

豬霍亂沙門氏菌特異—非特異 位相變異實驗觀察

廖子哲

(貴州省衛生防疫站化驗科)

在過去我國各地所檢出的豬霍亂菌株中，有特異相和非特異相^[1]，但在貴陽至目前為止，所分離到的菌株則概屬非特異相^[2]。作者於1955年曾作本菌24株的非特異→特異位相變異試驗，曾發現各菌株結果不甚一致，其中20株分離到特異相；3株於通過1、2、3、5血清半固體基3代內未出現特異相；1株(240號菌)在實驗中未轉變成特異相，但產生與b及g血清凝集的細菌。爲了對本菌的生物學特性作進一步觀察，乃另取本菌20株作系統實驗觀察，茲將實驗觀察結果報告於下。

實驗材料及方法

(一)材料

1. 菌種：20株係陸續於1955年5月至1956年2月在貴陽自住院病人分離，保存在半固體基內，抗原結構式爲VI, VII:—1,5。此外240號菌係1955年3月份變異試驗中通過1、2、3、5血清半固體基3代之變系，以240 P₂代表之。

2. 血清：(1)特異相鞭毛c血清——大連生物製品所1954年出品。臨用時，再經過生理鹽水稀釋成1:20，用於玻片凝集試驗。(2)非特異相鞭毛1,5血清——用本地分離的本菌非特異相免疫家兔，再用免疫菌體抗原吸收製成，凝集滴度1:2,560。用生理鹽水稀釋成1:10，用於位相變異試驗及玻片凝集試驗。因爲前文實驗所用血清係大連生物製品所出品，含硫柳汞，爲欲觀察到同樣結果，將血清分成兩份；甲、含硫柳汞約百萬分之一，用於第一次試驗，乙、不含硫柳汞，用於第二次試驗。

3. 培養基：(1)半固體培養基——0.4%肉湯瓊脂，pH 7.4，按前文方法^[2]分裝，每管4毫升。(2)1,5血清半固體培養基——於半固體培養基中，每管加入上述1,5血清0.1毫升，最終血清濃度0.2%，凝集滴度相當於1:64。共計有兩種，甲、含硫柳汞約四千萬分之一，乙、不含硫柳汞。

(二)方法

1. 位相變異試驗：方法同前文所述^[2]，每通過1,5血清半固體培養基及一次移種瓊脂斜面即算作一代，分別以“P₁”、“P₂”、“P₃”……代表之。

2. 半固體培養基傳代：方法同上述變異試驗，所用半固體培養基不含血清。每通過半固體培養基1次及移種瓊脂斜面，即算作一代。

3. 瓊脂斜面傳代: 細菌移種肉湯瓊脂斜面, 孵育 37°C , 24 小時後, 移種另一瓊脂斜面。每移種一次即算作一代。

逐代作成 H 抗原, 用 c 及 1,5 血清試驗其位相。

4. 抗原製備: 按照 Kauffmann 氏法^[3]。

5. 凝集試驗: 試管凝集試驗同一般肥達氏反應操作; 凝集滴度從“++”以上計起。玻片凝集試驗用一直徑 4 毫米的白金耳取抗原 1 滴, 置潔淨玻板上; 再用同一白金耳取血清 1 滴混合於抗原滴中, 振搖之, 對光觀察凝集現象。

6. 菌落位相檢查: 自 24 小時肉湯瓊脂平板上挑取單個菌落混懸於玻板上兩滴生理鹽水中, 分別用 c 及 1,5 血清試驗。

實 驗 結 果

(一) 特異——非特異位相變異

1. 在含硫柳汞的 1,5 血清半固體培养基中, 非特異→特異位相變異。

由於前次試驗^[2]係用大連生物製品所出品的血清, 其中含硫柳汞, 為欲證實與前次相同的結果, 仍採用含硫柳汞的 1,5 血清半固體培养基。試驗結果, 各菌先後自接種處運動生長到分離處^[2], 生長時間相差很大, 最短的 24 小時, 最長的 308 小時, 如表 1。

表 1 20 株通過 1,5 血清半固體基一代“P₁”生長時數及位相變異結果

特 異 相				非 特 異 相				中 間 相			
菌株號	生時 長數	血 清 c	反 應 1,5	菌株號	生時 長數	血 清 c	反 應 1,5	菌株號	生時 長數	血 清 c	反 應 1,5
607	216	++	—	666	216	—	++++	594	42	—	—
667	92	++	—	665	210	—	++++	583	126	—	—
598	216	++	—	604	216	—	++++	581	120	—	—
600	25	++	—	670	24	—	++++	585	308	—	—
668	92	+	—	584	308	—	++	605	44	—	—
599	210	+	—	586	308	—	+	587	42	—	—
669	116	±	—					685	99	—	—

