

异型白喉杆菌菌株的研究*

吳 皎 如

(福建省中心檢驗室)

白喉杆菌的异型菌株历年俱有發現。最显著者如1928年 Mair 氏^[1]分离出一种白喉杆菌异型菌株;它与白喉杆菌主要不同系其所产生的毒素,虽与白喉毒素在免疫学上極其相似,但其分子構造有一部分不受白喉抗毒素的抗体所中和,故白喉抗毒素不能阻止此毒素在豚鼠皮膚內所生的反应。1948年 Jebb 氏^[2]亦發現类似白喉杆菌的异型菌株。其特点系能液化筋膠,蔗糖發酵延迟,硝酸盐不还原,白喉抗毒素不能阻止此异型菌株所生的毒素在豚鼠皮膚上所生的反应。同年 Coleman 氏^[2]亦分离1株白喉杆菌异型菌株。其特征系对动物的侵襲力特別强。將此菌注射豚鼠皮內皮下后,能在豚鼠心臟血液中分离出此菌;白喉抗毒素亦不能保护豚鼠对此菌外毒素的感受性。翌年該氏又分离一株新菌株。其特征系糖类發酵与白喉杆菌不同:葡萄糖發酵非常緩慢,其他糖类如麦芽糖、蔗糖、及糊精等則不發酵。这些异型菌株的發現会使白喉杆菌檢驗工作复杂化。在檢驗过程中,若不加以特別注意,極易引起假性陰性。由1951年至1953年白喉流行时期,我們檢驗白喉标本2000份以上,皆在培养陽性后,即作动物試驗。先將动物試驗結果报告医院,然后作生物化学反应各項鑒定手續。总结結果时,我們發覺許多动物試驗陽性的菌株,其生物化学反应表现异常的结果,其中最为突出的异型菌株为蔗糖迅速發酵的菌株,其毒力非常强。此种菌株約占分离菌株的20.4%(見表1)。为

表1 各种白喉杆菌的百分率

白喉杆菌种类	分离百分率	葡萄糖	麦芽糖	蔗糖	糊精	淀粉	动物毒力試驗
第一种 輕型 中間型	28.15% 15.53%	+	+	-	+	-	兔皮膚反应强陽性
第二种	11.56%	+	-	-	-	-	同上
第三种 重型	5.80%	+	+	-	+	+	兔皮膚坏死动物死亡
第四种 异型	20.4%	+	+	+	+	-	兔皮膚反应强陽性有时动物死亡
第五种	18.56%	+	+	-	-	-	陰 性

* 1956年1月3日收到。

了進一步了解此種異型白喉桿菌菌株的生物學和免疫學特性，我們對此種菌株作了下述各項研究。

細菌學及血清免疫學上特征

(一) 細菌學上特征：我們研究此種異型白喉桿菌菌株系按照下列各項實驗詳細觀察：

1. 形态及着色力：取在 Dorset 氏蛋培基斜面上培養 48 小時以上的菌苔作塗片檢查，共用三種染色法染色：革蘭氏染色、Ponder 氏染色及 Loeffler 氏美蘭染色。革蘭氏染色過程中，以純乙醇脫色 15 分鐘。分離的異型菌株在純乙醇脫色 5 分鐘時，菌體即變為革蘭氏陰性；但變性色素顆粒仍保留陽性色澤。若以酞脫色則菌體仍為陽性，僅極少數菌體脫色。用 Ponder 氏染色法及以 Loeffler 氏美藍染色 5 分鐘着色佳良且均勻；色素顆粒亦極明顯。菌體排列狀態與正常白喉桿菌相同。

2. 培養特性：(1) 在 Loeffler 氏血清培養基上，異型菌生長比正常白喉桿菌好，在 37°C 孵育 24 小時即成一片灰白而厚的菌苔。(2) 在血液瓊膠平板上，菌落細小，直徑在 1 毫米以內。表面高突，不透明，色澤黃白色，周緣完整。僅有少數不規則，表面有發亮的光澤。(3) 在硝酸鉀血清瓊膠平板上，37°C 培養 96 小時後，80% 菌落細小，直徑僅 0.5 毫米。少數菌落直徑超過 1 毫米，尚有菌落小如針尖。菌落形狀皆為圓形，僅少數有不規則邊緣。有的菌落中央有乳嘴形隆突，小形菌落表面皆為圓穹形，色澤黑色。(4) 以此種異型菌株接種于普通牛肉湯中，在 37°C 培養 24 小時後，牛肉湯呈現均勻混濁；培養 72 小時後，發現中等度粗大的沉淀。(5) 生物化學反應：將此種異型菌株接種于各種糖類并作其他各項生物化學反應，結果全部蔗糖發酵，有的（第 8 號）能發酵鼠李糖和柳甘；但鼠李糖發酵時間較遲（6 天後始發酵），柳甘發酵迅速（24 小時後即發酵）。有的異型菌株（第 15 號）對鼠李糖及柳甘于普通無糖牛肉膏基內不發酵，在 Hiss 氏血清糖基內培養 6 天，溫度為 37°C，僅柳甘發酵；且發酵程度輕微。異常菌株的美紅反應俱為陽性，而正常菌株（Toronto 株）則為陰性。

