

## 类鼻疽菌血清分型

韩藕儿 李 俐 赵忠利

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

类鼻疽假单胞菌根据不耐热抗原的有无分为血清 I 型和 II 型。在没有标准血清情况下,用吸收试验,选出产不耐热抗原较好的菌株,用 Sephadex G-200 纯化抗原制备 I 型血清,用该血清对我国分离的 68 株及引进 6 株菌以琼脂扩散法,进行血清学分型。结果表明: 68 株为血清 I 型, 3 株为血清 II 型菌, 3 株不稳定。上述结果与文献报道的一致。即血清 I 型菌多存在于亚洲,血清型与菌株来源(环境、动物)无关,但与地理分布有关。

**关键词** 类鼻疽菌;血清分型

据文献报道<sup>[1]</sup>类鼻疽假单胞菌有两个血清型。I 型多存在于亚洲,具有不耐热抗原和耐热抗原; II 型主要在澳大利亚和非洲,只有耐热抗原。为了解我们保存的菌株的血清型,在没有标准品的情况下,做了两个方面的工作: 研制了分型血清;对 74 株类鼻疽菌进行了血清分型。报道如下:

### 材料与方 法

#### (一) 菌株

74 株类鼻疽菌(其中 68 株是我国广东、海南岛、广西地区分离, 2 株从越南引进, 4 株来自美国 ATCC 保存株。

#### (二) 培养基

4% 甘油琼脂。

#### (三) 抗原

1. 全菌抗原: 类鼻疽菌接种 4% 甘油琼脂罗氏瓶 37℃ 48h 培养, 加盐水 20ml 洗下菌苔, 用甲醛灭活后, 试管凝集用。

2. 加热全菌抗原: 同样方法制备的菌悬液 100℃ (流通蒸汽) 1h, 去除不耐热抗原。

3. 冻融菌体抗原: 将菌接种 4% 甘油琼脂大斜面 37℃ 培养 24—48h, 用 3ml 蒸

馏水洗下菌苔, 约含菌 350 亿/ml, 分装试管内, 分别于 -30℃、37℃ 反复冻融, 每天一次, 冻融 6 次终止。

#### (四) 抗血清

1. 抗全菌血清: 全菌抗原免疫家兔获取血清, 测抗体效价为 1:640。

2. 抗加热全菌抗原血清: 加热处理的抗原免疫家兔后获得其中抗体效价为 1:64。

#### (五) 试验方法

免疫琼脂扩散法。

### 结 果

#### (一) 选种

选出具有较多不耐热抗原的菌株。选用不同地区 8 株类鼻疽菌制备加热的全菌抗原(24 亿/ml)使与相应菌株的抗全菌血清等量混匀 4℃ 过夜吸收后, 10000r/min 离心 25min, 收集上清液, 同样方法重复一次。吸收后血清与加热抗原, 全菌抗原作试管凝集试验, 选出与加热抗原不显凝集反应效价(即对耐热抗原的抗体被完全吸收)的, 但与全菌抗原较高凝集反应(即

表 1 吸收后血清与加热菌体抗原、全菌抗原试管凝集效价

Table 1 Agglutination titer of absorbed-serum with antigens and heated-antigens of *P. pseudomallei* strains

吸收后类鼻疽血清(株) Absorbed-serum of <i>P. pseudomallei</i> strain	加热菌体抗原 Heated-antigens of <i>P. pseudomallei</i>	全菌抗原 Antigens of <i>P. pseudomallei</i> strain
350102	—	1:40
350106	—	—
350112	—	1:40
350132	—	1:80
350140	—	1:80
350149	—	1:40
350154	1:80	—
350160	1:20	1:40

含不耐热抗原较多的菌株)的菌株,用它作为制备分型血清(表 1)。

表 1 结果表明,经过加热抗原两次吸收后,仅有 2 株与该抗原有凝集反应效价,说明它们抗原含量有差异。我们选用具有较多不耐热抗原的一株(350140)作为制备分型血清的菌株。

## (二) 抗原的纯化与分型血清的制备

1. I 型抗原的纯化: 将甘油琼脂罗氏瓶培养物制成菌悬液,经超声波破碎(破壁达 90% 左右),10000r./min 离心 30min,上清液经微孔滤膜除菌,经过 Sephadex G-

200 柱层析 (60cm × 2.5cm) 分离,加样 30mg,用 0.15 mol/L pH 7.2 PBS 液洗脱,紫外监测,收集蛋白峰(即纯化抗原)与全菌血清出现两条沉淀线(a 线与 b 线),a 线为不耐热抗原,b 线为耐热抗原,与加热抗原血清出现一条沉淀线为 b 线,因此纯化抗原可确认为 I 型抗原(图 1)。

2. I 型血清的制备: 参考 A. Dodin 报道<sup>[2]</sup>的免疫方案,用以上纯化抗原多部位注射(皮内、腹腔、皮下、肌肉),注射 4 针,加上佐剂作基础免疫,以水剂作加强免疫,4 周后获得的血清抗体效价 1:32—1:

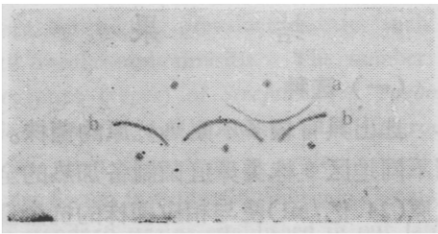


图 1 I 型抗原与加热抗原和全菌血清的双向琼脂扩散试验

Fig. 1 Bi-directional agar diffusion test of Type I antigen with serum of the heated-antigens and strains

