

鼠疫桿菌之分離與鑑定

蘇拉特市位於孟買以北 270 公里處，是印度西部切割加工鑽石的中心，人口 200 萬，於 1994 年 9 月 20 日出現第一例肺鼠疫死亡病例。疫疾是由嚴重的洪水災害所帶來，洪禍毀滅了災區的潔淨飲水及衛生設施，當水患消退後，瘟疫接踵而至。由於鼠疫流行，約有 40 萬人逃離了城市。從蘇市逃離的 40 萬居民，把病菌帶到蘇市所在的古加拉特省的鄉村地區。而遠在蘇市以北 1,180 公里的首都新德里，以及距離蘇拉特 1,600 公里，人口 600 萬的加爾各答均發現鼠疫病患。印度除古加拉特省、馬哈拉斯特拉省及首都新德里外，還有拉加斯坦省、西孟加拉省、塔米爾納都省、北方省、中央省和奧利沙省等六省也有疑似肺炎鼠疫病例的報導。人數由拉加斯坦省的 37 人到中央省與塔米爾納都省的各有兩人不等。此次印度發生鼠疫流行，共有 8 個省份傳出病例，並蔓延到巴基斯坦、孟加拉及英國。截至 10 月 19 日約有 6,000 個報告病例其中有 260 個病例被確認為鼠疫，而有 56 例死亡，之後就無死亡病例。而截至 11 月 8 日，印度已連續 12 天(兩倍潛伏期)無新的鼠疫病例出現，根據規定印度的鼠疫流行已算完全控制。

鼠疫桿菌(*Yersinia pestis*)是 Tersin 及 Kitasato 於 1894 年，分別研究引起香港及鄰近的中國大陸鼠疫的原因時發現的⁽¹⁻²⁾。自此對鼠疫桿菌的研究就不曾間斷。傳統的檢驗包括將菌接種於實驗動物、由動物組織中分離菌株、再用標準的細菌學步驟確認。以上方法較為昂貴，在檢驗各別鼠蚤時較不敏感，某些工作者較不願意使用，而且時間上亦較慢。為防疫上的需要，能於較短時間內獲得結果之檢驗方法，就變成很重要。在五年前(1989 年)，使用去氧核糖核酸雜交探針(DNA hybridization probe)來檢測三種鼠蚤桿菌的方法被發展出來⁽³⁾。但是去氧核糖核酸探針法之敏感並不高，且菌數少於 10^5 時便不易被偵測出來。去年(1993 年)Hinnebusch 及 Schwan 發展出聚合酶鏈鎖反應法(polymerase chain reaction, PCR)，可以由實驗感染的東方鼠蚤 *Xenopsylla cheopis* 體內偵測到 10 個鼠疫桿菌菌體⁽⁴⁾。不過由人體檢體檢驗確認鼠疫桿菌，仍以細菌檢測為準。以下分別對由各種檢體之採集、保存與運送、細菌學檢查、判定依據及鑑定以及聚合酶鏈鎖反應法等作詳細之介紹，並對如何防治鼠疫以及發生鼠疫大流行時應採取之措施加以介紹，希望能對國內的防疫工作有所幫助。

由於鼠疫桿菌為具高度感染之細菌，故檢驗操作人員要特別小心，以免受到感染。最好能在 P3 設備中操作，至少需於負壓之無菌操作檯操作。

一、鼠疫之診斷及鼠疫桿菌之檢驗

鼠疫之潛伏期，腺鼠疫為二至六天，肺鼠疫為二至四天。檢驗診斷準則為：一、由臨床檢體(血液、淋巴結及痰液)中分離出鼠疫桿菌。二、鼠疫桿菌血清抗體力價(antiserum titer)有四倍以上之改變。

