

13株变异性痢疾桿菌的复原觀察*

龔 天 恩

(解放军 175 医院檢驗科)

1957 年在大量收治痢疾患者期中,我們共分离到 149 株痢疾桿菌。在分离鑑定的过程中,我們发现 13 株生化反应完全不象痢疾桿菌,但对痢疾多价血清,在玻片上却发生明显的凝集現象。为了探明这些菌株的性質,我們把它收集起来,作了較系統細致的研究觀察。

指導我們這項工作思想的是米丘林和李森科的辯証唯物主义的生物学理論,即:全部生长过程以及遗传性能和变异过程,以生命来源即营养为轉移的,因此,我們对这些菌株首先假設的对象,是否为受营养性杂交,所引起的杂种或变种。理由是痢疾桿菌在与人体复杂的共生条件下,可能因受环境的作用,其营养条件的改变,使得其同化与异化作用发生了变异。这个变异过程,又以量变到质变的規律,还未达到“穩固”的阶段。只是在发酵作用上被改变了。如果用短期传代的方法,是否能使它复原?在这个理論思想的基础上,我們用下述方法将 13 株变异性痢疾桿菌完全复原,証实了我們的設想,以及米丘林生物学理論的正确性。茲将所得結果报告如下。

实验材料与方 法

菌株来源:本报告中 13 株痢疾桿菌,均系本实验室 1957 年于江西南昌地区,自住院患者粪便中分离所得到的。选择的原則乃是菌株对痢疾多价或福氏多价血清,在玻片上发生明显的凝集現象,但在生化反应上,却表现为不典型或完全否定的現象。

培养基的制法^[1]:称取蛋白胨 20 克、氯化鈉 5 克、磷酸氯二鈉 3 克、琼脂 25 克,放入到 1 升的烧瓶內,加入蒸餾水 1000 毫升。加热使其溶解,矫正 pH 为 7.4,用 4 层紗布过滤。另取小烧杯 1 只,加入可溶性淀粉 10 克、葡萄糖 5 克,用少量水促其溶解后,再加入到上述琼脂培养基內混匀,分装于試管內,8 磅压力灭菌 20 分钟,放成斜面,行无菌試驗后备用¹⁾。

传代菌株在此培养基上較普通琼脂培养基生长的菌落光滑和茂盛。

传代法:自伊紅美兰或中国兰平板上,以白金錢挑取可疑菌落,接种在含鉄双糖培养基上,于 37°C 孵育 24 小时。以痢疾多价抗血清行玻片法定性凝集試驗,并記錄其結果。再自双糖培养基上挑取菌落,分別接种于五管糖,及其它生化反应培养基內,37°C 24 小时后亦記錄其結果。阴性的糖管則繼續培养直到一周。以上过程,在本实验中亦作 2 代計,但在此 2 代中,并未行定量凝集試驗。

将上述所有拟試菌株,分別接种于淀粉琼脂斜面培养基上。在 37°C 24 小时,刮下菌落,分別行逐代定量凝集試驗,并移种至新的培养基上。如此連續移植后,如与痢疾多价

* 1958 年 8 月 1 日收到。

1) 該培养基如 pH 滴定过高,不能以酸来中和,因此测定 pH 时必须注意。

表1 13株变异性病杆菌复原前后的生化性状

复 原 前										复 原 后									
次 序 号	菌 落	革 兰 氏 染 色	运 动	双糖管				糖 发 酵				硫 化 氢	凝 基 质	尿 素 分 解	M. R. 试 验	V. P. 试 验	石 蕊 牛 乳		
				斜 面	底 层	葡 萄 糖	乳 糖	麦 芽 糖	甘 蔗 糖	蔗 糖									
1	透 明	阴 性	无	红	黄	⑤ ¹	⑤ ¹	⑤ ¹	⑤ ¹	⑤ ¹	-	+ ³	-	-	-	-	酸		
2	半透明	“	微弱	“	不变	+ ³	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
3	透 明	“	无	“	黄	⑤ ²	⑤ ²	⑤ ²	⑤ ²	⑤ ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
4	“	“	“	“	不变	+ ³	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
5	透 明	“	“	“	“	+ ³	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
6	“	“	“	“	黄	+ ¹	+ ²	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ²	+ ³	-	-	-	-	“		
7	半透明	“	有	“	不变	+ ²	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
8	半透明	“	无	“	“	+ ³	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	“		
9	“	“	“	“	“	+ ⁴	- ²	- ²	- ²	- ²	-	+ ³	-	-	-	-	弱酸		
10	“	“	微弱	“	黄	⑤ ¹	⑤ ²	⑤ ²	⑤ ²	⑤ ²	-	+ ³	-	-	-	-	酸		
11	透 明	“	“	“	“	⑤ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	-	+ ³	-	-	-	-	“		
12	半透明	“	“	“	“	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	-	+ ³	-	-	-	-	“		
13	“	“	无	“	不变	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	+ ¹	-	+ ³	-	-	-	-	“		

