

# 不同动物血液对于鼠疫菌生长影响的实验研究

赵莹<sup>1,2,3</sup>, 张玲玲<sup>4</sup>, 霍小玉<sup>4</sup>, 黄雪娟<sup>4</sup>, 郭敏<sup>1</sup>, 高子厚<sup>2,3</sup>, 苏超<sup>2,3</sup>

1. 大理大学公共卫生学院, 云南 大理 671000; 2. 云南省地方病防治所;  
3. 云南省自然疫源性疾病预防控制技术重点实验室; 4. 昆明医科大学公共卫生学院

**摘要:**目的 探讨应用不同物种、不同浓度动物血制作的培养基对于鼠疫菌生长的影响, 为优化改良鼠疫菌培养基提供理论依据。方法 使用 0.1%、0.5%、1% 和 2% 四种浓度下大鼠血、兔血、豚鼠血等十种动物血制作的培养基培养鼠疫菌, 共传十代, 观察培养结果, 再进行相应统计分析。结果 1% 浓度下十种动物血对于鼠疫菌菌落数目的影响有差异 ( $P=0.015 < 0.05$ ), 且猪血优于鸡血 ( $P=0.026 < 0.05$ ); 四种浓度的猪血对于鼠疫菌菌落数目的影响差异具有统计学意义 ( $P=0.037 < 0.05$ ), 1% 浓度下优于空白 ( $P=0.002 < 0.05$ )。四种浓度下十种动物血对于鼠疫菌长度的影响差异均具有统计学意义 ( $P < 0.001$ ); 而十种动物血液四个浓度间对于鼠疫菌长度的影响差异也具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。结论 在观察菌落数量时, 最优选择为 1% 猪血, 除此之外尽可能选择低浓度、易获取的血液刺激剂。若想培养出更优长度的鼠疫菌, 最优选择为 0.1% 兔血, 既能达到理想的实验效果又能节约成本。此外, 利用只添加血液刺激剂的赫氏敏感培养基培养鼠疫菌, 菌株的性状不会发生 L 型转变, 菌株的总体性状是稳定的, 这对菌种稳定传代保存有重要意义。

**关键词:** 鼠疫菌; 动物血液; 血液刺激剂; 生长; 实验研究

中图分类号: R117 文献标志码: A 文章编号: 1003-8507(2024)12-2235-08

DOI: 10.20043/j.cnki.MPM.202401421

## Experimental study on the effects of different animal blood on the growth of *Yersinia pestis*

ZHAO Ying\*, ZHANG Ling-ling, HUO Xiao-yu, HUANG Xue-juan, GUO Min, GAO Zi-hou, SU Chao

\* School of Public Health, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China

**Abstract: Objective** To provide a theoretical basis for optimizing and improving the culture medium of *Yersinia pestis*, the effects of different species and different concentrations of animal blood on the growth of *Yersinia pestis* were investigated.

**Methods** Ten kinds of animal blood including rat blood, rabbit blood and guinea pig blood at four concentrations of 0.1%, 0.5%, 1% and 2% were used as blood stimulators to culture *Yersinia pestis* in the medium. The culture results were observed and the corresponding statistical analysis was carried out. **Results** The effect of 10 kinds of animal blood on the number of *Yersinia pestis* colonies at 1% concentration was different ( $P=0.015 < 0.05$ ), and pig blood was better than chicken blood ( $P=0.026 < 0.05$ ). The effect of four concentrations of pig blood on the number of *Yersinia pestis* colonies was statistically significant ( $P=0.037 < 0.05$ ), and it was better than the blank at 1% concentration ( $P=0.002 < 0.05$ ).

The effects of ten kinds of animal blood at four concentrations on the length of *Yersinia pestis* were statistically significant ( $P < 0.001$ ). The difference in the effect of four concentrations of blood on the length of *Yersinia pestis* in ten animals was also statistically significant ( $P < 0.001$ ). **Conclusion** When observing the number of colonies, the optimal choice is 1% pig blood. In addition, low concentration and easy-to-obtain blood stimulants can be selected as far as possible. To cultivate a better length of *Yersinia pestis*, the optimal choice is 0.1% rabbit blood, which can achieve the desired experimental results and save costs. In addition, using the Herxheimer's sensitive medium with only blood stimulator to culture *Yersinia pestis*, the characteristics of the strain will not undergo L-type transformation, and the overall characteristics of the strain are stable, which is of great significance for the stable passage and preservation of the strain.

