

# 关于由猪分离的肺炎双球菌的研究

刘景华

(吉林农业大学兽医系)

## 一、前言

双球菌病主要是幼畜的一种传染病，多见于犊牛、仔羊和仔猪，能給家畜繁育业带来相当严重的损失。苏联学者对双球菌病的研究业绩甚多，如 K. П. Цепуров(1)氏曾詳細研究过分离自牛、羊和猪的 329 个菌株，証明它們都具有极相近似的形态、培养和生化学特性，但在血清学上是有差异的，依据交叉凝集反应分为 A、B、C、D、E、F、G、H 等八个血清学型，其中 C、D 型最为多见。在苏联文献里通常称此种双球菌为枪形双球菌 (*Diplococcus lanceolatus*)，它与致发人类肺炎的肺炎双球菌 (*Diplococcus pneumoniae*) 在性状上极相近似，仅在致病性和抗原構造上互有差异。

欧美学者对幼畜双球菌病的报导极少，我国过去也未聞有此病之报导。仅在解放后，于 1955 年首次见到刘書芹(2)氏等于北京报导一例仔羊肺炎双球菌败血病，而对仔猪肺炎双球菌病尚无所聞，尤其对病原体的特性和血清学分型方面的研究尚未着手。作者于 1956 年自長春地区患病仔猪分得肺炎双球菌 12 株，进行了较为細致的細菌学檢查和血清学分型，以期对長春地区存在的仔猪肺炎双球菌的血清学型有所了解。茲特提出报导，希望能起到抛磚引玉的作用，使国内同道提起注意，为察明和解决我国的幼畜双球菌病而努力。

## 二、菌株来源及分离經過

1956 年初，長春市郊某軍事学校小型养猪場，飼有体重約 30—60 市斤的幼猪近 40 头，百斤以上的肥猪約 50 头。猪舍的防寒和卫生条件很差。由一月初开始，幼猪陸續发病。病猪精神沉郁，畏冷，躺臥时縮成一团，食欲減損，呼吸困难和重篤的持續性咳嗽，并間或有下痢者，病程長者持續二十余日，短者七、八日。发病后約月余時間，所有仔猪几乎死亡殆尽，其中部分病亡仔猪和患病瀕死仔猪送我校委託作細菌学和病理解剖学诊断。現扼要的把細菌分离和剖檢的主要眼观变狀記述如下。

細菌的分离过程：在病猪死亡直后或瀕死猪在死前屠杀后，立刻以无菌手續采取心血、脾臟、肝臟和肺臟各一小块，直接涂抹接种于普通血液琼脂平板和血清平板培养基上，在 37℃ 温度下孵育 24—48 小时后，挑选典型菌落純培养后保存之。各仔猪的分离培养結果如表 1。

表 1 肺炎双球菌分离培养結果

猪号	臟器	心	血	脾	肝	肺
1		++		+++	+	+++
2		+++		+++	++	+++
3		++		++	++	+++
7		++		++	++	+++
8		+		+	+	++
9		++		++	++	+++

10	+	+	+	卅
11	+	卅	+	卅
17	+	+	+	卅
19	卅	卅	卅	卅
22	卅	卅	卅	卅
24	卅	+	+	卅

符号表示:

- 卅——一块平板上有30个以上的菌落。
- 卅——一块平板上有10—30个菌落。
- +——一块平板上有10个菌落以下。

由表1看出,病猪生前各臟器和血流内都有肺炎双球菌,但以肺臟的菌数较多,这表明是慢性經過的败血症,在慢性过程中之初期,肺炎双球菌主要集中在肺臟形成多数的肝变区和化膿灶,以及纖維素性肺肋膜炎和心包膜炎,因此,肺組織中的菌数最多。这种慢性病例的病理解剖学变化,在П.Н.Андреев[3]等二氏所著“猪傳染病学”中記載较为詳細。

