

豚鼠痢疾菌性角膜结膜炎的初步探讨^{* **}

潘 紹 武

(第七军医大学微生物教研室)

为了进一步探讨有关细菌性痢疾的一些悬而未决的问题,近几十年来,已有很多学者从事痢疾的动物实验模型的研究。一般使用的动物模型如猴、猫、小白鼠等,或由于尚存在着一定的缺陷,或因为动物来源不易,均不够理想。1955年匈牙利学者 Sereny 氏^[1,3]以豚鼠眼睛重复 Zoeller 和 Manoussakis 二氏^[2]的痢疾菌感染试验获得成功,苏联学者^[4-10]以及我国学者^[11,12]都相继以豚鼠的角膜结膜炎作为动物试验模型,进行了痢疾菌的传染、免疫以及实验性治疗等方面的研究。多数学者认为,豚鼠在细菌性痢疾的研究中,可能是较好的一种实验动物。我们也做了一些研究,现报告所得结果。

一、实验材料和感染方法

(一) 实验材料

1. 豚鼠: 选用白色眼睑、角-结膜均健全、正常的豚鼠。
2. 感染菌的准备: 事先将感染用的菌株进行生物化学和血清学的鉴定。在普通琼脂培养基上, 37℃ 培养 20—24 小时, 以无菌生理盐水洗下, 经灭菌纱布过滤, 制成均匀悬液。用标准硫酸铜比浊管测定并调整感染所需的细菌浓度, 立即应用或保存于冰箱(4℃), 临用前调配所需浓度。
3. 感染用具: 用无菌的 1 或 2 毫升的注射器, 伴以小号针头——每滴相当于 1/70 毫升。

(二) 感染方法

将准备好的菌液, 调整为 280 亿菌/毫升或 140 亿菌/毫升的浓度, 以感染用具吸取并向豚鼠角膜滴入 1 滴(约为 4 亿或 2 亿菌量)。在滴入之前, 母指和食指应将感染侧的上下眼睑固定, 以免由于滴入的刺激产生角膜反射, 而致菌液溢出。在滴入之后, 二指应将眼睑稍加轻微揉动, 以使菌液均匀分布。

二、实验结果

实验 1 豚鼠痢疾菌性角膜结膜炎基本过程的观察

以新近由病人粪便中分离出的 3 株痢疾杆菌及实验室中保存期尚不满 3 个月的 1 株舒米茨氏痢疾菌, 给 15 只豚鼠进行单侧眼睛的感染实验: 豚鼠 8 只感染福氏 2 型痢疾杆菌, 2 只感染福氏 3 型痢疾菌, 3 只感染舒米茨氏痢疾菌, 2 只感染宋内氏痢疾菌, 另 1 只豚鼠滴 1 滴无菌生理盐水以作对照。然后定期进行各种观察。

* 本文 1960 年 1 月 25 日收到。

** 在实验过程中曾蒙我校病理教研室及摄影室同志多次协助, 谨此志谢。

实验結果:对照者眼睛正常,而感染者均先后发病。除宋內氏痢疾菌外,其他各株由痢疾菌所致的角膜結膜炎情况,是接近一致的。其基本症状和經過如下:初次接种痢疾菌之后,通常經過 24 小时左右(有短至 18 小时者,有长至 36—48 小时者)的潛伏期,即出現症状。初起为泪水分泌旺盛,充盈眼眶,結膜稍現紅色,輕度发炎現象。于发病的第二天,乃发展为明显的急性結膜炎,眼瞼水肿,結膜充血,泪水增多,且有浆液性或脓性分泌物向眼边堆积。第五天,結膜极度充血,并有血管丛生;动物有畏光表現,眼裂縫窄小,脓性分泌物布滿眼眶,有时致使眼裂封閉;此刻角膜已开始发炎而变灰色,角—結膜的界綫混淆不清。第十天,結膜炎已趋消退,而角膜炎加剧,角膜表面凸凹不平,潰瘍弥烂,有少許脓性分泌物堆积,角膜边缘形成紅色血管网环,并逐漸向中心伸展,可将瞳孔遮盖。第十五天,結膜已无炎症,角膜亦較光滑,呈灰褐色,但中心隆起,且为乳紅色,尚有个別黃白色脓点存留,角膜的边缘仍有少数血管分布,然角—結膜的界綫已現輪廓;眼眶中分泌物很少見到(显然角膜已开始进行恢复)。第二十天,角膜进一步地恢复,好轉,炎症已消,但呈混浊状态,肉眼观察甚为平整,但組織切片检查,仍可能存有尚未完全修复的小潰瘍的凹陷。第二十五天,全部实验动物基本上已完全恢复正常,但角膜的透明度与正常者相比,則稍有差异。宋內氏痢疾菌感染的豚鼠,則与上述稍有不同,发病較迟(第三天方发病),但于第八天即达炎症頂点而开始恢复,至 15—16 天已基本恢复正常。

