

中国肺炎链球菌标准菌株的筛选和建立

张丽娟 袁曾麟 杜宗利 肖忆梅 丁绍卿

(中国药品生物制品检定所, 北京)

对我国自行分离的 737 株肺炎链球菌, 依据生物学特性、地区分布及血清学分型进行筛选, 选出 297 株具有典型特征的肺炎链球菌, 建立了我国肺炎链球菌标准菌株。共分成 42 个群(型), 其中有我国自行分离并保藏的二株国际上首次发现的新型 10C 和 16A 致病性肺炎链球菌, 以及国际上多年来未见到的 19C 型、22A 型和仅在亚洲分离到的 33C 型菌株。研究肺炎链球菌的血清学分型(群), 建立标准分型菌株不仅有分类学的重要价值, 而且对研究肺炎链球菌疾病的防治具有重要意义。

关键词 肺炎链球菌; 菌型(群)

肺炎链球菌是引起肺部感染, 婴幼儿及儿童急性化脓性中耳炎和细菌性脑膜炎的重要病原菌, 也常常引起关节炎、心内膜炎、胸膜炎、腹膜炎、眼部疾患、脓胸及皮肤感染等疾病, 严重危害人民的健康, 尤其对老年人及婴幼儿危害更甚, 病死率较高^[1-5]。建立肺炎链球菌分型(群)标准菌株, 在科学研究、疾病防治中有重要意义。我们对收集的 737 株肺炎链球菌进行了我国标准肺炎链球菌的筛选和建株。

材料和方法

(一) 菌种

从北京、天津、上海、辽宁、山东、河南、山西、宁夏、江苏、湖北、安徽、四川、贵州、江西、广东、广西、云南等 17 个省市患者的脑脊髓液、血液、中耳液及其它体液和分泌物标本中分离出的 737 株菌。菌种采用冷冻真空干燥保存。

菌种培养及检定用 5% 脱纤维羊血琼脂, 2% 健康兔血清葡萄糖肉汁, 5 种生化培养基及各种试剂, 制备方法见文献[6]。

(二) 筛选标准及方法

在 5% 脱纤维羊血琼脂培养基上形成

α -溶血、灰白、半透明、圆形、表面光滑、湿润、边缘整齐的小菌落。随着培养时间延长, 有些菌株发生自溶而使其菌落中心下陷。肺炎链球菌是一种典型的有明显荚膜的革兰氏阳性双球菌, 不形成芽孢, 无鞭毛。在血清肉汁中呈混浊生长, 在普通肉汁中不生长或生长不良。在 10% 二氧化碳环境中生长良好。发酵葡萄糖、棉子糖、菊糖及蜜二糖, 产酸不产气, 不发酵山梨醇, 胆汁溶菌试验及 optochin 敏感试验阳性。以荚膜肿胀试验进行血清学分型。

筛选方法: 采用菌落、菌形、生长特征、鉴别性生化反应, 荚膜检查、胆汁溶菌试验、optochin 敏感试验等生物学特性检定, 初步确定为肺炎链球菌后, 再以荚膜肿胀试验进行血清学分型。

结 果

从不同地区及各类标本来源的菌株中筛选建立标准菌株。按照筛选标准的要求, 从 737 株肺炎链球菌中初选出 324 株, 经反复检定、比较, 进一步筛选出 297 株具

本文于 1989 年 12 月 15 日收到。

有典型特征的肺炎链球菌。这 297 株肺炎链球菌均为 α -溶血,有荚膜和典型的形态,胆汁溶菌及 optochin 敏感试验阳性率为 100%;鉴别生化反应结果见表 1。葡萄糖及棉子糖发酵阳性率 100%;菊糖发酵阳性率为 83.83%,蜜二糖发酵阳性率为 99.33%,山梨醇不发酵者占 96.97%。

表 1 297 株肺炎链球菌特征生化反应
Table 1 Typical biochemical identification of 297 pneumococcal strains

糖 类 Substrate utilization	阳 性 Positive		阴 性 Negative	
	株 数 Number	(%)	株 数 Number	(%)
葡萄糖 Glucose	297	100	0	0
棉子糖 Raffinose	297	100	0	0
菊 糖 Inulin	249	83.83	48	16.17
蜜二糖 Melibiose	295	99.33	2	0.67
山梨醇 Sorbitol	9	3.03	288	96.97

注: 阴性 1—14 天不产酸。
Negative: No acid produced during 1—14 day's incubation.