上排: 左孔加热抗原血清;右孔全菌血清  
下排: I 型抗原

Up line: Left: serum of the heated-antigens  
Right: serum of strains  
Down line: Type I antigen

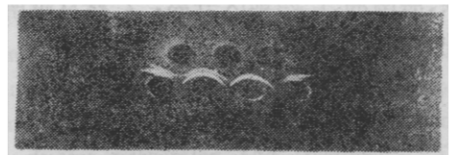


图 2 I 型血清与 I 型抗原和 I 型加热抗原的双向琼脂扩散试验

Fig. 2 Bi-directional agar diffusion test of I type serum with Type I antigen and heated-antigen of type I

上排: I 型血清  
下排(右数): 1,2 孔: I 型抗原  
3,4 孔: 加热后的 I 型抗原

Up line: I type serum  
Down line (from right): 1,2 zone: Type I antigen  
3,4 zone: Heated-antigen of type I

64, 该血清与纯化抗原在琼脂扩散试验中出现两条沉淀线 (a 线与 b 线), 纯化抗原在水浴中煮沸 30min 后, 只出现一条沉淀线 (b 线)(图 2)。

### (三) 74 株类鼻疽菌的血清分型

在琼脂双向扩散中与 I 型血清出现两条沉淀线的冻融抗原, 经流通蒸汽处理 1h 后仅剩一条线的菌被认为是具有耐热性及不耐热二种抗原的菌, 即为血清 I 型菌。抗原加热前后都只出现一条沉淀线 (耐热抗原沉淀线) 被称为血清 II 型菌, 结果与图 2 相同。三次实验的结果表明, 74 株冻融抗原中较稳定地出现两条沉淀线的菌 (68 株) 为血清 I 型, 具一条沉淀线的 (3 株) 为血清 II 型, 结果不稳定的 (3 株) 为不稳定血清型。

### (四) 血清分型的证明

用血清 II 型菌株 (350106、350164) 制备的 II 型血清分别与 3 株 II 型菌、14 株 I 型菌和 3 株不稳定株的加热前后抗原作琼脂双向扩散试验出现相同的沉淀线, 说明此两株 II 型菌仅具有耐热抗原, 上述抗原与 I 型血清作琼脂双向扩散试验时出现不同的沉淀线, II 型菌只出现一条, I 型菌则出现两条, 说明 I 型菌含有耐热和不耐热抗原, 3 株表现不稳定, 尚未定型有待进一步研究。

## 讨 论

A. Dodin 和 J. Fournier (1970) 采

用双向扩散法的免疫电泳和试管凝集方法对类鼻疽菌进行了血清分型研究, 并将该菌分为血清 I 型和 II 型。我们在没有标准分型菌株和血清的条件下, 应用吸收试验方法从不同地区的 8 株代表株中选出产不耐热抗原较强的一株菌 (350140), 此法比较简便, 效果较好。该菌经超声波破碎, 高速离心, 上清液经微孔滤膜除菌, 通过 Sephadex G-200 柱层析分离纯化抗原, 琼脂扩散与全菌血清出两条沉淀线, 与加热全菌血清只出现一条沉淀线, 说明该抗原含有不耐热和耐热两种成份。用纯化抗原免疫家兔获得 I 型血清, 该血清与纯化抗原琼脂扩散出现两条沉淀线, 此抗原加热至 100°C 经 30min 后只出现一条沉淀线, 说明 I 型血清含有两种抗体, 可用于菌株分型。冻融全菌抗原作为分型用抗原是可行的, 制备较简便, 冻融 6 次即可应用。稳定出现一条沉淀线的有 3 株为 II 型菌, 3 株不稳定偶尔出现很浅不耐热线因此未定型, 68 株为血清 I 型菌 (其中 6 株是引进的), 3 株 II 型菌是从我国分离的。血清型与地区分布有关, 而与菌株来源无关 (外界环境、感染动物), 这点与 A. Dodin 等人报道的一致。

## 参 考 文 献

- [1] Dodin, A. et al.: *Ann. Inst. Pasteur*, **119**: 211—221, 1970.
- [2] Galimad, M. et al.: *Bull. Soc. Path. Ex.*, **76**: 652—656, 1983.

## CLASSIFY SPECIES OF *PSEUDOMONAS PSEUDOMALLEI* INTO SEROTYPES

Han Ouer Li Li Zhao Zhongli

(*Institute of Microbiology, and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

Species of *P. pseudomallei* can be classified into two serotypes, serotype I and serotype II, based on whether or not it contains a thermolabile antigen beside a thermostable one. Under the condition of lack of typing serum, by means of serum absorption test, we recognized a strain which contains a major thermolabile antigen. The antigen was purified by Sephadex G-200, and it was used to inoculate rabbits. With the immunoserum at hand, we identified 68 of the domestic chinese strains and 6 of alien strains for serotyping by bi-directional agar diffusion test.

The results showed that 68 strains were identified serotype I, 3 strains serotype II, and the remaining 3 comparable with those reported indicating that strains of serotype I were found mostly in Asia, and that the serotype are unrelated to their existing environments, nor that of animal bodies, but connected with their existence in geographic distribution.

### Key words

*Pseudomonas pseudomallei*; Serotype