

# 从野栖小家鼠中分离克雷伯氏菌的报告\*

梁俊勋

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁)

克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 的细菌在自然界中的存在较为广泛, 常见于人的呼吸道和泌尿系统的感染中<sup>[1-3]</sup>, 它可引起人的大叶性肺炎或偶尔的败血症, 对家畜及实验动物等具有强

毒性<sup>[3,6]</sup>。但从野栖小家鼠的病鼠中分离到肺炎克雷伯氏菌 (*K. pneumoniae*) 和臭鼻克雷伯氏菌 (*K. ozaenae*) 的报道迄今未曾见到。

1978年8月从捕获的104只小家鼠中发

现有 51 只是罹病和死亡鼠。从 51 只中分离获得细菌 30 株, 其中肺炎克雷伯氏菌 12 株, 臭鼻克雷伯氏菌 8 株, 克雷伯氏菌的检出率为 39.2%。现将该菌的分离情况报告如下。

## 材料和方 法

### 一、菌株的来源

取已死或临死的小家鼠的肝、脾组织在琼脂平板上分离培养, 经选择、纯化后, 供鉴定用。新分离菌株编号 (以下简称新菌株): 肺炎克雷伯氏菌为 M7881, 臭鼻克雷伯氏菌为 M7885。对照菌株: 肺炎克雷伯氏菌(46114)、臭鼻克雷伯氏菌(46110) 和鼻硬结克雷伯氏菌(46111), 均由卫生部药品生物制品检定所供给。

### 二、实验动物

野栖小家鼠 (*Mus musculus*) 和灰仓鼠 (*Cricetulus migratorius*) 捕获后经正常饲养一周以上者。小白鼠系本所供给。家兔外购, 体重约 2000g。

### 三、抗血清的制备

新菌株和对照菌的抗血清, 均系取该菌在 5ml 肉汤中的 24 小时培养物作抗原, 对家兔耳静脉接种免疫后制成的。免疫分死菌和活菌两种进行, 前者系将肉汤培养物经 60℃30 分钟灭活后, 分别以 0.5、1.0 和 1.0ml 进行家兔免疫, 6 天一次, 共 3 次; 后者系用不作任何处理的肉汤培养物, 分别以 0.5、1.0 和 2.0ml, 间隔 5 天后, 再免疫 3 次。在末次免疫后一周由心脏采血, 测定抗血清的凝集度, 结果在 640—1,280 之间。

### 四、毒力试验

新菌株对小白鼠的 LD<sub>50</sub> 测定, 系用斜面上生长的 M7881 和 M7885 的菌苔各 10mg, 均匀地溶于 5ml 生理盐水中, 以腹腔注射法测定。

对小家鼠等动物的致病力试验, 系分别使用各菌株在 5ml 肉汤中的培养物和溶菌盐水作为菌液, 以腹腔和皮下注射两种方法进行。

## 五、凝集试验

抗原系用新菌株和对照菌株在 5ml 肉汤中经 24 小时后的培养物。死菌抗原系用 0.5% 甲醛制取, 以 3500rpm 离心 15 分钟, 弃上清液并加入两倍于肉汤 (10ml) 的生理盐水制成。活菌抗原不加甲醛, 处理方法与死菌相同。试验用常规方法进行。

## 实验结果

### 一、形态及培养性状

新菌株形态为革兰氏染色阴性, 呈球杆状, 大小约 1—2.5 × 0.8—1.2nm。在陈培养物中可见到发育的荚膜, 成双或单个甚至不规则排列。经染色处理, 未发现鞭毛状物。

该菌在普通琼脂上生长丰富, 菌苔光滑, 边缘整齐, 菌落突起, 呈不透明的浅灰黄色, 大小约 1—2mm, 稍有臭味, M7885 菌较浓, 而 M7881 菌比 M7885 菌具较大的粘稠性。

新菌株不具运动性。在半固体平板上不扩散生长, 在琼脂和明胶穿刺培养, 生成茺菁状。琼脂斜面划线培养生成丝状。该菌于 22℃ 生长不及 37℃, 在 2—4℃ 不生长。在肉汤培养基上于 37℃ 培养, pH7.2 生长良好, 混浊度均匀, 48 小时后有薄层菌膜生成, 并有沉淀物产生。在 pH5.0 初始生长。在 S.S 琼脂上生长不良或不生长, 在 EMB 琼脂上生长成细小的紫黑色菌落, 具粘稠性。