3. 抵抗力：(1) 0.5% 石炭酸溶液殺菌力試驗：將各種白喉桿菌的菌苔刮下，放置于 0.5% 石炭酸溶液內；經 5 分鐘，10 分鐘，15 分鐘，及 20 分鐘分別接種于培養基中，檢查是否生存。其結果異型白喉菌株抵抗力相當強；經 20 分鐘 0.5% 石炭酸溶液作用後，培養于血液鉀硝瓊膠平皿上尚有菌落生長。我們所用標準白喉桿菌（Toronto 菌株）在 0.5% 石炭酸溶液中，經 5 分鐘的作用，再接種于血液硝酸鉀瓊脂平皿上，經 5 天後生長極疏，若在 0.5% 石炭酸溶液中作用 10 分鐘，即完全無菌落生長。

(2) 加熱殺菌試驗：以 58°C 的溫度將異型菌株第 8 號，第 15 號和正常白喉杆菌一同加熱，加熱時間分為 10 分鐘和 20 分鐘。然後將加熱的菌液再行培養於血清牛肉湯內，經 72 小時以後檢查。結果證明第 15 號異型菌株比正常的白喉杆菌抵抗力強；加熱 10 分鐘尚有生存的菌體。

(3) 乾燥抵抗力試驗：白喉杆菌對乾燥抵抗力強弱與白喉病的流行有極大的關係。據過去經驗，白喉杆菌在乾燥的義膜塊上或在其他物體上，經 14 日再培養，尚能證明其生存。異型白喉菌株對於乾燥的抵抗力經試驗結果證明比正常白喉杆菌強。我們將 48 小時生長的白喉杆菌菌苔塗於消毒的乾燥濾紙小塊上，在普通室溫及光綫的作用下，經不同的時間取樣培養 72 小時，檢查其生長狀況。表 2 說明實驗結果：正常白喉杆菌經 18 日即無生長。異型白喉杆菌菌株經 24—27 日尚能生長。

表 2 白喉杆菌對乾燥的抵抗力

種 別	標準白喉杆菌	異型白喉杆菌第八號	異型白喉杆菌第十五號
經過乾燥時間			
第 5 日	生長	生長	生長
第 8 日	生長	生長	生長
第 12 日	生長	生長	生長
第 15 日	生長	生長	生長
第 18 日	生長	生長	生長
第 21 日	無生長	生長	生長
第 24 日	無生長	生長	生長
第 27 日	無生長	生長	生長
第 30 日	無生長	無生長	無生長

(4) 在動物體內寄生時間的長短：白喉杆菌能寄生於健康人的咽喉腔粘膜上，而可以不發生疾病症狀。此種帶菌狀態對於白喉病的流行關係很大。在普通情況下，罹患白喉痊愈後，平均兩星期以後，白喉杆菌在咽喉粘膜上即不易找到。在此次大流行中，檢查傳染病病院痊愈白喉病人千餘例，兩星期內，在粘膜上不能找到白喉杆菌者，有 70% 左右。26% 的痊愈病人能培養出白喉杆菌，但皆為無毒力的。僅有 4% 的痊愈病人咽喉粘膜上，能找到有毒的白喉杆菌。其毒力亦甚弱。檢查白喉帶菌者時，發現蔗糖發酵的革蘭氏陽性杆菌一般都認為非白喉杆菌。故特作一實驗決定此種異型菌株在動物體寄生時間的長短，以推想此種異型菌株是否與白喉流行有密切的關係。實驗方法係以此異型菌株培養於心肌荷爾蒙湯中，在 37°C 孵育 72 小時後，以棉拭子蘸生長的荷爾蒙湯塗布於兔子咽喉上。同時以標準菌株作比較。在不同日期，由兔子咽喉內採取材料作培養檢查，以證明異型菌株在兔子咽喉內寄生時間。結果如表 3。

