

# 868份長沙市居民血清中布魯氏 菌凝集價的調查報告

易 有 年

(湖南醫學院細菌學科)

波狀熱為布魯氏桿菌在人體中所致的一種疾病，自1905年起，在我國各地曾有許多作者報告此類病例的發現<sup>[1]</sup>。如在重慶、福建、河南、上海、北京、東北、貴陽<sup>[2]</sup>、長沙<sup>[3]</sup>等地均曾發現有已證實的或可疑的病例。關於北京<sup>[4]</sup>、上海<sup>[5]</sup>、貴陽等地居民布魯氏桿菌凝集價的調查，也曾有人作過。1948年在長沙曾發現兩例小兒波狀熱，均經血液培養證明為米利他布魯氏桿菌 (*Br. melitensis*)，已由梁覺如教授等報告<sup>[3]</sup>。故此病在長沙的存在，已無疑問。為瞭解此病在長沙存在的情況，作者曾於1949—1950年作長沙居民布魯氏桿菌凝集價的調查。

本文內容包括布魯氏桿菌凝集反應的兩種方法，即試管法與玻片法，以及此二法測定布魯氏桿菌凝集反應的結果。

## 一. 材料與方法

(一) 菌種來源：用做抗原所用的菌種，為本科所保存的流產布魯氏桿菌 (*Br. abortus*) Bang 19 菌株乾燥菌種。於開啓後，培養於適宜的培養基上，證明其為光滑純種，然後接種於葡萄糖、乳糖、麥芽糖、甘露醇及蔗糖培養基中，經4日培養後，均有生長，但無發酵現象。接種於含硫堇 (Thionine 1:30,000) 之血瓊脂平皿上不能生長，接種於含 1:25,000 的鹼性複紅培養基 (血皿) 上，證明能夠生長，接種於含醋酸鉛培養基中，有硫化氫產生，最後用特殊免疫血清證明為布魯氏菌。

(二) 抗原製備及試驗方法：

1. 試管法：

(1) 抗原製備：將流產布魯氏桿菌接種於肝浸液瓊脂培養基 (pH 7.2—7.4) 上，置 37°C 溫箱中培育 72 小時後，以塗片及革蘭氏染色證明其為純種，然後以含 0.5% 石碳酸之生理鹽水將菌落輕輕洗下，若洗出之菌液中含有瓊脂小塊，則經數層無菌紗布過濾。置 60°C 水浴中加熱 1 小時以殺死細菌。調整菌液濃度至每毫升約含 1,000,000,000 個細菌。本實驗中菌數之計算係採用三種方法，然後取其平均值：即 (1) 以 McFarland 混濁比色管比較獲得之；(2) 以血片計菌法；(3) 直接數菌法。結果所用的菌液濃度約為每毫升中含 1,300,000,000 個細菌。將此已製備好的抗原液與已知的陽性血清 (由家兔中製備的免疫血清) 及陰性血清作試管凝集試驗，所得結果陽性及陰性反應分明，方供應用。

## (2) 試驗方法：

將欲試驗的血清以生理鹽水稀釋成 1:5、1:10、1:20、1:40、1:80 等不同稀釋度，各管中含血清量為 0.5 毫升，然後加入 0.5 毫升已製備好的抗原液，混合均勻，使血清最後稀釋度為 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160。此外並作一不加血清的抗原鹽水的對照管。將所有試管置於 37°C 溫箱內，於 48 及 72 小時後觀察結果，但僅以 72 小時所得之結果作為最後結果。

## 2. 玻片法：此法係自文獻上<sup>[6]</sup>參考得來，其方法如下：

### (1) 抗原製備：

取容量為 1,000 毫升的小口扁瓶 (Kolle flask)，內置肝浸液瓊脂 (pH 7.2—7.4)，作成平板狀。將布魯氏流產桿菌接種於此種培養基上，於 37°C 溫箱中培育 72 小時後，以塗片證明其為純種。每瓶為 25 毫升，含 12% 氯化鈉、20% 甘油及 0.5% 石碳酸的蒸餾水。將菌落洗下，如菌液中有瓊脂小塊存在時，則以數層無菌紗布過濾。然後於洗下之菌液中加入 1% 的結晶紫溶液及 1% 的煌綠 (Brilliant green) 溶液，使此二種染料的最後濃度為 1:25,000。將此菌液置 60°C 水浴中加熱 1 小時，然後以培養方法證明細菌已被殺死。以離心沉澱方法將菌液濃縮至其原體積的 20%，上清液仍須保留作稀釋抗原之用。