上述 297 株菌来源于北京 (56 株)、天

津 (23 株)、上海 (9 株)、辽宁 (22 株)、山东 (21 株)、河南 (4 株)、山西 (3 株)、宁夏 (2 株)、江苏 (37 株)、湖北 (39 株)、安徽 (13 株)、四川 (14 株)、贵州 (37 株)、江西 (9 株)、广东 (1 株)、广西 (2 株)、云南 (5 株)。其中来自中耳液 97 株,脑脊髓液 80 株,血液 42 株,鼻分泌物 13 株,眼分泌物 12 株,胸水 8 株,腹腔积液 6 株,脓汁 6 株,上颌窦液 6 株,支气管冲洗物 5 株,痰液 5 株,鼻窦穿刺液 3 株,肺泡液 2 株,硬膜下积液 2 株,泪囊分泌物 2 株,咽拭子 2 株,囊肿液 2 株,关节液 1 株,骨髓液 1 株,腮腺液 1 株,皮肤感染面液 1 株,反映了我国肺炎链球菌性疾病的致病性和广泛分布。

采用荚膜肿胀试验对上述 297 株肺炎链球菌进行了血清学分型,结果见表 2。这 297 株菌分为 42 个群(型)。其中 19 群、1 型、6 群、15 群、23 群、5 型及 14 型最多。25 群、32 群、38 型及 41 群仅各 1 株。

按照 WHO 推荐采用的丹麦分类方法,选出的 297 株肺炎链球菌标准菌株分为 42 个血清群(型),67 个血清型。包括 1 型,2 型,3 型,4 型,5 型,6 群 (6A 型、6B 型),7 群 (7F 型、7C 型),8 型,9 群

表 2 297 株肺炎链球菌血清型分布
Table 2 Serotype (group) distribution of 297 pneumococcal strains

型 Type (群) Group	菌株数 Number	型 Type (群) Group	菌株数 Number	型 Type (群) Group	菌株数 Number	型 Type (群) Group	菌株数 Number
1	18	12	9	23	15	36	3
2	12	13	2	24	3	37	2
3	6	14	14	25	1	38	1
4	4	15	16	27	7	39	5
5	14	16	2	28	6	41	1
6	18	17	2	29	6	43	2
7	10	18	11	31	3	45	2
8	9	19	20	32	1	46	5
9	5	20	4	33	13	48	3
10	7	21	8	34	5		
11	5	22	4	35	13		

(9N 型、9V 型), 10 群 (10F 型、10A 型、10C 型), 11 群 (11A 型、11B 型、11C 型), 12 群 (12F 型、12A 型), 13 型, 14 型, 15 群 (15F 型、15A 型、15B 型、15C 型), 16 群 (16F 型、16A 型), 17 群 (17F 型), 18 群 (18F 型、18A 型、18B 型、18C 型), 19 群 (19F 型、19A 型、19C 型), 20 型, 21 型, 22 群 (22A 型), 23 群 (23F 型、23A 型、23B 型), 24 群 (24F 型), 25 型, 27 型, 28 群 (28F 型、28A 型), 29 型, 31 型, 32 群 (32A 型), 33 群 (33F 型、33B 型、33C 型), 34 型, 35 群 (35F 型、35A 型、35B 型、35C 型), 36 型, 37 型, 38 型, 39 型, 41 群 (41F 型), 43 型, 45 型, 46 型, 48 型。其中有我国自行分离并保藏的二株国际上首次发现的新型 10C 和 16A 致病性肺炎链球菌, 以及国际上多年来未见到的 19C 型和 22A 型和仅在亚洲才分离到的 33C 型菌株。选入国家标准的肺炎链球菌标准菌株 297 株, 按照中国医学细菌保藏管理中心的要求编号为 CMCC (B) 31401—31999, 现保存在中国医学细菌保藏管理中心(北京)。

讨 论

肺炎链球菌引起急性呼吸道传染病及急性中耳炎等疾病, 严重危害人类的健康。由于近年来对抗生素耐药菌株的出现, 给临床治疗造成了困难和严重后果。引起各种疾病的肺炎链球菌血清型别不同。1967—1980 年美国从血液分离出的 4335 株菌中 8 型最多见, 14 岁以下儿童以 14 型最多, 而从脑脊髓液中分离出的 519 株菌株中 6 型最多见, 从中耳液中分离出的 1360 株菌以 19 群和 23 群最多。法国从血液分离出的菌株 1 型最多, 从脑脊髓液分离出的菌株以 19 群最多, 其它国家分离出的菌株的菌型也各自不同。我国从血液中