在以上12头病猪体内分得肺炎双球菌的同时,并在其中8头病猪体内(心血、脾、肝和肺臟),分出了多杀性巴氏杆菌,具体情况見表2。

表2 肺炎双球菌和巴氏杆菌分离培养結果

猪号	菌別	肺炎双球菌	巴氏杆菌	备 考
1		+	+(屬C型)	死后剖檢培养
2		+	+(屬C型)	"
3		+	+(屬C型)	"
7		+	+(屬C型)	濒死剖檢培养
8		+	+(屬C型)	"
9		+	-	死后剖檢培养
10		+	-	"
11		+	+(屬C型)	"
17		+	-	濒死剖檢培养
19		+	+(屬C型)	"
22		+	-	"
24		+	+(屬B型)	死后剖檢培养

符号表示:

- +——表示培养結果阳性
- 表示培养結果阴性

由表看出,12头病猪中有4头(9、10、17和22号)是單发性双球菌病,其余8头則是肺炎双球菌和巴氏杆菌的混合感染。分得的8株巴氏杆菌經詳細鑑定后,系属于刘景华[4]氏分类之B型和C型(7株),C型菌毒力甚低,而死亡率如是之高,这和兩者的混合感染有关。

病理解剖的主要眼观变状:全部剖檢仔猪的病变以肺臟为最显著,有处于不同时期的肝变区,胸膜炎和纖維素性心包炎。尤其特異的是在肺断面的肝变区内和肝变区周圍,散在有多数由高粱粒到黄豆粒大的

灰白色化膿灶，指压化膿灶上部时，即由化膿灶緩慢地流出油脂样的灰白色膿汁，此种散在的多数化膿灶是單純巴氏杆菌病时所沒有的病理解剖学变化，以膿汁作涂片标本鏡檢时，可見有多数的双球菌。在苏联学者 С.Н. Вюмелесский(5) 氏等的著書中記載，在慢性双球菌病时，病变主要集中于肺臟，并經常形成由帽針头到鷄卵大的化膿灶。由此可見，在剖檢变狀上也能使人考虑到可能有双球菌性傳染的存在。

### 三、研究 方 法

#### (一) 形态、培养和生化学特性檢查法

1. 荚膜染色法：用接种純培养物后死亡的小白鼠腹腔液或脾臟涂片，以 Hiss 氏荚膜染色法檢查之。
2. 溶血性檢查：以含有 5—10% 綿羊血液的普通瓊脂，划线培养 24—48 小时后观察之。
3. 菊淀粉醱酵特性檢查法：用 Hiss 氏菊淀粉血清水培养基，接种后放 37℃ 温度下，观察 21 日。
4. 醱酵特性檢查：用 pH7.4 的蛋白陳水为基础，加入 1% 的糖或醇即成。用前加入 3% 无菌馬血清，放 37℃ 温箱中 72 小时行杂菌檢查，然后接种被檢菌之新鮮培养物，放 37℃ 下，观察 21 日。
5. 胆汁溶菌試驗檢查法：取 18 小时被檢菌的普通肉湯培养物 4.5 毫升，然后加入灭菌的新鮮牛胆汁 0.5 毫升，混合均匀，放 37℃ 温箱 15 分鐘后判定結果。
6. 其他培养：生化学反应檢查法：与一般同，略。

(二) 小白鼠毒力試驗法：以新鮮純培养物接种于 10% 馬血清肉湯中，放 37℃ 温箱中孵育 18—24 小时，取 0.5 毫升，腹腔接种約 10 克重的小白鼠后，观察二周。

(三) 血清学分型法：由于目前国内尚无标准的幼畜双球菌分型免疫血清，同时也沒有苏联或其他国家的标准分型血清或标准菌株，因此，想取得和国际相一致的分型是不可能的，但客观形势又要求我們不能一味的等待，在这样的情况下，就只好用新分得的菌株，自制免疫血清，用交叉凝集反应的方法，把試驗菌株进行初步分型。这样作，可能有利于此項工作的逐步开展。

