

自猩紅热病例分离的 925 株溶血性鏈球菌血清学分类及其毒素性质的研究

刘雋湘 何 亨 孙文憲 陈維玲

(卫生部生物制品研究所, 北京)

在北京的一个猩紅热流行的季节里, 从猩紅热病例分离到溶血性鏈球菌 925 株, 96.8% 属于 A 羣, 其中 666 株作出了型的鉴定: 最多是 6 型, 占 15.6%, 其次是 5 型 8.15%, 24 型 6.6%, 27 型 5.36%, 4 型 4.8%; 其他型均少见; 一般认为可能与急性肾炎有关的 12 型有 18 株, 占 2.01%。

产毒試驗結果: 925 株中产毒的有 865 株, 占 93.5%; 用这 865 株产生的猩紅热毒素 (以下简称毒素) 与 Dochez NY5 抗毒素^[1,2] 作中和試驗, 81.9% 完全中和, 4.7% 部分中和, 13.4% 完全不中和, 选产毒高的 8 株制备毒素及抗毒素, 与 NY5 毒素及抗毒素一起进行定量的交叉中和試驗, 发现不与 NY5 抗毒素中和的几个毒素之間彼此也不中和或不完全中和。

进一步观察表明, 这些菌株 (包括 NY5) 至少产生两种毒素, 在不同条件下其相对的及绝对含量可能不同。这种现象与有些作者的报告一致^[3-7], 乃是一个值得注意的问题, 在狄克氏毒素或猩紅热抗毒素的制备与应用中都应予以考虑。

兹将試驗方法与結果报告于后。

一、菌种采集

菌种采自北京第一传染病院猩紅热病例的咽拭子培养。选取 β 溶血菌落, 涂布 10% 羊血琼脂平皿, 分离丛集形 (matt) 单集落, 如无从集形则选光滑形 (glossy), 接种血琼脂斜面, 37°C 培养 18—24 小时, 然后移种于血斜面 1 支、0.2% 葡萄糖肉水 2 支及 Todd-Hewitt^[8] 牛肉水 1 支。血斜面培养 18—24 小时, 移种于脱纤兔血中, 腊封保存以备复查; 牛肉水培养 18 小时, 作型鉴定的凝集抗原; 葡萄糖肉水 1 支培养 18—24 小时, 提取羣鉴定的沉淀抗原, 另 1 支培养 24—48 小时, 加热 60°C 30 分钟, 作毒素测定及中和試驗。

共采集菌种 947 株, 分得 β 溶血的 925 株, 其余 22 株中 15 株不溶血, 7 株 α 溶血, 未作进一步研究。

二、血清学分类*

分离菌的鉴定程序: β 溶血的菌株先用在人类呼吸道感染中比较常见的几个羣 (A、C、F 及 G) 的血清作沉淀反应, 属于 A 羣者进一步作型鉴定; 型鉴定先作凝集反应, 凝集反应不能明确鉴别者再作沉淀反应。

本文 1962 年 11 月 15 日收到。

* 关于分羣分型血清及抗原的制备和分羣分型方法另文报告^[9], 本文仅述要点。

(一) 羣鉴定

分羣血清为本試驗室自制。羣抗原提取用 Fuller 氏^[10] 甲酰胺法。曾比較了 Lancefield^[11] 盐酸法,发现交叉較多,結果不如 Fuller 法明确可靠。

沉淀反应用內径 0.3—0.5 厘米的小管,用毛細管将血清 0.1 毫升加于管底,注意勿接触管壁,然后沿管壁緩緩加入等量的抗原,避免冲击血清液面或产生气泡。一般用不稀释的血清及抗原,若結果可疑則視情况将血清或抗原作适当稀释重复試驗。根据我們的經驗^[9,12],用 1% 明胶做稀释液,环状反应最为明显,試驗的分辨力較好。反应大多在数分鐘內出現,15 分及 30 分再各观察 1 次,判定結果;阴性反应放置冰箱过夜再观察 1 次。