**Keywords:** *Yersinia pestis*; Animal blood; Blood stimulators; Growth; Experimental research

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32360248; 81660554); “兴滇英才支持计划” (YNWR-MY-2018-035); 云南省重大科技专项课题 (202102AA100019)

作者简介: 赵莹 (1999—), 女, 硕士在读, 研究方向: 鼠疫自然疫源性疾病预防研究

通信作者: 苏超, E-mail: yiedsc@163.com; 高子厚, E-mail: yngzh@126.com

云南省有家、野两类疫源地,且近年来野鼠疫源地一直处于活跃状态,家鼠疫源地也存在复苏的迹象<sup>[1-2]</sup>,警示着鼠疫从来没有淡出我们的生活。因此尽早发现并确定鼠疫疫情,及时处置并控制危害的扩大依然非常重要。鼠疫耶尔森氏菌(以下简称鼠疫菌)作为鼠疫的病原体,是判定鼠疫疫情的依据之一<sup>[3]</sup>。培养基是分离鼠疫菌的基本条件,也是培养鼠疫菌的“容器”,而优质培养基对于细菌学诊断、菌落的辨认与挑选、鼠疫菌的分离培养、毒力因子的鉴定以及鼠疫菌保存机制的探索具有重要意义<sup>[4]</sup>。血液是鼠疫菌生长的良好刺激剂,以往研究时常用的血液刺激剂为兔溶血<sup>[4-11]</sup>,其他动物血对鼠疫菌生长的影响是否与兔血相同尚未可知。考虑能自然感染鼠疫的动物种类众多<sup>[12-13]</sup>,但因动物实验的条件限制,且云南以鸡、牛、羊、猪等家禽较为常见,因此本研究在全省范围内,选择马、牛、猪、狗、鸡等与人类接触密切动物以及大鼠、豚鼠的血液制作培养基,探究添加不同浓度、不同动物血液的培养基对鼠疫菌生长的影响,以便为今后鼠疫菌培养基血液刺激剂筛选、鼠疫现场广泛应用及鼠疫菌病原学研究提供理论依据,同时优化后的培养基对于菌株鉴定、鉴别和分型,探索新型鼠疫菌的毒力因子以及鼠疫菌的传播与保存机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 试验菌株** 鼠疫疫苗菌株(EV<sub>76</sub>),由云南省地方病防治所提供。

**1.1.2 血液选择** 无菌脱纤维豚鼠全血、无菌脱纤维大鼠全血、无菌脱纤维狗全血、无菌脱纤维兔全血、无菌脱纤维马全血、无菌脱纤维羊全血、无菌脱纤维驴全血、无菌脱纤维牛全血、无菌脱纤维猪全血、无菌脱纤维鸡全血。

### 1.2 方法

**1.2.1 无菌脱纤维动物血液制备** 对相应健康动物无菌采集全血,将其注入盛有玻璃珠的器皿中,不停转动玻璃珠以分离纤维蛋白,阻止血液凝固,最后得到无菌脱纤维动物全血(全程无菌操作)。

**1.2.2 血液培养基的制备** 往配制好的赫氏培养基中依次添加不同的动物血液,摇匀,完成浓度 0.1%、0.5%、1%、2%的培养基配置,倒板。将制作好的培养皿做好标记放入 37℃ 的恒温培养箱中,待 24 h 观察是否有污染;将无污染的培养基密封保存于 4℃ 冰箱,备用。

**1.2.3 菌液制备** 将麦氏浊度为 0.5 的菌液(约相当于每毫升  $1 \times 10^8$  个细菌)稀释至  $1 \times 10^4$  个/ml,振

荡混匀。再吸取已稀释的菌液 10  $\mu$ l(约 100 个菌)滴入不同血液浓度的平皿上,用一次性 L 棒涂布接种,于 28℃ 培养,每 48 h 传代一次,传至十代。

**1.2.4 活菌计数** 培养皿培养 24 h 后取出,使用全自动菌落计数器计数,记录每一代菌落数。

**1.2.5 染色制片** 利用革兰氏快速染液染色制作玻片标本,于 Olympus 生物显微镜油镜(100 $\times$ )下观察,并拍照留存。

**1.2.6 测量菌落长度** 镜检后的菌落镜检图,用 Image J 科研图片处理软件测量每一种血液培养的每一代鼠疫菌菌落长度,每张图片测量不少于 50 个菌体。

**1.2.7 质量控制** 实验过程中全程无菌操作。每次实验前后均对实验环境和生物安全柜进行紫外线照射消毒;试验器材使用前用高压蒸汽灭菌设备高压灭菌(121℃,20 min)。培养皿制作后于 37℃ 的恒温培养箱中培养,24 h 后检查是否有杂菌。培养皿无菌冷藏保存,接种时使用质量较好,完好无杂菌的培养皿接种。

