

出血性黄疸钩端螺旋体之培养动物 实验与对青霉素敏感度之测定

王家駒 何世元 馬家整

(浙江臨海醫院檢驗科)

出血性黄疸钩端螺旋体为 Weil 氏病之病原, 早为日本学者稻田、井戶二氏^[1]于 1915 年所証明。氏等起初系应用野口氏腹水臟器培养基而得首次純培养。后日本学者多应用野口氏血清培养基來培养。欧洲許多学者, 如 Schüffner、Fletcher、Verwoot、Karthof 諸氏对培养上均作过很多研究及改進。此病在我國虽在二十多年前 (1928), 首次于河南有本病發現, 后許多國內外学者相繼于山东臨清、山西太原、沈陽、廣州等处均有病例报告, 但找到本螺旋体者, 僅廣州三例 (1937 湯澤光报告 1 例, 1955 鄭顯准等报告 2 例)。

浙江地区于 1949 年起即有病例發現, 1952 年于一患本病死者之腎臟切片中找到了本螺旋体。去年于 2 例患者小便中及 1 例患者之血及脊髓液中分离到本螺旋体并獲得純培养。到今年 9 月底为止, 已分离到出血性黄疸钩端螺旋体 6 株。在我國本螺旋体从人体中分离到純培养, 据我們所知尙屬首次。为了对該螺旋体進一步的認識及对國外一些学者所做实验作一些温習, 我們曾作了下列一些实验, 將結果报告出來以供大家参考。

(一) 培养实验

1. 对培养基之选择实验:

下列每种培养基均接种相同数量同一株, 置室温 (本地区夏季室温为 29—35°C) 中培养 7 天后, 用肉眼及暗視野檢查(应用高倍鏡)。

(1) 野口氏培养基: 發育中度良好, 每視野螺旋体条数約为 50—80。

(2) Fletcher 氏培养基: 發育良好, 对光檢查培养基呈輕度淡云絮狀混濁, 管底有少許沉淀, 每視野約 80—100 条。

(3) Schüffner 氏培养基: 發育情况与 Fletcher 氏培养基相似。

(4) Verwoot 氏培养基: 發育情况与 Fletcher 氏培养基相似。

(5) Karthof 氏培养基¹⁾ 發育最良好, 培养液呈顯著淡云絮狀混濁, 管底有少許沉淀, 每視野螺旋体数在 100 条以上。

(6) Karthof 氏培养基(用腹水代替兔血清): 發育不良, 培养基不混濁, 每視野螺旋体数僅 30—50 条。

(7) 含 10% 兔血清之井水 (pH 7.2): 發育情况与 Karthof 氏腹水培养基相似。

(8) 含 10% 兔血清之生理鹽水 (pH 7.2): 發育情况比含兔血清之井水差些, 每視野螺旋体数約 20—40 条。

(9) 含 10% 兔血清之蒸餾水 (pH 7.2): 發育情况比含兔血清之生理鹽水还差些, 每視野螺旋体数僅 10—20 条。

(10) 大庭氏培养基: 發育情况与含兔血清之蒸餾水相似。

2. 对 pH 之敏感性試驗:

应用 Karthof 氏培养基, 校正 pH 从 7.2—8.2 止, 培养 7 天后用高倍鏡行暗視野檢查, 結果以 pH 7.2—7.4 間發育最为良好, 然而在 pH 8.2 时亦能發育, 但生長不良, 运动緩慢, 呈衰退現象。

3. 对葡、乳、麥、甘、蔗等五种糖之發酵試驗:

应用 Karthof 氏培养基²⁾, 每管加入 0.5% 含量之各种糖液, 并用溴甲酚紫作指示剂, 接种本螺旋体, 7 天后作檢查, 結果对 5 种糖类均不發酵, 而螺旋体發育不良, 运动緩慢, 呈衰退現象。

4. 培养物对豚鼠之致病性試驗:

普通培养二三代后, 对豚鼠即無致病作用, 如連續通过豚鼠四、五代, 又能恢复致病性。

5. 培养物在暗視野中的情况:

檢查本螺旋体之暗視野, 可用高倍鏡進行, 本螺旋体在暗視野中运动活潑, 二鈎端反光特別亮些, 細行观察則可看到細小緊密之螺旋, 如“念珠”狀, 螺旋体長短不等, 長者可达短者 3—4 倍之長度。