#### 1. 家兔免疫血清制法：基本是按小林氏(6)方法进行的。

动物：用体重 2 公斤左右的健康家兔，經 7 日观察后，开始免疫注射。

免疫原制法：以含有 1% 葡萄糖的 pH7.6 普通肉湯为生产免疫原的培养基。接种后孵育 24 小时，取出，經涂片鏡檢証明无杂菌后，放 60℃ 水浴中，經 30 分鐘加热杀菌，并作无菌培养試驗。然后，將經過杀菌的液体培养物，用无菌手續經低速离心沉淀后（每分鐘 1000 轉），棄其上清，將沉淀物混悬于含有 0.3% 弗尔馬林生理鹽水中即成。其濃度相当于 Mc.Farland 氏比濁計的第 6 号管。

免疫注射方法：共注射 5 次，均注入耳靜脉內。第一次 0.1 毫升，第二次 0.2 毫升，第三次 0.5 毫升，第四次 1.0 毫升，第五次 2.0 毫升。末次注射后經一周試血，凡凝集价达 20 倍以上者，即为合格，絕食一夜后，行全采血。分出血清后，加入万分之一比的硫柳汞防腐，保存于 4℃ 冰箱中备用。

2. 凝集反应术式：基本上按粵村(7)氏的肺炎双球菌分型交叉凝集反应术式进行。凝集原制法和免疫原相同，用 Mc.Farland 氏比濁計第 2 管濃度。免疫血清由 10 倍开始行倍倍稀釋，直至 640 倍。每管血清量为 0.2 毫升，加等量凝集原，振蕩均匀，放 37℃ 温箱 2 小时（中間須振蕩一次）然后取出，室温下放置一夜后判定。判定标准，以“卅”表示全凝集，上清透明；“—”表示无任何变化；“±”表示微具凝集痕迹；“卅++”表示处于“卅—±”之間的不同程度的凝集。

### 四、研究 成 績

#### (一) 形态、培养和生化学特性

1. 形态：用人工培养物或病料制成的涂片标本中，大都成双排列，也能看到由 4—10 个菌体組成的短鏈状排列，尤以在人工培养物內較为多見。用人工感染致死的小白鼠腹腔液和脾臟制成的涂片中，可見有明显的荚膜圍繞于菌体周圍（見第一图）單个菌体微呈卵圆形，其長徑約为 0.9—1.2 微米，橫徑約为 0.6—0.75 微米，并常以兩鈍端相联成对，兩銳端向外，因此，有枪形双球菌之称，但此种現象往往不太明

显。在一般人工培养基上，不能形成荚膜，但血液平板的初代分离培养物涂片标本尚可见较为明显的荚膜。用Hiss氏染色法染出之荚膜最为清晰，Löffler氏硷性美兰液也能染出荚膜，但不如前者清楚。本菌能着染于各种常用的苯胺染料。革兰氏染色阳性。无运动性。总之，其形态和人类肺炎双球菌极相近似。

