

CO 70

Raymond A. Kelser

凱緒

Harry W. Schoening

合 著

醫 細 菌 學

盛 彤 笙 譯

下 冊

四版1943改編 譯本第一版1944發行

發行者： 中國畜牧獸醫學會出版部

獸 醫 細 菌 學

下 冊

1 9 4 4

中國畜牧獸醫學會出版部發行

目錄

上 冊

第一篇 細菌及其形態、生理與分類	1
第一章 緒論	1
第二章 細菌之形態生理及分類	4
第二篇 細菌學之方法	13
第三章 顯微鏡	13
第四章 消毒及玻璃器皿之預備	16
第五章 培養基製造法	22
第六章 細菌培養法	35
第七章 細菌之顯微鏡檢查，染料及染色法	43
第三篇 傳染及免疫	61
第八章 細菌與疾病，抵抗力與免疫性	61
第九章 傳染與免疫之學說，吞噬作用，調理素及調理指數， 抗體	64
第十章 過敏性(變態反應及過敏震盪)，Shwartzman氏現象	71
第四篇 細菌變異	75
第十一章 細菌變異	75
第五篇 裂殖菌綱之病原菌	87
第十二章 弧菌屬(Vibrio)	87
第十三章 假單胞菌屬(Pseudomonas)	91
第十四章 葡萄球菌(Staphylococcus)	93
第十五章 出血性敗血症桿菌屬(Pasteurella)	98
第十六章 鼻疽桿菌屬(Milleomyces)	105
第十七章 流產桿菌或蒲氏桿菌屬(Brucella)	109
第十八章 嗜血桿菌屬(Hemophilus)	117
第十九章 鏈球菌(Streptococcus)	120

中 冊

第五篇 裂殖菌綱之病原菌(續).....131

第二十章	大腸桿菌屬(<i>Escherichia</i>).....	131
第二十一章	克氏桿菌屬(<i>Klebsiella</i>).....	134
第二十二章	副傷寒桿菌或沙氏桿菌屬(<i>Salmonella</i>).....	136
第二十三章	志賀氏桿菌屬(<i>Shigella</i>).....	142
第二十四章	李氏桿菌屬(<i>Listerella</i>).....	145
第二十五章	放線桿菌屬(<i>Actinobacillus</i>).....	147
第二十六章	有芽胞桿菌屬(<i>Bacillus</i>).....	150
第二十七章	梭菌屬(<i>Clostridium</i>).....	156
第二十八章	棒狀桿菌屬(<i>Corynebacterium</i>).....	174
第二十九章	分枝桿菌屬(<i>Mycobacterium</i>).....	180
第三十章	丹毒桿菌屬(<i>Erysipelothrix</i>).....	191
第三十一章	放線菌屬(<i>Actinomyces</i>).....	195
第三十二章	疏螺旋體屬(<i>Borellia</i>).....	200
第三十三章	鉤端螺旋體屬(<i>Leptospira</i>).....	203

第六篇 致病之黴菌.....207

第三十四章	芽生菌(<i>Blastomycetes</i>)及絲菌(<i>Hyphomycetes</i>).....	207
第三十五章	致病之芽生菌.....	209
第三十六章	囊菌(<i>Ascomycetes</i>).....	211
第三十七章	不完全菌(<i>Fungi imperfecti</i>).....	215

第七篇 原生蟲.....219

第三十八章	寄生之原生蟲.....	219
第三十九章	根足蟲(<i>Rhizopoda</i>).....	225
第四十章	原鞭毛蟲(<i>Mastigophora</i>).....	227
第四十一章	芽胞蟲(<i>Sporozoa</i>).....	235
第四十二章	纖毛蟲(<i>Ciliata</i>).....	244
第四十三章	研究原生蟲之方法.....	245

下 册

第 八 篇 濾過性毒及立克氏體.....	251
第四十四章 致病之濾過性毒	251
第四十五章 立克氏體 (Rickettsia)	293
第 九 篇 血清學.....	295
第四十六章 獸醫上普通應用之血清試驗	295
第 十 篇 血學.....	317
第四十七章 臨診血液檢查	317
第十一篇 獸醫生物藥品之製造.....	323
第四十八章 菌苗、疫苗、攻擊素、血清、抗毒素、結核素、鼻疽素 等之製法	323
第十二篇 牛乳細菌學，牛乳之消毒，水之檢查.....	341
第四十九章 牛乳細菌學，牛乳之消毒，水之檢查	341

致 歉

本書上中兩冊於1944年出版後，因經費困難，下冊遲至1946年始克在京付印，因情形變更，紙張字體，均不能與上中兩冊一致，至爲歉疚，尙希讀者見諒爲幸。



養濾過性毒須用組織培養或動物接種法。病毒在動物體中之繁殖不獨須視動物之感受性而定，亦因接種方法及組織對病毒之親和力而不同。

獸醫上有重要性之大部份病毒皆可利用其自然宿主而繁衍之。如係大動物之疾病或須接種多數動物以作統計研究時，則亦可利用小動物以作實驗，其中尤以小白鼠應用最廣。接種之途徑須視病毒對於外胚、中胚或內胚層組織之親和力或適應性而定，如病毒為全嗜性 (Pantropic) 則用任何方法接種皆可引起傳染，如為嗜神經性 (Neurotropic)，其活動性僅限於神經系統中者，則須經神經或中樞神經系統而傳染，如係嚴格嗜上皮性 (Epitheliotropic) 者，則須接種於上皮組織中，餘類推。