### 二、生化特性试验

新菌株的各项生化试验主要是依照 Edwards<sup>[4]</sup> 的方法进行。结果见表 1。

表 1 结果可见, 新菌株与对照菌的结果是相一致的, 并符合 Kauffmann<sup>[1]</sup> 和 Edwards<sup>[4]</sup> 给肺炎克雷伯氏菌和臭鼻克雷伯氏菌下的定义。新菌株与阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 相区别。

### 三、对动物的毒力试验

1. 对小白鼠的 LD<sub>50</sub> 测定: 结果见表 2, M7881 和 M7885 菌的 50% 致死量分别为  $1 \times 10^{-2.3}$  和  $1 \times 10^{-2.1}$  稀释度。

2. 对动物的致病力试验: 新菌株对动物的

表 1 新菌株的生化反应

生化反应	新菌株		对照菌株			阴沟 <sup>[4]</sup> 肠杆菌
	M7881	M7885	46114	46110	46111	
葡萄糖	⊕*	⊕	⊕	⊕	+	⊕
卫矛醇	+	-	+	-	-	-或+
肌醇	⊕	-	⊕	+	-	-
鼠李糖	+	+	+	+	+	+
木胶糖	+	+	+	+	+	+
硫化氢	-	-	-	-	-	-
明胶(22℃)	-	-	-	-	-	+
侧金盏醇	⊕	+	+	+	-	-或+
山梨醇	+	-	+	+	+	+
麦芽糖	+	+	+	+	+	△
水杨苷	+	+	+	+	+	d
乳糖	+	+	+	+	-	+
蔗糖	+	+	+	+	+	+
甘露醇	⊕	⊕	⊕	⊕	+	+
脲酶	+	-	+	-	-	+或-
柠檬酸铵	+	+	+	+	+	+或-
硝酸盐	+	+	+	+	+	+
靛基质	-	-	-	-	-	-
V-P 反应	+	-	+	-	-	+
丙二酸钠	+	-	+	-	+	+或-
氰化钾	+	-	+	-	+	+
赖氨酸	+	+	+	-	-	-

\*“⊕”产酸产气;“+”阳性;“-”阴性;“+?” 2 天后阳性,余类推;“+或-”多数阳性,少数阴性;“-或+”多数阴性,少数阳性,“d”有不同的反应;“△”未做。

表 2 新菌株对小白鼠的 LD<sub>50</sub> 测定

菌株号	稀释度	注射量 (ml)	动物数量 (只)		结果		累积数		死亡率 (%)	LD <sub>50</sub>
			存活	死亡	存活	死亡				
M7881	10 <sup>-1</sup>	0.5	5	0	5	0	9	100	1×10 <sup>-2.8</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	0.5	5	2	3	2	4	67		
	10 <sup>-3</sup>	0.5	5	4	1	6	1	14		
	10 <sup>-4</sup>	0.5	5	5	0	11	0	0		
M7885	10 <sup>-1</sup>	0.5	5	0	5	0	7	100	1×10 <sup>-2.1</sup>	
	10 <sup>-2</sup>	0.5	5	3	2	3	2	40		
	10 <sup>-3</sup>	0.5	5	5	0	8	0	0		
	10 <sup>-4</sup>	0.5	5	5	0	13	0	0		

\* 表内稀释度 10<sup>-1</sup>=2 mg/ml 湿菌重,其余为 10 倍稀释,LD<sub>50</sub> 以稀释度表示。

致病力试验结果见表 3。表 3 结果说明,在 14 天观察终止时, M7881 菌无论腹内或皮下攻击,均可致小白鼠和小家鼠死亡半数以上,死亡时间多在第 3 天和 5—10 天,对小家鼠的毒力高于小白鼠。而 M7885 菌的致病力低于 M7881 菌。对照 46114 菌也具有相当的毒力。M7881 菌对灰仓鼠在第 9 天死亡 1 只,其他有不同程度的症状。对家兔仅在接种部位发生轻度炎症,均不死亡。由死亡的试验鼠中均分离到所注入的细菌。