**1.2.8 数据分析** 利用 SPSS 25.0 软件,对同种浓度不同动物血液、不同浓度相同动物血液中生长的鼠疫菌菌落数目和长度进行单因素方差分析。若存在差异,方差分析结果采用 LSD 法进行两两比较;Kruskal - Wallis 检验分析结果采用非参数检验多个独立样本间两两比较,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 不同血液刺激剂对鼠疫菌菌落数的影响分析

**2.1.1 同一浓度,不同动物血液对于鼠疫菌菌落数目的影响** 采用 Kruskal - Wallis 检验分析 0.1%、0.5%、1%、2% 浓度下十种动物的血液刺激剂对鼠疫菌菌落数目的影响。结果显示,1% 浓度下十种动物血对于鼠疫菌菌落数目的影响存在统计学意义( $P = 0.015 < 0.05$ )。其余三种浓度下,十种动物血间对于鼠疫菌菌落数目的影响无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

进一步采用非参数检验多个独立样本间两两比较,结果显示 1% 浓度下添加猪血的培养基培养鼠疫菌时,菌落数目优于鸡血( $P = 0.026 < 0.05$ )。见表 2。

**2.1.2 不同浓度,同一动物血液对鼠疫菌菌落数目的影响** 采用 Kruskal - Wallis 检验分析,结果显示,四种浓度下大鼠血、马血、牛血、豚鼠血对于鼠疫菌菌落数目的影响无统计学意义( $P > 0.05$ )。采用方差分析探究添加了狗血、鸡血、驴血、兔血、羊血、猪血的培养基对鼠疫菌菌落数目的影响时,结果显示四种浓

度下的猪血对于鼠疫菌菌落数目的影响具有统计学意义 ( $F = 2.799, P = 0.037 < 0.05$ ), 其余差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

进一步采用 LSD 法进行两两比较, 以具体分析四

种浓度下的猪血对于鼠疫菌菌落数目的影响。结果显示, 1% 浓度的猪血优于空白组 ( $P = 0.002 < 0.05$ )。见表 4。

表 1 同一浓度、不同动物血液对鼠疫菌菌落数目的影响分析

Table 1 Analysis of the effect of the same concentration and different animal blood on the number of *Yersinia pestis* colonies

| 浓度   | 十种物种菌落数目秩平均值 |       |       |       |       |       |       |       |       |       | H 值   | P 值    |       |
|------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|
|      | 大鼠           | 鸡     | 驴     | 马     | 牛     | 兔     | 豚鼠    | 羊     | 猪     | 空白    |       |        |       |
| 0.1% | 49.40        | 49.80 | 51.75 | 59.40 | 63.35 | 49.35 | 61.30 | 65.35 | 60.55 | 62.60 | 37.65 | 7.116  | 0.714 |
| 0.5% | 58.50        | 38.70 | 33.65 | 52.35 | 64.25 | 58.40 | 68.30 | 75.05 | 50.85 | 60.40 | 50.05 | 14.603 | 0.147 |
| 1%   | 45.00        | 37.35 | 31.85 | 64.50 | 46.70 | 58.35 | 67.40 | 68.70 | 60.30 | 81.65 | 48.70 | 21.971 | 0.015 |
| 2%   | -            | 48.40 | 22.80 | 55.05 | 48.70 | 40.40 | 58.45 | 63.10 | 61.15 | 58.00 | 48.95 | 15.353 | 0.082 |

注:“-”用 2% 的大鼠血作为血液刺激剂培养鼠疫菌时, 发生污染, 无数据。

表 2 1% 浓度下, 不同动物血液对鼠疫菌菌落数目的影响的两两比较

Table 2 Pairwise comparison of the effects of different animal blood on the colony number of *Yersinia pestis* at 1% concentration

| 物种 | 大鼠    | 狗     | 鸡     | 驴     | 马     | 牛     | 兔     | 豚鼠    | 羊     | 猪     |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 空白 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 大鼠 | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.560 |
| 狗  | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.104 |
| 鸡  | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.697 | 0.537 | 1.000 | 0.026 |
| 驴  | -     | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 马  | -     | -     | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 0.784 |
| 牛  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 兔  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 | 1.000 |
| 豚鼠 | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 1.000 | 1.000 |
| 羊  | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | -     | 1.000 |