此項原則亦適用於組織培養，乃將欲培養之組織如腦經、皮膚或睪丸等（普通多用胚胎組織）置生理鹽水或台氏液 (Tyrode Solution) 中，內加血漿或組織抽提液，或否，然後將無菌之濾過性毒懸液接種於其中，一部份病毒甚易在如此保存之組織中生長，培養時自須保持絕對無菌，並小心謹慎，技術不得稍有差誤。

各方學者所用台氏液之成份殊不相同，Parker 氏在其 1938 年發行之『組織培養法』一書中所舉者如下：

氯化鈉	8.00公分
氯化鉀	0.20公分
氯化鈣 (CaCl ₂)	0.20公分
氯化鎂 (MgCl ₂ · 6H ₂ O)	0.10公分
酸性磷酸鈉 (NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O)	0.05公分
重碳酸鈉 (NaHCO ₃)	1.00公分
葡萄糖	1.00公分
水(用玻璃器皿蒸溜三次者)，加至	1,000公撮

『多數研究者於配製此液時，常感困難甚多，或則液體混濁不清，或則鹼性太強，其實祇須注意下述幾項簡單之要點即可避免：所用各種化合物務須絕對純淨，先置三製蒸溜水約 850 公撮於一大量筒中，然後將各種化合物按上述次序加入水中，每次一種，須俟其完全溶解分散均勻後方可加入第二種以防局部之濃度過高，各物加完後再加水使總量為一公升。』

此液之 pH 應為 7.4—7.8，須用濾過法滅菌，儲藏於加有橡皮塞之容器中備用。

另一培養濾過性毒之法乃 Woodruff 及 Goodpasture 二氏首用於培養雞痘病毒之雞胚法，乃將病毒接種於孵化之雞胚或其絨毛尿膜或卵黃囊上，亦可將雞胚取出作組織培養。所用之雞卵必須極端清潔，選自無病之健康雞羣，且須受精率極高，庶免浪費。接種之法視病毒之性質而定，譬如牛痘及雞痘病毒係在絨毛尿膜上生長，馬腦脊髓炎病毒普通雖係接種於絨毛尿膜上，但能在各組織中生長，立克氏體乃接種於卵黃囊，在其中生長。胚胎之日齡亦視所欲培養病毒之性質而定。

茲舉 Higbie 及 Howitt 二氏於 1935 年所首創用雞胚培養馬腦脊髓炎病毒之法於次，以示一般：

取大小一律之清潔雞卵，在孵卵器中孵育8—10日後，取出置特製有凹窩之容器上，用蘸有碘酒之棉花拭子輕觸其鈍端及卵側兩端間之中點，用齒鑽分別在兩處各鑽一孔，直徑約1mm.或小於1mm.，深僅及壳膜，同樣用碘酒輕觸兩處之壳膜，然後將鈍端氣孔處之壳膜用烙器戳破一孔，不可使其邊緣塌陷，至於卵側處之壳膜，則戳破與否均無不可，普通祇須將氣孔處之壳膜戳破，則絨毛尿膜即自卵側處回縮卵中，此即接種之處，可用玻璃注射器及22—26號針頭吸取稀釋之病毒滴於絨毛尿膜上，普通多用稀釋之病毒0.1公撮，其稀釋度須視病毒之濃度、接種之目的及接種材料之性質（係腦經、胚胎或血液）而定。接種後將兩孔同用臘、火棉膠、石臘及蜂臘之混合物或其他材料封固之，如其中胚胎未因接種而死亡，則置孵卵器中孵育，如係已在雞胚適應之腦脊髓炎病毒，則可於15—20小時內將雞胚殺死，每公分雞胚組織所含病毒可能多至一千萬天竺鼠致死量以上，如死後繼續孵育則病毒量隨之減低。

用以大規模製造馬腦脊髓炎疫苗之病毒種子普通係將雞胚磨碎後懸浮於加有緩衝劑之生理鹽水或其他稀釋液中，須作細菌培養試驗以證其無菌，作動物或雞胚接種試驗以定其傳染力，然後將其稀釋100—10,000倍以供大規模接種雞胚之用。

病毒在雞胚或其他鳥胚或組織培養中所引起之病理變化與在其自然宿主或實驗動物體中者極相近似，視病毒之不同，普通多為細胞之變性與壞死，細胞浸潤，原生質內及核內包涵體之形成等。欲觀察絨毛尿膜上之病變，可在卵側開一氣窗，用無菌手術將卵壳及壳膜除去，在絨毛尿膜上接種病毒後，用石臘或其他適當物質塗於氣窗四週，以消毒蓋玻片將氣窗蓋牢，即可透過蓋玻片觀察雞胚內部，此法尤適於痘病病毒之研究，可計數痘數之多寡而測定其毒量。

病毒之鑑定——既知某組織含有一種病毒後，即須定其究為何毒。病毒之鑑定雖不如細菌之簡單，但如此病毒已經前人發現，則亦甚易易，可就其致病力、潛伏期、病狀、病程及病灶而加以初步之分類，至於決定性之鑑別則有賴免疫之研究，或以特徵免疫血清作保護試驗，或在體外作中和試驗。如作保護試驗則須用此種欲待檢查之病毒及所疑某病之免疫血清，或同時注射，或先後注射於實驗動物體中，在對照動物則僅注射病毒而不注射血清，如所用血清確與此種病毒相當且效力強大部份量足夠，則凡曾注射血清之動物應不顯症狀，而對照動物則皆發病。如係嗜神經性病毒，則血清縱不須於病毒之前注射，亦必須於病毒之後立即注射，方有保護之効。