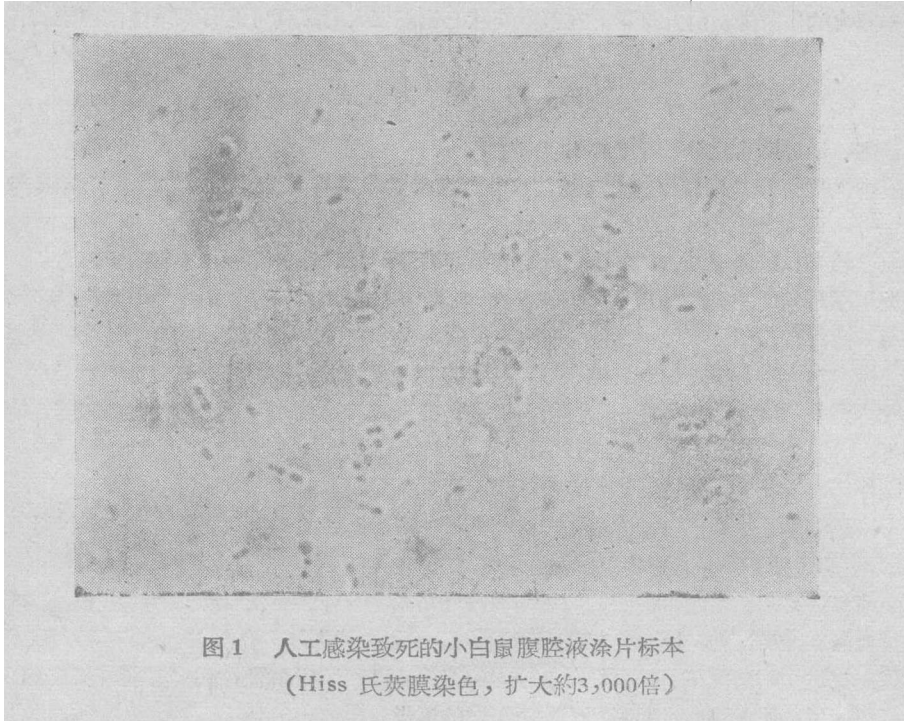


图1 人工感染致死的小白鼠腹腔液涂片标本  
(Hiss氏荚膜染色，扩大约3,000倍)

2. 培养和生化学特性：在培养和生化学特性检查过程中，并加入人类肺炎双球菌之 I、II、III、IV 型典型菌株各一株，和本教研室保存的动物溶血性链球菌，绿色链球菌各一株，以作对照和比较观察。检查成绩如表 3。

由表看出：

(1) 无论仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌，都能发酵菊淀粉产酸，使血清凝固（其中人  $\pi$  型菌酸酵能力较弱）；而绿色链球菌和乙型溶血链球菌不能发酵菊淀粉。

(2) 酸酵试验结果表明：无论仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌，都能发酵葡萄糖、乳糖、麦芽糖、蔗糖、果糖、半乳糖、棉实糖、杨甘、糊精和不同程度地发酵木胶糖产酸不产气；不能发酵甘露醇（人 II 型土）、伯罗糖（人 IV 型土）、卫矛醇和山梨醇。两者的酸酵特性甚相一致。同时也能明显地看出与绿色链球菌、溶血性链球菌的区别，绿色链球菌不能发酵乳糖、棉实糖、糊精和木胶糖，溶血性链球菌不能发酵棉实糖和木胶糖。

(3) 胆汁溶菌试验结果与人类肺炎双球菌未能一致，人类肺炎双球菌都呈阳性反应，而仔猪肺炎双球菌大都呈阴性反应，其中只 1 号和 10 号二菌株于分离之后后呈现阳性反应，但通过保存及数次人工传代后也变成阴性。

(4) 全部试验菌株都不能产生胨基质和硫化氢，不能还原美兰，不能在自然酸性马铃薯培养基上生长。

(5) 全部试验菌株都能使紫乳变黄凝固，人类肺炎双球菌仅使紫乳变黄但不凝固，溶血性链球菌也仅变黄未凝固，而绿色链球菌则无任何变化。

(6) 无论仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌，在含 5—10% 绵羊血液瓊脂平板上孵育 24—48 小时，都形成圆形，湿润细小如露滴样的菌落，并于菌落周围出现狭窄的绿色溶血环，如继续在室温放置 24—48 小时，则绿色溶血环逐渐增宽，同时菌落也变得比较扁平，甚至有些菌落的中心出现塌陷，但部分菌株变



为扁平的现象并不明显。綠色鏈球菌虽然也呈现綠色溶血，但其綠色溶血的程度远較肺炎双球菌为强，除綠色非常显著外，其綠色溶血环也較肺炎双球菌寬 2 倍余。

(7) 全部試驗菌株都不能使明膠液化，仅能沿穿刺綫形成灰白色的綫狀生長，但綠色鏈球菌較其他菌株的生長远为丰盛。

(8) 無論仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌接种于10%馬血清肉湯后，經一夜即形成中等度的均等混濁，經48小时后，上液仍均等混濁，底部形成較多量的灰白色尘埃狀沉淀，輕微搖振时，立即上浮，且易分散。虽孵育15日，亦不能形成菌膜和菌环。

总括上述形态，培养和生化学特性表明仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌极相近似，仅在胆汁溶菌試驗上未能完全一致。