二、檢體之採集⁽⁵⁾

一、人體檢體

為檢驗疑似患者是否感染鼠疫桿菌，需將疑似患者之檢體進行培養檢驗，用以培養之檢體有鼠蹊部的抽取液(aspirates from buboes)，跳蚤咬過部位的膿(pus from the area of flea bite)，痰(sputum)，咽喉拭子(throat Swab)，或血液(blood)等。

二、動物檢體之取材

為瞭解老鼠是否感染鼠疫桿菌，可將老鼠解剖，取其各種器官進行培養檢驗。解剖取材時，先以消毒液將鼠體沾濕消毒，然後按皮下、胸腔、腹腔的順序解剖。採取腹股溝、腋窩等腫脹的淋巴結、肝、脾、肺和心臟備驗。每取完一種臟器後，剪刀、鑷子都要沾酒精以火燄滅菌一次。若臟器腐敗或殘缺不全，則應取骨髓檢驗，若骨髓已乾枯，可用無菌注射器注入少許生理食鹽水，再抽取液體檢驗。

三、鼠蚤之搜集

為瞭解老鼠身上之鼠蚤是否感染鼠疫桿菌，可將鼠蚤搜集，並進行培養檢驗。鼠蚤檢出率高，又易於保存、易於運送，可大面積搜集，以供細菌檢驗。從病死鼠或死鼠附近鼠洞中採集的跳蚤，尤需仔細檢驗。

1. 分組檢驗：當檢獲大量蚤時，可按地區·宿主、蚤種進行分組檢驗，每組以 15—20 隻為宜。分組後用滅菌生理食鹽水洗滌三次，置入滅菌研鉢中，加少許生理食鹽水研磨成懸浮液，以供檢驗之用。

2. 單體蚤壓碎培養：將洗過的蚤體在滅菌玻片上以滅菌玻棒壓碎，直接塗於培養基上即可。

三、檢體之保存與運送⁽⁵⁾

一、人體檢體

人體檢體之運送可使用Cary-Blair運送培養基，根據實驗鼠疫桿菌於常溫下在此運送培養基中保存 30 天仍可分離出菌，為極適用之運送培養基。

二、組織塊的保存

最容易的保存方法為Girard 法。即將組織塊保存於 0.85 %生理食鹽水中，以石臘密封。亦可用中性甘油 20ml、蒸餾水 80ml、碳酸鈣 2g的Broke 氏液保存。將 1~2 cm²之臟器小塊放入 5~10ml Broke 液中可保存數月。以Cary-Blair保存培養基運送鼠疫檢驗材料，在熱帶氣候條件下，30 天後仍可獲得陽性結果。

三、蚤體之保存

(1)活蚤的保存：將活蚤置於清潔之試管或有橡皮塞(不能用棉花塞)之小瓶中，並放入 2~3 片無味綠草，管底放少許乾沙或濾紙塊(厚度約 1cm)，以便使空氣濕潤，並置於陰暗處。應避免接觸藥物。

(2)保存液法：將蚤放入 20ppm 龍膽紫(gentian violet)和 2 %食鹽水溶液中，保存 3 天仍可從蚤體分離出鼠疫菌。

四、診斷用培養基⁽⁵⁾

一、接種分離培養基：可使用血液瓊脂平板(blood agar plate), Mac - Conkey 瓊脂平板(Macconkey agar plate)或血液培養瓶(blood cul - tur 。 bottl 。)等進行分離培養。