分羣結果如表 1。

表 1 925 株溶血性鏈球菌分羣結果

羣 別	A	C	F	G	其 他*	共 計
株 数	895	3	2	8	17	925
百分数(%)	96.8	0.3	0.2	0.9	1.8	100

* 与 A,C,F,G 羣血清反应阴性者。

(二) 型鉴定

分型血清为本試驗室自制。凝集反应血清是用来自苏联的一套 1—30 型“Griffith”菌种¹⁾制备。原菌种缺 20 及 21 型,但因非 A 羣故可略去^[13]。血清未經吸收处理,但按苏联生物制品法規^[14]的方法稀释至“实用单位”,大多数血清可以直接使用。7 型血清交叉高,不能用,但因非 A 羣故舍去。3、4、5、6 及 30 型血型交叉也高且不能用稀释法除去,故用异型菌或其甲酰胺抗原吸收处理,結果制得 4 个单型血清(3、4、5、6 型),唯 30 型未制备成功。上述几个血清在沉淀反应中无交叉,但凝集反应仍有交叉,故仅用了沉淀反应。

凝集反应抗原:18 小时牛心肉水培养,在无盐肉水中传 2—3 代,菌体用 0.2% NaCl 液洗 2—3 次,然后悬于 0.2% NaCl 液中,用前振荡 3—5 分钟,靜置数分鐘,如不自凝即可使用,如有自凝,則用以下几种方法試行处理:(1)0.2% 盐水反复洗数次;(2)用 0.001N NaCl 液稀释;(3)0.5 毫升菌液加 Cole-Onslow 5% 胰浸液 1 滴,用 1/5N NaOH 矫正 pH 至 8.0—8.2,37℃ 作用 2 小时,如仍自凝可提高作用温度或延长作用時間;(4)菌种移种于三角瓶肉水中振荡培养不超过 4 小时收集菌种^[9]。用以上方法能解决一部分、但不能解决全部自凝問題。

玻片凝集反应:血清稀释至“实用单位”,用毛細管滴于玻片上,加等量菌液,搖匀,在室温观察反应。一般阳性反应在 5 分鐘內出現,观察 15—20 分鐘判定結果可以肯定有无交叉反应。另以 0.2% 盐水菌悬液不加血清作对照,观察有无自凝。在观察过程中須尽量避免蒸发。

沉淀反应抗原,用 Lancefield^[11] 盐酸法提取:牛心肉水 18 小时培养,离心收集菌体,生理盐水洗 1 次,悬于 1N/10 盐酸中在水浴中煮沸 15 分钟,冷后离心,上清用 1N NaOH 中

1) 承中国协和医院张学德大夫贈給。

和,再离心澄清即得。

沉淀反应试验方法与羣鉴定相同(見上文)。

为了节省材料,将凝集血清按其交叉反应分组配成 5 个多价血清。分离菌均先经多价血清作初步试验,知其属于某组后再用相应的几个单价血清作最后鉴定。因自凝或交叉反应不能明确分型的菌株重新制备抗原,反复鉴定 2—3 次,估计可能属于 3、4、5 或 6 型,而用凝集反应不能鉴别者,用单价沉淀反应血清作沉淀反应,如有交叉(即两个血清对该菌的滴度相差不到 1 倍者,先试按交叉模式(pattern)分类,仍不能分类者作为不能分型论。

分型结果见表 2。

表 2 A 羣菌 895 株分型结果

型 别	株 数	占可分型 菌株的%	占全部 菌株的%	型 别	株 数	占可分型 菌株的%	占全部 菌株的%
1	6	0.90	0.67	22	17	2.55	1.9
2	12	1.80	1.34	23	25	3.75	2.79
3	14	2.10	1.56	24	59	8.85	6.6
4	43	6.45	4.8	25	6	0.90	0.67
5	73	10.95	8.15	26	31	4.65	3.47
6	139	20.80	15.6	27	48	7.20	5.36
8	11	1.65	1.22	28	6	0.90	0.67
9	7	1.05	0.78	29	16	2.40	1.78
10	18	2.70	2.01	30	16	2.40	1.78
11	5	0.75	0.56	4/5/6	9	1.35	1
12	18	2.70	2.01	9/13/17/19/23	12	1.80	1.34
13	19	2.85	2.12	24/26	8	1.20	0.89
14	5	0.75	0.56	可分型菌株	666	100.00	74.4
15	5	0.75	0.56	1—30 型以外	26		2.9
17	2	0.30	0.22	不能分型菌株	203		22.7
18	16	2.40	1.78	总 计	895		100.00
19	20	3.00	2.23				

