

慢性气管炎肺炎双球菌血清型别及其毒力的鉴定

北京药品生物制品检定所菌种室*

(北京)

1971—1974年,在北京、河北、沈阳等地分离收集到慢性气管炎肺炎球菌161株,非慢性气管炎肺炎球菌109株。其血清学及毒力鉴定结果:弱毒株占鉴定菌株总数的74.9%,强毒株1、3、4型所占比例很小,分别为1.9%、1.2%、1.2%。说明,慢性气管炎肺炎球菌的主要特征是弱毒株占绝大多数,毒株毒力强弱与慢性气管炎患者的病型(喘息型或单纯性)和病情(轻、中、重)也没有关系。血清型很分散是慢性气管炎肺炎球菌的又一特点,161株慢性气管炎肺炎球菌中血清型多达38个(不包括亚型),其中比较常见的血清型顺序排列为9、33、18、19及6型,占菌株总数的27.9%。非慢性气管炎肺炎球菌的血清型,虽然也很分散,但强毒株所占比例较高。可见,肺炎球菌与慢性气管炎的关系,并不取决于菌株本身毒力的强弱或某些特定的血清型,而是取决于机体的抵抗力。当机体抵抗力减弱、呼吸道防御机能遭受损伤后,平常存在于呼吸道中的肺炎球菌则又成为慢性气管炎的一种续发性致病因素。对13例慢性气管炎患者的肺炎球菌(29株)血清型变化动态的观察结果:肺炎球菌血清型先后一致的有8例,占检查人数的61.6%,喘息型患者肺炎球菌血清型先后一致的高于单纯型的,前者为83.3%,后者为43%。

慢性气管炎是广大工农兵中常见的多发病。为了积极配合防治这种病,我们开展了细菌病因学的研究。

慢性气管炎的病因学相当复杂,除物理化学因素外,微生物也是重要因素之一。近几年来,一般均认为肺炎球菌是与慢性气管炎关系比较密切的。尤其在慢性气管炎的急性期或感染期,病人痰液中的肺炎球菌更为常见。肺炎球菌也是慢性气管炎下呼吸道直接分离较为多见的一种细菌^[1,2]。

但是,肺炎球菌血清型别及其毒力与慢性气管炎的关系,迄今仍然不清楚。因此,开展有关细菌血清学分型的研究工作是一个值得注意的问题。据此,我们对慢性气管炎肺炎球菌的血清型别及其毒力进行了初步的鉴定。

肺炎球菌的血清型别是比较复杂的。

其血清型的区分主要在于肺炎球菌荚膜多糖体之不同。本文以Lund-Kuffmann肺炎球菌的血清学分型方法^[3,4]为基础进行分型。

我们总结分析了161例慢性气管炎肺炎球菌血清型的分布情况,并和来自109例非慢性气管炎(肺炎或其他疾病的患者)的肺炎球菌血清型的分布情况作了比较,对各型肺炎球菌的毒力以及13例慢性气管炎患者痰液中肺炎球菌血清型的变化动态也进行了初步探索。

肺炎球菌的收集和鉴定

1971—1974年由北京部分医院、河北

本文于1975年3月12日收到。

*北京第二传染病医院,北京医院,铁路总医院,建工、儿童、首钢、宣武等医院,以及河北省卫生防疫站、沈阳医学院等单位提供菌株,特此致谢。

卫生防疫站及沈阳医学院等单位收集到肺炎球菌共 270 株, 其中 161 株由慢性气管炎患者痰液中分离到(简称慢性气管炎肺炎球菌); 109 株由非慢性气管炎患者(肺炎或其他疾病)各种标本中分离到(简称非慢性气管炎肺炎球菌)。所有收集到的菌株均及时冻干保存, 并按本实验室对肺炎球菌的常规鉴定方法, 进行了溶血、胆汁溶解、Optochin 敏感(部分菌株)、荚膜和革兰氏染色及生化反应等试验。绝大多数菌株均为革兰氏阳性双球菌(个别呈短链); 均有荚膜; 在 5% 羊血平皿上均呈甲型溶血; 在 1—2% 兔血清肉汤中生长良好、均匀混浊; 胆汁溶解阳性; 对 Optochin (1:5000) 敏感; 均不发酵卫矛醇、山梨醇、肌醇及阿拉伯胶糖; 有 1 株发酵木胶糖; 均发酵菊糖、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖、果糖、蕈糖; 不发酵乳糖的有 1 株; 发酵水杨素、葡萄糖、甘露醇的菌株分别占 96.3%、97.2% 和 42.2%。上述结果符合肺炎球菌的一般特性^[5,6]。