表 3 不同浓度、同一动物血液对鼠疫菌菌落数目的影响分析

Table 3 Analysis of the effects of different concentrations and the same animal blood on the number of *Yersinia pestis* colonies

| 物种  | 四种浓度下菌落数目秩平均值/均数 ± 标准差 |               |               |               |               | 检验统计量 | P 值   |
|-----|------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-------|-------|
|     | 0.1%                   | 0.5%          | 1%            | 2%            | 空白            |       |       |
| 大鼠血 | 18.20                  | 24.40         | 19.30         | -             | 20.10         | 1.619 | 0.655 |
| 马血  | 29.75                  | 31.00         | 24.10         | 24.95         | 17.70         | 5.248 | 0.263 |
| 牛血  | 25.15                  | 30.05         | 31.05         | 21.90         | 19.35         | 4.825 | 0.306 |
| 豚鼠血 | 25.80                  | 30.50         | 28.65         | 27.75         | 14.80         | 7.281 | 0.122 |
| 狗血  | 41.90 ± 27.67          | 35.80 ± 16.44 | 35.20 ± 19.54 | 41.50 ± 24.44 | 46.80 ± 35.83 | 0.350 | 0.842 |
| 鸡血  | 42.00 ± 26.66          | 32.20 ± 16.70 | 30.80 ± 23.26 | 21.40 ± 17.29 | 46.80 ± 35.83 | 1.593 | 0.193 |
| 驴血  | 48.60 ± 26.47          | 43.60 ± 19.38 | 54.30 ± 22.19 | 48.60 ± 28.21 | 46.80 ± 35.83 | 0.207 | 0.933 |
| 兔血  | 47.70 ± 22.96          | 53.20 ± 19.38 | 54.10 ± 17.70 | 50.40 ± 24.17 | 46.80 ± 35.83 | 1.753 | 0.155 |
| 羊血  | 49.00 ± 25.37          | 42.30 ± 18.19 | 49.60 ± 15.81 | 50.30 ± 19.27 | 46.80 ± 35.83 | 1.426 | 0.241 |
| 猪血  | 49.30 ± 24.73          | 47.10 ± 18.23 | 63.20 ± 15.75 | 50.00 ± 22.40 | 46.80 ± 35.83 | 2.799 | 0.037 |

注:用 2% 的大鼠血作为血液刺激剂培养鼠疫菌时, 发生污染, 无数据。

表 4 四种浓度下的猪血对于鼠疫菌菌落数目的影响的两两比较

Table 4 Comparison of the effects of pig blood at four concentrations on the number of *Yersinia pestis* colonies

| 浓度   | 0.1% | 0.5%  | 1%    | 2%    | 空白    |
|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 0.1% | -    | 0.815 | 0.144 | 0.941 | 0.073 |
| 0.5% | -    | -     | 0.092 | 0.758 | 0.116 |
| 1%   | -    | -     | -     | 0.165 | 0.002 |
| 2%   | -    | -     | -     | -     | 0.062 |

## 2.2 不同血液刺激剂对鼠疫菌长度的影响分析

2.2.1 同一浓度、不同动物血液对鼠疫菌长度的影响 采用 Kruskal - Wallis 检验分析 0.1%、0.5%、1%、2% 浓度下十种动物血液对鼠疫菌长度的影响, 结果显示, 四种浓度下十种动物血对于鼠疫菌长度的影响均具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。见表 5。

进一步两两比较, 0.5% 浓度下大鼠血、羊血、兔血和猪血, 1% 浓度下驴血、牛血、豚鼠血、羊血、兔血

和猪血以及 2% 浓度下豚鼠血和猪血培养的鼠疫苗长度均低于空白组 ( $P < 0.05$ )。结合两两比较的结果,若想培养更优长度的鼠疫苗,0.1% 浓度下,可选择的血液刺激剂依次为兔血、羊血、猪血;0.5% 浓度