895 株 A 羣菌有 637 株作出型鉴定,占 71.2%,可按“模式”分类的有 29 株,占 3.2%,以上两次共 666 株,占 74.4%;26 株反应阴性,可能是 30 以外的型,占 2.9%;未能定型的 203 株(占 22.7%),绝大部分是由于自凝,小部分由于有不规则的交叉反应。

三、产毒试验及毒素的性质

(一) 产毒试验:葡萄糖肉水 24 小时培养,60℃ 加热 30 分钟灭菌后过滤,用生理盐水稀释 10 倍,注射 0.1 毫升于感受性适度的家兔皮内,6 及 24 小时各观察 1 次,以 24 小时为准,出现发红反应直径在 5—10 毫米以上者为阳性。

试验结果:925 株中产毒者 865 株,占 93.5%,139 株 6 型菌作了毒素滴定:将菌移种于葡萄糖磷酸盐缓冲肉水^[15],培养 48 小时收获。毒素作连续稀释,各注 0.1 毫升于家兔皮内,24 小时观察结果,注射 0.1 毫升引起直径 10 毫米发红反应为 1 个皮肤反应量(STD),乘以稀释倍数即为该毒素每毫升所含 STD。

滴定結果: 产毒 < 100 STD /毫升者 13 株, 占 9.3%, 100—500 STD/毫升者 19 株, 占 13.7%, 6,000 STD/毫升者 17 株, 占 12.2%, 10,000 STD/毫升者 74 株, 占 53.3%, 20,000 STD/毫升者 13 株, 9.3%, 30,000 STD/毫升者 3 株, 2.2%。可見大部分菌株产毒相当高。

(二) 中和試驗: 865 株产毒的菌株与 NY5 抗毒素作中和試驗, 方法如下:

NY5 抗毒素即本試驗室制造的猩紅热抗毒素^[2]。将各菌株所产毒素与 NY5 抗毒素按效价稀释, 使混合后每 0.1 毫升含毒素約 10 STD 及抗毒素 U, 注射家兔皮內, 24 小时观察結果。反应阳性者判为“中和”, 反应 < 0.5 厘米为“部分中和”, 反应 0.5—1.0 厘米者为“不中和”。因事先未对每个菌株的毒素作詳細的滴定, 效价只能估計。但曾經初步試驗証明, 毒素与抗毒素按上述比例混合进行試驗可以減少重試机会, 因为毒素的滴度即使估計不准, 相差上下 5—10 倍仍可得到初步結果。每一家兔上均包括以下对照: 标准狄克氏毒素 1 STD, 100℃ 2 小时加热的标准毒素, 分离菌的毒素各 1 STD, 标准抗毒素 1U 加标准毒素 50 STD, 标准抗毒素 1U, 以上均含于 0.1 毫升中。

中和試驗結果: 865 株中与 NY5 抗毒素中和者 708 株, 占 81.9%; 部分中和者 41 株, 占 4.7%; 不中和者 116 株, 13.4%。

从上述 116 株中选产毒素 > 20,000 STD/毫升的 8 株制备毒素及抗毒素, 与 NY5 毒素及抗毒素一起进行交叉中和試驗, 方法如下:

各个菌株的抗毒素均用其相应的毒素检定, 均以中和 50 个 STD 的量为 1 个抗毒素单位(U)^[2,10]。将各菌株的毒素及抗毒素按效价稀释, 使混合后每 0.1 毫升含 12.5 STD 毒素及 0.5 或 0.25U 抗毒素, 或使每 0.1 毫升含 5 STD 毒素及 0.2 或 0.1U 抗毒素。注射家兔皮內, 24 小时观察反应判定結果。毒素被当量的抗毒素中和者(0.1U + 5 STD 或 0.25U + 12.5 STD) 判为“中和”; 不被当量但被超量的抗毒素中和者(0.2U + 5 STD 或 0.5U + 12.5 STD)判为“部分中和”; 不被超量抗毒素中和者判为“不中和”。

NY5 与 5 个分离菌的交叉中和試驗結果如表 3。

表 3 5 株分离菌及 NY5 毒素交叉中和試驗結果(5STD 毒素 + 0.2 或 0.1U 抗毒素)

毒素 \ 抗毒素	1006	1095	1104	1288	15501	NY5
1006	+	-	-	±	±	-
1095	-	+	±	±	±	-
1104	-	+	+	±	±	-
1288	-	±	-	+	-	-
15501	-	±	±	+	+	-
NY5	-	±	±	±	-	+

