

小肠结肠炎耶尔森氏菌血清群的研究

I. “不能定群”菌株抗原性的研究

李 笃 唐 乔 红 星

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

应用凝集素吸收试验和间接血凝试验, 检定国内新分离的耶氏菌血清学试验中, 有 28 株菌同现使用的 51 种(O: 抗原因子为 1(1、2a、3)、2(2a、2b、3)、3、4.32、4.33、5、5.27、6.30、6.31、7.8、8、9、10、10(kl)、11.23、11.24、12.25、12.26、13.7、14、15、16、16.29、17、18、19.8、20、21、22、25.35、28、35、36、37、38、39、40、41.42、41.43、44、44.45、46、47、48、49.51、50.51、52、52.53、52.54、55、57) 参考耶氏菌分群血清均不呈凝集阳性反应, 从中选出 8 株代表株进行抗原性试验。根据抗原性试验的分析证实, 这些代表菌株之间抗原性是不同的, 其菌号命名为 BC(1413)、BC(88)、BC(89)、BC(12)、BC(18)、BC(66)、BC(777)、BC(F37), 并表明与 51 种群参考菌株的抗原也不相同, 初步确认的 8 株菌属不同 O 抗原的新血清群菌株。

关键词 小肠结肠炎耶尔森氏菌

近年来, 小肠结肠炎耶尔森氏菌(以下简称耶氏菌) 在国内是已被重视的病原菌之一, 成功的分离到本菌的报告也逐年增多^[1-3]。新分离菌株的血清群以 O:3 为最多, 其次为 O:9、O:5, 但也有其他血清群株, 可涉及到 20 余个, 依地区不同差异较大。

目前, 国内应用的耶氏菌参考分群血清是用国外引进的分群参考菌株制备的, 共有 51 个 O 抗原群(1、2、3、4.32、4.33、5、5.27、6.30、6.31、7.8、8、9、10、10(kl)、11.23、11.24、12.25、12.26、13.7、14、15、16、16.29、17、18、19.8、20、21、22、25.35、28、35、36、37、38、39、40、41.42、41.43、44、44.45、46、47、48、49.51、50.51、52、52.53、52.54、55、57)。实际应用结果表明, 这套分群血清对新分离的耶氏菌株可作出定群的占 88.5% 以上。然而尚有少量菌株与分群血清不发生凝集反应或即使凝集, 效价也很低,

11.5% 达不到特异性凝集效价。对不凝集菌株命名为“不能定群”菌株。并从 28 株中筛选出 8 株代表株, 菌号为 BC(1413)、BC(88)、BC(89)、BC(12)、BC(18)、BC(66)、BC(777)、BC(F37), 对此 8 株的抗原性进行了试验。

材 料 和 方 法

(一) 菌株

来自国内 14 个省(市)、地、县卫生防疫、医疗、教学、科研等单位, 从人和动物粪便、食品、环境等分离送检的菌株, 按常规方法进行检定。培养基系用普通琼脂, 25℃ 培养 48 小时, 菌落呈无色透明或半透明, 圆形隆起、光滑湿润, 边缘整齐有光泽。能分解葡萄糖、麦芽糖、甘露醇、蔗糖、纤维二糖、草糖、阿拉伯糖、山梨醇、半乳糖, 不分解福寿草醇、卫矛醇、鼠李糖, 不分解或迟缓分解乳糖。水杨素分解不定, 七叶苷水解不定。丙二酸钠和柠檬酸盐不利用, 苯丙氨酸脱氨阴性, MR 反

本文于 1985 年 4 月 25 日收到。

王玉亭同志参加部分试验工作, 特此致谢。

应及硝酸盐还原为阳性。对“不能定群”的 8 株代表株, 分别制备出血清。

(二) 抗血清制备

选出的 8 株代表株, 接种于适宜琼脂培养基上, 25℃ 培养 48 小时, 用生理盐水制成菌悬液, 煮沸 2.5 小时或 10 磅 20 分灭菌处理后, 用本所生产的玻璃粉比浊标准管, 以肉眼比浊制成 50 亿/ml 菌体浊度。耳静脉注射于体重 2,500—3,000g 的健康家兔, 免疫程序为每周 2 次, 每次间隔 3 天, 共 5 次。末次免疫后第 7 天试血, 合格后颈动脉放血, 分离血清除去补体与类属凝集素, 凝集素效价最终不低于 1,280 倍。

