

# 绿脓杆菌血清型的研究

黑龙江省应用微生物研究所免疫室

(哈尔滨)

中国人民解放军 59171 部队

在全国 16 个主要省市 100 多所医院里,收集了 869 株绿脓杆菌,并进行了血清型分类。分型率达 98.7%。从血清型分布规律看,前 4 个型分布的最多(占 59%),其次是 7、8、9 型(占 31.3%),5、6、10 和 11 型分布极少。Fisher 的 7 个免疫型株中 I、II、IV、VI 和 VII 型菌各与我国血清型株有交叉凝集,而 III 和 V 型菌没有交叉凝集。本文还叙述了血清型的分型方法。并用此方法对本菌的流行病学和生态学研究的意义进行了讨论。

绿脓杆菌血清型的研究,对绿脓杆菌感染症的诊断、治疗、预防及其流行病学和生态学的研究,均有十分重要的意义。

目前,绿脓杆菌分型的方法有血清学分型法、绿脓菌素分型法和噬菌体分型法三种。其中血清学分型法由于操作简便,稳定性较好,在医学实践中已广泛应用。

有关绿脓杆菌血清学分型及其分布的研究,袁昕<sup>[1]</sup>、赵仲芳<sup>[2]</sup>、Homma<sup>[3-5]</sup>、本间逊<sup>[6]</sup>和 Fisher<sup>[7]</sup>等均发表过论文报告。世界几个主要国家都有自己的绿脓杆菌血清型标准株和分型血清。袁昕和赵仲芳<sup>[1,2]</sup>报告我国的绿脓杆菌血清型为 11 个型。

绿脓杆菌血清型不同,给绿脓杆菌菌苗的研制带来很多麻烦<sup>[8]</sup>,因为临床实践要求用多价菌苗来控制各种不同型绿脓杆菌的感染<sup>[9]</sup>。因此研制绿脓杆菌菌苗时,必须注意到绿脓杆菌血清型及其分布的研究。本文报告绿脓杆菌分型及其分布规律的研究结果以及我国的血清型与 Fisher 的 7 个免疫型的比较研究。

## 材料与方法

(一) 标准菌株: 采用袁昕等报告的 11 个型标准株: PI-393、PII-017、PIII-55、PIV-04、PV-05、PVI-189、PVII-166、PVIII-053、PIX-09、PX-010 和 PXI-011。

采用美国 Fisher 的 7 个免疫型菌株: FI-PD-05139、FII-PD-05142、FIII-PD-05704、FIV-PD-05141、FV-PD-05140、FVI-PD-05144 和 FVII-PD-05140。

### (二) 分型血清的制备

1. 免疫原的制备: 选取 La 型菌接种于琼脂斜面上,37℃ 培养 18 小时,用 pH 7.2 的磷酸缓冲盐水(以下简称 PBS)洗下。100℃ 加热 1 小时,离心收集菌体,再悬浮于 PBS 中。用比浊法将其浓度调至 60 亿个/毫升。(72 型分光光度计,600 毫微米,比色槽径 1 厘米条件下,光密度为 1.0),4℃ 冰箱保存待用。

2. 免疫方法: 选取 2 公斤左右的家兔,耳静脉注射。第 1 天 0.4 毫升,第 4 天 0.5 毫升,第 7 天 0.6 毫升,第 10 天 0.7 毫升,第 13 天 1.0 毫升。末次免疫后 7 天试血,若抗体价低于 1:640

本文于 1978 年 6 月 8 日收到。

时可再注射 1.0 毫升。抗体价达到 1:640 以上时,自颈动脉放血,分离血清。

3.交叉吸收制备分型血清: 将分离到的 11 个型血清,分别用 11 个标准菌株凝集原进行交叉凝集。若除本型菌外有凝集反应的,必须用凝集反应阳性株去吸收。吸收方法如下: 选择吸收菌的 La 型菌接于琼脂斜面上,37℃培养 18 小时,并悬浮于 PBS 中,120℃ 加热 90 分钟,离心收集菌体,再用 PBS 洗一次,悬浮于 PBS 中,使其浓度为 50 毫克/毫升。将吸收菌等量加到待吸收的血清里,置 37℃ 水浴 30 分钟,然后放 4℃ 冰箱过夜。第二天离心除去菌体,再用凝集反应阳性菌作凝集反应,不再产生阳性反应者为吸收合格。将所得的分型血清用 0.01% 硫柳汞生理盐水稀释 10 倍,分装后放 4℃ 冰箱保存备用。