表 3 白喉杆菌寄生在动物咽喉内的生存时间

接种后生存时间	种 别 白 喉 杆 菌 Toronto strain	异型白喉杆菌第八号	异型白喉杆菌第十五号
第 5 日	生 長	生 長	生 長
第 10 日	無生長	生 長	生 長
第 15 日	無生長	無生長	無生長

4. 毒力試驗：以下列三种方法檢查异型菌株的毒力：

(1) 兔子皮內注射試驗：將异型菌株第 8 号及第 15 号在 37°C 培养 5 日后，各以 0.2 毫升注射于白兔背部皮內。經 4 小时，注射白喉抗毒素 1,000 單位于白兔腹腔內。并以标准菌株作比較。經 1 小时半另一側白兔皮內再注射 0.2 毫升的同一含毒素的培养基。72 小时后，檢查注射部位各病灶結果注射血清后所注射的各种白喉毒素皆無明显反应，而另一側在注射血清前 4 小时所注射的第 8 号及标准菌株的病灶，有明显紅腫滲潤，坏死的直徑都达 3 厘米；第 15 号的病灶仅有微紅，至第 5 天开始發生浸潤坏死。

(2) 豚鼠皮下注射試驗：以孵育 5 天的上述 3 株白喉杆菌所分泌的外毒素 1 毫升，各注射于 2 只豚鼠皮下。另以上述 3 株白喉杆菌的外毒素 1 毫升加 0.1 毫升抗毒素 (10000 單位) 混和后，在 37°C 中孵育 3 小时后，即各注射于 2 只豚鼠皮下。結果仅注射毒素的豚鼠在 3 日內先后死亡，注射第 8 号及标准菌株的豚鼠在 48 小时以內即死亡，而注射第 15 号的豚鼠死亡較慢，至 72 小时始死亡。

(3) Ouchterlony 氏血清沉降試驗^[1]：每毫升血清瓊膠加 40 單位白喉抗毒素，然后傾于平皿上再將 Toronto 株白喉杆菌接种于中央，第 8 号及第 15 号接种于兩側。在 37°C 恒温箱中孵育 4 天后观察生長菌帶兩旁各有沉淀帶；但标准菌株兩旁沉淀較明显。

5. 免疫試驗：本試驗的目的系証明异型白喉菌株的外毒素与正常白喉杆菌的外毒素是否相同；有無亲緣上关系。

(1) 交互免疫試驗：將第 8 号异型白喉杆菌菌株培养 7 日，將毒素制成类毒素。并以华东生物制品所的白喉类毒素为对照，各免疫一群豚鼠，每只豚鼠注射类毒素 1 毫升(皮下注射)。經 9 星期后，先以錫克氏試驗測定各豚鼠对白喉毒素的反应为陰性时，始以标准菌株和第 8 号异型白喉杆菌所产生的毒素，分別經皮下注射于各免疫豚鼠，并观察一星期。試驗結果見表 4。

由交互試驗結果来判断第 8 号白喉杆菌外毒素的性質，可能与正常白喉杆菌的外毒素有些不同。表 4 說明交互免疫試驗的結果。

(2) 交互凝集反应試驗：將第 8 号和第 15 号异型白喉杆菌菌株分別注射白兔体

表 4 交互免疫試驗結果

免疫豚鼠种类 毒素种类	第 8 号白喉杆菌类毒素免疫的豚鼠		标准种株毒素免疫的豚鼠		华东制品所白喉类毒素免疫的豚鼠	
	毒素剂量	死亡率	毒素剂量	死亡率	毒素剂量	死亡率
标准菌株毒素	100 M.L.D.	50%	1000 M.L.D.	0	1000 M.L.D.	10%
第 8 号异型白喉杆菌的毒素	100 M.L.D.	0	1000 M.L.D.	40%	1000 M.L.D.	100%

內,使其产生自动免疫的血清;然后将該血清与各型白喉杆菌作交互凝集反应。各管在 37°C 水浴內 24 小时后观察結果。表 5 說明交互凝集結果。

表 5 白喉杆菌交互凝集反应

免疫血清 菌液	第 8 号异型白喉杆菌			第 15 号异型白喉杆菌			Hoffmann 氏杆菌			标准白喉杆菌			由病人分离的正常白喉杆菌		
	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160	1:40	1:80	1:160
第 8 号异型白喉杆菌	++++	+++	+++	+++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
第 15 号异型白喉杆菌	+++	++	++	++++	++++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Hoffmann 氏杆菌	+	+	+	+	+	+	++++	++++	++++	-	-	-	-	-	-
标准白喉杆菌	++	++	++	+++	++	++	-	-	-	++++	++++	++++	++++	++++	+++
正常白喉杆菌 (由病人分离)	++	++	++	++	++	++	-	-	-	++++	+++	+++	++++	++++	++++