慢性气管炎和非慢性气管炎肺炎球菌血清型别的分布情况

1. 肺炎球菌诊断血清

9 组多价血清、46 个分型或分群(不包括亚型)血清供本实验室鉴定肺炎球菌的血清型别用(详见表 1)。其中 1、2、3、

表 1 肺炎球菌诊断血清

多价血清	单价(分型或分群)血清
A	1, 2, 4, 5, 18
B	3, 6, 8, 19
C	7, 20, 24, 31, 40
D	9, 11, 16, 36, 37
E	10, 12, 21, 33, 39
F	17, 22, 27, 32, 41
G	29, 34, 35, 42, 47
H	13, 14, 15, 23, 28
I	25, 38, 43, 44, 45, 46, 48

4、5、9、13、17、18 及 19 型系本所自制。其余来自丹麦国家血清研究所。

2. 诊断抗原的制备

制备诊断抗原的条件应一致, 并尽可能使其荚膜发育良好。具体方法为: 启开冻干保存的肺炎球菌, 接种于 1—2% 兔血清肉汤中, 37℃ 培养 20 小时后, 量取 0.4 毫升, 接种于 40 毫升 1—2% 兔血清肉汤中, 37℃ 培养 6 小时(一般为肺炎球菌荚膜发育最好的时间)后, 加福马林(含量 0.5%) 杀菌、离心沉淀半小时, 弃上清, 用 2 毫升磷酸盐缓冲液稀释沉淀抗原, 置冰箱保存备用。

3. 鉴定肺炎球菌血清型别的方法

参考诺费氏(Neufeld)法进行, 根据玻片上油镜检查肺炎球菌诊断抗原与诊断血清的荚膜肿胀反应结果, 确定肺炎球菌的血清型别。每一诊断抗原先用肺炎球菌多价血清进行鉴定, 然后在多价血清的范围内用每一单价血清进行鉴定。并用试管方法, 测定了每一抗原与相应血清的荚膜肿胀效价。肉眼可见的凝集反应作分型鉴定的参考。

4. 慢性气管炎和非慢性气管炎肺炎球菌血清型别的分布情况

共鉴定了 161 株慢性气管炎肺炎球菌和 109 株非慢性气管炎肺炎球菌的血清型, 结果见表 2。

由表 2 可见, 慢性气管炎肺炎球菌血清型的分布是很分散的, 161 株慢性气管炎肺炎球菌中有 38 个血清型(不包括亚型)。其中比较多见的血清型顺序排列为:

表2 慢性气管炎和非慢性气管炎肺炎
球菌血清型的分布情况

肺炎球菌 血清型	慢性气管炎 肺炎球菌		非慢性气管炎 肺炎球菌	
	菌株数	占总菌株数 百分比	菌株数	占总菌株数 百分比
1	3	1.9	4	3.66
2	2	1.2	3	2.75
3	2	1.2	8	7.33
4	2	1.2	1	0.91
5	0	0	3	2.75
6	7	4.4	2	1.83
7	4	2.5	4	3.66
8	5	3.1	4	3.66
9	11	6.8	4	3.66
10	6	3.7	2	1.83
11	6	3.7	8	7.33
12	1	0.62	0	0
13	1	0.62	1	0.91
14	0	0	0	0
15	3	1.9	1	0.91
16	2	1.2	1	0.91
17	2	1.2	1	0.91
18	8	5.0	8	7.33
19	8	5.0	8	7.33
20	6	3.7	1	0.91
21	6	3.7	1	0.91
22	1	0.62	7	6.42
23	6	3.7	5	4.58
24	4	2.5	0	0
25	3	1.9	1	0.91
27	1	0.62	4	3.66
28	2	1.2	1	0.91
29,35	6	3.7	1	0.91
31	4	2.5	0	0
32	4	2.5	2	1.83
33	11	6.8	7	6.42
34	3	1.9	4	3.66
35	1	0.62	1	0.91
36	6	3.7	3	2.75
37	0	0	3	2.75
38	3	1.9	0	0
39	1	0.62	0	0
40	0	0	0	0
41	4	2.5	0	0
42	4	2.5	2	1.83
43	2	1.2	0	0
44	0	0	0	0
45	0	0	0	0
46	0	0	0	0
47	0	0	0	0
48	4	2.5	2	1.83
未定型	6	3.7	1	0.91
	共161株		共109株	