體外中和試驗乃先將病毒及血清在體外混和，然後將其注入有易感性動物體中，其技術須視所研究之病毒而不同，各方研究者所採方法亦因其設備不同而略有差異，茲舉Howitt氏研究馬腦脊髓炎病毒之方法如下，以為示例：取20%含病毒之腦組織懸浮液置離心機中搖轉20分鐘，將其上浮液體用加有緩衝劑之生理鹽水沖淡25倍，然後與等量之可疑血清混和，又用確知為陽性及確知為陰性之血清同樣操作，將混和液置37°C.中2小時，再置冰箱中過夜，然後各取十分之三公撮分別注射於體重300公分之天竺鼠腦內。視病毒傳染性之不同，亦有用其他稀釋度或用不同之稀釋度與等量血清混和，置冰箱中經一定時間後注射於數個實驗動物體中者，如此可以測定血清之効力，如為能中和10,

100或1000天竺鼠致死量等，凡中和力在10致死量以下者均無大價值。

利用中和試驗可作各種疾病（多為人類疾病）之調查，在家畜方面則主要用之於馬腦脊髓炎及St. Louis 腦炎之調查，發現此病之中和物質分佈極廣。惟此法之主要困難在於病毒傳染力及其他特性之不同及標準方法之缺乏，Hammon及Izumi二氏曾有文論及之矣。

在大部份濾過性毒所致之疾病中，其痊愈後之免疫性皆因體液中有抗體所致，例如上述之中和物質即係體液中的一種抗體，可在血液中表現之，有時在未曾患病之動物體中亦有其存在，乃因前曾與此種病毒接觸而未會察覺也。

經病毒傳染後又可產生補體結合物質。因純粹病毒之不易獲得，故作補體結合反應時須用含病毒之組織懸浮液為抗原，然此種抗原常有對抗補體之性質，此為其最大之困難，Casals及Pr. Iacios二氏近創一法，謂於嗜神經性病毒用腦組織作抗原時可以免除此種困難云。在設備適當之實驗室中，補體結合反應可供濾過性毒所致疾病之診斷及其病原之鑑別。

綜而言之，鑑定病毒最滿意之方法乃為在已經同種病毒主動免疫之動物作接種試驗，如分別用經東方型及西方型馬腦脊髓炎病毒免疫之天竺鼠以及對照天竺鼠，使受某種馬腦脊髓炎病毒之傳染即其例也。如對西方型病毒免疫之天竺鼠及對照天竺鼠均死而對東方型病毒免疫者獨存，則此病毒為東方型；如對東方型病毒免疫者及對照天竺鼠死而對西方型免疫者生，則可斷此毒為西方型；如三者皆死，則此毒或根本非腦脊髓炎病毒，或傳染劑量太大，勝過其免疫性所致，蓋免疫性原不過一種相對之抵抗力，並非使動物對某病絕對不能感染，此於濾過性毒所致之疾病為尤然。一部份動物祇須受病毒之極輕度侵襲即可產生長期之免疫性，而一部份動物（尤其體況羸弱及同時患有他病者）則甚難免疫；此外則種別、年齡、傳染之方法及病毒之性質等亦皆有相當之關係也。

濾過性毒之性質——Rivers氏有言曰：『欲下濾過性毒之定義，現尚甚難。』欲知其詳細性質，須參考其他文獻。本書以限於篇幅，祇能作一簡單之綜述。Beijerinck氏曾呼烟草葉斑病之病毒曰『傳染活液（Contagium fluidum virum）』，然今日一般概念則皆認病毒為顆粒性。舊說有認病毒之性質與細菌相同者，僅較細菌為小而已；另一方面又有信其為一種酵素者。Stanley氏研究烟草葉斑病病毒，曾於1935年分離得一種蛋白質之結晶體，與病葉濾液之性質相同，後人亦證其結果不謬。結晶體普通皆認為係無生命之物質，結晶體而能致病，不免使人對於病毒之性質發生熱烈之辯論，在未得進一步之研究結果以前，多數問題尚有待後日之解答也。

病毒之某種特性極有興趣。病毒與細菌不同，能耐受甘油之作用，故純甘油或稀釋之甘油為大部份病毒之極佳保存劑。大部份病毒在腐化物質中不能久存（僅狂犬病及馬傳染性貧血之病毒為例外，稍能耐受腐敗變化）。強鹼性溶液如1—2%氫氧化鈉普通對病毒有極強之消毒力，但一部份病毒則更易為酸性溶液所毀滅。動物之病毒皆為寄生性，在自然情形下在體外不能長期生存，惟痘病及其他少數嗜上皮性病毒在適當情形下對乾燥之抵抗力甚強，可見對於病毒之任何定律皆有例外，每種病毒各不相同也。

茲將在獸醫上有重要性之各種病毒分論於下：

狂犬病病毒

狂犬病 (Rabies) 或恐水病 (Hydrophobia) 爲極古疾病之一，可因動物（尤其犬類）之咬傷而傳於人類，故極爲重要。人類之疾病未有如狂犬病之可怖者。

1804年 Zinke 氏研究狂犬病，發現病犬唾液之傳染性，惜此後七十五年中，未有對此病作實驗研究者。迨1879年 Galtier 氏發現可用人工接種方法將狂犬病傳於家兔，引起此病之啞型或麻痺型，遂得研究此病之一安全便法，大規模之研究亦因此而始。

1881年 Pasteur 及其同事 Chamberland 及 Roux 二氏發現狂犬病之病毒對於神經組織有特殊之親和力，在中樞神經系統中濃度特高；在此後之數年中（1881—1888），因 Pasteur 氏之精心研究，終獲一完滿之免疫法。