于各組豚鼠发病后的急性期,按日測量体温,未發現任何动物有发热現象;此外,我們亦未見豚鼠有腸道机能紊乱的症状。

病理組織学检查:于豚鼠发病过程中的不同日期,取动物的眼球进行病理組織学检查,并取正常豚鼠的眼球作对照,所得結果如下:发病的急性期,結膜充血,并有化脓病变,角膜組織亦現輕度水肿,并有中性白血球浸潤。繼而炎症进一步恶化,角膜明显增厚,并有上皮細胞坏死脫落現象。此外,組織亦現疏松,且可見及大量的炎症細胞浸潤;至发病的第十日前后,則角膜发炎現象达至頂峯,上皮細胞繼續坏死脫落,形成多数小潰瘍,除急性炎症細胞浸潤外,尚有毛細血管向內生长。此后,結膜炎迅速消失,角膜亦开始修复,呈現纖維組織增多和少数淋巴球、中性白血球的浸潤現象,毛血管虽有減少但仍有分布;由此繼續好轉,第 20—25 天即恢复正常(但角膜組織中仍可有极少数淋巴球和嗜酸性白血球存在)。[以上各期豚鼠角—結膜病理組織学的变化概况參見图 1; 2a、2b; 3a、3b; 4]。

表 1 痢疾菌分离的結果:“(+)”检出痢疾菌,“(—)”未检出)

組別(感染菌株)	动物号	感染发病后各时期痢疾菌检查結果(天)							
		48 小时	5	10	17	20	25	32	39
甲組(福氏 2 型痢疾菌)*	①	+	+	+	+	—	+	—	—
	②	+	+	+	+	+	—	—	—
乙組(福氏 3 型痢疾菌)	①	+	+	+	—	+	—	—	—
	②	+	+	+	—	—	—	—	—
丙組(舒米茨氏痢疾菌)	①	+	+	+	+	+	+	+	—
	②	+	+	+	—	—	—	—	—
丁組(宋內氏痢疾菌)	①	+	+	+	—	—	—	—	—
	②	+	+	+	—	—	—	—	—

* 另 7 只豚鼠因分期挖去眼球作組織切片,故不計在內。

細菌学检查：我們曾于豚鼠发病和恢复各期，以伊紅美藍琼脂培养基或伴以 S. S. 琼脂培养基平板，由患側結膜囊进行痢疾菌的分离，并进行生物化学和血清学的鉴定，以証实系原始接种的細菌，其結果見表 1。

在此检查中，我們发现分离培养时，痢疾菌数的多少和純度，似同豚鼠角膜炎的发展情况有密切的关系。角膜炎愈严重，則分离培养出的痢疾菌愈多，并几乎为純种。但随着角膜炎的減退和恢复，而分得的痢疾菌数則明显地減少或分离不出，然杂菌却相反增加。

血清学检查(凝集素的滴定)：在豚鼠被感染痢疾菌之前 24 小时和感染后各期，由其心脏采血 1—2 毫升，分析血清，进行凝集素效价的測定，結果大部分豚鼠于感染之后，均有凝集素产生，并逐漸增高，且証明为特异性抗体；但亦有少数动物自始至終其血清凝集素的检查均为阴性(見表 2)。

表 2 感染前后豚鼠血中凝集素的变动情况

組別(感染菌株)	动物号	感染前后凝集素的效价				
		前 1 天	后 10 天	后 20 天	后 25 天	后 40 天
甲組(福氏 2 型痢疾菌)	①	—	1/20	1/20	1/40	1/80
	①	—	1/160	1/320	1/80	—
乙組(福氏 3 型痢疾菌)	②	—	1/40	1/160	1/640	1/160
	①	—	1/40	1/160	1/80	1/40
丙組(舒米茨氏痢疾菌)	②	—	1/20	1/40	1/80	1/80
	③	—	—	—	—	—
丁組(宋內氏痢疾菌)	①	—	—	—	—	—
	②	—	1/80	1/80	1/40	1/20

实验 2 以带菌者体存的痢疾菌感染豚鼠的結果

将新近由带菌者分离出的舒米茨氏、福氏(生化性質不典型、凝集性亦不强)、新城型、鮑氏、宋內氏痢疾菌各 1 株，按前法制成菌悬液，給 14 只豚鼠进行双侧眼睛的感染試驗。結果宋內氏痢疾菌于首次感染后未見发病，2 日后，用 1 滴 8 亿浓度的菌液进行二次感染，观察 2 日仍未成功。又以 1 滴 12 亿浓度的菌液再次进行感染，方致发病。其他四株痢疾杆菌均一次感染成功。

各豚鼠所发生的角—結膜炎的基本过程与实验 1 所述大致相同，唯炎症恢复較快，一般于发病后 16—20 天即完全恢复。而宋內氏痢疾菌所致的炎症亦同实验 1 所述。

实验 3 感染菌的剂量和豚鼠的大、小在角膜結膜炎感染試驗中之意义的观察

以福氏 2 型痢疾杆菌(即实验 1 所用菌株)制成 6 种不同浓度的菌液(即每滴菌液含菌数为 2 亿、5,000 万、1,000 万、100 万、10 万、1 万)，分別給大(600 克左右)小(250—300 克)两类豚鼠进行接种，并分別飼养，观察发病率的情况；其結果如表 3。