(三) 凝集素吸收试验

吸收菌接种于适宜琼脂培养基上, 25℃ 48 小时, 用生理盐水制成菌悬液, 以 0.2% 福尔马林杀菌, 经无菌试验合格, 再用生理盐水 1—2 次洗涤后备用。吸收试验采用每毫升血清中加入 0.2 g 菌体, 充分摇匀, 置 37℃ 水浴中 3—4 小时, 经常摇动。然后放冰箱内过夜, 次日 3,000 转/分离心 30 分钟, 测血清中凝集反应的改变, 一次吸收不彻底, 可重复吸收, 直至抗血清中不与相应吸收抗原出现凝集阳性为止。

(四) 间接血凝试验

致敏红细胞用的抗原制备, 是用超声波将菌体粉碎, 在显微镜下检查证实后, 取上清液用于致

敏红细胞。

对红细胞的处理方法, 一种是用新鲜红细胞经生理盐水洗涤 3 次, 用 PBS 液配成含有 2% 红细胞悬液。另一种是经甲醛固定后鞣化。两种悬液均用等量菌液混合, 置 37℃ 水浴中 1 小时后, 反复离心, 以生理盐水洗涤 2—3 次, 除净多余抗原, 配制成含有 0.5% 红细胞悬液。

结 果

(一) 8 株“不能定群”菌株的生化特性

8 株代表株, 除形态、培养特性及菌落性状符合耶氏菌的特征外, 并用耶氏菌参考株进一步根据生化特性加以证实, 结果见表 1。

从表 1 的生化试验结果看出, 8 株代表株与耶氏菌参考对照株的生化反应结果符合。根据 Nilchn 或 Wauters 氏的生物学分型法符合 1—4 生物型。

(二) 8 株菌的抗原性分析

应用现使用的耶氏菌 51 个参考群血清检定 8 株代表株, 结果均不呈现凝集反应, 表明已知各群血清中不含有此 8 株菌

表 1 8 株代表菌株的生化反应结果

Table 1 Biochemical reactions for cultures of 8 representative strains

菌株 Strain	三糖铁 TSI	脲酶 Urease	靛基质 Indole	灵叶 Aesculin	柠檬酸盐 Citrate	氨基酸 Ornithine	从碳水化合物产酸 Acid from carbohydrates:							
							蔗糖 Sucose	木糖 Xylose	鼠李糖 Rhamnose	山梨醇 Sorbitol	纤维二糖 Cellobiose	蜜二糖 Melibiose	棉子糖 Raffinose	水杨苷 Salicin
BC(1413)	A/A	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
BC(88)	A/A	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-
BC(89)	A/A	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
BC(12)	A/A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
BC(18)	A/A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
BC(66)	A/A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
BC(777)	A/A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
BC(F37)	A/A	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+
Y.e(203)	A/A	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-
Y. pseu.	K/A	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+

注: 25℃

表 2 8 株菌的玻片凝集试验
Table 2 Slide agglutination of strains

菌 株 Strain	抗血清 (20×) Antiserum of							
	BC(1413)	BC(88)	BC(89)	BC(12)	BC(18)	BC(66)	BC(777)	BC(F37)
BC(1413)	++++	+	-	-	-	-	-	-
BC(88)	+	++++	-	-	-	-	-	-
BC(89)	-	+	++++	+	-	-	-	-
BC(12)	-	-	-	++++	+	+	-	-
BC(18)	-	-	-	-	+++	-	-	-
BC(66)	+	+	-	-	+	++++	-	-
BC(777)	-	-	-	-	-	-	++++	-
BC(F37)	-	-	-	-	-	-	-	++++

的相应凝集素。为了对此 8 株菌的抗原进一步了解,分别制备出抗血清,并作交叉玻片凝集试验,结果见表 2。

表 2 结果表明, 8 株代表株之间的玻片凝集试验均与本菌的相对应抗血清呈较强的凝集反应,除 BC(18) 的凝集程度定为+++外,其余 7 株均达到++++。但在代表株之间也有类属交叉,如 BC(88) 抗血清与 BC(89)、BC(1413)、BC(66) 抗原; BC(1413) 抗血清与 BC(88)、BC(66) 抗原; BC(66) 抗血清与 BC(12) 抗原; BC(12) 抗血清与 BC(89) 抗原,以及 BC(18) 抗血清与 BC(12)、BC(66) 抗原之间均有较弱的交叉凝集反应。仅有 BC(12) 抗血清与 BC(66) 抗原的交叉凝集反应较高(++)。

