

铜绿假单胞菌血清学分型和铜绿菌素分型的研究

第三军医大学野战外科研究所一室 李建南* 第四军医大学临床微生物室 过祥豹 汪美先

提要 用铜绿假单胞菌12群“O”分群(型)血清和改良菌素分型法对西安地区118株铜绿假单胞菌分型。结果表明,以Ⅵ、I、Ⅲ群分布最多,Ⅵ群多见于伤口感染、I群多见于呼吸道感染。菌素分型以1型和UT型为主,1型中主要是1/c和1/x亚型,85.7%的1/c亚型属血清Ⅵ群,84.4%的1/x亚型属血清I群,似表明两者之间有一定关系。

关键词 血清型 菌素型 铜绿假单胞菌

铜绿假单胞菌(旧称为绿脓杆菌)的分型主要有三种方法,即血清学分型(群)、噬菌体分型和铜绿菌素分型。这三种分型对追踪医院感染和爆发流行的传染源均有重要意义^[1]。血清学分型具有简便、快速的特点。菌素分型是根据铜绿假单胞菌产生的铜绿菌素(Pyocin)抑制或杀死产生株以外的同种近缘菌而分型的。这种方法能将相同的血清型或噬菌体型的菌株再区分为不同的菌素型。传统的铜绿菌素分型法为Gillies和Govan(1966)^[1]介绍的“十”字划线法。Fyfe(1984)^[2]和Govan(1985)^[3]发展了平板点种法,具有重复性好、分型率高、操作简便、快速等特点。作者对西安市临床来源于烧伤创面、呼吸道感染、其他系统感染的铜绿假单胞菌进行血清学分型和改良法菌素分型,并对其应用进行了初步研究。

材料和方法

一、菌种来源:由西安11所医院收集、分离和鉴定的铜绿假单胞菌118株,其中来自创面31株,痰液44株,咽拭4株,胸水4株,小便9株,其他系统标本13株,来自烧伤病区地面、水池、拖把等物13株。

二、血清学分型(群):分群血清采用卫生部成都生物制品研究所生产的铜绿假单胞菌12群“O”诊断血清。方法:以接种环取35℃ 18小时斜面培养物少许与分群血清(先3组多价,后单价)作玻片凝集试验。2分钟内出现明显凝集颗粒者为阳性,对与两群血清有交叉凝集的菌株,100℃ 2小时破坏交叉抗原后再作分群。

三、铜绿菌素分型:

指示菌株:系Gillies和Govan(1966)选出的8个铜绿菌素分型指示菌(编号1~8)和他们于1969年选出的5个分亚型的指示菌(编号A~E),均由卫生部成都生物制品研究所惠赠。

分型用培养基:胰化大豆琼脂,营养性肉汤,0.5%半固体营养琼脂。

分型方法:在Fyfe(1984)^[2]和Govan(1985)^[3]分型方法基础上,稍加改进。基本程序:(1)用5号针头输液管吸取被检菌37℃ 5小时肉汤培养物,点种于平板表面,每平板一滴,一平板可点种16~20个被检菌,制备13个相同点种平板,菌液浓度约 $10^8 \sim 10^9$ /ml(或

* 已调卫生部成都生物制品研究所工作,邮政编码610063

37℃ 18小时斜面培养物，再用盐水制成悬液)；(2) 平板置30℃ 孵箱中培养6小时，便于细菌产生菌素；(3) 用直径9cm浸氯仿的滤纸熏平板表面15分钟，以杀灭被检菌生长物，但菌素则对氯仿耐受；(4) 取指示菌0.1ml (37℃ 4小时肉汤培养物，菌量 10^7 /ml) 加入3ml的50℃ 半固体培养基中混匀，迅速倾入处理后的被检菌平板制成指示菌覆盖层，13个指示菌分别倾入13个处理平板成为一套，置37℃ 14~16小时后观察结果；(5) 点种区及其周围出现明显抑菌区为阳性(抑菌环边缘呈切迹状为R或F型菌素，抑菌环较大、边缘呈浸润扩散状为S型菌素)。部分抑菌环内有少数抗性菌落仍判为阳性。点种区及其周围无明显抑菌环的判为阴性。呈噬菌斑状的噬菌体裂解也判为阴性；(6) 根据Gillies和Govan规定的抑菌反应谱，可查出被检菌所属菌素型别和亚型。他们将铜绿假单胞菌，共分出105个菌素型和25个亚型。