1903年 Remlinger 氏報告狂犬病毒可以通過滅菌濾器，濾液中雖不含細菌，却仍能致病。次年（1904）Bertarelli 及 Volpino 二氏證實 Remlinger 氏之說。在美國則此項病毒之濾過性係首由 Poor 及 Steinhardt 二氏所證實，後其他多數學者亦有同樣觀察。

1903年中又有一重要之發現，意大利 Parvia 城之 Negri 氏發現患狂犬病而死之動物中樞神經細胞（尤其海馬體之大神經節細胞及小腦之 Purkinje 氏細胞）中有一種包涵物，形圓或卵圓，體積出入甚大（0.5—22 μ ），如染色適當，可見其大者中含有染色甚深之顆粒。Negri 氏認爲此種包涵體爲狂犬病中所特有，且信其即爲本病之病原，繼之各方之研究確證此種包涵體爲狂犬病之特徵，Volpino, D'Amato, Bertarelli, Bose, Poor 及其他學者亦皆見有此種包涵體，其爲診斷狂犬病之可靠方法今已確立無疑，在大部份病例中，可以代替動物接種試驗，節省時間不少。

此種 Negri 氏體在診斷上之特徵性雖已確立無疑，然其與本病之關係究竟如何，則學者意見尙不一致，大別之可分爲兩派，一部份學者認爲 Negri 氏體僅爲狂犬病中之一種特徵細胞變性現象，而與其病原無關，一部份學者則認爲此種包涵體不獨爲此病診斷上之特徵，且爲此病之一種病原原生蟲云。

相信前說反對後說者之理由，乃因狂犬病之病毒可以濾過，決非一種原生蟲，且不含 Negri 氏體之神經組織亦可有傳染性，而在由『固定毒』所致之傳染中則 Negri 氏體甚少甚小。在另一方面，相信 Negri 氏體爲狂犬病之病原者，則認爲 Negri 氏體之體積出入甚大，其生活史之某階段或能通過濾器，且 Negri 氏體偶亦可存於神經細胞之外，如將細胞中含 Negri 氏體之神經組織磨碎，加入 Antiformin 溶化之，則用顯微鏡檢查亦可見多數自細胞中分離而出之 Negri 氏體，足證 Negri 氏體非僅爲細胞之一種變性區域，且其明顯之輪廓、規律之構造及染色性亦均不足支持變性之說云。

在過去十年中，關於病毒之研究日增，狂犬病尤受人之注意。由於此病在美國各部之繼續流行，及欲利用疫苗以謀將其自犬類肅清，故學者大都注意於此病之免疫學，尤着重於檢定疫苗効力方法之改進。

Webster 及 Dawson 二氏於1935年報告謂有一種特殊品系之瑞士小白鼠對於狂犬病之易感性極高，適於診斷及免疫試驗之用。Johnson及Leach二氏曾詳細比較各種品系小白鼠對狂犬病之易感性，則謂市上所購各種小白鼠皆極適於狂犬病診斷之用，並無出入。

用小白鼠以爲狂犬病診斷之實驗動物甚爲有利，以其價值甚廉，且發病之潛伏期較在他種動物爲短，此點在診斷上極有價值。

小白鼠感染狂犬病者潛伏期約爲6—10日，早期之症狀爲動作遲頓，被毛粗亂，初微生顫搐，後可發痙攣，繼以麻痺，麻痺多係自後肢開始。病者多於症狀顯現後24小時內死亡，亦有能存活數日者。

接種之法係用醚將小白鼠麻醉，以27號注射針穿過頭骨，注射0.03公撮於腦中，小白鼠之頭骨甚薄，故注射針不難刺入。每次診斷時須同時注射6—8鼠，在海馬體中甚易覓見Negri氏體，有時在症狀發生前已有Negri氏體存在，故欲作早期診斷者可於第6日殺死一鼠，以驗Negri氏體之有無，如爲陰性，則次日再殺一鼠同樣檢查之，如仍爲陰性，則須候至發生症狀時再行檢查，如接種後21日尚不生症狀且無Negri氏體發生，方可謂爲陰性結果。

過去研究狂犬病毒之培養者甚多，但至最近方獲成功。學者所採方法有組織培養及雞胚二法。Kanazawa氏培養固定毒曾獲成功。Webster及Clow等氏將鼠胚之腦經置於含有10%人或猴血清之台氏溶液中作組織培養，亦獲培養狂犬病毒，其法如下：

威含有猴血清10%之台氏溶液4公撮於容量50公撮之三角瓶中，加小白鼠胚胎腦經懸浮液0.02公撮，然後接種稀釋100倍之病鼠腦組織懸浮液1公撮於其中，病鼠腦經須於腦內接種後第7—8日採取。每隔三四日將三角瓶中之內容物吸出置於一離心管中，俟其沈降後吸出其上層清液2.5公撮入於另一培養瓶中，如此繼續接種，並常將稀釋10倍之培養液接種於瑞士小白鼠之腦內以檢定其毒力。所有上述各種培養手術均須在無菌情形下行之。

Plotz及Regan二氏報告曾利用組織培養法培養狂犬病之街毒，其培養基爲台氏溶液、15%猴血清、10日雞胚細胞懸浮液4滴及雞血漿3滴，經培養11代後，雖以其 10^{-6} 稀釋液接種於小白鼠腦內亦能引起狂犬病之發生。

Dawson氏報告曾在雞胚內培養狂犬病街毒，法乃先將病毒接種於一日之雛雞腦內，17—18日後發生麻痺之症狀，經四次通過雞胚後，乃將病毒接種於13日雞胚之腦內，4日後將雞胚殺死，又移植於孵育13日之新胚，在受染雞胚之腦內有大量Negri氏體存在。