(三) 血清分型方法

1.凝集原的制备: 将 La 型菌 24 小时琼脂斜面培养物,悬浮于 PBS 中,其浓度为 20 亿个/毫升。

2.分型操作: 采用玻片凝集法和试管凝集法进行分型。两种方法结果一致,可互相代替。

(1) 玻片凝集法: 将被检菌制成的凝集原逐滴滴于清洁的玻璃片上,然后分别滴加 11 个分型血清各一滴。以生理盐水作对照。轻轻振动玻片,使其均匀混合,置室温 15—20 分钟判定结果。有明显凝集颗粒者为阳性。呈均匀混悬状者为阴性。

(2) 试管凝集法: 在小试管内加 0.5 毫升分型血清,再加 0.5 毫升待分型的菌悬液,摇匀置 37℃ 水浴 2 小时,置 4℃ 冰箱过夜,次日判定结果。其标准如下: 管底见明显沉淀,上清透明者为阳性(++)。能看到清楚的沉淀,但上清稍混浊,摇动时能看到凝集块时为阳性(+)。管底看不到沉淀,液体呈均匀混浊时,为阴性。不加血清的对照管,有时在管底看到沉淀,但摇动时呈均匀的菌悬液,也为阴性。与被分型菌株发生凝集的血清型为该菌株所属的血清型。

(四) 分离及鉴定

1.分离: 在全国 16 个主要省、市、区的 100 多所医院里,从烧伤患者创面、外伤感染患部、病人血液、尿、痰等标本中,分离到 869 株绿脓杆菌。如不能立即进行分型者,用半固体或冻干保

存。

2.鉴定: 先根据菌落形态、绿菌素、革兰氏染色和生蟹味,初步鉴定为绿脓杆菌。然后用诊断血清作凝集反应,阳性者即可确定为绿脓杆菌,并定出它所属的血清型。与诊断血清不凝集者,再用乙酰胺酶法<sup>[10,11]</sup>进行复试。阳性者为绿脓杆菌。

结 果

(一) 血清型的分布

869 株绿脓杆菌分型结果,如表 1 所见,前 4 个型和 7、8、9 型的分布较多,其中 3 型的分布最多,而 5、6 和 10、11 型的分布较少。西藏拉萨地区例外,未见到 3 型,以 9 型分布的最多。由此看来,地理条件不同,分布规律也有差异。其分布的百分率,如图 1 所示,前 4 型分布各自为 10.4%、8.3%、23.6% 和 16.7%,共为 59%,7、8、9 型分布各为 7.7%、8.2% 和 15.4%,共为 31.3%,仅次于前 4 个型,占第二位。

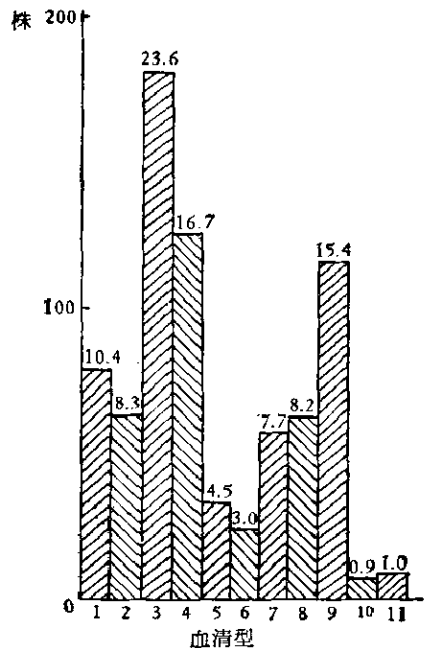


图 1 762 株绿脓杆菌血清型分布百分率

表 1 绿脓杆菌血清型的分布

省、市、区	和一个血清型凝集的菌株数											和二个以上血清型凝集的菌株数	自凝株数	不凝集株数	菌株数
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11				
北 京	3	3	11	17	6		5	4	9			13			71
上 海	18	6	22	14	7	4	8	22	14	1	1	16		2	145
天 津	2		1			1						1			5
黑龙江	20	25	66	21	4	1	15	3	25	2	1	14	2	1	200
吉林	1	2	30	21	2	4	10	15	19			4		1	109
辽宁	4	10	21	9	1		4	4	8	3		8	1		78
河南	10	10	13	17	2	3	6	3	4			9	1		78
江苏			1	2	1		2	1	5			3			15
广东	2			2				2				3			9
湖南	2	1	1	1	1			3				3			12
湖北			1	2			2					1			6
四川	7	2	4	6		1	2	2	5			8		1	38
新疆	1		1	3	2	2	2		1			1			13
甘肃		3	7	3	1			3	2			1			20
宁夏			1	3			2		1			2			9
拉萨		2		6	7	7	1	1	24	1	6	9	2		66
菌株数	80	64	180	121	34	23	59	63	117	7	8	96	6	5	869
	762														
分型率(%)	87.7											11.0	0.7	0.6	
总分型率(%)	98.7												1.3		