免疫性的观察

在上述各实验的基础上，我們又进行了一系列的免疫性方面的实验观察，实验結果証明，豚鼠血中特异性凝集素的存在与豚鼠眼球对痢疾菌不感受性的免疫并无密切关系，无凝集素的豚鼠其眼球可为免疫状态，相反地血中有凝集素的豚鼠也可能再获传染。与 Геккер、Белая 氏^[6]等所报导的“局部性免疫”无异。此外，Манолов 氏^[8]等所提出的“传染后免疫”以及 Геккер 氏^[5]、馮氏^[12]等关于“豚鼠經感染后所获得的免疫沒有明显的

表3 感染菌量和豚鼠的大小对發病率的影响

組 別	感 染 菌 量	豚鼠大小	豚鼠头数	眼 数	感 染 結 果	
					豚 鼠 数	眼 数
一 組	2 亿	大小	4	8	4/4	8/8
		大小	—	—	—	—
二 組	5,000 万	大小	3	6	3/3	6/6
		大小	3	6	3/3	6/6
三 組	1,000 万	大小	3	6	3/3	5/6
		大小	3	6	3/3	5/6
四 組	100 万	大小	3	6	2/3	3/6
		大小	3	6	3/3	6/6
五 組	10 万	大小	3	6	1/3	1/6
		大小	3	6	3/3	3/6
六 組	1 万	大小	2	4	0/2	0/4
		大小	—	—	—	—

附注 1. 分母——感染数,
分子——发病数。

2. 感染菌量在 1,000 万以下者, 潜伏期較长(部分豚鼠达 5—7 天)。

3. 小豚鼠发病后, 恢复稍快。

种和型的特异性”等报导, 在我們的实验中也获得了証实。

三、討 論 与 总 結

1. 用新分离的(或实验室保存时间不久的)痢疾杆菌的浓菌液小滴直接滴入豚鼠眼結膜囊, 可以規律地引起角膜結膜炎。但宋內氏痢疾菌所需感染菌量要大, 感染后潜伏期較长, 发病后恢复也較快。

此外, 我們也曾証实, 以实验室保存 6—12 个月以上的痢疾菌株进行感染, 无论何型, 均不易成功。

2. 实验証明从带菌者分离的痢疾杆菌, 具有較明显的致病力。

3. 豚鼠发病后各个时期, 痢疾菌的检出率及其純度, 同豚鼠角膜炎的发展情况有密切关系, 角膜炎愈严重, 則痢疾菌的检出率愈高, 菌落愈純。反之則否。

4. 豚鼠的大小不同, 其所需的感染菌量亦有明显差异。在系統研究工作中必須重視这些基本影响因素。

5. 在豚鼠免疫性方面我們所进行的一些实验观察, 結果与国内外学者的报导基本一致。

参 考 文 献

- [1] Sereny, B., *Acta Microbiol. Hung.*, **3**: 293—296, 1955.
[2] Zoeller, C. and Manousakis, C. *R. Soc. Biol.*, **91**: 257, 1924.
[3] Sereny, B., *Acta Microbiol. Hung.*, **4**: 367—376, 1957.
[4] Геккер, В. Д., *Тезисы доклад. М.*, 344—345, 1956.
[5] Геккер, В. Д., Белая, Ю. А., *Ж. М. Э. И.*, **7**: 110—114, 1957.
[6] Геккер, В. Д., Белая, Ю. А., *Ж. М. Э. И.*, **3**: 18—23, 1958.
[7] Сироко, И. А., *Ж. М. Э. И.*, **4**: 71—77, 1958.
[8] Маволов, Д. Г., *Ж. М. Э. И.*, **10**: 94—98, 1957.
[9] Яхнина, Н. А., Кузнецова, Н. С., *Ж. М. Э. И.*, **2**: 98—102, 1959.
[10] Носков, Ф. С., *Ж. М. Э. И.*, **7**: 124—125, 1959.
[11] 馮振南、方 綱、謝少文: 中华医学杂志, **4**: 329—337, 1958.
[12] 馮振南: 人民保健, **7**: 605—608, 1959.

EXPERIMENTAL KERATO-CONJUNCTIVITIS IN THE GUINEA PIG PRODUCED BY DYSENTERY BACILLI

PAN SHAO-WU

1. Kerato-conjunctivitis could regularly be produced in the guinea pig by dropping directly into the conjunctival sac thick suspensions of various *Shigella* freshly isolated from clinical cases. In the case of *Shigella sonnei*, a heavier inoculum was required, the incubation period was longer, and the conjunctivitis was shorter in duration.

Dysentery bacilli which had been cultivated artificially for 6—12 months failed to infect.

2. It was shown that dysentery bacilli freshly isolated from human carriers were also capable of infecting the conjunctiva of the guinea pig.

3. The rate of successful culture of dysentery bacilli from the conjunctival union and the purity of the culture were closely parallel to the intensity of the infection process.

4. Younger guinea pigs seemed to be more susceptible to conjunctival infection with dysentery bacilli than the guinea pigs of older age.