下,可依次选择狗血、驴血;1% 浓度下,建议选择狗血,其次为鸡血、大鼠血;2% 浓度下则选择马血、狗血、鸡血。见图 1,2。

表 5 同一浓度、不同动物血液对鼠疫苗长度的影响分析

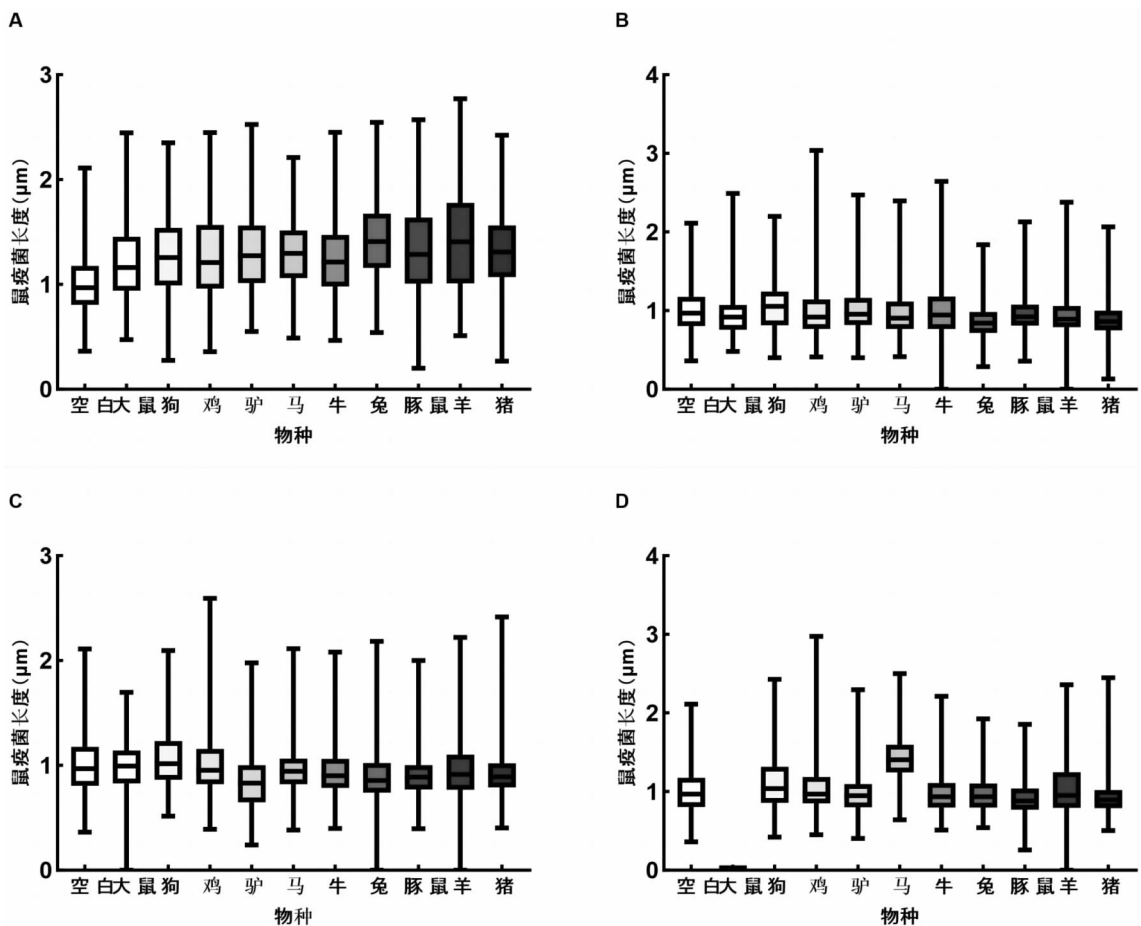
Table 5 Analysis of the effect of the same concentration and different animal blood on the length of *Yersinia pestis*

| 浓度   | 十种物种鼠疫苗长度秩平均值 |          |          |          |          |          |          |
|------|---------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|
|      | 大鼠            | 狗        | 鸡        | 驴        | 马        | 牛        | 兔        |
| 0.1% | 2 435.65      | 2 697.13 | 2 636.38 | 2 834.56 | 2 856.77 | 2 580.70 | 3 303.62 |
| 0.5% | 2 625.46      | 3 221.10 | 2 764.10 | 2 974.16 | 2 696.27 | 2 844.31 | 2 202.50 |
| 1%   | 3 045.18      | 3 422.62 | 3 080.89 | 2 081.36 | 2 825.32 | 2 659.46 | 2 364.15 |
| 2%   | -             | 2 824.59 | 2 584.23 | 2 216.04 | 4 124.42 | 2 246.61 | 2 200.50 |

| 浓度   | 十种物种鼠疫苗长度秩平均值 |          |          |          | H 值     | P 值    |
|------|---------------|----------|----------|----------|---------|--------|
|      | 豚鼠            | 羊        | 猪        | 空白       |         |        |
| 0.1% | 2 910.01      | 3 153.42 | 2 963.45 | 1 579.82 | 415.049 | <0.001 |
| 0.5% | 2 759.72      | 2 628.79 | 2 284.49 | 2 991.47 | 178.093 | <0.001 |
| 1%   | 2 462.45      | 2 719.92 | 2 537.86 | 3 056.29 | 293.752 | <0.001 |
| 2%   | 1 942.90      | 2 449.72 | 2 018.69 | 2 397.30 | 849.629 | <0.001 |