接種街毒之胚胎多於6—8日後死亡，一部份則可存活達14日，較正常之孵化期超出5—6日，但據Dawson氏之經驗，腦內接種狂犬病毒之胚胎未有能孵出者。

狂犬病毒雖可在組織培養中多次通過，但此種培養對於小白鼠之致病濃度未有超過 10^{-4} 者，實較被接種小白鼠腦中之濃度不啻遠甚，因在腦中之濃度常可達 10^{-6} 至 10^{-7} 也。（街毒及固定毒均可接種於一日雛雞之腦內而發病。）

Kligle及Bernkopf二氏亦曾獲在組織培養及孵育5—6日之雞胚中培養狂犬病之固定毒，接種之雞胚達2星期時，腦經及其他組織中即有病毒存在，此後則濃度漸減，終至消滅，一部份接種之胚胎且能孵出，體況正常而無病毒存在。

狂犬病之診斷——動物腦中之有Negri氏體者皆可斷為狂犬病一節，今已確立無疑，利用此法以作診斷時，必須注意下述各項要點：

第一、凡早期殺死之病畜，Negri氏體可能尚甚小，或數目甚少，易被忽略，故最好任病畜自斃或在病之後期將其撲殺，則產生Negri氏體之機會較多。撲殺時不可射擊腦部，否則腦經不適於實驗檢查之用。

其次、製備標本及寄遞至實驗室之手續亦須注意。如實驗室近在左右，祇須於死後立即將頭割下送至實驗室即可；如距離較遠，稍有延擱，則須將頭保藏於冰中；如須經郵局寄遞，最好按下述方法進行：將腦經小心取出，循大腦兩半球之間切為兩半，置一半於甘油中，另一半於10%伏馬林中，小心包裝投郵寄遞。保存於甘油中之一半可供作觸片及動物接種之用。如須作切片，則可用保存於10%伏馬林中之一半。

新鮮未經保存之腦組織最適於直接顯微鏡檢查之用，故在可能範圍以內務須以此種材料供給實驗室之診斷。以今日交通之便捷，保存於冰中之標本不難於短期內作遠距離之遞送也。

檢查狂犬病時，實驗室可採下述三法：即觸片檢查、切片檢查及動物接種試驗是也。

觸片——如標本寄至實驗室時尚甚新鮮，第一步即須作一觸片，用顯微鏡檢查有無Negri氏體，其法如下：如寄來者係整個犬頭，須將腦經取出，小心將海馬體（即Ammon氏角）剖出；如係保存於甘油及伏馬林中之腦經，則可將保存於甘油中之一半取出，剖出其海馬體之一半，用無菌生理鹽水輕輕洗淨；同時預備清潔之載玻片數塊、利刃或刀片一塊、立方木塊一二塊或軟木塞數塊、盛有甲醇之染色瓶一隻，用利刃或刀片將海馬體橫切下一片，置木塊或軟木塞上，新鮮之切面朝上，用載玻片輕壓於切面上，作觸片數枚，迅置甲醇中固定2分鐘，然後取出染色。如僅欲驗Negri氏體之有無，則著者喜用Mann氏法，其對照甚為明顯，如欲研究Negri氏體之構造，則用Giemsa氏法。

如用Mann氏法，可將固定之抹片覆以Mann氏染色劑（見第51頁），染色5—15分鐘，然後用水洗淨，通過50%、75%、95%及純酒精，用等份Xyloil及柏木油之混和液使透明，則神經細胞呈淡藍色，Negri氏體呈磚紅色，紅血球呈橙色。Negri氏體存大神經節細胞中，間亦可存小神經細胞中及細胞外，在一細胞中常有數個Negri氏體同在。

如用Giemsa氏法，則最好染色過夜，結果最佳。可於一染色瓶中滿盛蒸溜水，每蒸溜水1公撮加1%炭酸鉀5—6滴及Giemsa氏染色劑1滴，將觸片置於其中過夜，次晨取出用蒸溜水沖洗，用95%酒精辨色，辨色時務須小心，最好置觸片於95%酒精中清洗數秒鐘，再用蒸溜水洗淨，乾後用高倍乾鏡檢查，如神經細胞仍呈深紫色，則須再用酒

精清洗數秒鐘，同樣檢查，通常須如此重覆數次，可使辨色洽到好處，神經細胞呈淡藍色，細胞核呈紅色，Negri氏體呈知更鳥之卵藍色，內含紫紅色顆粒。關於 Giemsa 氏染色劑之製配參閱第50頁。

另一染Negri氏體之滿意方法為Van Giesson氏法，Williams氏之修正法及Sellers氏法亦極滿意，各法詳見第51頁。

切片——如腦組織寄遞至實驗室時情況已不佳，不合於製作觸片之用，則須切片檢查之。如有一部份腦組織係保存於伏馬林中，可將其小腦及海馬體各切下一小塊，作成切片。如非保存於伏馬林中，則可置Zenker氏液中固定6小時，結果最佳。在小腦之切片中，Negri氏體係存於Purkinje氏細胞中。