## (二) 血清型及其分型率

869 株中, 762 株(87.7%)与一个血清型凝集, 96 株(11%)与 2 个或 2 个以上型血清凝集, 自凝者 6 株(0.7%), 不凝集者 5 株(0.6%)。分型率为 98.7%。

## (三) Fisher 的 7 个免疫型与我国 11 个血清型的比较

用我国的 11 个绿脓杆菌分型血清, 对 Fisher 的 7 个免疫型代表株, 进行血清分型。结果如表 2 所示。Fisher 的 7 个型代表株中的 5 个型(I、II、IV、VI 和 VII)与我国的绿脓杆菌标准株有交叉凝集。仅 III、V 和两株无交叉凝集。

## (四) 两个血清型以上凝集的菌株的型分布

如表 3 所示, 在 7 个主要省市的两个血清型以上凝集的 80 株菌中, 与两个型凝

表 2 我国绿脓杆菌血清型与 Fisher 免疫型比较

Fisher 免疫型	中国的血清型 (C)
F-I	C-5, C-4, (C-1)*
F-II	C-1, C-11
F-III	—
F-IV	C-7
F-V	—
F-VI	C-8
F-VII	C-3

\* 括号内表示弱凝集

集的有 55 株(68.8%), 而与六、七个型凝集的仅各有 1 株(1.25%)。从交叉凝集的型分布看, 与 1、4、7、11 型交叉凝集的机率较高, 与 3、8、10 型交叉凝集的机率就小。

## 讨 论

各国绿脓杆菌血清型, 是相对稳定的。但日本的例外, 不断变化, 从 10 个型<sup>[12]</sup>到

表 3 两个血清型以上凝集菌株的型分布

省、市	菌株数	血清型别及交叉凝集型分布											血清型数						
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	2	3	4	5	6	7	
北 京	18	8	4	0	5	5	5	7	1	4	1	3	12	5	1	0	0	0	
上 海	16	11	1	0	7	7	2	8	0	2	0	2	10	5	1	0	0	0	
黑 龙 江	15	7	5	4	6	6	4	5	0	4	0	4	9	3	0	1	1	1	
辽 宁	7	2	4	1	4	1	0	0	0	0	1	1	7	0	0	0	0	0	
河 南	9	6	1	0	2	1	1	3	1	2	0	2	7	2	0	0	0	0	
四 川	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	6	0	0	0	0	0	
拉 萨	9	1	0	0	4	0	5	1	2	6	1	8	4	1	3	1	0	0	
总计	80	41	15	5	26	20	17	24	4	18	3	26	55	16	5	2	1	1	
%													68.75	20.0	6.25	2.5	1.25	1.25	

14 个型<sup>[5]</sup>、16 个型<sup>[13]</sup>，又从 17 个型归纳为 13 个型别<sup>[14]</sup>。我国的绿脓杆菌为 11 个血清型<sup>[1,2]</sup>。

本间<sup>[14]</sup>报告菌株在室温下长期放置后，可发生血清型的改变和血清型的多样性。如 N<sub>16</sub> 株在室温长期放置 3 型变为 9 型。又如从一个株选取 35 个菌落的纯培养物，其中 2 株是 9 型，7 株是 8 型，2 株是 2 型，1 株是 3 型，2 株是 1 型，2 株不凝集。这种现象应引起注意和进一步研究。

Muraschi<sup>[15]</sup> 概括比较了世界不同地区的绿脓杆菌血清型分布情况，认为德国、英国、挪威、美国和东南亚等国家的动物来源的和人来源的绿脓杆菌“O”抗原分布和血清型分布是类似的。日本分布的最多的是 8、10 和 5 型。其分布机率分别为 27.1—39%、11—14.4% 和 9—30.7%<sup>[16-18]</sup>。袁昕等<sup>[1]</sup> 报告，前 4 型的分布机率高（占 79.8%），其中 1 型最高（占 53.4%）。赵仲芳报告<sup>[2]</sup>，前 3 型分布机率最高（占 43.9%）。他们均认为 5、11 型分布少。本试验结果亦证实我国的绿脓杆菌血清型的分布规律为：前 4 个型分布最高。5、6、10 和 11 型分布极少。