(二) 小白鼠毒力試驗結果：多数菌株接种后于18—48小时致小白鼠死亡，个别菌株有达72小时以上者。以死鼠的腹腔液，脾臟或心血涂片，用 Hiss 氏荚膜染色法染色后，可見多数具荚膜的双球菌，接种于培养基可得純培养。經長期在人工培养基移植后，毒力显著下降。

### (三) 血清学分型

1. 家兔免疫血清的凝集价測定：肺炎双球菌凝集素的产生較为困难，共使用16头家兔，才制出了5个菌株的免疫血清，且血清效价甚低，測定結果如表 4。

表 4 免疫血清凝集价測定成績

稀釋倍数	10	20	40	80	160	320	640	对 照
1	卅	卅	卅	卅	±	—	—	—
7	卅	卅	卅	+	—	—	—	—
8	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
17	卅	卅	卅	卅	—	—	—	—
22	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—

由表看出：1、7、8 和17号菌株的免疫血清凝集价都在40—80倍之間，只有22号效价高达160倍。

2. 交叉凝集反应成績：用上述5个菌株的免疫血清，与分得的全部仔猪肺炎双球菌，以及人类的 I、II、III、IV型标准肺炎双球菌、綠色鏈球菌等，共17个菌株，进行交叉凝集反应，成績如表 5。(65頁)

由表 5 看出，所分得的12株仔猪肺炎双球菌，虽然在形态、培养和生化学特性上都极相近似，无法区分；但依交叉凝集反应成績看来，却能明显的区分为三个不同的血清学型。为了便于应用，和不致与国外之命名混淆，暫將以1号菌株为代表的7个菌株称为 α型；以22号菌株为代表的4个菌株为 β型；7号菌株为 γ型。三型之間虽有明显区分，但 α型菌株和 γ型的免疫血清有微弱的类屬反应，尤以3号菌株和 β型免疫血清之凝集現象更为明显，而 β型和 γ型菌株则甚为严格。

其次还所以看出，仔猪肺炎双球菌和人类肺炎双球菌的抗原性是不同的，仅 I、II 型菌株能与部分仔猪肺炎双球菌免疫血清呈现极微弱的类屬反应。和綠色鏈球菌无任何凝集現象。

## 五、总括及討論

(一) 1956年初，在長春市由12头体重約30—60市斤重的患病仔猪，分得肺炎双球菌12株，其中与巴氏杆菌混合感染的8例，单独分离出肺炎双球菌的4例。病程經過緩慢，快者也在一周以上，慢者有达三周以上的。死后剖檢变化以肺臟为最显著，除有各期肝变外，并有特異的双球菌病变——肺断面散在有多数高粱粒大的灰白色化膿灶，病变部的切片或涂抹染色标本中，能看到多数双球菌。以心血、脾臟、肝臟和肺臟分別用血液平板涂抹培养后，发现肺臟的菌数最多。总括以上事实認為，这是經過較为緩慢的單发性

表5 交叉凝集反应成續

菌	免疫血清稀釋倍数		α				β				γ		鹽水对照					
	株		1		8		17		22		7							
	10	20	40	80	10	20	40	80	10	20	40	80		160320640				
α 型	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	19	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
β 型	22	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	24	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
γ 型	I 型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	II 型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	III 型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	IV 型	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
綠色鏈球菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

註：因乙型溶血鏈球菌呈現自發凝集，所以未參加交叉凝集反应

幼畜双球菌败血症，和双球菌与巴氏杆菌混合感染呈慢性经过的败血症。本病例之所以未能致发急性败血症的原因，可能是主要与仔猪的年龄有关，据 С.Н.Вышелесский(5) 氏记载，双球菌病的急性病程现于出生后1.5—2个月以内的仔猪，2个月以上的仔猪主要为慢性过程。既然在我国幼猪中发现了双球菌病，那么，就要求兽医师在临床上应该加以考虑。目前因对菌型和分布情况尚一无所知，因此无法生产菌苗和血清。据 Я.Р.Коваленко(8) 氏记述，以青霉素治疗幼畜双球菌病，能收到良好效果，因此，目前可以依靠青霉素治疗可疑患者，并大力开展对仔猪双球菌病的流行病学、病原学、病理解剖学和治疗方面的研究工作。