切片染色可用Mann氏或Giemsa氏法，如係用Zenker氏液固定包埋於石臘中之切片，則用Mallory氏伊紅美藍染色法結果最佳。

Schleifstein氏近曾報告一表現組織切片中Negri氏體之加速方法，可取厚不過3mm.之海馬體或小腦小塊，於37.5°C.之溫度下置Zenker氏液中固定3小時，然後用水沖洗30分鐘，迅用Dioxane去水，法取Dioxane80公撮盛於一有毛玻璃塞之寬頸瓶中，瓶底置無水氯化鈣一層，厚約1公分，加碘粒數顆以助昇汞沉澱之清除，組織須支持於Dioxane中，勿與氯化鈣相接觸，在37.5°C.中去水經1小時後，將其取出，在56°C.之溫度下置等份Dioxane及石臘之混和液中，小心使組織懸浮於離瓶底數公分處，蓋Dioxane常有分出沈下之趨勢也。此後再將切片置56°C.之石臘中一小時，然後包埋於石臘中，切成厚4 μ 之薄片，粘於載玻片上，用Xylol將臘除去，通過各種濃度之酒精後，換置蒸溜水中，然後染色。Schleifstein氏主用下述修正之Wilhite氏染色法：

溶 液 一

Rosaniline (Guebler公司出品)	1.8公分
美藍 (N21. col.)	1.0公分
甘油 (T. P.)	100.0公撮
甲醇 (T. P.)	100.0公撮

搖震數分鐘、此液可以無限期保存。

溶 液 二

1:40,000 之氫氧化鉀水溶液

用時於溶液二2公撮中加溶液一1滴，須於染色前臨時製備。將切片自水中取出，置於一電熱板上，覆以新鮮製備之染料，使生蒸氣，歷5分鐘，冷後迅用自來水沖洗。分別將每片置90%酒精中脫色及辨色，微微擺動玻片至切片呈淡紫色為止，此步極為重要。然後將切片迅速通過95%酒精、純酒精及Xylol，封於坎拿大樹膠中。Negri氏體呈深紅色，其中顆粒呈深藍色，核仁呈藍黑色，細胞質呈藍紫色，紅血球呈銅色。

動物接種試驗——動物腦中如有Negri氏體存在乃狂犬病之明徵，如經長期之仔細檢查，未能發現Negri氏體，則泰半可斷其非狂犬病，但亦有一部份病例，雖小心尋覓

亦不能見 Negri 氏體，而用動物接種試驗則終證其為狂犬病者。

近來利用小白鼠為實驗動物以診斷狂犬病，頗足校正顯微鏡檢查之結果。Leach 氏報告會檢查腦組織1032例，其顯微鏡檢查呈陰性者之12%，用小白鼠接種試驗則證為陽性。Damon及Sellers二氏報告會在Alabama州檢查標本1300例，在Georgia州檢查標本754例，亦發現在顯微鏡檢查呈陰性反應之病例中，平均有12.4%呈陽性動物接種試驗；但在兩州檢查之標本1200例中，亦有顯微鏡檢查呈陽性而動物接種試驗呈陰性者，在Alabama州佔4.1%，在Georgia州佔2.5%。

如有人被犬咬傷而犬腦之顯微鏡檢查為陰性，最好再用動物接種試驗以校正其結果，兔、天竺鼠或小白鼠均可應用，小白鼠之易感性極高，尤合診斷之用。如組織新鮮或係保存於甘油中者，可以少許乳化於無菌生理鹽水中，注射於實驗動物之硬腦膜下。

如寄至實驗室之腦經已經敗壞，則診斷不易，縱有Negri氏體存在亦難表現，惟有倚賴動物接種試驗以定診斷。組織中之污染細菌常於腦內注射後18—24小時內致死，有時將其腦經浸於甘油中置冰箱中24小時可以消滅其中之污染細菌，使注射得告安全。

Sulkin及Nagle二氏報告曾用醚消滅腦中之污染細菌，極為成功，其法如下：自海馬體之中央部切下一小塊以備作顯微鏡檢查及保存於甘油之用，將剩餘者乳化於肉羹10公撮中，在室溫中靜置1小時後將上浮清液吸入一容量15公撮之有塞離心管中，加醚10%（約1公撮），搖勻後在冰箱中靜置2小時，然後置離心機中任其在低速度下搖轉，將醚下清液吸出作動物接種之用。

接種於小白鼠時可採Webster及Leach等氏之法。Webster氏之法如下：取可疑動物之海馬體或腦經之他部在乳鉢中磨碎，用無菌清水或肉羹稀釋約20倍，然後注射於八隻2—3星期大小之瑞士小白鼠腦中。

如欲得早期診斷，可於第5日殺死一鼠，如為陰性，再於第六及第七日各殺一鼠。被注射之鼠多於第7—10日發生症狀，第9—12日死亡，據Webster氏之觀察，罕有於15日後始行發病者，但通常多繼續觀察20日。

Leach氏之法如下：取海馬體一小塊於無菌乳鉢中磨碎，每份中加內分泌肉羹9份，乳化後置離心機中，在每分鐘2000—2500轉之速率下搖轉5分鐘，用一容量0.25公撮之結核素注射器穿過頭骨注射清液0.03公撮於一4—6星期大小之小白鼠腦內，須用 $\frac{1}{4}$ 英寸長之27號針頭，注射於頭骨中線之一側眼耳之中間，注射前用酒精將注射處潤溼，用醚將鼠微微麻醉，每次須同時注射四鼠，如注射者為熟練之技術員，則因注射之受傷而死者僅及0.5—1.0%。

據Leach氏之經驗，凡曾經免疫或治療之犬隻，腦中Negri氏體之表現較難，但如將此種材料接種於小白鼠，則甚易發病，而在鼠腦中覓得Negri氏體。

在家兔作硬腦膜下注射時，可在頭骨上鑽一小孔，在注射器上安一小針頭，注射於硬腦膜下。但下述方法更為簡單：取18號皮下注射針頭一根，磨至約十六分之三英寸之長度，安置於一結核素注射器上，吸入組織乳化液少許，在兔眼外眥之延長線上，位於眼後數公分處，用食指可以觸覺有一小橫溝，此處之頭骨甚薄，極易穿過，可將其上毛