註: ⊕=产酸并产气, ⊖=产酸产少量气, ⊕, ⊕, ⊕, ⊕, ⊕=阳性量级, -=阴性, +*=呈阳性所需天数, -*=呈阴性的天数, 酸*=变酸并凝固

表 2 13 株變異性痢疾桿菌復原前的抗原性狀

次 序 号	刺 莖 多 价	沙 門 氏 多 价	复原前的凝集价	复 原 后 的 凝 集 价																
				价																
				1代	2代	3代	4代	5代	6代	7代	8代	9代	10代	11代	12代	13代	14代	15代	16代	17代
1	+	+	160×	—	160	320	320	1280	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
2	+	—	320×	—	320	320	320	1280	1280	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	
3	+	+	160×	—	160	320	320	1280	1280	2560	2560	2560	5120	—	—	—	—	—	—	
4	++	—	320×	—	320	640	640	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
5	+	—	80×	—	80	80	320	320	320	640	640	1280	1280	2560	2560	2560	5120	—	—	
6	+	+	80×	—	160	160	320	1280	1280	2560	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	
7	++	—	640×	—	1280	1280	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
8	++	—	640×	—	640	1280	1280	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
9	++	—	80×	—	160	160	160	640	640	1280	1280	1280	2560	2560	5120	—	—	—	—	
10	±	+	40×	—	40	40	40	320	320	640	640	640	1280	1280	1280	1280	1280	5120	—	
11	+	+	160×	—	160	320	320	640	640	1280	2560	5120	—	—	—	—	—	—	—	
12	+	+	80×	—	160	160	320	640	640	1280	5120	—	—	—	—	—	—	—	—	
13	+	+	80×	—	160	160	320	640	640	1280	1280	2560	5120	—	—	—	—	—	—	

註: 抗血清凝價為 1:6400 — = 未做

血清的頻度逐漸下降者,則淘汰弃之;相反的,如果滴度增至 5120 倍(血清效价 6400)亦发生凝集时,即确定为变异菌株被复原。与此同时,再作一次生化反应,以資最后确定。

抗磺胺藥物試驗:培养基的制法^[2],如 Мороз 氏法。

临床材料概要

本报告中的全部变异菌株,除 1 株的材料丢失外,其他 12 株得自慢性痢疾患者。其中 6 例曾分离出典型福氏痢疾菌,1 例分离出宋内氏痢疾菌,1 例分离出斯密氏痢疾菌,4 例多次培养,未見痢疾桿菌生长。12 例中 9 例有合併阿米巴原虫感染,1 例并有腸道滴虫。上述患者均經用爱米丁、药特灵、卡巴肿、阿的平、磺胺,部分病例亦用黄连、白头翁、合霉素、生霉素或大蒜汁灌腸治疗。所有病例虽經数种藥物多次治疗,但大便仍每日 3—4 次或更多次,便中多含粘液,但至后阶段,粪便及腸拭子虽次多培养,但未見典型之痢疾桿菌发现。

原始菌株的一般性狀描述

菌落 在中国兰或伊红美兰琼脂平板上,37℃ 24 小时后,为无色圓形,边緣整齐,光滑稍凸出,略小的透明或半透明的集落,以白金綫勾之,无粘性感觉。

运动 无运动,微弱运动,或运动活泼的不同。

染色 革兰氏染色,呈阴性中等大小,不弯曲两端較圓的桿菌,因限于人力,未作鞭毛染色检查。

生化学性狀 詳細結果見表 1。对各种糖类有不分解,分解不产气或产气等不同結果。

在普通肉湯中,37℃ 24 小时,除 1 例形成薄膜和发生少量沉淀外,其余皆呈均匀生长。

从生化学情况来看,13 株变异菌株可分为 7 个不同类型。

血清性狀 13 株对痢疾多价血清均呈不同程度的凝集,其凝集价自 1:40 到 1:640 不等。对各型单价血清,只在福氏多价抗血清中呈微弱凝集現象(以上血清均系上海生物制品研究所出品)。