“+”中和, “±”部分中和, “-”不中和。

由表 3 可見菌株 1006 及 15501 对 NY5 沒有交叉, 其他株均有不同幅度的交叉。用 NY5 抗毒素与 7 株分离菌的毒素作中和試驗, 結果見表 4。

由表 3 及表 4 可見, 各次試驗中均出現“中和”, “部分中和”及“不中和”3 种反应, 而几次結果不完全一致。这种現象說明, 这些菌株 (包括 NY5) 可能产生两种以上的毒素, 在不同条件下其相对及絕對含量不同。

表 4 7 株分离菌毒素与 NY5 抗毒素中和試驗結果

菌 号	1006	1095	1104	1288	7798	8170	27971	NY5
第 1 次試驗	+	+	±	○	±	-	○	+
第 2 次試驗	+	○	±	+	+	-	+	+

“+” 中和, “±” 部分中和, “-” 不中和, “○” 未試。

四、討論与結論

(1) 使用与人类呼吸道感染关系最大的 A、C、F 及 G 羣血清, 可以鉴定分离自猩紅热的 925 株鏈球菌的 98% 以上, 足以解决临床及流行病学观察的一般問題。分羣血清不难制备, 用甲酰胺抗原作沉淀反应可以得到明确可靠的結果, 适用于常规化驗。

(2) 分型試驗比較复杂, 血清較难制备, 試驗方法也还須探討。凝集反应操作简单, 材料节省, 但主要困难是菌的自凝, 用現有方法不能完全解决。沉淀反应可以避免自凝, 但操作較繁, 尤其是盐酸提取的抗原中含有羣抗原, 除非使用經過吸收处理的单价“M”血清, 否則交叉反应很多。分型試驗方法很不統一。苏联是以凝集反应为主, 美国是以沉淀反应为主, 英国是凝集与沉淀反应并用; 根据英国鏈球菌中心試驗室的經驗^[17,18], 单用沉淀反应仅能鉴别出分离菌的 60.6%, 并用凝集反应即可鉴别 83%。

我們认为可以先用凝集反应分型, 不能得到結果的再用沉淀反应进一步鉴定, 可以得到滿意的結果。采取这种方法, 我們仅用了 26 个凝集反应血清和 4 个沉淀反应血清就达到了 74.4% 的鉴别率。

(3) 我們的試驗表明, 自猩紅热病例分离的鏈球菌可能产生两种以上的毒素, 在不同条件下其相对和绝对含量可能不同。

早在 1928 年 Hooker 及 Follensby^[3,19,20] 即曾提出“猩紅热鏈球菌”产生 A、B 两种毒素的論点。Wheeler^[21], Wadsworth 及 Coffey 等氏^[6,21-23] 也有同样的見解。但是, 这一問題似乎未引起足够的注意。有些試驗室制备狄克氏毒素或猩紅热抗毒素似乎沒有考虑到这一問題^[24]; 有的虽然考虑到这一問題并規定使用两个菌种^[25], 以包括 A 及 B 两种成分, 但对 A、B 各含多少并无具体要求, 而且也不分別測定。近来 Halbert 等氏^[26,27] 对 B 毒素作了比較仔細的研究, 最近 Stock 及 Lynn^[7] 已經分离出較純的 B 毒素并証明其性質与 A 毒素有所不同。至少有两种猩紅热毒素存在已經日益肯定。虽然在一般情况下 A 毒素是主要的, 抗 A 的抗毒素能中和 75—80% 以上菌株所产的毒素, 但其余的百分之十几到二十还是不应忽視的。

在临床方面, 对于猩紅热有不同毒素的問題, 似乎注意更少。在使用狄克氏毒素及猩紅热抗毒素进行診斷或治疗时也常有一些矛盾現象; 例如: 有的恢复期患者狄克氏反应阳性而血中却可測出抗体; 同一份恢复期血清有时在 1 个病人身上引起典型的轉白反应 (blanching), 而在另一个病人身上則不能引起这种反应; 在少数病人中抗毒素的疗效很差, 等等。这些現象有些可能与不同猩紅热毒素的存在有关。