討 論

1. 根据上述的細菌学及血清免疫学的鉴定,第 8 号及第 15 号兩菌株是白喉杆菌的一种异型菌株。由其牛肉湯生長情况、菌落形态、生物化学反应、血清免疫学反应及毒力試驗等,可以决定此种异型菌株系在亲緣上接近于輕型白喉杆菌;而外毒素性質与正常白喉杆菌外毒素稍有不同。

2. 蔗糖發酵在正常白喉杆菌非常少见,仅在其生物变异性高度分化时,始有分解蔗糖的能力*。第 8 号及 15 号白喉杆菌菌株的生物学性質非常稳定。由病人材料分离出此兩株菌株后,即能在普通培养基中分解蔗糖。在硝酸鉀培养基上,亦未發現特殊不同原形的菌落。抽选十余个菌落作糖类發酵力检查,未發現对糖类有不同發酵力的菌株。

* 方氏等于 1940 年^[2]报道有几株有毒性白喉杆菌能發酵蔗糖,但没有作进一步的研究——編者注。

3. 异型白喉杆菌菌株的生活力强。在抵抗干燥状态和石炭酸杀菌力, 都比正常白喉杆菌长久。寄生在动物咽喉内的生存时间, 亦比正常白喉杆菌长久。这些特性对白喉病流行有很大意义。

4. 异型白喉杆菌的外毒素产生条件非常简单。接种异型白喉杆菌菌株于普通葡萄糖牛肉汤中, 在 37°C 恒温箱中孵育 24 小时以上, 即能产生 100 最小致死量以上的外毒素; 故此菌株传染至人体后, 可能易于引起白喉病。

5. 因为本菌容易生长, 对蔗糖又易发酵, 很容易被误认为副白喉杆菌; 所以对临床检验上易引起错误诊断, 影响治疗时间和防疫措施, 故值得细菌学家和临床医师的特别注意。

6. 由交互免疫试验的结果, 可以看出异型白喉杆菌菌株外毒素的抗原性和正常白喉杆菌外毒素的抗原性有些不同。交互免疫的动物仅对自己的毒素有完全免疫力。此种实验结果对普通白喉类毒素预防接种的效果可能有很大影响。儿童经普通白喉类毒素预防注射后, 对此种异型白喉杆菌外毒素可能免疫不完全。

总 结

1. 异型白喉杆菌对蔗糖有发酵能力。虽似副白喉杆菌, 但动物实验证明具有产生外毒素的能力。

2. 此种异型白喉杆菌, 由细菌学鉴定和免疫血清学反应, 在亲缘上接近于轻型白喉杆菌。

3. 外毒素的抗原性和正常白喉杆菌外毒素的抗原性有些不同。

4. 异型白喉杆菌生活力强, 容易生长和产生外毒素, 故对白喉病流行关系很大。

参 考 文 献

- [1] Saxholm, R.: *J. Path. Bact.* 63: (2), 303, 1951.
- [2] Coleman, M. B.: *J. Bact.* 58: (5), 712, 1949.
- [3] Световицова В. М.: *Журнал Микробиологии, эпидемиологии, и иммунологии* (9), 1955.
- [4] Галунина З. И.: *Журнал Микробиологии, эпидемиологии, и иммунологии*, (8), 1954.
- [5] 方良、謝少文: *Chin. Med. J. Suppl.* III, 334, 1940.

A STUDY ON ATYPICAL *C. DIPHTHERIAE*

WU CHIAO-JU

Central Diagnostic Laboratory, Fukien

Saxholm, in a recent review of the toxin-producing diphtheria-like organisms isolated from the throat of patients, emphasized their differences from the typical *C. diphtheriae* and their clinical implications. We have also examined more than 2000 throat cultures for diphtheria bacilli during a recent epidemic, and found 20.4% of the latter were sucrose-fermenters, while their toxin-producing ability was also equally evident. A more detailed study of these organisms showed that biochemical and antigenic properties of two of the isolated strains inclined them to be included in the mitis type, but their toxin was not exactly identical with those of the clinical *C. diphtheriae* as demonstrated by cross immunization test with a well known strain, the Toronto strain. The epidemiological significance of the present finding is briefly discussed.