由表 1 觀察, 20 株之“P₁”中, 有 7 株變為特異相, 與 c 血清呈不同程度的凝集反應; 6 株仍為非特異相, 與 1,5 血清呈不同程度的凝集反應; 有 7 株既不與 c 也不與 1,5 血清發生凝集, 作者暫名之為“中間相”。隨即全面地試以因子血清 a, b, d, f, i, k, m, r, s, t, p, q, u, y, e, h, lv, enx, g, p 等亦均無凝集發生。

凡“P₁”未得特異相者, 繼續通過 1,5 血清半固體培养基, 逐代檢查其位相, 結果 14 株中有 8 株於不同代數顯特異相。3 株(586、670、604)於傳代中曾出現對 c 血清弱凝集反應, 但繼續傳代復行喪失; 3 株連續 10 代, 始終無凝集出現。各代菌株均曾全面地試以上述各種鞭毛因子血清, 亦均無凝集。同時各代均曾作成菌體抗原, 試以 C 羣菌體血清與菌體因子血清 VII, 證明為試驗菌。

2. 在不含硫柳汞的 1,5 血清半固體培养基中, 非特異→特異位相變異。

試驗方法同上, 1,5 血清中不含任何防腐劑, 結果雖各個菌株的位相變化與上述試驗

結果不盡相符,但基本情況相似,如表 2。

表 2 20 株通過 1,5 血清半固體基一代“P₁”生長時數及位相變異結果

特 異 相				非 特 異 相				中 間 相			
菌株號	生時長數	血清 c	反應 1,5	菌株號	生時長數	血清 c	反應 1,5	菌株號	生時長數	血清 c	反應 1.5
667	22	++	-	666	62	-	+++	594	19	-	-
670	22	++	-	584	86	-	++	583	158	-	-
665	38	+	-	598	158	-	++	581	38	-	-
586	66	±	-	668		-	++	605	182	-	-
585	27	±	-	599	62	-	++	600	38	-	-
				685	264	-	++	667	24	-	-
				587	312	-	++				
				604	165	-	++				
				669	110	-	+				

這次試驗中,有 5 株變為特異相;9 株仍為非特異相;6 株呈現“中間相”。

19 株的“P₁”繼續通過 1,5 血清半固體培养基,逐代檢查其位相,結果各菌分別於不同代數逐漸出現或加強了對 c 血清的凝集性,於 10 代內全部呈現了特異相。

(二)“中間相”抗原性研究

為了對無鞭毛抗原凝集性的細菌(“中間相”)的鞭毛抗原性作進一步研究,分別從下述三方面進行實驗。

1. 凝集性的進一步測定:為欲進一步證實“中間相”不被 c 及 1,5 血清凝集,任擇 581 及 669 號兩菌的“P₁”(表 1),用 c 及 1,5 血清作試管凝集試驗,結果在 1:20 稀釋中,均為陰性。

2. 凝集原的測定:上述二菌作成 H 抗原,免疫家兔各二隻。家兔於第二次注射後一日死於敗血症(免疫菌未被福爾馬林完全殺死)。瀕死前採取心血作培養檢查,分離到用作免疫的原菌,仍無鞭毛凝集性。析出血清,測定其凝集素,結果對原免疫菌株的 H 和 O 抗原均有 1:640 的凝集滴度。對典型的特異相與非特異相的 H 抗原亦有不同程度的凝集反應。但將 581 “P₁”血清用原免疫菌株的 O 抗原吸收後,對原免疫菌株的 H 和 O 抗原以及典型的特異相 H 抗原均不凝集,但保留對典型的非特異相 H 抗原的凝集性(1:40)。實驗說明:“中間相”581 “P₁”具有產生 1,5 凝集素的能力。

3. 凝集素結合力的測定:選擇 581、669、594、605、685 各菌的“P₁”(表 1)分別兩次吸收 1,5 血清。結果除 669 “P₁”能部分吸收 1,5 凝集素(由 1:1280 降到 1:400)外,其餘各菌概不能吸收。選擇 581、669、605、685 各菌的“P₁”(表 1)一次吸收 c 血清,結果除 581 “P₁”不能吸收外,其餘各菌能部分吸收,由實驗看出:各菌不一致地具有吸收 c 或 1,5 凝集素的能力。

(三)關於“P₁”的實驗研究及菌落位相檢查

1. 7 株的“P₁”瓊脂斜面傳代:

為欲觀察“中間相”的遺傳穩定性,選擇 7 株的“P₁”用肉湯瓊脂斜面傳代,結果除 583 號 1 株回復為非特異相外,其餘 6 株分別於不同代數出現特異相。

2. 7 株的“P₁”半固體培基傳代:

由上述瓊脂斜面傳代結果,聯想到各菌株各代通過 1,5 血清半固體培基特異相的出現,不盡由於 1,5 血清作用的積累,而可能係由於“P₁”在培養基中轉變為特異相,需要一定的移種代數。乃取 7 株的“P₁”用不含血清的半固體培基傳代,結果 7 株中有 5 株於不同代數出現明顯的特異相,2 株於不同代數回復為非特異相,如表 3。

表 3 7 株“P₁”半固體培基傳代,逐代位相檢查結果

菌 株 號 c 1,5	代 數													
	1		2		3		4		5		6		7	
	c	1,5	c	1,5	c	1,5	c	1,5	c	1,5	c	1,5	c	1,5
581 - -	++	-	+++	-										
600 - -	+	-	+++	-										
583 - -	-	++	-	+++										
586 ± -	++	-	++	-	++	-								
605 - -	±	-	++	-	+	+	+	++	-	+++				
594 - -	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
585 ± -	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+++	-

由以上瓊脂斜面和半固體培基傳代結果觀察,實驗菌經 1,5 血清作用一代後,雖未呈特異相,但容易地變為特異相。其遺傳性不甚穩定,根據培養條件的不同也可以回復為非特異相。如 605、594 二菌的“P₁”於瓊脂斜面傳代中出現特異相,而於半固體培基傳代中則回復為非特異相。“中間相”本身處在動搖狀態中,只有當實驗菌繼續通過 1,5 血清半固體培基,才能獲得變為特異相的最大可能性。

3. 菌落位相檢查:

一般認為雙相型沙門氏菌的任一相菌株,當接種平板後,往往有兩個相的菌落出現。為了觀察本菌在同一菌株內,各個菌落的位相是否有所不同,分別檢查了本菌 4 株菌落各 100 個,均未發現特異相菌落。並檢查了其中 2 個菌株(581, 585 號)的“中間相”和特異相各 100 個菌落,結果如表 4。

表 4 2 株菌落位相檢查結果

菌 株 號			581										585													
菌 株 代 數			原		P ₁		P ₂		P ₃		P ₄		原		P ₁		P ₂		P ₃		P ₄		P ₅			
菌 株 凝 集			c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5	c 1,5		
反 應			-	+++	-	-	++	-	++	-	+++	-	-	+++	±	-	±	-	+	-	++	-	+++	-		
菌 株 表 現 位 相			非		中		特		特		特		非		?		?		特		特		特			
各 相 菌 落			非	不	特	不	特	不	特	雙	不	特	雙	不	非	不	特	不	特	不	特	不	特	不		
百 分 數			94	6	3	97	99	1	90	1	0	97	2	1	99	1	18	82	78	22	67	33	80	20	88	12

註: (1) 原—原始菌株, 特—特異相, 中—中間相, 非—非特異相;

(2) 不一與 c 及 1,5 血清均不凝集的菌落, 雙—與 c 及 1,5 血清均凝集的菌落;

(3) 凡特異相菌落對 c 血清的凝集反應逐代加強。

由表 4 看來：在非特異相菌株內未發現特異相菌落；在“中間相”菌株內有少數特異相菌落；在特異相菌株內有個別雙相菌落；無論在非特異相、“中間相”或特異相菌株內，均有不與 c 及 1,5 血清凝集的菌落。

問題在於：非特異菌株中的無鞭毛抗原凝集性的菌落和“中間相”菌株中的無鞭毛抗原凝集性的菌落，究竟有無實質上的差別？前者係由自然界中分離的原菌株，後者則為經過實驗變異後的菌株。自 581 號原菌株平板上挑取無凝集性菌落 1 個，移種於瓊脂斜面，孵育 37°C 18 小時，即呈明顯的非特異相。自 581 “P₁”平板上挑取無凝集性菌落 1 個：(1)移種於瓊脂斜面及平板，孵育 37°C 18 小時，檢查其位相，仍無凝集性。又檢查平板上 100 個菌落，除 3 個菌落與 c 血清、1 個菌落與 1,5 血清有微量凝集外，其餘 96 個菌落均無凝集性。(2)通過半固體基傳代，至第三代呈現明顯的特異相。可見原菌株中的無凝集性菌落，實質上不同於“中間相”菌株中的無凝集性菌落。前者迅速地形成非特異相，後者則容易地變為特異相。