(2) 抗原滴定：取小試管 5 支，按下表加入抗原及上清液，作為 5 種不同的稀釋度：

試管號	1	2	3	4	5
濃菌液	1 毫升	1 毫升	1 毫升	1 毫升	1 毫升
上清液	0.1 毫升	0.2 毫升	0.3 毫升	0.4 毫升	0.5 毫升

將每一個稀釋度的抗原分別與不同稀釋度的已知陽性血清及陰性血清作玻片凝集反應（方法見下），能夠產生分明的陽性反應及陰性反應的抗原稀釋度，即為合宜的稀釋度。將所有濃菌液均按合宜稀釋度以所保留之上清液稀釋之，分裝成 20 毫升一瓶，置冰箱中保存。

(3) 所需儀器：在進行玻片試驗時，需要下列各種用具。

(i) 抗原滴管：盛抗原液瓶，需配有一定規格之滴管，此種滴管有一定的口徑，滴管尖端外口徑為 0.07 吋，內口徑為 0.06 吋（約相當於 15 號注射針頭），以此種滴管所滴出之液體，每一滴約等於 0.03 毫升。

(ii) 玻璃片：最好為有凹穴的玻璃片，一個玻璃片上具有 10—20 個凹穴。本實驗中，我們即用作克萊氏梅毒血清反應（Kline test）的多凹玻璃片。

(iii) 光源：可用一木箱或紙盒，內置較強的燈光，箱或盒的頂上開一洞，以置玻片，借此光源即可清楚地觀察凝集反應的結果。

(4) 試驗方法：

抗原及血清自冰箱取出後，須使其溫度漸達室溫。以康氏抗原吸管，吸取已經加熱  $56^{\circ}\text{C}$  經 30 分鐘處理過的試驗血清標本，以 0.08、0.04、0.02、0.01 及 0.004 毫升 5 種不同量，置於 5 個凹穴中（此量約相當於試管法中，加於 2 毫升抗原液之 1:25、1:50、1:100、1:200 及 1:500 五個稀釋度）。

將抗原搖勻（如作實驗時間過長，則抗原於靜置 2 小時以後，即須再搖勻一次），以抗原滴管吸取抗原於每一血清中滴入 1 滴，以牙籤或小玻棒將每一抗原與血清混合物混勻，舉起玻璃片，來回傾斜約 2—3 分鐘，然後置燈光上觀察結果，如為陽性反應，則顯示顆粒狀的凝集，因凝集的強弱，可以 ++++、+++、++、+，記其不同程度，以“++”的凝集作為其凝集價。

此法一人每次可同時作 5—6 份血清，看完結果後，即將玻璃片沖洗乾淨，便可再用。抗原滴定時，即按上述方法，將已知陽性血清與陰性血清的不同量，與抗原的每一稀釋度作之。在每次實驗時，仍必須作陽性、陰性血清對照及抗原對照。

(三) 試驗血清標本來源：

本報告中所作之血清標本來源有二：試管法所作之血清標本，係 1949 年本院檢驗科血清室作康氏反應的血清，選擇其中康氏反應陰性，病人無發熱症狀，且未被染污的血清共 344 份。此血清大部分來自病人，少數為健康人作體格檢

查的，絕大多數為長沙市的居民，其中包括各種職業者及家庭主婦，年齡自新生兒至 64 歲者均有。

玻片法所作的血清標本，則係健康人的血清共 524 份，全部為男性，大部分原係華北、東北、山東等地人，少數為湖北、四川、廣西及湖南其他縣人，但在長沙均已至少有 3—6 月以上的居留時期，以前的職業多係工人、農民，少數為商人或學生，年齡包括 17—41 歲者均有。