注：“-”用 2% 的大鼠血作为血液刺激剂培养鼠疫苗时,发生污染,无数据。



注:A、B、C、D 分别表示 0.1%、0.5%、1% 及 2% 四种浓度;用 2% 的大鼠血作为血液刺激剂培养鼠疫苗时,发生污染,无数据。

图 1 同一浓度、不同动物血液培养鼠疫苗长度箱式图

Fig. 1 Box diagram of the length of *Yersinia pestis* cultured in blood of different animals at the same concentration

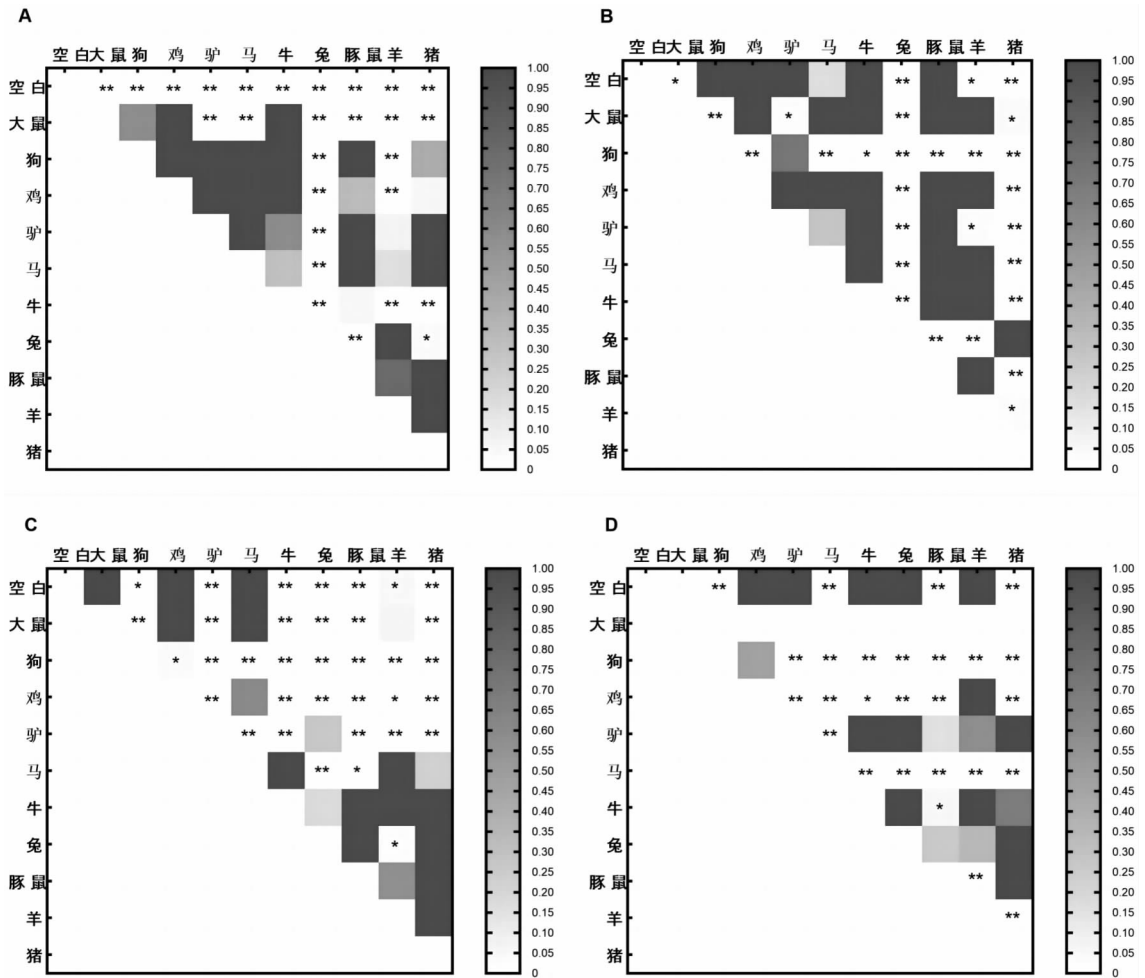
2.2.2 不同浓度,同一动物血液对鼠疫苗长度的影响 采用 Kruskal - Wallis 检验不同浓度、同一动物血

液对鼠疫苗长度的影响,结果显示,十种动物血液刺激剂在 0.1%、0.5%、1%、2% 四种浓度下对于鼠疫苗

长度的影响差异均具有统计学意义 ( $P < 0.001$ )。见表 6。

进一步两两比较发现 0.5% 浓度大鼠血、兔血、羊血和猪血; 1% 浓度驴血、牛血、兔血、豚鼠血、羊血和猪血以及 2% 浓度的豚鼠血和猪血培养的鼠疫菌长

度均低于空白组 ( $P < 0.05$ )。结合两两比较结果, 可选择 0.1% 浓度大鼠血、兔血等九种动物血作为血液刺激剂, 也可选择 2% 的马血作为血液刺激剂。见图 3。