二、營養培養基：含有某種刺激鼠疫桿菌生長因子之培養基。

(1)Meyer(1926)：亞硫酸鈉，降低培養基內氧化還原電位。在培養基中之最終濃度為 0.025 %。

(2)0.4 %鉍酸鉍，有刺激鼠疫桿菌生長之作用。

(3)血液：血液是鼠疫桿菌最好的生長刺激劑，特別是家兔溶血，在培養基內含量以 0.1~1 歸最好。

三、選擇營養培養基：能抑制其他雜菌生長而又能促進鼠疫桿菌生長之培養基。

(1)Meyer(1926): Hormone 培養基：含龍膽紫和亞硫酸鈉。

(2)Morris(1958): Trypose 培養基中加入 neomycin，亞諦酸鈉，erythromycin，actidione，以及胃酶消化羊血。

(3)區治風(1958): 100ml 1 %血液洋菜培養基中加入 15ml 2.5 %之去氧膽酸鈉(desoxycholate)做為選擇培養基。

(4)Marke(1963)：以 2 %牛膽汁加血液培養基，分離鼠疫桿菌的陽性率為 56 %。

(5)Albizo(1968)：含 4.5 %去氧膽酸鹽及 0.25 %硫酸銅的培養基抑制變形桿菌的效果最佳。

(6)吉林省地方病第一防治研究所(1970)：30 %膽鹽、4 %硫酸銅、0.1 %亞碲酸鉀、1 / 6000 結晶紫及 20 %溶血的膽碲銅紫培養基。其對變形桿菌、大腸桿菌和革蘭氏陽性菌等抑制能力強，並對鼠疫桿菌有促進作用。

四、鑑別培養基：

Albizo(1968)：將鼠疫桿菌接種於加抗鼠疫血清的血液洋菜平板上，於 37°C 培養後，經氣仿薰蒸可顯現出 F1 抗原抗體沉澱環，由此證明鼠疫菌存在。

五、鼠疫桿菌細菌學檢查⁽⁶⁾

一、顯微鏡檢查

1. 標本製備：以脫脂棉將載玻片拭淨。再將淋巴結、皮膚滲出液、血液、肝、脾、肺、骨髓和痰等用白金耳取材或直接塗片。
2. 染色：標本於乾燥後用甲醇、95 %酒精、或 95 %酒精、乙醃各半之固定液固定 10 分鐘。待乾後以革蘭氏染色法、魏申氏(Wayson's)液染色。
3. 鏡檢：在顯微鏡下觀查菌體形態及染色特性。鼠疫桿菌為兩極濃染，兩端鈍圓，革蘭氏陰性短小桿菌。

二、鼠疫桿菌抗原之免疫螢光抗體染色(fluorescent antibody stain)鏡檢法⁽⁷⁾

將免疫所得並經純化後之抗體與螢光物質結合，若檢體中含有鼠疫桿菌之抗原，則此抗原會與連接螢光物質之抗體結合，而由螢光顯微鏡中檢測出來。

先將組織(肝臟及脾臟)、鼠蹊部的抽取液、結節、血液、培養菌抹在玻片上，經風乾、固定後加上連接螢光物質之抗體，以載玻片蓋起來以防止蒸發(在乾燥地區要用保濕盒)，經反應一段時間後，以緩衝液沖洗載玻片，風乾或小心吸乾緩衝液後，滴加緩衝液與甘油之混合液，蓋上玻片後以螢光顯微鏡觀察，若出現小的、卵形且蘋果綠螢光菌體，或細小蘋果綠螢光顆粒(油鏡下)，則為正反應。此方法之專一性(speciflcity)甚高，常被用以確認鼠疫桿菌。目前

亦有由鼠疫桿菌純化製得之F1 抗原(purined F1 antigen from Y . Pestis)市售產品，可用於檢測疑似患者血清中之抗體力價(titer)，以決定是否感染鼠疫。

三、噬菌體裂解試驗⁽⁵⁾

1. 將鼠疫桿菌與鼠疫噬菌體混合，於 18 –22°C 培養 18 –24 小時，在固體培養基上形成一種均一的，輪廓清晰透明的圓形噬菌斑。
2. 在液體培養基內，由於噬菌體裂解鼠疫桿菌，可使混濁的培養液變成透明。
3. 鼠疫噬菌體對鼠疫桿菌的裂解作用，一般在 18–22°C 下，6 –8 小時即可見，有較強的特異性。
4. 在 37°C 時，除鼠疫桿菌外，噬菌體亦可裂解某些假結核菌株、大腸桿菌、及痢疾桿菌。在 18°C 時上述菌株並不會被裂解。