9、33、18、19及6型,分别占慢性气管炎肺炎球菌菌株总数的6.8%、6.8%、5.0%、5.0%及4.4%。这5个血清型的菌株数加在一起,占慢性气管炎肺炎球菌菌株总数的27.9%。非慢性气管炎肺炎球菌血清型的分布也很分散。109株非慢性气管炎肺炎球菌中共有33个血清型(不包括亚型)。

表3 慢性气管炎患者痰液中肺炎
球菌血清型的变化动态

姓名	痰液分离次数	病型	病情	肺炎球菌血清型
王××	第1次	喘息型慢性气管炎	重	19
	第2次	”	”	2
张××	第1次	”	中	15
	第2次	”	”	15
赵××	第1次	”	重	19
	第2次	”	”	19
朱××	第1次	”	”	38
	第2次	”	”	38
李××	第1次	”	”	未定型
	第2次	”	”	”
张×珍	第1次	”	”	17
	第2次	”	”	17
马××	第1次	单纯性慢性气管炎	中	21
	第2次	”	”	7
白××	第1次	”	”	20
	第2次	”	”	20
吴××	第1次	”	”	35
	第2次	”	”	35
郭××	第1次	”	”	34
	第2次	”	”	未定型
甄××	第1次	”	重	20
	第2次	”	”	25
	第3次	”	”	28
刘××	第1次	”	”	48
	第2次	”	”	33
	第3次	”	”	25
李×宽	第1次	”	”	31
	第2次	”	”	31
	第3次	”	”	31

其中比较常见的顺序排列为: 3、11、18、19、33 及 22 型。分别占非慢性气管炎肺炎球菌菌株总数的 7.3%、7.3%、7.3%、6.4% 及 6.4%。这 6 个血清型的菌株数加在一起, 占非慢性气管炎肺炎球菌菌株总数的 42.2%。在慢性气管炎和非慢性气管炎的肺炎球菌中, 均未发现 14、40、44、45、46 及 47 型。另外, 前者未定型的有 6 株, 后者有 1 株。

慢性气管炎肺炎球菌血清型的变化动态

结果见表 3。

对 13 例慢性气管炎患者的痰液共分离了 29 次, 每一患者分离 2 次—3 次。第 1 次于 71 年 5 月分离, 半个月后进行第 2 次分离, 3 个月后进行第 3 次分离, 每次均分离到肺炎球菌, 共 29 株。表 3 结果表明: 每一患者肺炎球菌血清型第 1 和第 2 次或第 1、第 2 和第 3 次先后相同的有 8 例。占检查人数的 61.5%, 喘息型慢性气管炎患者肺炎球菌的血清型, 先后一致的高于单纯型的, 前者 6 例中有 5 例肺炎球菌血清型先后一致, 占喘息型人数的 83.3%, 后者 7 例中肺炎球菌血清型先后一致的有 3 例, 占单纯型人数的 43%。

各型肺炎球菌的毒力

在鉴定慢性气管炎肺炎球菌血清型的基础上, 为进一步了解慢性气管炎肺炎球菌血清型以及各型菌株的毒力这三者之间有无关系? 我们用小白鼠测定了 108 株慢性气管炎肺炎球菌(共 36 个血清型)的毒力、同时和 69 株非慢性气管炎肺炎球菌(25 个血清型)的毒力进行了比较。对肺炎球菌的毒力与慢性气管炎患者的病型、病情有无关系也进行了初步探索。

1. 菌液的制作

启开冻干保存的各型肺炎球菌, 接种于第一代 1—2% 兔血清肉汤中, 37℃ 培养 20 小时后划线接种于第 2 代 5% 羊血琼脂平皿上, 37℃ 培养 20 小时后选单个菌落接种于第 3 代 1—2% 兔血清肉汤中, 37℃ 培养 20 小时后接种于第 4 代 1—2% 兔血清肉汤中, 此第 4 代菌液经 37℃ 6 小时培养后为毒力试验用的细菌原液。测毒时稀释成 10^{-1} — 10^{-5} 或 10^{-5} 以上。菌液均进行了菌形、荚膜、血清型别、胆汁溶解、Optochin 敏感试验等鉴定后用于测定毒力。