注: A、B、C、D 分别表示 0.1%、0.5%、1% 及 2% 四种浓度; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 2 同一浓度、不同动物血液对鼠疫菌长度的两两比较

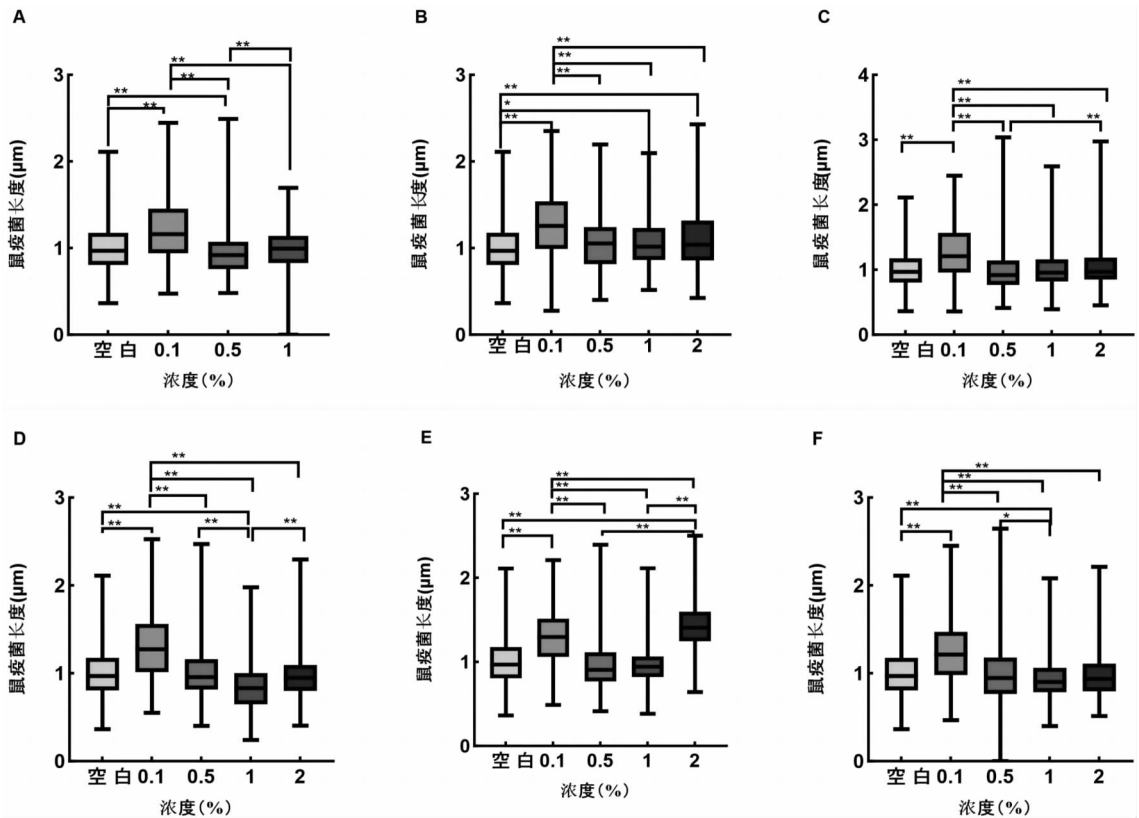
Fig. 2 Pairwise comparison of the length of *Yersinia pestis* in the same concentration and different animal blood

表 6 不同浓度、同一动物血液对鼠疫菌长度的影响分析

Table 6 Analysis of the effects of different concentrations and the same animal blood on the length of *Yersinia pestis*