(二) 分得的全部菌株都具有和人类肺炎双球菌极相近似的形态，培养和生化学特性，而与绿色链球菌溶血性链球菌有显著区别。与人类肺炎双球菌所不同的是它们在胆汁溶菌试验上都呈阴性反应。为了查明此特性，曾查找对幼畜双球菌研究得最多的苏联学者 К.П.Чепуров(1) 氏的原研究报告，惜未查到，在其最近的一本著作(1)中，亦未谈及胆汁溶菌试验成绩，以致无法对照。此点，有待于今后分出更多的菌株试验之。

试验菌株的形态，培养和生化学特性与 К.П.Чепуров(1) 氏、П.Н.Андреев(3) 氏等记述之 *Diplococcus lanceolatus* 的性状基本相同，仅在对甘露醇、山梨醇和棉实糖的发酵特性上不同，这表明两者在某些生化学特性上并不完全一致。

(三) 如果对双球菌的血清学分型，以及落形的地区分布情况无所了解，就无法制造菌苗和血清。К.П.Чепуров(1) 氏在各种幼畜双球菌的分型研究基础上，创制出了有效的菌苗和血清，在预防治疗各种幼畜双球菌病方面起到了重大的作用。我们在这方面是进行得太迟了，必须急起直追，在这样的思想支配和没有标准分型血清的情况下，为了达到分型和开展这一工作的目的，只好用新分离的菌株制成免疫原给家兔免疫，制出免疫血清后，自行分型。为了不致和国外的命名混淆，乃采用希腊字母命名。依据交叉凝集反应，把全部试验菌株区分为三型，假称为  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$ 。 $\alpha$  型的部分菌株能与  $\beta$  型和  $\gamma$  型的免疫血清呈现很微弱的类属凝集反应，表明在抗原上有某些共通性；而  $\beta$  型和  $\gamma$  型菌株的抗原性则较为特异。在分得的全部菌株中， $\alpha$  型最多， $\beta$  型次之， $\gamma$  型最少。肺炎双球菌的型是很复杂的，估计在我国的不同地区，可能有很多不同的型，若想了解全国的菌型分布情况，并取得一致的分型标准，在目前来看，是有些困难的，但只要一致努力，经常注意交流经验，还是可以争取在一个不太长的时期内，完成此项工作。这将对预防和消灭我国的幼畜双球菌病起到积极和良好的作用。

分得的菌株虽然在形态培养和生化学特性上和人类肺炎双球菌极为接近，但在血清学上则有显著区别。表明在抗原性状上相互间是有显著差异的。

## 六、結 論

(一) 依据流行病学、细菌学和病理解剖学等方面的资料，确定在长春市有单发的仔猪双球菌病，及与巴氏杆菌混合感染的病例，首次证实了在我国有仔猪双球菌病存在。

(二) 分得的12株仔猪肺炎双球菌，它们彼此间，以及与人类 I、II、III、IV 型等肺炎双球菌之间，在形态、培养和生化学特性上都极相近似，不易区分，所差的是由仔猪分得的肺炎双球菌，对胆汁溶菌试验大都是呈现阴性反应。其次是与苏联学者 К.П.Чепуров(1) 氏、П.Н.Андреев 氏等记述之 *Diplococcus lanceolatus* 的性状基本相同，仅在对甘露醇、山梨醇和棉实糖等的发酵特性上不相一致。

(三) 分得的12株仔猪肺炎双球菌，虽然都具有极相近似无法区分的形态、培养和生化学特性；但它们自制的家兔免疫血清作交叉凝集反应结果，能明显区分为三个不同的血清学型。为了不致与国外分型混淆，乃选用希腊字母  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  为三型名称。其中  $\alpha$  型占 58.4%， $\beta$  型占 33.3%， $\gamma$  型最少，占 8.3%。此分型虽因无标准血清，以致未能与国际分型取得一致，但在目前情况下，对开展研究我国的仔猪肺炎双球菌型分布情况，和在全国范围内取得一致的分型标准等工作上，会起到积极作用。