结 果

一、血清学分群结果：

1. 铜绿假单胞菌血清群别分布：118株铜绿假单胞菌有109株能被分为12个“O”群，分群率为92.4% (109/118)。其群别分布从I~Ⅷ群分别为21.1、3.7、15.6、1.8、6.4、29.4、1.8、11.9、4.6、0.9、1.8、0.9%。以Ⅵ群最多，占能分群菌株的29.4% (32/109)，其次为I群(21.1%)，Ⅲ群(15.6%)和Ⅷ群(11.9%)。

不能分群的有9株，占总菌株的7.6% (9/118)。其中有与多价和单价血清均不凝的，有与多价凝单价血清不凝的，还有与Ⅲ和Ⅷ群血清均凝而经100℃ 2小时处理仍不能去除交叉凝集的。

64株铜绿假单胞菌经半固体室温保存2个月，4株发生血清群的转换。1株由Ⅱ群转为I群，1株由Ⅷ群转为Ⅵ群，2株分别由Ⅴ群和Ⅶ群转为不能归群，转换率为6.3% (4/64)。

2. 伤口来源的铜绿假单胞菌的群别：伤口来源菌株中Ⅵ群占58.1% (18/31)，与非伤口来源Ⅵ群菌株分布率(11.4%，8/70)相差非常显著。说明西安市伤口中铜绿假单胞菌以Ⅵ群为主。

由西京医院烧伤病人创面及其病房环境(地面、水池、拖把等)标本中分离出的铜绿假单胞菌，经血清学分群测定，其分布率相差不显著($P>0.05$)，说明两者之间存在着交叉污染的可能性，值得引起临床医务人员重视。

3. 呼吸道来源铜绿假单胞菌的血清群别：呼吸道来源菌株以血清I群分布率较高(22.9%，11/48)，其他群别为Ⅲ、Ⅵ及Ⅷ群，各为16.7、12.5及14.6%。

二、铜绿菌素分型结果：

1. 铜绿菌素分型率：118株铜绿假单胞菌有98株能被Gillies和Govan的8个分型指示菌分出菌素型别，分型率为83.1% (98/118)。20株UT有19株能被5个亚型指示菌分出亚型，故总分型率达99.2%。118株菌共分出24个菌素型，型别分布以I型最高，占39.8%，其次为UT型，占16.9%，3型7.6%，46型5.9%，18型5.1%等。

2. 主要菌素型的亚型分布：结果见表1。

3. 铜绿菌素型和血清群的关系：通过实验表明，85.7%的1/c菌属血清Ⅵ群，82.4%的1/x菌属血清I群，7株3/g菌属血清Ⅲ群，5株46/c均为血清Ⅷ群。说明菌素型和血清群之间有一定关系。

三、病人菌株两种分型结果的观察：相同的血清群可用菌素分型法再分成若干型，有利于传染源的追踪。如表2所示，同一病人在不同时间内分离的铜绿假单胞菌，有时血清群不同，有时血清群虽同但其菌素型不同，说明了铜绿假单胞菌传染源的多源性。05和06号病人烧伤创面均分离出Ⅵ群铜绿假单胞菌，有的菌素分型属于1/c型，而同病区环境(地面、水池、拖把等)标本中也分离到不少Ⅵ群1/c型

表1

铜绿假单胞菌5个主要菌素型的亚型分布

菌素型	亚 型											不能分 亚 型	总计	
	a	b	c	f	g	h	k	n	s	x	y			
1	1		21 (44.7)	1	1		1			17 (36.2)			5 (10.6)	47
3					7 (77.8)				1			1		9
18		1	3 (50.0)								2			6
46			5 (71.4)								1	1		7
UT			1	10 (50.0)		2	3			1	2		1	20

*表内数字为菌株数，括号内数字为百分率

表2

同一病人连续分离出的铜绿假单胞菌两种分型试验的联合结果

病人编号	株数	血清群	菌素型	病人编号	株数	血清群	菌素型	
05	3	VI	1/x	08	4	I	1/x	
			1/c				V	1/c
			105/x					V
1/c	V	1/x						
06	2	VI	UT/f	11	2	I	1/x	
			44/x				V	4/x
07	6	V	UT/f	12	2	I	6/f	
			UT/f				I	18/c
			UT/f					III
			46/x	III	11/y			
			18/c		III	11/y		
09	2	III	17/y	环境标本	6	VI	1/c	
			9/g				I	1/x
								NO

的铜绿假单胞菌，足以说明创面细菌的来源及其传播方式。

讨 论

西安市118株铜绿假单胞菌血清学分群率为92.4%，与成都〔4〕、上海〔5〕、重庆〔6〕等用12群“O”诊断血清分群结果相似，其群别以VI、I、III群为多，这与上海地区相似，但上海和重庆以I群居首位，西安则以VI群为首，可能存在着地区性差别。分析血清群与感染类型的关系，VI群菌多见于伤口感染（58.1%），明显高于非伤口来源的VI群菌，I群菌株在呼吸