四、培養⁽⁵⁾

1. 患者材料培養：

(1) 淋巴結穿刺液，在(a)含菌量高時：白金耳劃線培養。(b)含菌量少時：可用點狀培養。

(2) 生理食鹽水稀釋的穿刺液：用毛細滴管滴於培養基，使之流成直線，再用白金耳劃線培養。

2. 屍體臟器培養：以滅菌剪刀剪一塊臟器，將切面直接點於洋菜平板上，再用白金耳劃線。亦可用白金耳直接取臟器塊切面的材料後劃線培養。當接種腐敗材料時，需將臟器塊周圍用火燄輕燒後，以剪刀剪開，取中央部份做培養。

3. 捕獲鼠臟器培養：一般用選擇營養培養基培養。每隻老鼠的心、肺、脾、肝四種臟器分別接種培養於同一個平板上，並做好標記，培養方法同上。

4. 蚤培養：將分好組的蚤，以滅菌生理食鹽水洗滌後，再用細羅篩子，將蚤放在裡面沖洗數次，然後研磨製成乳劑，接種於選擇敏感培養基做分離培養。

5. 其他材料培養：毛皮浸液可接種於選擇營養培養基。

動物材料要連續培養觀察三天，病人、病死鼠及蚤等材料要連續培養觀察五天。經 10–18 小時培養後，用顯微鏡檢查，如有鼠疫桿菌可見其初期生長時所特有的破碎玻片樣菌落。24 小時後，可見中央隆起、中心發暗、呈黃褐色粗糙顆粒，周圍有薄而透明的鋸齒狀花邊的菌落，應立即用白金耳挑出在赫氏洋菜斜面及平板上進行純培養。

六、鼠疫桿菌的判定依據及鑑定⁽⁵⁾

一般根據四步驟檢查即可判定鼠疫，其判定依據為：

1. 形態學特徵及菌體染色特徵與鼠疫桿菌相符合。
2. 培養特徵與鼠疫桿菌相一致，尤其是粗糙型菌落具有重要意義。
3. 能被鼠疫噬菌體裂解。
4. 死於感染實驗之小白鼠，具有鼠疫特有的病理改變，並由實驗動物體內分離出鼠疫桿菌。

試 驗 或 特 性	反	應
	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
運動性：		
37°C	—	—
20~25°C	—	+
尿素之水解	—	+
培養液混濁度之均勻性	—	+
醣類之發酵：		
核糖醇	—	+
L-鼠李糖	—	+
密二糖	(-)	+
噬菌體之敏感性		
37°C	+	V
20°C	+	—
對 <i>Y. pestis</i> F1 抗血清之反應	+	—
凝固酶之產生	+	—
血纖維蛋白溶酶之產生	+	—
對動物之致病性：		
小鼠 (mouse)	+	+
白鼠 (white rats)	+	—
天竺鼠 (guinea pigs)	+	+
沙鼠 (Gerbil)	+	+
大鼠 (hamsters)	—	—

+ : 90 ~ 100 % 陽性 ; (+) : 75 ~ 89 . 9 % 陽性 ; (V) : 25 . 1 ~ 74 . 9 % 陽性 ;

(-): 101 ~ 25 % 陽性 ; — : 0 ~ 10 % 陽性

七、鼠疫桿菌鑑定之生化及培養特性⁽⁶⁾

鼠疫桿菌之生化及培養特性示如上表，同時亦將性質相近之 *Y. pseudo-tuberculosis* 並列方便比較。

八、聚合酶鏈鎖反應法⁽⁴⁾

聚合酶鏈鎖反應為能在較短時間內檢測鼠疫桿菌之方法，但其專一性不高，可做為鼠疫桿菌檢測之輔助，而不能完全據以判斷。目前材料費已降低，或可用為鼠疫桿菌篩選方法，如結果為陽性，再根據第六項所述，判斷是否罹患鼠疫。