髮剃去，塗以碘酒，由一助手將兔妥為捉住，俟碘酒乾後將針頭置於橫溝處，經頭骨刺入腦腔中。此法簡單迅速，極為滿意，惟一應當注意者乃注射針之長度，如針頭太長，則將深入腦中，引起大量之損失。

經用含街毒之腦組織乳液注射於硬腦膜下之兔隻常於12—25日內發病，如係用固定毒，則恆於5—6日內發病，於第7或第8日死亡。

傳播——狂犬病幾全因咬傷而由一畜傳於他畜，或由動物傳於人類，蓋病畜之唾液中含病毒極豐也。面部及手上之咬傷尤為危險。狂犬病毒並不能透過未破之皮膚；若消化道上無傷痕破損，亦不能因口服而傳染。

病畜唾液之傳染性以症狀發生後為最強，但在症狀顯現前2—5日亦有傳染性，惟較弱而已。在一小部份病例中，病前8—10日即能傳染。故如有一畜曾咬傷人類或其他家畜，宜將其看管15日，如在15日內不顯症狀，方可斷其在咬人之時，唾液中含有狂犬病毒。

1931年Hurst及Pawan二氏曾在Trinidad報告人及牛之麻痺性狂犬病一起，謂係由吸血蝙蝠所傳播。後Torres及de Queiroz Lima二氏果證吸血蝙蝠（*Desmodus rotundus murinus*）無論受自然傳染或人工傳染，其本身皆能抵抗此病，但體中帶有病毒，可因吸血而傳於其他動物。

街毒及固定毒——凡存自然病例之唾液及神經組織中之狂犬病毒，通常稱曰街毒。Pasteur氏發現如將街毒連續通過多數（90）家兔，其對家兔之毒力大增，恆能於接種後第6日發生症狀，且保持其毒力不變，Pasteur氏名之曰固定毒。固定毒之毒力乃因直接由兔腦接種於兔腦而增強者，故對腦組織有極高之適應性，而對其他組織（皮下及肌肉注射）之適應性則隨之減低。如將固定毒注射於其他任何動物（犬、馬、牛、羊等）之腦內，皆可於與在兔相同之潛伏期後致病。

固定毒注射於腦內雖有極強之毒力，但注射於皮下則一般信其毫無毒力，惟據著者之經驗，如注射於犬、兔及綿羊皮下亦偶有能致病者。

狂犬病毒之多型——關於狂犬病毒是否有多種型類一問題，研究尚嫌不足，未能定論；但各種品系固定毒之免疫性不同，則已由Hampil及Roberts二氏證實。二氏曾用24日大小之瑞士小白鼠研究17種不同之固定毒品系，發現其中四系之免疫性較優。Habel氏亦發現一部份固定毒之品系對石炭酸之抵抗力較強，此種抵抗力較強之品系，用於製造疫苗時抗原性亦較優。

抵抗力——狂犬病毒之抵抗力不強，如暴於空氣日光中迅能將其摧毀，在空氣中使之乾燥亦能於短期中將其破壞。58°C.之溫度能將其於半小時消滅，煮沸立能生效。5%石炭酸能將其於半小時內殺死，1:1000昇汞、3%復方樟腦油醇溶液及1%伏馬林則祇須15分鐘。如無其他惡劣影響，則此毒可以長期抵抗腐敗。甘油須若干星期方能將其毀滅，如將腦組織切成小塊保存於甘油中，或將其乳化於甘油中，則數星期即失其毒力，如係保存於甘油中之大塊組織，則其中病毒可存活數月之久。

免疫——狂犬病免疫法為Pasteur氏最著成就之一，氏發現如將因固定毒而死之家

兔脊髓在氫化鈉上乾燥，可使其中所含病毒之毒力漸減，如經5日之乾燥，則注射於家兔硬腦膜下須8日後方能發病，如經9日之乾燥，須15日方能發病，如經2星期之致弱，則毒力完全喪失，利用此項發現遂創其著名之免疫法，先注射毒力最弱之脊髓，繼注射較強者，終而注射致弱最少者。

各醫學機關所採Pasteur氏治療法多係注射乾燥8至2日之脊髓，歷時21—25日。又有所謂加重治療者，用於咬傷極重之病人（尤其面部及手上受傷者），在整個治療過程中有數次注射係用僅經乾燥一日之脊髓。惟上述Pasteur氏乾燥脊髓之原法近已受各種修正法之淘汰而不復用矣。修正法有下述各種：

Hogyes氏法係用各種不同稀釋度之病毒，先用較稀者，後漸增其毒量。此法應用甚廣。

Harris氏法係將含病毒之脊髓及腦經在二氧炭雪中冰凍，磨成細末，置 -18°C .之真空乾燥器中在硫酸上任其乾燥，乾後封裝於真空管中，貯於冰點以下，此法不需經各種不同時期之乾燥，且至少能貯藏6月不失其毒力，故可一次製造大量產品。此法能將固定毒之毒力減低一半，用時取定量之粉末溶於生理鹽水中以行注射，注射量逐漸增加。此法應用不廣。

Cumming氏發現如將含病毒之腦經及脊髓乳化液置火棉膠囊中，在蒸溜水中使其透析，將殘餘囊中之材料注射於家兔硬腦膜內，將不復致病，但如用以爲疫苗，則能預防此病。利用此法製備之疫苗結果極佳。