分离出的菌株 1 型最多, 从脑脊髓液中分离出的菌株 2 型最多, 从中耳液中分离出的菌株 19 群最多。在我国 2 及 5 型也是最常见的菌株, 这与美国、英国、法国等不同^[7-9]。但各国报告引起肺炎链球菌性疾病的多为常见的 7—10 个血清型, 各血清型菌株引起的疾病在临床表现、治疗及病死率都有差别。因此, 研究肺炎链球菌的血清学分型, 建立标准的分型菌株, 不仅有分类学的重要价值, 而且对研究肺炎链球菌性疾病的防治也有重要意义。

肺炎链球菌的分类方法主要有丹麦 Lund 和美国 Eddy 两种分类系统。Lund 分类是把共同抗原的菌型归于同一个血清群, 用数字表示群, 而用数字后加大写英文字母表示型别。Eddy 分类则是按照菌株检定的顺序用数字命名。Lund 分类系统已有 46 个群 83 个型。Eddy 分类系统为 84 个型。WHO 推荐 Lund 分类方法。本文报告的标准菌株共有 42 个群(型), 是近年来在国际上分出型别较多的。同时首次发现了 10C 和 16A 型致病性肺炎链球菌国际上新的血清型, 使肺炎链球菌由 84 个型增加到 86 个型。还发现了国际上多年见不到的 19C 和 22A 型, 以及仅在亚洲分离到的 33C 型菌株。新型及罕见型菌株的发现, 不仅丰富了国际肺炎链球菌分类标准菌株, 完善了分类系统, 在分类学上有重要的科学价值, 而且在防治肺炎链球菌感染中也有重要的实用意义。它标志着我国肺炎链球菌的分类研究、标准菌株的建立和收藏达到了国际先进水平。

肺炎链球菌感染的特异性实验诊断方法较多, 如对流免疫电泳、酶联免疫吸附试验、放射免疫分析、SPA 协同凝集试验、免疫荧光试验及乳胶凝集试验等, 是采用检测肺炎链球菌的抗原或其抗体进行诊断和分型的。本次筛选和建立的肺炎链球菌分

型标准菌株为研制诊断试剂提供了条件。1979 年 WHO 提出了一个肺炎链球菌多糖菌苗制造及检定规程, 开展特异性预防研究。由于一些国家的菌型与我国不完全相同, 因而规定用于制造多糖菌苗的菌型也应有所不同。我国标准菌株的建立, 为研制多糖菌苗提供了参考依据。这次标准菌株是从较多的菌株中筛选和建立的, 具有地区分布广的特点, 是在我国首次建立的肺炎链球菌分型标准菌株。

参 考 文 献

[1] 丁绍卿: 国外医学 (生物制品分册), 5: 197,

1980。

- [2] 叶人邦等: 微生物学通报, 15: 65, 1988。
- [3] Laxer, R. M. and M. I. Marks: *Amer. J. Dis. Child.* 131: 850, 1977.
- [4] Klein, J. O. et al.: *Rev. Infect. Dis.* 3: 246, 1981.
- [5] Mufson, M. A. et al.: *J. A. M. A.* 246: 1942, 1981.
- [6] 丁绍卿等: 生物制品学杂志, 1: 18, 1988。
- [7] Austrian, R. et al: *Lancet*, 1: 651, 1989.
- [8] 丁绍卿: 医学研究通讯, 6: 28, 1989。
- [9] Pedersen, F. K. and J. Henriksen: *Acta. Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B.* 91: 129, 1983.

ESTABLISHMENT OF STANDARD STRAINS OF SEROTYPES (GROUPS) OF *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* IN CHINA

Zhang Lijuan Yuan Zenglin Du Zongli Xiao Yimei Ding Shaoqing

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

Streptococcus pneumoniae is an important human pathogen which is responsible for life-threatening infections such as pneumonia, bacteremia and meningitis as well as for less severe but highly prevalent diseases such as otitis media and sinusitis. The number of serogroups (types) of *Streptococcus pneumoniae* found in the world is total 46 groups or 83 types according to typing system of Statens Serum Institute, Copenhagen, Denmark. The standard strains established in our lab of 42 groups or 67 types distributed in 17 different regions in China. The significance of this study is that two of the new serotypes (10C, 16A) are first reported in the literature in which the microbes were the agents causing pneumococcal infections. Our standard strains also include some serotypes on rare occasions such as 19C and 22A and 33C which

have been found only in Asia. Our findings not only increase the total number of known types of pneumococci from 83 to 85, but also indicate that China has made progress in the field of pneumococcal research. It is the first time to report establishing a series of standard strains of pneumococci involving many serotypes (groups) in China. The work is necessary as a preliminary for pneumococcal disease prevention and treatment. The standard strains listed here with providing the resource of strain and scientific basis for developing vaccine and biological products.

Key words

Streptococcus pneumoniae; Serotype (group)