2. 动物

各型肺炎球菌菌液的每一稀释度一般用体重 14—16 克健康小白鼠 3—5 只, 每只腹腔注射菌液 0.5 毫升。

3. 各型肺炎球菌的毒力结果

连续观察 3 天, 其毒力按最小致死量判定。

表 4 指出: (1)肺炎球菌毒力的强弱, 主要由肺炎球菌血清型别所决定。各型肺炎球菌之间的毒力差别悬殊。1、3、4 型肺炎球菌的毒力最强, 反复试验多次, 其最小致死量均可达 10^{-1} — 10^{-5} 以上; 8 型毒力次之; 2、11、18、22、25、27 及 31 型肺炎球菌的毒力较弱, 其最小致死量大多数介于 10^{-1} —原液之间, 个别可达 10^{-3} , 少数可达 10^{-2} ; 5、7、9、10、15、16、17、19、20、23、24、28、29 及 32—48 型, 肺炎球菌的毒力最弱, 其最小致死量大多数低于原液(即原液亦不能全部致死小白鼠)。(2)肺炎球菌的毒力似与菌株的来源有一定的关系。比较慢性气管炎肺炎球菌和非慢性气管炎肺炎球菌毒力试验的结果可以看出, 前者的

表4 慢性气管炎和非慢性气管炎各型肺炎球菌的毒力

肺炎球菌血清型	慢性气管炎肺炎球菌								非慢性气管炎肺炎球菌							
	菌株数	毒力(最小致死量)							菌株数	毒力(最小致死量)						
		10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	原液	低于*原液		10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻¹	原液	低于*原液
1	3	3							3	3						
2	2				1	1			—							
3	1	1							3	2	1					
4	1	1							—							
5									3							3
6	4							4	1		1					
7	2							2	2							2
8	2	1	1						3	1		1		1		
9	9					4		5	2			1			1	
10	4							4	10							2
11	3				1			2	6				2	1		3
12	1					1			—							
15	3					1	2		1							1
16	1							1	1							1
17	2							2	—							
18	2			1			1		9			1	3	4		1
19	5						2	3	6					3		3
20	5						4	1	1					1		
21	3						2	1	1					1		
22									5			2	2	1		
23	4							3	2							2
24	2					1	1		1							1
25	1					1			1		1					
27									3		1	1	1	1		
28	1						1		1				1			
29,35	2					1	1		—							
31	4				3	1			—							
32	3						2	1	—							
33	8					1	4	3	4					2		2
34	2							2	2					1		1
35	1							1	—							
36	3						1	2	—							
37	2						1	1	—							
38	3						2	1	—							
39	1						1		—							
41	4						3	1	—							
35,42	4						3	1	1					1		
43	2						1	1	—							
48	3						1	2	1				1			
未定型	5						2	3	2							2
共	108株	6	1	1	5	14	36	45	67株	6	1	3	5	11	16	25
	%	5.5	0.92	0.92	4.6	13.0	33.3	41.6	%	9.0	1.5	4.5	7.5	16.4	23.8	37.3

*原液不能全部致死小白鼠。

强毒株少于后者,弱毒株多于后者。(3)肺炎球菌毒力的强弱与慢性气管炎肺炎球菌血清型的分布情况没有一致性的关系。如慢性气管炎患者痰液中较为多见的 9、33、18、19 及 6 型肺炎球菌(共占 29.1%),其毒力均很弱,反之,毒力最强的 1、3、4 型肺炎球菌,在慢性气管炎患者的痰液中则均属少见,其百分比为 1.2—1.9。