结果说明,此 8 株菌中均含有各不相同的抗原因子。

(三) 8 株菌的交叉试管凝集试验

根据玻片交叉凝集的试验结果,为了进一步验证,作了试管凝集试验,结果见表 3。

从表 3 的结果看出, 8 株代表株的抗血清与其相对应抗原试管凝集试验的效价均达到 1.280 × 以上,但也看出在各株(群)之间有交叉类属凝集。除 BC(18) 抗血清与 BC(66) 抗原的交叉滴度达 640 × 外,一般都在 160 × 以下,属低滴度交叉。另外还有 320 × 的,对此种群间交叉反应,除用吸收方法处理外,还可用较高稀释血清的方法加以消除,因此对特异性定群结

表 3 8 株菌的试管交叉凝集试验
Table 3 Tube cross agglutination of 8 strains

抗 血 清 Antiserum	抗 原 Antigen							
	BC(1413)	BC(88)	BC(89)	BC(12)	BC(18)	BC(66)	BC(777)	BC(F37)
BC(1413)	2560	—	160	—	—	—	—	—
BC(88)	160	2560	320	—	160	320	—	—
BC(89)	—	—	2560	160	—	160	—	—
BC(12)	160	—	320	1280	—	160	—	—
BC(18)	160	—	160	320	1280	640	—	—
BC(66)	—	—	—	320	—	2560	—	—
BC(777)	—	—	—	—	—	—	2560	—
BC(F37)	—	160	—	—	160	320	—	2560

表 4 交叉吸收凝集试验

Table 4 Cross agglutination absorption tests

抗血清 Antiserum	吸收菌 Strain	抗 原 Antigen							
		BC(1413)	BC(88)	BC(89)	BC(12)	BC(18)	BC(66)	BC(777)	BC(F37)
BC(1413)	BC(1413)	—	—	—	—	—	—	—	—
BC(88)	BC(88)	—	—	—	—	160	320	—	—
BC(89)	BC(89)	—	—	—	160	—	640	—	—
BC(12)	BC(12)	160	—	—	—	—	160	—	—
BC(18)	BC(18)	160	—	—	320	—	640	—	—
BC(66)	BC(66)	—	—	—	640	640	—	160	—
BC(777)	BC(777)	—	—	—	—	—	—	—	—
BC(F37)	BC(F37)	—	—	—	—	—	160	—	—
血清原效价	—	2560	2560	2560	1280	2560	2560	2560	2560

注：80×以下判为阴性。

果判定并无影响。

(四) 交叉吸收凝集试验

为了进一步肯定代表菌株的抗原性，作了交叉吸收试验。将抗血清与相对应的菌株作吸收原进行吸收，直至与吸收菌不出现凝集反应为止，即将抗血清中的特异性凝集素全吸收干净，然后检查血清中的凝集素情况(表4)。

从表4可见，8株代表株抗血清，经过本抗原吸收后的试管交叉凝集，抗血清与相对应的抗原凝集反应均为阴性。说明其凝集抗原与血清中的凝集素是一致的，也初步看出在各株(群)之间的类属关系中，

各自的抗原性不同，其类属凝集也较低。即使通过本菌吸收后，其它类属交叉凝集滴度并无明显改变，表明此8株菌的抗原特性都各自含有独立的异种群抗原成份。

(五) 间接血凝试验

用8株代表菌株，再致敏红细胞，以间接血凝方法进一步试验。将绵羊红细胞，经甲醛固定鞣化后进行致敏(表5)。

表5中间接血凝试验结果，进一步证明了8株代表株的抗原性是不同的，与凝集试验的结果完全一致。但血凝试验检定耶氏菌又比凝集试验方法较好，因血凝反应中出现交叉反应少或不出现。

表 5 8株菌的间接血凝试验

Table 5 Indirect hemagglutination reaction of 8 strains

致敏红细胞抗原 RBC sensitized	抗血清 Antiserum of							
	BC(1413)	BC(88)	BC(89)	BC(12)	BC(18)	BC(66)	BC(777)	BC(F37)
BC(1413)	2560	—	—	—	—	—	—	—
BC(88)	—	2560	—	—	—	—	—	—
BC(89)	—	—	1280	—	—	—	—	—
BC(12)	—	—	—	1280	—	—	—	—
BC(18)	—	—	—	—	1280	—	—	—
BC(66)	—	—	—	—	—	1280	—	—
BC(777)	—	—	—	—	—	—	10240	—
BC(F37)	—	—	—	—	—	—	—	10240