1) Karthof 氏培养基:

胰 0.8 克, 氯化鈉 1.4 克, 碳酸氫鈉 0.02 克, 氯化鉀 0.04 克, 氯化鈣 0.04 克, 磷酸二氫鉀 0.24 克, 磷酸二鈉 0.88 克, 蒸餾水 1 升。

置沸水浴中煮沸 20 分鐘, 用濾紙過濾, 校正 pH 至 7.2, 分裝于試管, 每支量为 5—10 毫升, 間歇滅菌 3 天, 滅菌后每管再加 10% 兔血清, 置 56°C 水箱中滅能 1 小时, 經無菌試驗后即可应用(按照实用細菌学手册中原方为每 100 毫升培养基再加無菌血珠胚液 0.8 毫升, 血清滅能僅 30 分鐘, 我們覺得血珠胚液操作麻煩又無濾过器, 結果此步省略, 不放血珠胚液, 而为达到完全滅能之目的, 故將血清滅能延長至 1 小时)。

2) 此 Karthof 氏培养基不放磷酸鹽緩沖質。

(二) 動物實驗

我們系應用豚鼠及小白鼠二種動物，豚鼠體重在 100—350 克之間，小白鼠年齡在 3—4 周左右。

1. 接種感染：

(1) 豚鼠：將有致病性之螺旋體接種于豚鼠之腹腔內，一般豚鼠于接種後 7—12 天死亡，死前有短期發熱現象，繼則黃疸出現體溫下降而死亡。

肉眼檢查：全身皮膚、粘膜、內臟均有顯著黃疸及出血點，肝腎腫大表面有許多黃色坏死區及出血點，塗片能找到許多螺旋體，尤以肝臟內為最多。脾腫大，并郁血，肺之出血斑最為特異，呈花蝴蝶之翅膀狀，心臟通常無大變化，如細心檢查脾及腎上腺等均能找到螺旋體。

組織檢查：

心：切片顯示心肌纖維稍有斷裂，此外在肌層中有出血小區見到。

肺：肺組織除有充血及大小不等之出血變化外，無其他特異變化。

肝：肝細胞呈混濁腫脹，肝細胞索結構有离散變化，在用 Levaditi 氏染色法的切片中，可以見到許多螺旋體。

脾：脾的淋巴濾泡無特異變化，脾紅髓的血竇充血，內皮細胞腫脹，同時也有少數吞噬細胞浸潤。

腎：腎曲細管的上皮細胞呈混濁腫脹，在腎曲細管腔內可以見到紅血球及無結構着粉紅色的物質。在 Levaditi 氏染色切片中，也可找到許多螺旋體。

(2) 小白鼠：腹腔注射致病性螺旋體後，部分可不致病，如致病者則于 7—15 日間死亡，死亡後，行肉眼及組織檢查與豚鼠相似，肝臟中也能找到螺旋體。我們發現部分小白鼠于接種致病性螺旋體後雖出現黃疸，呈病態現象，但幾天後，黃疸漸失，恢復健康。

2. 接觸感染試驗：

將已接種致病性螺旋體之豚鼠，與健康豚鼠飼養于同一籠內，并共一飼養盤，健康豚鼠不受感染。

3. 利用豚鼠作濾器試驗：

豚鼠腹腔注射出血性黃疸鉤端螺旋體培養液，十分鐘後抽取心血作培養，可獲純培養。

(三) 對染色液之着色試驗

1. Fontana 氏鍍銀染色法：

着色良好，螺旋體粗大。

2. Giemsa 氏染色法:

对新配制之应用液 (pH 6.8 左右), 着色良好, 染色时间需延长至 18—24 小时, 但对陈旧之染色液, 着色不良, 往往不能着色。

3. Wright 氏染色法:

如染料选择适宜, 则着色良好, 否则着色不佳。(我们用的系美国 Coleman Bell 公司出品)。

4. 革兰氏染色法:

着色不良, 如 pH 适宜 (pH 6.8 左右), 本螺旋体着色为革兰氏阴性。

5. 若用 Fontana 氏染色法的第一及第二液作用后, 用稀释洋红再染 1—2 分钟, 则着色良好。如单用鞣酸作用后, 用稀释洋红染色, 结果也良好。

(四) 对各不同株别螺旋体之抗原性测定试验

我们系用 980 号患者病第 13 天之血清, 用 Smith 及 Tulloch 二氏的试管凝集法来测定, 结果如表 1。

表 1 各株螺旋体之抗原性测定

螺旋体号码 \ 稀释倍数	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400
301	+	+	+	+	+	+	+	+	+
328	+	+	+	—	—	—	—	—	—
341	+	+	+	+	+	+	+	+	+
898	+	+	+	+	+	+	—	—	—
940	+	—	—	—	—	—	—	—	—
980	+	+	+	+	+	+	+	+	+

(五) 对青霉素之敏感度试验

应用 Karthof 氏培养基稀释青霉素, 每管总量为 2 毫升, 第一管以每毫升含量 5 单位开始, 用连续稀释法稀释至第八管。第九管为阳性对照, 不加青霉素。然后每管各取出 0.2 毫升, 后再加入螺旋体培养物 0.2 毫升, 总量每管为 2 毫升, 置室温中培养 7 天后,

表 2 各株螺旋体对青霉素之敏感度试验

螺旋体号码 \ 每 c.c. 浓度	5 单位	2.5 单位	1.25 单位	0.625 单位	0.3125 单位	0.1562 单位	0.0781 单位	0.03905 单位	对照管
301	—	—	—	—	—	—	+	+	+
328	—	—	—	—	—	—	—	+	+
341	—	—	—	—	—	—	+	+	+
898	—	—	—	—	—	—	+	+	+
940	—	—	—	—	—	—	—	+	+
980	—	—	—	—	—	—	—	+	+

用暗視野檢查，結果如表 2。

討 論

從實驗中得知，出血性黃疸鈎端螺旋體對環境及培養基的要求均不苛刻，如欲使本螺旋體發育良好，除加免血清外，培養基成分亦需接近自然水環境。因此許多學者認為本螺旋體之培養基應用自然水較蒸餾水為佳。我們應用井水作培養基做過多次實驗，初步体会到井水易受氣候及地域等自然環境影響，其中成分不易穩定，不如應用蒸餾水作培養基，其中加入磷酸鹽緩沖液效果較佳。至於野口氏培養基等，因其上蓋有一層輕油，在檢查中甚感不便，而本螺旋體與梅毒螺旋體不同，須在少量有氧環境下生長，因此我們認為蓋油一步實屬可省略。有些學者^[2]認為本螺旋體之培養基中所需之膽必需優等，如德貨 Witte 廠出品之膽，而我們應用日貨啞鈴廠出品之膽，培養結果也甚滿意，因此我們認為膽的好壞，對本螺旋體之發育關係不大。本螺旋體之培養溫度，日本學者認為 22—25°C 間發育良好，Toyor Goyle 諸氏認為 32°C 發育最佳，蘇聯學者如 Арин-стовский 等諸氏^[3]則認為 25—35°C 間均能良好發育，并云最初 5—6 天內保持在 32°C，而後則置放在 25—28°C 間。我們由於條件限制沒有專用孵育箱，在夏季則置于室溫中培養，冬季則置于 20—37°C 間保溫箱中培養，均能良好發育。如培養基選擇適宜（如 Karthof 氏培養基等），普通接種培養 4、5 天后，培養液即開始呈絮狀混濁，10 天左右發育即達高峯，于 4 周內均不死亡。因此我們認為本螺旋體之培養溫度一般在 20—37°C 間均能發育。

從實驗中得知，豚鼠對本螺旋體感染性很大。稻田、井戶二氏（1915）即利用豚鼠首次發現本螺旋體。因此早期日本學者認為凡有本螺旋體之存在，均能使豚鼠致死。後來一般學者^[2,4]認為成年豚鼠對本螺旋體之感染性不大，以 50—250 克間之豚鼠最為適宜。我們所分離到的 4 株螺旋體所用的豚鼠均在 350 克左右，而在 50 克重之幼年豚鼠之抵抗力甚弱，接種後很易死亡。因此我們認為作為本螺旋體接種用之豚鼠在 100—350 克重之間均可應用。本螺旋體致死之豚鼠，有特殊之病理變化如黃疸、出血及組織學上的變化等，所以確定是否為本螺旋體，除用血清學外，對豚鼠之致病性及病理學上的變化也甚重要。