表 3 新菌株对动物的致病力试验

试验动物	攻击菌株	攻击途径	攻击菌量 (ml)		攻击动物数 (只)	动物死亡数 (只)							
			肉汤培养物	2mg/ml 的菌液		M7881		M7885		46114		46110	
						1-7	8-14 (天)	1-7	8-14 (天)	1-7	8-14 (天)	1-7	8-14 (天)
小白鼠	M7881	腹内 皮下	0.5	0.5	5	3	2						
				0.5	5	0	3						
	M7885	腹内 皮下	0.5	0.5	5			1	4				
				0.5	5			0	2				
小家鼠	M7881	腹内 皮下	0.5	0.5	10	4	3						
				0.5	10	3	2						
	M7885	腹内 皮下	0.5	0.5	10			2	3				
				0.5	10			0	3				
				0.5	5					1	2		
46110	皮下	0.5	5							0	2		
灰仓鼠	M7881 46114	皮下 皮下	0.5 0.5	0.5	5	0	1						
				0.5	5			0	0				
家兔	M7881 46114	皮下 皮下	1.0 1.0	1.0	2	0	0						
				1.0	2			0	0				

表 4 新菌株和对照菌株之间的凝集试验

抗血清	死 菌 抗 原					活 菌 抗 原				
	M7881	M7885	46114	46110	46111	M7881	M7885	46114	46110	46111
M7881	640	—	160	20	—	320	—	160	—	—
M7885	—	640	—	80	—	—	640	—	—	—
46114	160	—	640	—	—	320	—	1280	—	—
46110	80	320	—	640	—	—	320	—	640	—
46111	—	40	40	—	160	—	—	—	—	320

注：表内的凝集价均为 1×；其中 1×320 为“++”滴度；1×80 以下系反应不清楚。

#### 四、凝集试验

凝集试验结果由表 4 可以看出，M7881 和 46114 菌的抗血清对其相应活菌抗原具有特异性反应，两菌的交叉试验也呈现凝集关系。M7885 菌和 46110 菌抗血清与其相应抗原之间也具明显的凝集反应。

#### 五、病鼠的主要症状

M7881 菌在致小白鼠发病后，在初期(1—5 天)动物体温稍低于正常值(36℃)0.5—1.0℃，到中期(5—7 天)和后期(8—14 天)时，病鼠的体温在 32℃或更低，至死亡前低于 13℃。从中期起动物即表现反应性差，不取食似冷状聚集，毛被松散并脸盘浮肿。便泻肛门红肿，在感染 2—3 天后的排泄物即呈黄乳状物。

由死鼠解剖可见，肺呈湿润性充血，消化道及其系膜充血。经测定肝脾脏器，每克的含菌量达 26.5 亿。鼠鼠淋巴结肿大。野栖小家鼠罹病后也呈现相似症状。

## 讨 论

从野栖小家鼠分离到的 M7881 和 M7885 菌株，通过生化试验的结果证明，两菌株均符合克雷伯氏菌属的生化反应。同时，与该属其他三个种的特征相比较，M7881 和 M7885 菌分别与肺炎克雷伯氏菌和臭鼻克雷伯氏菌是一致的，并与对照菌株 46114、46110 的反应相同。在血清学方面，由新菌株和对照菌的复合

抗原(即包含有荚膜和菌体在内)制备的抗血清，做了初步的凝集试验，结果表明 M7881 和 46114；M7885 和 46110 之间有着相当明显的特异性关系。

对于克雷伯氏菌的致病力，有文献报道，对鼠类尤其对小白鼠呈高度致病<sup>[3,5,6]</sup>。从新菌株对小白鼠、小家鼠的攻击结果看，致病力也是明显的。因此，在自然条件下鼠间发生局部性的克雷伯氏菌病的可能性是存在的，其次野栖小家鼠的分离结果还可说明，由于疾病的引发，在一定条件下对于该地区小家鼠的数量变化无疑是一个影响因素。

#### 参 考 文 献

- [1] 考夫曼：《肠杆菌科》(方景燧等译)，p.253—259，人民卫生出版社，北京，1964。
- [2] V. B. D. 斯克尔曼：《细菌属的鉴定指导》(蔡妙英等译)，p.191—192，科学出版社，北京，1978。
- [3] 中国科学院微生物研究所细菌分类组：《一般细菌常用鉴定方法》，91—92，科学出版社，北京，1978。
- [4] Edwards P. R. & Ewing W. H.: *Identification of Enterobacteriaceae*, (3rd edition), 324—338, Burgess Publishing Co., 1972.
- [5] Lennette E. H. et al.: *Manual of Clinical Microbiology*, Second Edition., 201—202, Am. Society For Microbiology, Washington, D. C. 1974.
- [6] Buxton A. & Fraser G. L.: *Animal Microbiology*, Vol. I, pp. 119, Blackwell Scientific Publications, London, 1977.

\* 菌株得到卫生部药品生物制品检定所诊断室协助鉴定，特此致谢。