討 論

至目前為止，本地分離到的豬霍亂沙門氏菌雖概屬非特異相，但用實驗方法證明了可以人工地由非特異相得到特異相的變異的現象。由實驗觀察：其變異過程多是逐漸的。非特異相經 1,5 血清作用 1 代或多代後，向特異相發生變異，首先是 1,5 抗原凝集性的逐漸減弱和消失，然後是 c 抗原凝集性的逐漸出現和加強。本菌的特異——非特異位相變異，雖屬種內的抗原轉化，但卻體現了由量變到質變的過程。在變異過程中出現了“中間相”。“中間相”並非“O”型，因為所有的“中間相”菌株，均係經過在半固體培基內運動生長後分離到的；且當分離後均曾經接種半固體培基，觀察其動力，除個別菌株的運動力較弱外，絕大多數菌株的動力極為明顯。“中間相”雖不被 c 或 1,5 血清凝集，但不一致地具有產生 1,5 凝集素以及吸收 c 或 1,5 凝集素的能力，亦即或多或少含有 c 或 1,5 抗原成分。“中間相”位於非特異相到特異相的轉捩點，極不穩定，一般逐漸地轉化為特異相。至於原菌株中的與 c 及 1,5 血清無凝集的菌落，是否為本菌自然發生位相變異的中間過渡階段，尚待進一步研究。Seligmann 氏等^[4]曾在鼠傷寒沙門氏菌株中發現“X”相菌落，既不被 i 也不被 1,2 血清凝集。“X”相被認為由特異相和非特異相成分混合構成。這次實驗中在原菌株中發現的無 c 及 1,5 抗原凝集性的菌落，與“X”相有所類似，但需進一步實驗觀察。

本菌 20 株通過含硫柳汞的 1,5 血清半固體培基時，有 4 株於連續通過 10 代後仍無凝集性出現，但在不含硫柳汞的 1,5 血清半固體培基中則無此種情形。或可認為由於硫柳汞參與了對實驗菌酶系統的干擾作用，影響了 C 抗原的形成。此點尚待進一步證實。

240 號菌在前次實驗中出現與 b 及 g 血清發生凝集的現象，或為該菌在實驗條件（硫柳汞加 1,5 血清）下所發生的抗原混亂現象。但由於菌種內在的較強的遺傳穩定性，該菌並未形成別的鞭毛抗原，終究定向地變為本菌固有的特異相。

結 論

1. 本文報告豬霍亂沙門氏菌（孔成道夫變種）20 株，在 1,5 血清作用下由非特異相到特異相的實驗位相變異過程。一般首先是 1,5 抗原凝集性的逐漸減弱以至消失，然後是

c 抗原凝集性的出現以至逐漸加強,體現由量變到質變的轉化過程。

2. 在變異過程中出現一個既不被 c 血清也不被 1,5 血清凝集的中間過渡階段,作者暫名之為“中間相”。“中間相”一般定向地變為特異相,但在一定條件下(通過半固體培基傳代),又可回復為非特異相。同時在原菌株(非特異相)中亦曾發現既不與 c 血清也不與 1,5 血清凝集的菌落,但其性質與“中間相”不一樣,當移種培養時,迅速變為非特異相。

附記: 本文實驗操作由陳策、何虎丞二同志協助,文稿寫作中,承于本崇副教授指導,一併誌謝。

參 考 文 獻

- [1] 濱野滿雄: 中國沙門氏菌屬傳染的情況,大連衛生研究所彙刊, 1: 3, 1951.
- [2] 廖子哲: 中華醫學雜誌, 43: 431—434, 1957.
- [3] Kauffmann, F.: Enterobacteriaceae, Einar Munksgard, Copenhagen, p. 60—71, 1954.
- [4] 見 Edwards, P. R., McWhorter, Alma C. and Fife, Mary A.: *J. Bact.*, 67: 346—349, 1954.
- [5] 廖子哲: 尚未發表的材料。

EXPERIMENTAL OBSERVATION ON SPECIFIC- NON-SPECIFIC PHASE VARIATION OF *SALMONELLA CHOLERA-SUIS*

LIAU, T. C.

(Kwei-Chow Public Health Service, Kwei-Yang)

Specific phase antigen had been demonstrated from twenty strains of pure non-specific phase *Salmonella cholera-suis* var. Kunzendorf by means of growth in semisolid medium containing flagellar 1,5 immune serum. The result of this experimental phase variation showed, in general, that the agglutinability to 1,5 antiserum gradually decreased and it was finally lost, followed by a gradual increase of c antigenic agglutinability. The process of transformation seemed to be a quantitative change turning to a qualitative change.

Some strains, besides the specific and non-specific phases, yielded cultures agglutinated with neither c nor 1,5 serum. It is tentatively called “intermediate phase” by the author. The hereditary quality of “intermediate phase” cultures were not stable. In general, the “intermediate phase” cultures would change into specific phase upon transferring on artificial media, with or without antiserum, but some of them returned to non-specific phase after several passages in semisolid medium.

Upon plating, the original cultures were found to yield colonies agglutinated with neither c nor 1,5 serum. These, however, were different from the “intermediate phase”, as they were changed immediately to non-specific phase when transferred on agar slant.