九、鼠疫之防治方法

鼠疫之防治方法分預防方法、隔離及治療三方面談。最主要預防措施為減少被跳蚤叮咬機會，及避免暴露於肺鼠疫病人之生活環境中。其他預防方法有：

1. 定期調查嗜齒類動物族群，評估鼠病流行情形及防治效果
2. 清除鼠類及蚤類。
3. 來自疫區之船隻應蒸薰除鼠。
4. 死菌疫苗(inactivated vaccine)效果甚低，生菌減毒疫苗(live at - tenuated vaccine)較有效果，但反應較大，可提供數月防護力，適用於高發病地區之居民、旅客及處理鼠疫桿菌之實驗室人員。但僅對腺鼠疫產生部份抵抗力。

隔離：當發生流行時，即刻以有效的殺蟲劑撲滅病人身上、衣服之跳蚤，肺鼠疫和腺鼠疫末期的病人尤需嚴格隔離，以防空氣傳染，俟抗生素治療三天，病情好轉以後方可稍懈，腺鼠疫病人最好住院，假如無咳嗽且胸部 X 光檢查無病灶，在有效治療開始後則須小心處理其膿液及排泄物三天。排泄物及污染物質須加消毒。死者屍體在處理時務須符合無菌操作規定。腺鼠疫接觸者應以 2 % diazinon 或 1 % malation 殺蟲劑滅蚤並監視七天，且應實施預防投藥(成人每天服用 tetracycline 15—30 mg / kg 或 sul - fonamide 40 mg / kg 分四次服用連續服用七天)。肺鼠疫接觸者(含醫護人員)視情況使用殺蟲劑，並進行預防投藥，且監視七天，每天至少量體溫四次，一旦出現發燒或其他臨床症狀，應立即施以追加治療。

治療：鏈黴素 (streptomycin) 四環黴素 (tetracycline) 或 氯黴素 (chloramphenicol) 及早使用有效(肺鼠疫發作 8 ~ 24 小時內)，盤尼西林

penicillin)無效。某些病人在第五、六天會呈現突發性發燒，但無其他任何症狀，可能是該感染原對藥物具抵抗力或發生其他併發症，應立即採病人的痰檢體，依據檢驗結果給予適當抗生素治療，若發現化膿性淋巴腺腫，應予以切開引流。

十、鼠疫大流行時應採取之措施

當發生鼠疫大流行時，應採取下列措施：

1. 驗屍或實驗室檢驗調查所有可能因鼠疫死亡者。
2. 以新聞媒體實施衛教，安撫民心。
3. 組織鼠蚤控制中心。
4. 控制嚙齒類動物。
5. 保護接觸者，施予預防投藥。
6. 保護田野工作者，避免受鼠蚤叮咬。

參考文獻

1. Yersin A . Lapeste bubonique a Hong—Kong . Ann . Inst . Pasteur(Paris)1984 ; 8 : 662—667 .
2. Kitasato S. The bacillus of bubonic plague , Lancet 1984 ; 11 : 428—430 .
3. Thomas RE , McDonotlgh KA , Schwan TG . Use of DNA hybridization probe 's for detection of the plague bacillus(*Yersinia pestis*)in fleas(*Siphonaptera* , *Pulicidae* and *Ceratophyllidae*). J Med Entomol . 1989 ; 26 : 342—348 .
4. Hinnebusch J , Schwanand TG , A new method for plague surveillance using the polymerase chain reaction to detect *Yersinia pestis* in fleas . J Clin Microbiol 1993 ; 31 : 1511—1514 .
5. 紀樹立：鼠疫人民衛生出版社 1988 。
6. William JH , Kenneth LH , Henry DI , et al . Manual of Clinical Microbiology , 1991 .
7. Fluorescent antibody technique in detection of *Y . pestis* antigen , Protocol of CDC . 1994 —

撰稿者：潘子明(行政院衛生署預防醫學研究所細菌組)