由表 2 可见，Fisher 7 个免疫型株，除

3 和 5 型外，均与我国的血清发生交叉凝集。说明“O”抗原有共同性。推测可能有相同的血清型分布。

由于分型方法的改进和分型血清的完备，血清型分型率越来越高。日本的分型率为 88—94.6%<sup>[4,6,16,17]</sup>，苏联的分型率为 90%<sup>[19]</sup>，袁昕等报告我国的分型率为 87.2—88%<sup>[1,2]</sup>，本试验的分型率为 98.7%。

绿脓杆菌引起交叉感染的因素，除本菌传播途径的多样性、分布的广泛性、耐药性等因素外，其对水的污染，已逐渐引起人们的重视。儿玉报道<sup>[18]</sup>，富岗市内三个河水的检菌率为 86.7%，同时血清型别同临床上分布的类似，即 8、10 和 5 型分布的多。因此，提出环境和病人之间交叉循环中，水可能起重要的作用。

当一个地方出现好多同一个型的菌株，需要进一步分型时，只靠血清型就不可能，而有必要用噬菌体或绿脓菌素分型<sup>[20,21]</sup>。

交叉凝集与菌血清型分布的关系不大，因为型分布机率高的 3 型，8 型很少发生交叉凝集，而分布机率极少的 11、5、6 型交叉凝集分布机率反而高。交叉凝集的出现可能与抗血清吸收不彻底，或一般方法不能提纯 11 型血清所致。分型血清的完

善,可减少交叉凝集。

### 参 考 文 献

- [1] 袁昕等: 人民军医(增刊), 2: 28, 1963。
- [2] 赵仲芳: 中华医学杂志, 51(5): 307, 1965。
- [3] Homma, J. Y. et al.: *Japan J. Exp. Med.*, 21: 375, 1951。
- [4] Homma, J. Y.: *Japan J. Exp. Med.*, 40(5): 347, 1970。
- [5] Homma, J. Y.: et al.: *Japan Exp. Med.*, 41: 89, 1971。
- [6] 本间逊: 感染症学杂志, 46: 189, 1972。
- [7] Fisher, M. W.: *J. Bacteriol.*, 98: 835, 1969。
- [8] Waisbren, B. A. et al.: *Research in Burns*, 221, 1970。
- [9] Crowder, J. G. et al.: *J. Lab. Clin. Med.*,

- 79: 47, 1972。
- [10] 五岛瑳智子: 日本细菌学雑誌, 27(5): 621, 1972。
- [11] Taketoshi, A.: *Japan Microbiol.*, 14(4): 279, 1970。
- [12] 本间逊: 日本细菌学雑誌, 25: 379, 1970。
- [13] 西村忠史: 感染症学雑誌, 48(12): 489, 1974。
- [14] Homma, J. Y. et al.: *Japan J. Exp. Med.*, 42(2): 171, 1972。
- [15] Muraschi, T. F. et al.: *J. Inf. Dis.*, 116: 84, 1966。
- [16] 滝上正: 诊断と治疗, 61(7): 1, 1973。
- [17] 藤田晃三: 他: 感染症学雑誌, 48: 57, 1974。
- [18] 儿玉博英: 他: 感染症学雑誌, 48(10): 385, 1974。
- [19] Колкер, H. H.: Ж. М. Э. Н., p52, 1973。
- [20] 内藤达朗: 绿脓菌とその感染症, 312, 1975。
- [21] 内藤达朗: 绿脓菌とその感染症, 316, 1975。

## STUDIES ON SEROTYPES OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Department of Immunology, Institute of Applied Microbiology  
(Harbin)

The Chinese People's Liberation Army No. 59171

869 strains of *Pseudomonas aeruginosa* from more than 100 hospitals distributed in 16 provinces were collected. Serological typing of 98.7% of the collected strains were carried out. The first 4 types distributed most widely (about 59.0%), types 7, 8 and 9 were next wide in distribution (31.3%), while types 5, 6, 10 and 11 had only very limited distribution. The I, II, IV, VI and VII

among Fisher's 7 immunological type strains cross agglutinated with the serological types of our country. But there were no cross agglutination reaction for strains III and V. A more detailed description of the serological typing methods were given, and using the methods in epidemiological and ecological studies was discussed.