Larson 氏^[5]認為三周內的小白鼠對本螺旋體之感染性也甚大，可代替豚鼠。但我們認為小白鼠對本螺旋體之感染敏感度較豚鼠為差。

Schüffner 氏^[6]（1940）認為豚鼠對本螺旋體之感染性很大，可作為本螺旋體之生物性濾器用。我們的實驗也證明此法頗為適用。若在培養過程中被雜菌污染，用此法將

培养液注射豚鼠之腹腔，待 10 分鐘后，抽心血作培养，即可重獲純培养。

从实验中得知对本螺旋体之着色除镀銀法 (Fontana 氏) 外，Giemsa 氏、Wright 氏染色液常因染色液之酸鹼度、配置時間、染料質量等关系，着色不佳。在应用 Fontana 氏染色法中，在第一液及第二液作用后，用稀釋洋紅复染，或單用鞣酸作用后，用稀釋洋紅染色，效果均佳，方法簡便，染料易得，实有应用和推广之价值。

从实验中得知各株螺旋体之抗原性有很大出入。因此很多学者^[7,8]認為作凝集反应之抗原，应采用多价抗原，此点在实验診斷上实屬重要。

从实验中得知本螺旋体对青霉素之作用甚为敏感。青霉素每毫升含量为 0.03905—0.0781 單位間即有致死作用。Florey 氏^[9]試驗 56 株螺旋体致死敏感度在 0.03 > 1 單位間，在臨床上也經証明如早期应用青霉素治療，效果頗为顯著。如分离出 940 号螺旋体之患者，于病后第三天入院，即用青霉素治療，第一天 120 万單位，以后每天 60 万單位，注射 24 小时后，即退热未出現黃疸，即進入恢复期，第二天血培养即陰性。因此我們認為出血性黃疸病如在早期治療較小剂量之青霉素即可收到治愈的效果。

本病的确实診斷是靠血、尿及脊髓液中分离到病原体及行血清学檢查。

血液內本螺旋体的檢出率，据 Toyor Coyle 諸氏意見在病 4—5 天内，檢出率可达 80—85%，黃疸出現后即急剧下降，有时僅 2—3%，我們以前因对本螺旋体較為生疏及由于条件上的限制，在 14 例病例所作的血培养及动物接种中僅一例陽性 (341 号病第六天)，今年比較对该病原体有些認識，今年在住院病例 3 例中，有 2 例于血液中分离到螺旋体 (889 号病第六天，940 号病第三天)。血液中于檢查出的 3 例中血培养陽性 2 例 (341，940) 但豚鼠接种中均分离得本螺旋体。此 3 例患者均有發热，因此我們認為凡有热度存在时，血液是適于本螺旋体之分离用。用血液分离法我們是行床边培养法及床边动物接种法，每管培养基內接种患者之血 1 毫升，每次需用培养基 2—3 支，动物接种为豚鼠之腹腔內注射患者之血 3—5 毫升。在培养方面，普通培养 5 天，即可开始用暗視野檢查，以后每日檢查 1 次，如觀察二周后仍無生長，可再重新移种 1 次，往往于移种后發育旺盛。在动物接种方面，于接种豚鼠后，过几天，再抽心血行培养檢查。

脊髓液一般于發病后 4、5 日即呈病理变化，我們僅檢查 4 例，即有 2 例陽性，1 例患者之脊髓液于病变之前一天，即在該脊髓液呈正常情況下，培养到本螺旋体。因此我們認為脊髓液之培养及动物接种对診斷上帮助很大。

尿液之培养易致污染，所以应行动物接种，然后再由动物抽心血培养較為理想。

尿液之檢查一般學者認為尿液必須中性或弱鹼性，接种前必須濃縮。但我們檢查到螺旋体的 4 例尿液均为酸性 (pH 均在 6.2 左右) 而也未經沉淀处理。虽然本螺旋体

在酸性尿中迅速死亡，但在機體內尿液中的螺旋體不一定都會死亡。普通電動离心机也不一定能夠將螺旋體沉下。我們曾將培養液用每分鐘 3000 轉之速度轉 15 分鐘後雖大部螺旋體沉至管底，但上層液中仍含有相當數量之螺旋體。從此點看來，一般离心机之轉速不能全部將螺旋體沉下。尿液接種方法同血，即豚鼠腹腔內注射 3—5 毫升，于無菌導尿後立即接種。當然如能獲得中性尿或弱鹼性尿再行注射更為理想。