## 二. 試驗結果

(一) 試管法：結果見表 1，血清標本總數為 344 份。

表 1 試管法布魯氏菌凝集反應結果表

	陽 性					總 計	陰 性
	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160		
數 目	30	36	10	10	3	89	255
百分數	8.7	10.4	2.9	2.9	0.9	25.8	74.2

表 1 中呈陽性反應者，1:40 以上的 23 人，與職業的關係曾作過一些分析，因數目太少，似無顯著差別可見，故未列出，年齡則包括 16—49 歲者均有，但絕大多數係在 20—40 歲之間。

(二) 玻片法：結果見表 2，血清標本總數 524 份。

表 2 玻片法布魯氏菌凝集反應結果表

	陽 性					總 計	陰 性
	1:25	1:50	1:100	1:200	1:500		
數 目	65	27	10	3	1	106	418
百分數	12.4	5.2	1.9	0.6	0.2	20.3	79.7

表 2 中呈陽性反應者，1:40 以上的 41 人中，以 20—30 歲者佔多數，可能係受試者中原以此一部分年齡居多數之故，與以前的職業關係，工人與農民也無顯著差別，籍貫則以東北者佔多數，但也可能由於受試者中東北人原佔多數之故。

### 三. 討 論

由以上所得結果，與其他各地者相比較，較北京及上海二地所得的陽性百分數為高，但較貴陽所得者為低，茲比較於下（見表 3）：

表 3 我國各地居民布魯氏菌凝集價調查比較表

地 名	調查年代	方 法	陰性（低於 1:40 者）	陽性（高於 1:40 者）
北 京	1935	試 管 法	98.7%	1.3%
上 海	1936	試 管 法	99.8%	0.2%
貴 陽	1944	試 管 法	44.53%	55.47%
長 沙	1949	試 管 法	93.3%	6.7%
	1950	玻 片 法	92.1%	7.9%

由表 3 中所示，長沙市居民的布魯氏菌凝集陽性百分數較北京、上海兩地為高，尚難找到合理的解釋，但各地所作的方法可能不完全一致，所用的抗原含菌數也可能不相同，這是在比較結果時應當考慮的因素之一。至於貴陽百分數為何較其他地方特高，此一問題因對貴陽方面情況不甚瞭解，也難推測其原因，是否因為該地隱性感較多，還有待貴陽方面細菌學界人士深入研究。

表面上看來，以試管及玻片二法所測出的結果，似乎相差不遠，但事實上二方法所測的血清標本來源完全不同。試管法所測者主要為當地居民，多數為無發熱症狀的病人；而玻片法所測者則多係來自北方，在長沙居留 3—6 月之健康人。所用的血清稀釋度也不相同，試管法係用 1:10、1:20、1:40、1:80、1:160 之稀釋度，而玻片法係用 1:25、1:50、1:100、1:200、1:500 之稀釋度。血清稀釋度計算法也有差別，試管法所用的稀釋度是直接稀釋出來的，而玻片法的稀釋度則是估計的。有以上諸因素的不同，因此這二種方法在本文中實際上是無法相比的，這也是由於在作實驗之初，沒有周密計劃之故，今後對此一問題，當深入研究以彌補此點缺憾。

玻片法與試管法的效果，在本文中雖無法進行比較，但玻片法試驗步驟簡單，且在較試管法為短的時間內（5 分鐘內）觀察結果，加以所得結果並不過於敏感。雖抗原製備過程較繁，但抗原一經製備妥當，置於冰箱內可保存較長時間，根據我們的經驗，保存 6 個月以上仍可應用。抗原中加有結晶紫與煌綠，可使抗原不易被染污；且據 Minster 氏<sup>[7]</sup>稱，加有此類染料之抗原對於稍有染污之血