参 考 文 献

- [1] Dochez, A. R. & Sherman, L.: *J. A. M. A.*, **82**:542, 1924.
- [2] 許健音等:生物制品通訊, **4**:56, 1959.
- [3] Hooker, S. B. & Fellensby, E. M.: *J. Immunol.*, **27**:177, 1934.
- [4] Trask, J. D. & Blake, F. G.: *J. A. M. A.*, **101**:753, 1933.
- [5] Fraser, F. H. & Plummer, H.: *Tr. Roy. Soc. Canad.*, Sect. V, **29**:63, 1935.
- [6] Coffey, J. M.: *J. Immunol.*, **35**:121, 1938.
- [7] Stock, A. H. & Lynn, R. J.: *Ibid.*, **86**:561, 1961.
- [8] Todd, E. W. & Hewitt, L. F.: *J. Path. Bact.*, **35**:973, 1932.
- [9] 孙文宪等:卫生部生物制品研究所集刊, 1962 年。
- [10] Fuller, A. T.: *Brit. J. exp. Path.*, **19**:130, 1938.
- [11] Lancefield, R. C.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **38**:473, 1938.
- [12] 戚迦陵:未发表。
- [13] Hare, R.: *J. Path. Bact.*, **41**:499, 1935.
- [14] 苏联生物制品法規汇编, 482 頁, 卫生部生物制品委员会出版, 1957 年。
- [15] 鍾昆等:生物制品通訊, **4**:52, 1959.
- [16] Veldee, M. V.: *Publ. Hlth. Rep.*, Wash., **47**:1043, 1932.
- [17] Williams, R. E. O. & Maxted, W. R.: *6th Int. Congr. Microbiol.*, Rome, **1**(2):46, 1953.
- [18] Williams, R. E. O.: *Bull. WHO.*, **19**:153, 1958.
- [19] Hooker, S. B. & Follensby, E. M.: *Am. J. Hyg.*, **29**:371, 1928.
- [20] Ditto: *J. Bact.*, **23**:85, 1932.
- [21] Wheeler, M. W.: *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, **27**:570, 1930.
- [22] Wadsworth, A. & Coffey, J. M.: *J. Immunol.*, **29**:505, 1935.
- [23] Wadsworth, A. B. & Kirkbirde, M. B.: *Am. J. Hyg.*, **29**:371, 1939.
- [24] 苏联生物制品法規汇编, p. 402, 404, 1957。
- [25] Wadsworth, A. B.: *Standard Methods, Division of Laboratories and Research*, N. Y. State Dept. Hlth, 3rd. Ed., Williams & Wilkins Co., Baltimore, 639, 668, 1947.
- [26] Halbert, S. P., Swick, L. & Sonn, C.: *J. exp. Med.*, **101**:557, 1955.
- [27] Halbert, S. P.: *Ibid.*, **108**:385, 1958.

STUDIES ON 925 STRAINS OF HEMOLYTIC STREPTOCOCCUS ISOLATED FROM SCARLET FEVER PATIENTS WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR ANTIGENIC PROPERTIES

LIU CHÜN-HSIANG, HE HEN, SUN WEN-HIAN AND CHEN WEI-LIN

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

925 strains of β -hemolytic streptococcus were isolated from scarlet fever patients at the First Isolation Hospital, Peking. 895 (96.8%) of the strains were identified as group A, 8 (0.9%) as group G, 3 (0.3%) as group C, and 2 (0.2%) as group F. The group A strains were typed according to Griffith's slide agglutination method and Fuller's precipitation method, using typing sera of Type 1—30 (but excluding Type 7, 16, 20 and 21, which do not belong to Lancefield group A). By means of these methods 666 (74.4%) of 895 strains were successfully typed. The order of frequency in occurrence was as follows: type 6 (15.6%), type 5 (8.15%), type 24 (6.6%), type 27 (5.36%), type 4 (4.8%), and all the other types are rarely met with.

Observations were made on the toxigenic properties of these strains. 865 (93.5%) of these strains were proved to be toxinogenic. When tested against NY 5 anti-serum, it was found that of the toxins produced by these strains, 81.9% were neutralized completely, 4.7% only partially, and 13.4% not neutralized at all. Marked antigenic differences were further revealed by cross neutralization tests between toxins not neutralizable with NY 5 antitoxin. Evidences obtained in the present study were in accordance with the multiple toxin hypothesis of Hooker and Follensby and agreed well with observations made by Coffey, Halbert, Stock and Lynn, and many others, that there exist more than one scarlatinal toxins. It was suggested that most of the toxigenic strains produce two (or more) toxins at the same time but the relative concentrations may vary in each individual cases.