结果还表明,肺炎球菌毒力的强弱与慢性气管炎的病型、病情也没有关系。

对结果的分析

1. 慢性气管炎肺炎球菌的血清型相当分散,毒力相当弱,这是慢性气管炎肺炎球菌比较突出的特点。在我们鉴定的 161 株慢性气管炎肺炎球菌中,共有 38 个血清型(不包括亚型),其中比较多见的血清型为: 9、33、19、20 及 6 型(共占菌株总数的 27.9%),它们的毒力均相当弱,大部分菌株的最小致死量低于原液,而毒力很强的肺炎球菌 1 型仅占 1.9%,3 型和 4 型分别为 1.2%。由肺炎或脑膜炎患者分离到 109 株肺炎球菌则与此相反,其血清型虽历年来变迁很大,但毒力强的肺炎球菌血清型总占多数。丹麦肺炎患者的 1 型肺炎球菌早期高达 33—40%,1955—1970 年则 3 型为比较常见^[7],Margaret 等^[8]报导(1960—1969 年)肺炎患者最常见的血清型亦为 3 型,占 36%。脑膜炎患者分离的肺炎球菌 3 型也最多^[9]。非慢性气管炎肺炎球菌的血清型也很分散,其中较多见的顺序排列为 3、11、18、19、33 及 22 型,共占总株数的 42.2%,但毒力强的 3 型所占比例高于慢性气管炎肺炎双球菌,为 7.3%。从毒力试验总的情况来看,慢性气管炎肺炎球菌的毒力也略低于非慢性气管炎肺炎球菌。

上述情况进一步说明了慢性气管炎病因学的复杂性。作为病原菌,肺炎球菌与慢性气管炎的关系不如与肺炎的关系那么直接那么密切。众所周知,肺炎球菌在任何气候条件下均能生存于健康人的鼻咽部,约 40—70% 的健康人鼻咽部带有肺炎球菌。而这些生存于上呼吸道的肺炎球菌,大多数毒力都较弱,在正常情况下可能不会引起气管炎的,但是,当呼吸道被其它微生物或物理化学因素所侵袭而降低了机体抵抗力之后,肺炎球菌可成为续发的病原菌。

2. 当机体抵抗力一旦减弱,呼吸道的防御机能遭受损伤后,肺炎球菌成为慢性气管炎的一种经常的致病因素是可能的。我们对 13 例慢性气管炎患者的肺炎球菌(29 株)血清型变化动态的观察对上述结论似乎提供了一些依据。由 13 例慢性气管炎患者痰液先后分离的 29 株肺炎球菌中,每一患者肺炎球菌血清型先后相同的有 8 例,占检查人数的 61.5%。喘息型慢性气管炎患者肺炎球菌血清型先后一致的比例高于单纯型的,前者为 83.3%;后者为 43%。这一情况应作进一步研究。

参 考 资 料

- [1] 卫生部直属等单位细菌病毒协作组: 中华医学杂志, 1: 4, 1972。
- [2] Menaught, W.: Lancet, ii, 1112, 1969。
- [3] Lund, E.: International J. of Systematic Bacteriology, July, 321, 1970。
- [4] Lund, E.: Acta. Path. Microbiol. Scand., 80(4):497—500, 1972。
- [5] Mørch-Lund: Acta. Path. Microbiol. Scand., 26:710, 1949。
- [6] Lund, E.: Bull. Wld. Heth. Org., 23: 5—13, 1960。
- [7] Lund, E.: Bayer-Symposium, III, 49—56, 1971。
- [8] Margaret et al.: Lancet, 1:5, 1970。
- [9] Lund, E.: Acta. Path. Microbiol. Scand., 61:487—490, 1964。

IDENTIFICATION OF SEROTYPES AND VIRULENCE OF THE PNEUMOCOCCI FOUND IN CHRONIC BRONCHITIS

LABORATORY OF CULTURE, BEIJING INSTITUTE FOR THE CONTROL OF
PHARMACEUTICAL AND BIOLOGICAL PRODUCTS

(Beijing)

During the years from 1971 to 1974, 161 strains of *Diplococcus pneumoniae* from chronic bronchitis cases and 109 strains from other patients were isolated in Beijing, Hobei, and Shenyong areas. Their serological reactions and virulence were studied with the following results:

1. Strains of low virulence are predominant (74.9%) in the 161 strains from chronic bronchitis cases, and the virulent strains of types 1, 3, and 4 only accounted for 1.9%, 1.2% and 1.2% respectively. In addition, the virulence is not correlated with the symptom type (asthmatic or simple) and severity of the cases.

2. The 161 strains from chronic bronchitis cases are further characterized

by a wide distribution of serotypes (38 serotypes). Strains occurred more frequently were serotypes 9, 33, 18, 19, and 6, which accounted for 27.9% of the total number of strains.

3. The serotypes of the 109 strains from other patients are also widely distributed with a slightly higher percentage of virulent strains.

4. It may be concluded, from the etiological view point, that the virulence and the serotype of pneumococci would not be the determinant factors for causing chronic bronchitis, but the resistance of the hosts would play an important part in the incidence of chronic bronchitis.