系统来源的铜绿假单胞菌中占较高百分率（22.9%），说明感染类型可能与血清群别有关。比较西京医院烧伤病房环境和病人创面血清VI群菌的分布率没有显著差别，说明创面和环境物品有相互交叉污染的可能。

国内制备的铜绿假单胞菌12群“O”诊断血清具有种的特异性和分群率较高的优点。但尚有8~10%菌株不能分群，宜增加若干血清群和进一步改进。部分铜绿假单胞菌由于长期保存可发生血清群的转换现象，宜将分离菌尽早分群。

铜绿菌素分型是追踪传染源的重要方法，

国内研究较少,特别是改良铜绿菌素分型法——平板点种法,国内尚未见报道。传统的菌素分型“十”字划线法往往存在稳定性差的缺点。我们以平板点种法对16株铜绿假单胞菌作了保存2月前后菌素分型对比,结果保存前后菌素型别全部符合,说明了平板点种法的稳定性。该法结果清晰、操作省时,对粘液型和非粘液型菌株都适用,对临床监测交叉感染和作流行病学调查较为适用。

118株铜绿假单胞菌的菌素分型率高达99.2%,分出24个菌素型,比血清群数目多一倍。西安地区以菌素1型铜绿假单胞菌为主(39.8%),其次为UT型(16.9%)。菌素1型中,亚型1/c和1/x分别占44.7%和36.2%,其中85.7%的1/c亚型属血清Ⅵ群,84.4%的1/x亚型属血清I群,表明菌素型和血清群之间可能存在一定关系。实验结果显示,菌素分型能对来自同一医院和病人的相同血清群菌株进一步加以区分鉴定,分为不同的菌素型。说明血清分群和菌素分型联合应用具有更高的鉴别力,有利于传染源的准确追踪。

Studies on the Serotyping and [Pyocintyping of Pseudomonas Aeruginosa Li Jiannan, et al., Research Institute of surgery, Third Military Medical College, Chongqing

Pseudomonas aeruginosa (118 strains) from

Xian were typed by 12 groups O-serum and revised pyocin typing method Results indicated that Ⅵ, I, Ⅲ were major serotypes, Ⅵ type were mainly from trauma infected, I type mainly from respiration system infected. Pyocintype were mainly I and UT types. Pyocintype I were mainly 1/c and 1/x subtypes. 85.7% of 1/c subtypes were serotype Ⅵ, 84.4% of 1/x subtypes were serotype I.

Key words Serotype Pyocintype Pseudomonas aeruginosa

参 考 文 献

1. Govan JRW. Pyocin typing of pseudomonas aeruginosa. In T. Bergan and JR. Norris (ed.), Methods in microbiology, Academic Press, Inc, London. 1978; 10: 61~91.
2. Fyfe JAM, et al. Revised pyocin typing method for pseudomonas aeruginosa. J Clin Microbiol 1984; 20(1): 47.
3. Govan JRW, et al. Typing of pseudomonas cepacia by bacteriocin susceptibility and production. J Clin Microbiol 1985; 22(4): 490.
4. 王世鹏, 等. 绿脓杆菌分群血清的研制. 中华微生物学和免疫学杂志 1982; 2(1): 22.
5. 晏碧君, 等. 上海地区243株铜绿色假单胞菌血清分群的观察. 中华医学检验杂志 1985; 8(1): 1.
6. 张雅萍, 等. 192株烧伤绿脓杆菌的血清学分型. 烧伤整形专辑. 第三军医大学 1982: 32~34.

(1990年3月7日收稿, 1990年5月3日修回)

食用孵化鸭蛋引起鼠伤寒沙门氏菌食物中毒的调查报告

呼和浩特市卫生防疫站* 徐素云 魏秀瑞 柴崇山 侯美英 张坛龙

我市农村某养鱼池食堂因食炒孵化过的鸭蛋引起食物中毒。经流行病学调查,系因在某养鸭场购回孵化过5天的鸭蛋,用油煎使蛋白质凝固出锅的炒食方法,达不到杀菌温度,而且时间也短。食后26小时开始发病。主要症状为头痛、头昏、发烧(38.5~40℃),少数病例恶心、呕吐,一般均有腹痛、腹泻(重者10余次),里急后重,有的病例泻物带粘液或血,发病率

为90%(45/50)。对两份剩余炒鸭蛋和一份鸭蛋皮经细菌培养、因子血清凝集、生化试验均判定为鼠伤寒沙门氏菌所致食物中毒,用被检菌(菌液浓度 10^9 /ml)与病人血清作抗体效价测定,发病第8天平均为1:300,第31天为1:914。

* 邮政编码 010020