糞便中的細微顆粒，滴於平板上後，常形成一不透明的薄膜，因此孤立的空斑也往往不能看出，這是一個很大的缺點。我們曾試將懸液低速遠心沉澱，再用上清液檢查，結果則較明顯。另外我們發現一種觀察裂解現象的方法，即使懸液有不透明物質或有菌生長，也能很容易的看出裂解現象。這方法是將懸液一滴滴加於塗種了菌的平板上之後，經培養約 3 小時，即觀察結果，此時可在滴加懸液的不透明的圓斑周圍，出現一圈狀如金環的無菌透明帶。我們稱之為“裂解環”或“環狀裂解現象”，觀察起來非常清晰明顯。這種現象，除有時懸液未加熱而有菌生長很快時，一般在次日仍可看出，當然如果只有少數的孤立空斑時或細菌之間有拮抗作用時，此種方法的正確性仍待考慮。

噬菌體一般是較耐熱的，根據此次檢查，還未發現因加溫（58°C，30 分鐘）而丟失，致不能檢出者。

標本中加入相應的菌株培養，噬菌體檢出機會增高，但如此處理後，噬菌體對該菌適應，而其原有的性質可能發生改變，而且裂解效價也會增高，因此，如果擬對原噬菌體性質進行研究時，似不應用此法分離。

此次試驗，標本中加入及檢查時，都只用一株菌，因此如果標本中既有噬菌體，但對此菌株如無特異性裂解作用時，仍不能檢出，所以實際工作時，應用較多株和較多型的菌株。

結 論

(一) 本文比較三種由水中分離痢疾、傷寒及副傷寒乙噬菌體的方法，八種由糞便中檢查痢疾噬菌體的方法。

(二) 由水或糞便中分離噬菌體，用加入相應菌株培養的方法，陽性率增高。

(三) 用除菌濾器過濾分離噬菌體的方法，可以用標本懸液加熱 58°C 30 分鐘直接檢查的方法代替，而且分離率較過濾方法高。這方法很方便，不需特別裝備，懸液如不透明，可以在培養的早期觀察噬菌體的“裂解環”。

(四) 文中對糞便種類與檢出噬菌體的關係，及其他有關問題做了討論。

參 考 文 獻

[1] 司穉东、于智麗：人糞便對痢疾噬菌體吸附作用的初步研究。微生物學報 3 (2):137—142, 1955。

A STUDY OF METHODS FOR THE DETECTION OF DYSENTERY, TYPHOID AND PARATYPHOID B PHAGES

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

Vaccine and Serum Institute, Dairen

In a previous communication, the authors pointed out that some substances in the normal feces possess ability to adsorb dysentery phage, and interfere with its filter-passing ability. In the present report, the authors compared various methods for the detection of phage activity besides the conventional method of studying the fecal filtrate. Phage activities against dysentery, typhoid and paratyphoid B were examined in water specimens and in human feces. It was found that the best method of detection is by the addition of bacterial suspension for which phage activity is desired. Both by plate method and tube method, by which several hundred specimens were examined, the highest percentage of phage activity was invariably obtained in this way. In the case of feces, a better yield could be further obtained, if after incubation with the bacterial suspension for which phage activity is desired, heating of the suspension to 58°C for 30 minutes was carried out.

This method is considered to be simple, easily carried out and it gives better results than the conventional method of detecting the phage activity from the fecal filtrates.