血清學檢查對本螺旋體病最為常用，其法分顯微鏡法與試管法二種。我們發現在病程第五—六天凝集價可達 1:200，二周可達 1:6400（均試管法）。由于本螺旋體與犬型、七日熱等鈎端螺旋體有部分相同的抗原，所以單憑一次檢查往往不能確診由何種螺旋體所引起，所以應該每周檢查一次，凡因出血性黃疸鈎端螺旋體引起者，其凝集價必然上升。

至于對患者之尿、血及脊髓液等，作直接檢查不論用染色法或暗視野法都很难檢得螺旋體；我們曾用這些方法檢查過我們的病人但一次也沒找到螺旋體。

總 結

(1) 本螺旋體不難培養，對培養基及環境之要求均不嚴格，我們試驗過多種培養基都能生長，但以 Karthof 氏培養基為最佳。

(2) 動物接種以幼年豚鼠為最佳，但體重在 100—350 克間者均可適用。

(3) 幼年小白鼠對本螺旋體感染性不大，用作實驗診斷，不太適宜。

(4) 本螺旋體之染色，以 Fontana 氏鍍銀法為最佳，如用 Giemsa 氏或 Wright 氏染色，必須注意染色液之酸鹼度，此點甚為重要。如單用鞣酸作用後，再以稀洋紅染色，着色效果頗佳。

(5) 試管內的試驗證明本螺旋體對青霉素甚為敏感，制止濃度每毫升在 0.039—0.078 單位間。

(6) 本螺旋體各株別的抗原性頗不相同，故進行血清凝集反應時，使用多價抗原，較為妥當。

(7) 對本螺旋體之檢查應在發熱期內取血培養或動物接種或在病第 4—5 天後行脊髓液培養或動物接種。這樣的檢查，螺旋體的檢出率頗高。再後則行尿液檢查。

本培養承浙江醫學院微生物學教研組錢家琪、于振康二醫師指導甚多，上海第一醫學院駱家貴教授代為病理檢查，特此一併誌謝。

参 考 文 献

- [1] 竹内松次郎:近世細菌学及免疫学。291—300頁,东京版大正十三年。
- [2] Jayor, J. and Goyle, A. N. *The Indian Jour. Med. Res. Memoir* 20:125—127, 1931.
- [3] Аристовский, В. М. 等著: 中國医大微生物学教研組譯, 医用微生物学。367—371, 人民衛生出版社, 1955.
- [4] Manson & Bahr, *Tropical Disease*, 228—236, 11th ed. 1940.
- [5] Larson, C. L., *U. S. Pub. Health Rep.* 56:1546, 1941.
- [6] 秦氏細菌学, 190—193, 中華医学会, 1951.
- [7] Mackie McCartney 二氏原著, 陈廷祚等編譯, 实用細菌学手册, 708—712, 人民衛生出版社, 1954.
- [8] Minkenhof, J. E., *Lancet*, 6514:8—10, 1948.
- [9] 戴自英: 实用抗生素学, 44, 人民衛生出版社, 1954.

EXPERIMENTAL STUDY OF LEPTOSPIRA: CULTIVATION, ANIMAL INOCULATION AND SENSITIVITY TEST

WANG CHIA-CHÜ, HO SHIH-YUAN AND MA CHIA-CHENG

Lin Hai Hospital, Chekiang

1. *Leptospira* can be easily cultivated and Karthof's medium is found to be most suitable for this purpose.
2. For animal inoculation, young guinea pigs are found to be most satisfactory.
3. Young mice are not very susceptible to infection by this pathogen, and hence they are not suitable for practical diagnostic purpose.
4. Fontana stain is found to give the best staining result; if Giemsa or Wright's stain is used, it is most essential to adjust the pH of the stain to the right degree, otherwise, the results will not be satisfactory.
5. In vitro tests have shown that leptospira is sensitive to penicillin from 0.039 to 0.078 unit per ml.
6. As is well known, various strains of leptospira show great variation in antigenicity, and so for the purpose of diagnosis, a polyvalent antigen is preferred.
7. For practical diagnosis of leptospirosis, blood culture may be employed during the early stage of the disease, whereas after 4-5 days, bone marrow culture and animal inoculation are preferable. By these means, a high percentage of positive results can be obtained.