1921年日人Umeno及Doi二氏首創一免疫法，預防犬類之狂犬病，乃於固定毒中加入石炭酸及甘油，祇須注射一次，其目的在建立犬類對狂犬病之抵抗力，以此病之防制。後由Eichhorn氏介紹入美，在美應用極廣。惟自Schoening氏於1925年發現按照日本方法所製之疫苗常含有活力之病毒，可在犬隻引起固定毒之傳染以來，此種疫苗之製法已加修改。美國畜產局規定凡用於犬隻之狂犬病疫苗皆須爲殺死之病毒，至少亦須無毒力，雖注射於實驗動物腦內亦不致引起狂犬病。凡獲有美國獸醫執照允許發行之犬用狂犬病疫苗，如製作得法，皆合於此項規定。

1928年Kelsner氏首創一種用氫仿殺死之狂犬病疫苗，以供犬類之一次免疫注射。自狂犬病疫苗介紹入美以來對其效果究竟如何，辯論極多。據著者二人之經驗，證實用氫仿殺死之疫苗對於犬及兔之實驗傳染最有保護之效。

犬用狂犬病疫苗之效力試驗近又重受學者之研究，Webster氏於1929年首創一法，利用小白鼠以作狂犬病疫苗之效力試驗，初經Wyckoff及Beck二氏之修改，繼經Habel氏之再度修改，使試驗時間縮短，適於檢查商製狂犬病疫苗之用，此項Habel氏試驗已由美國畜產局正式採用，所有犬用狂犬病疫苗均須合於此項要求，方得出售。在過去缺乏狂犬病疫苗效力之可靠檢定方法以前，惟求製造方法之合乎標準，自從採用Habel氏試驗以來，商製狂犬病疫苗之效力已大見增加矣。

Habel氏小白鼠試驗法如下：取一月大小重約11—13公分之瑞士種雌性小白鼠30頭，每隔一日於腹內注射0.5%腦組織乳液之疫苗0.25公撮（如係5%疫苗則須稀釋10倍，

如係25%疫苗則稀釋50倍)，共注射六次，試驗之前同時準備對照鼠18頭。第一次注射後14日即須注射試驗劑量，試驗病毒之製法如下：

第一次注射疫苗後第七日即須取正常小白鼠三頭，各注射10%固定毒乳劑0.03公撮，則此三鼠將恰於試驗時發病，須將其於表現明顯症狀之第一日殺死，將腦經取出，保存於0°C.之溫度中，以備應用。至第14日將鼠腦用溶於蒸溜水中之10%馬血清乳化之，其稀釋度為1:10，置離心機中在每分鐘1000轉之速率下旋轉10分鐘，然後將其上清液按十進加以稀釋，成 10^{-1} 以至 10^{-7} 之濃度（即1:10, 1:100, 1:1000等）。

將對照鼠18頭分為三組，每組6頭，分別於腦內注射稀釋 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} 倍之病毒各0.03公撮，以測定其最小致死量。又將已經免疫之試驗鼠30頭分為五組，每組亦為6頭，分別於腦內注射稀釋 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} 倍之病毒各0.03公撮。（觀察21日，僅其死前曾顯固定毒狂犬病症狀者方可謂係因狂犬病而死）。其能使對照組6鼠中3鼠致死之最高稀釋度即為其最小致死量。在各免疫組中，其最低稀釋度尚能使6鼠中至少有3鼠存活者即為免疫之終點。此二稀釋度相差之倍數即示保護之最小致死量數。如結果不一律，則須用Reed及Muench二氏之法測定對照組及免疫組50%終點。

除在小白鼠外，Webster及Casals與Leach及Johnson等氏又曾研究犬用狂犬病疫苗在犬類之効力，尤以Leach及Johnson二氏所作工作為多，曾在謹慎控制之情形下用多數犬隻作詳細之試驗，每犬在皮下一次注射疫苗5公撮，一月後注射有毒力之街毒於嚼肌中，茲將其三次試驗之結果綜述之於下：

第一次皮下注射用石炭酸殺死之疫苗於犬105頭，結果26頭死亡，相當於25%，在對照犬120頭中，66頭死亡，相當於55%。

第二次腹內注射用石炭酸殺死之疫苗於犬52頭，結果19頭死亡，相當於37%，在對照犬63頭中，34頭死亡，相當於54%。

第三次皮下注射用氯仿殺死之疫苗於犬50頭，僅2頭死亡，相當於4%，而對照犬55頭中死亡者佔34頭，相當於62%。

此項試驗之結果顯示免疫可使多數犬隻對於狂犬病之抵抗力增高，但非百分之百有效；實際應用疫苗免疫之結果亦同。

美國家畜衛生協會之狂犬病委員會曾於1939年對犬用狂犬病疫苗作下述聲明：

『據實驗研究及實地應用之結果，均示現行疫苗確有免疫之價值，但亦如其他各種生物藥品，其效用亦有其限度。美國今日所製疫苗皆係用石炭酸或氯仿所殺死，如製作合法，其中不含活毒。一次注射可使一部份犬隻對於狂犬病之抵抗力增加，但此種抵抗力僅為相對的，故一部份犬隻可以抵抗病毒之傳染，一部份則否。』

凡有狂犬病發生之區，必須將犬隻免疫以減低其易感性。有易感性之犬隻愈少則受染之犬隻亦愈少，此病流行之機會亦因而減低。

免疫犬隻之抵抗力既有出入，故疫苗之効力亦自有其限度，不可認為一經免疫即為絕對保險，而形成一種錯覺之安全感。在狂犬病防制運動中，已經免疫之犬隻亦應與未經免疫之犬隻同樣看待，無分軒輊。