对沙門氏多价(A—E 羣)抗血清(大連生物制品研究所出品),7 株凝集,6 株不凝集,因人力物力所限,7 株沙門氏多价血清凝集者,未做单价抗血清及因子血清的詳細鑑定。

抗磺胺藥物試驗 13 株变异痢疾桿菌,对磺胺胍、磺胺噻唑、磺胺嘧啶,均具抗药性,除二例外,对氯霉素均敏感。传代以后的生化反应及凝集結果,分別列于表 1 及表 2。

討 論

細菌变异的事实,在巴斯德时代就已被确定,但对这些事实的認識上,由于受魏斯曼、莫尔根种的恆定的不变唯心学說的統治,細菌变异的本质未能得到正确的揭发。只有在十月社会主义革命以后,在以米丘林生物学得到重視和不断发展的前提下,苏联学者提供了許多关于細菌变异新的研究成果,从而丰富了微生物学,并革新了微生物变异的理論。并为利用和認識改变了的微生物,奠定了良好的基础。

痢疾桿菌的變異原因，可能是由於腸道內正常菌叢與致病性菌株相互作用形成的。有些學者認為是由於痢疾桿菌或其代謝產物，作用於大腸或副大腸桿菌，使其獲得或部分獲得痢疾桿菌的性狀。相反的有些學者則認為是大腸或副大腸桿菌或其代謝產物，作用於痢疾桿菌，而使痢疾桿菌喪失了部分性狀^[3]，部分的獲得了大腸或副大腸桿菌的性狀。我們的結果似乎附合於後者。關於上述兩種變異原因的不同認識，我們認為並不矛盾，這要看共生的同時，占優勢者為哪一方。在急性患者中機體內，可能痢疾桿菌占主要地位，而慢性患者則以大腸—副大腸桿菌占優勢，因此相互作用的关系，可能是各不相同的。這不僅在我們的實驗中可以看出，B. M. Месняева^[3] 氏亦證明過，自慢性或恢復期痢疾病人分離得到的，能被特異的痢疾抗血清所凝集，但生化反應表現不典型的菌株；將其通過 бакто—Ж 培養基後，部分的細菌恢復了典型的弗氏痢疾桿菌。我們材料中的 12 株得自慢性或久治不愈的患者，根據此點可以設想，這種長期棲生在腸道內的痢疾桿菌，是完全可能被腸道內正常菌叢所作用，而逐漸形成新的性狀。

結 語

1. 從 12 例有慢性痢疾症狀患者（另外一例材料丟失）的糞便中，我們曾分離到 13 株痢疾桿菌的變種，按其生化性質，很容易和大腸—副大腸桿菌或碱糞桿菌混淆。

2. 在這 13 株痢疾桿菌的變種中，尚保存不同程度的抗原性，與痢疾多價抗血清發生凝集（40……640×）。

3. 13 株痢疾桿菌的變種中，經過 5—17 代的短期代後，均恢復了其生化特性，並能在很高稀釋度的特異抗血清中發生凝集，結果 12 株還原為福氏痢疾桿菌，1 株為宋內氏痢疾桿菌。

4. 13 株痢疾桿菌的變種，不論在復原前或復原後，對磺胺胍、磺胺噻唑、磺胺嘧啶均具有抗藥性，對氯霉素 2 例抗藥，還原後的菌株抗藥性仍沒有大改變。

參 考 文 獻

- [1] 中南軍區衛生研究所：培養基，1954。
- [2] Мороз, А. Ф.: Ж. М. Э. И., 1956, (3) 84.
- [3] Месняева, В. М.: Ж. М. Э. И., 1956, (3) 24.

* 本文承醫院首長多方鼓勵和孫衛醫師大力協作方得完成，故此致謝意。

OBSERVATION ON THE REVERSION TO TYPICAL FORM BY ATYPICAL DYSENTERY BACILLI

KUNG T. E.

From the fecal specimens of chronic dysentery cases, 13 strains of Gram negative bacilli giving atypical biochemical reactions but agglutinated by polyvalent dysentery serum in significant titre were studied for their reversion to typical form. They either showed lactose fermentation, or formation of gas, and still others showed failure to produce acid in mannite or maltose or in either. They were all agglutinated to a low titre by the polyvalent Flexner antiserum. After various number of passages on starch meat infusion medium, some colonies which were then agglutinated by the polyvalent dysentery serum to a higher titre were examined for their biochemical properties. These were found to have reverted to forms biochemically typical of Flexner group of organisms after 5--17 passages. However, they still remained resistant to the sulfa drugs, while two strains remained resistant to chloramphenicol. The significance of this finding was briefly discussed.