清作凝集反應時，仍可獲得較清晰的結果，故玻片法在實用中仍有推薦採用的價值。

由表 1 及表 2 中所示的結果，對於臨症上在長沙居民血清中布魯氏桿菌凝集反應是否應以 1:40 或 1:80 為有診斷價值之滴度，似難硬性規定。吾人意見最好根據病人年齡、採血時期與病程之關係及過去有無與感染原的接觸史等情況結合考慮。若病人為兒童，在病程早期採血，過去又無接觸史，1:40 可能有診斷感染存在的意義。根據吾人調查所得之結果，在試管法中，若以 1:80 以上的陽性反應才認為有診斷意義時，則長沙“正常人”血清滴度的陽性百分數為 3.8% (比 1:40 以上者少 2.9%)；如根據玻片法測定，以 1:100 以上的陽性反應認為有幫助診斷的意義時，則一般“正常人”的陽性百分數為 2.7% (較 1:40 以上者少 5.2%)，且 1:40 以上之陽性中，以 20—40 歲者佔絕大多數，故若病人為 20 歲以上之成年人，似以 1:80 以上認為有診斷意義較妥一些，若滴度達 1:320 時，則尤應重視其協助臨床可疑病例的診斷意義。

至於布魯氏桿菌凝集素滴度，是否與以前曾否接受霍亂菌苗注射有關，在本文中因原未計劃作此分析，且所收集的記錄不甚完全。但據試管法所作的血清標本中，有 20 份係本院醫護人員及醫學生，均係於本年至一年前曾接受過霍亂預防注射者，其中僅有 5 人為 1:10 以上之陽性反應，其餘 15 人全為陰性。玻片法所作的血清標本，大多數係來自那些在一年前曾注射過霍亂、傷寒、鼠疫等多種疫苗的人，但這些人的陽性凝集價及百分數並不見高或多，故本實驗未能說明或佐證布魯氏菌凝集價與霍亂菌苗注射有何顯明關係，但此問題還有待今後的深入研究，始能作出結論。

#### 四. 總 結

1. 本文報告長沙市居民中布魯氏桿菌凝集價調查的結果，以試管法測定的本地居民血清 344 份中，有 6.7% 呈 1:40 以上的陽性反應；以玻片法測定的 524 份外來居民血清中，有 7.9% 呈 1:40 以上的陽性反應。

2. 關於試管法及玻片法的操作方法，亦已詳細描述，並略加討論二法的比較及玻片法的應用價值。

3. 關於長沙市所得結果與北京、上海、貴陽等地所獲結果的比較，在長沙居民中認為對臨床診斷有意義的滴度，以及布魯氏桿菌凝集素的滴度與過去曾

否接受過霍亂菌苗注射的關係，亦均略加討論。

### 參 考 文 獻

- [1] 謝少文、王鳳連：布魯氏桿菌治療的近期發展。內科學報，1951，3 (4)。
- [2] 周裕濟：湘雅醫學院，1943 年畢業論文(未發表)。
- [3] 梁覺如、嚴淑芳、于佩呈、江澤芝：兒童波浪熱。中華兒科雜誌，1950，1 (1)。
- [4] Lang, C. W. National Medical College of Shanghai College Graduation Thesis, 1935,
- [5] Wang, D. H. Brucella Agglutinins among the Chinese in Shanghai. *Chinese Med. J. Supp.* 1936, 1: 280.
- [6] Diagnostic Procedures & Reagents: by American Public Health Association, 1st edition, 1941.
- [7] Roger, D. Minster: The Advantages of Stained Antigens in the Diagnostic Agglutination Test for Brucella Infections. *The J. of Lab. & Clinical Med.* 1937, 23: 3.

## BRUCELLA AGGLUTININ AMONG CHANGSHA POPULATION

Yi, Y. N.

*Hunan Medical College, Changsha*

1. Results of Brucella agglutinin among normal population in Changsha as examined by either tube or slide method are reported. Among residents of longer duration and examined by tube method, among a total of 344 samples of sera, 6.7% showed positive agglutination 1:40 or above, whereas by means of the slide method, among residents of recent date, 7.9% of 524 samples of sera showed the same titre.

2. The results obtained have been compared with those previously reported in this country elsewhere, and the advantages of the slide method briefly discussed.

3. Significant Brucella agglutinin titre for the diagnosis of the disease in Changsha, where undulant fever has been reported, is also discussed.