讨 论

耶氏菌的血清学分型,早在 1967 年 Winblad 已报道,分 8 个 O 抗原因子^[4]。1972 年 Wauters 又报道了 O 抗原因子分 44 个,群抗原分为 22 个^[5],并作为国际上通用的分群参考。耶氏菌的血清学分群,对于细菌学实验室诊断,流行病学调查以及病原学研究都起到积极作用。以后新的耶氏菌群不断增加,根据一些文献认为,耶氏菌的 O 抗原群,目前已增加到有 54 个^[6],但对新的分群菌株是否都为国际上公认,我们尚未查到确切的资料。

目前国内使用的耶氏菌分群血清,主要是国外引进的参考分群菌株研制的分群抗血清 51 种,其中有混合群 G.1 (O:1. 2. 3),提供国内诊断耶氏菌。几年来应用本分群血清,已鉴定出不少新分离的耶氏菌株,定群率达 88.5%。但在实际工作中,尚有少部分菌株(约 11% 左右)与这 51 种分群血清的凝集试验结果为阴性,称此类菌株为“不能定群”株。我们为了弄清这些“不能定群”菌株的抗原特性,首先通过筛选出 8 株代表株,分离来源为:儿童腹泻粪便 1 株,蝇体 2 株,猪舌 1 株,猪粪便 1 株,污水 2 株,沟鼠 1 株,并制备出抗血清进行试验研究。根据凝集试验与间接血凝试验的结果完全一致。说明此 8 株菌的抗原成份有明显差异,并与国外引进的 51 株菌的抗原成份各不相同,它们具有独立的特异性抗原因子。虽然从凝集试验的结果出现有群(株)间若干交叉凝集,但都比较低,属非特异性凝集,对结果的判定并无影响,而

且用一种交叉凝集菌的抗原经过凝集素吸收后,使抗血清中的交叉凝集素被吸收净,表明此 8 株菌含有较高的群特异和种特异性。

8 个新血清群的初步建立,它不仅符合我国实际情况,且在国际分群的基础上,还作了补充。目前,我们收集的国内新分离出的耶氏菌尚不多,在 276 株中发现有 28 株为“不能定群”株,其中以 BC(777)占多数(约为 26%)。新血清群的补充,有利于今后耶氏菌的及时定群。

间接血凝试验中,对红细胞的处理上,我们采用了两种方法并作了比较。结果表明,用新鲜红细胞直接致敏的抗原,比经过甲醛固定鞣化后的红细胞再以抗原致敏的血凝滴度高,但特异性差,群间交叉滴度也高。而甲醛固定鞣化处理后的致敏红细胞,其血凝滴度虽不太高,但用它比凝集试验的结果好,尤其在特异性方面,一般无群间交叉反应。因此,我们认为对耶氏菌的检定,采用甲醛固定鞣化后的致敏红细胞作血凝试验,较一般凝集试验优越。

参 考 文 献

- [1] 李笃唐等: 中华微生物学和免疫学杂志, 1(3): 156—160, 1982。
- [2] 陈亢川等: 同上, 1(3): 160, 1982。
- [3] 贺桂琴等: 河北医学院学报, 2(5): 83—85, 1984。
- [4] Winblad, S.: *Acta Path Microbiol. Scand. Suppl.*, 187: 115, 1967。
- [5] Wauters, G.: *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 122 (5): 951, 1972。
- [6] Donald, A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, Oct., 20(4): 831—832, 1984。

STUDIES ON THE SEROGROUP OF *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

I. INVESTIGATIONS ON THE ANTIGENICITY OF “NON-GROUPABLE” STRAINS

Li Dutang Qiao Hongxing

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

This paper reports the results of determinant antigen of *Y. enterocolitica* of non-groupable strains by means of agglutination absorption and indirect hemagglutination tests. These strains were isolated in China and they were found unagglutinable with 51 sera O: factors 1, 2, 3, 4.32, 4.33, 5, 5.27, 6.30, 6.31, 7.8, 8, 9, 10, 10(K1), 11.23, 11.24, 12.25, 12.26, 13.7, 14, 15, 16, 16.29, 17, 18, 19.8, 20, 21, 22, 25.35, 28, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41.42, 41.43, 44, 44.45, 46, 47, 48, 49.51, 50.51, 52, 52.53, 52.54, 55, 57 of

Y. enterocolitica reference groups.

According to analysis of serological properties of 8 strains i.e. group BC(1413), BC(88), BC(89), BC(12), BC(18), BC(66), BC(777), BC(F37), it has been clearly proven that they are different from those 51 classical groups. Therefore, these 8 strains may be preliminarily recognized as 8 new serological groups.

Key word

Yersinia enterocolitica