| 物种  | 四种浓度下鼠疫菌长度秩平均值 |          |          |          |          | H 值     | P 值    |
|-----|----------------|----------|----------|----------|----------|---------|--------|
|     | 0.1%           | 0.5%     | 1%       | 2%       | 空白       |         |        |
| 大鼠血 | 1 257.49       | 808.59   | 924.90   | -        | 939.21   | 162.920 | <0.001 |
| 狗血  | 1 574.58       | 1 166.22 | 1 194.98 | 1 267.82 | 1 048.90 | 149.848 | <0.001 |
| 鸡血  | 1 617.15       | 1 071.77 | 1 167.84 | 1 243.01 | 1 152.73 | 175.442 | <0.001 |
| 驴血  | 1 801.29       | 1 229.15 | 840.30   | 1 144.59 | 1 237.17 | 463.958 | <0.001 |
| 马血  | 1 611.33       | 896.07   | 876.85   | 1 875.17 | 993.08   | 817.501 | <0.001 |
| 牛血  | 1 640.47       | 1 151.27 | 1 022.25 | 1 117.15 | 1 188.94 | 231.354 | <0.001 |
| 兔血  | 1 969.16       | 912.38   | 968.14   | 1 157.19 | 1 245.64 | 690.205 | <0.001 |
| 豚鼠血 | 1 809.75       | 1 147.23 | 1 000.75 | 1 032.70 | 1 262.07 | 415.870 | <0.001 |
| 羊血  | 1 788.52       | 1 027.96 | 1 044.98 | 1 207.74 | 1 183.31 | 371.923 | <0.001 |
| 猪血  | 1 883.41       | 950.64   | 1 050.74 | 1 090.87 | 1 276.84 | 534.092 | <0.001 |

注:“-”用 2% 的大鼠血作为血液刺激剂培养鼠疫菌时, 发生污染, 无数据。



注:A、B、C、D、E、F、G、H、I、J分别表示大鼠、狗、鸡、驴、马、牛、兔、豚鼠、羊和猪十种物种; \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图3 不同浓度、同一动物血液对鼠疫菌长度的两两比较

Fig. 3 Pairwise comparison of the length of *Yersinia pestis* in different concentrations and the same animal blood

### 3 讨论

在鼠疫菌研究中,培养的鼠疫菌大小、长度与质量十分重要,培养基是分离鼠疫菌的基本条件,为了使鼠疫菌更好的生长和繁殖,需在基础培养基内加入某种刺激鼠疫菌生长的因子<sup>[14]</sup>,其中屠曼斯基等认为血液是鼠疫菌生长的最好刺激剂,因为血液能降低培养基内的氧压,所蕴含的血红素能刺激细菌的呼吸作用从而缩短迟滞期,也能提供其生长所需的碳源、氮源及无机盐等<sup>[15]</sup>。实验室常用的血液刺激剂为1%兔血<sup>[4]</sup>。此外,冯建萍等<sup>[7,16]</sup>探究了不同种类刺激剂对鼠疫菌生长的影响,结果显示破伤风培养基用I号溶液和10%脱纤维兔溶血对鼠疫菌刺激更优;脱纤维绵羊血液和喜马拉雅旱獭血液培养的鼠疫菌生长情况优于脱纤维兔溶血培养基、布氏菌专用血培养基和赫氏普通培养基。但其他常见动物如猪、牛、马等对于对鼠疫菌的生长作用效果如何,目前尚无报道。本实验则探索了不同浓度下兔血及其他常见动物血对鼠疫菌生长的影响,为优化改良鼠疫菌培养基提供理论依据。

我们的实验结果显示,一些动物血液培养的鼠疫菌长度低于没有添加血液刺激剂的空白组,猜测可能

与鼠疫疫苗菌株(EV<sub>76</sub>)活化程度以及测量鼠疫菌长度时存在系统误差有关。但作为实验室常用血液刺激剂1%脱纤维兔溶血,与1%大鼠血、狗血等10种动物血液以及空白组对鼠疫菌菌落数目的影响并无差异,反而1%猪血制作的培养基可获得更优数量的鼠疫菌菌落。菌落作为单个细菌生长而来,具有一定的稳定性,鼠疫菌菌落的形态特征对于衡量鼠疫菌菌种的纯度,辨认、鉴定及分离鼠疫菌的具有重要意义<sup>[4]</sup>。则1%猪血制作的敏感培养基更有利于观察菌落特征等实验。0.1%兔血所制作的培养基可以获得长度更优的鼠疫菌,对于鼠疫菌菌株鉴定和分型、研究鼠疫菌的毒理因子及其保存机制等是更好的选择。但由于云南家禽以牛、羊、猪等为主,兔血相对而言不易获取,因此建议可使用2%的马血,1%的狗血,0.1%的羊血,2%和0.5%的狗血及0.1%的猪血,也能培养出长度更优的鼠疫菌,以达到实验目的。

此外能自然感染鼠疫的动物种类众多,为鼠疫菌在自然状态下的生长、转变提供了极为众多的可能与不确定性。且其流行和保存机制尚不清楚,对于这种疾病疫情发生的可能性尚无法预测,随时随地都有发生鼠疫流行的可能。而L型作为细菌、真菌等微生物的细胞壁缺陷型,是真菌等受到不利因素(物理、化

学、生物等因素)的影响,生态环境发生改变时出现的一种特殊保存形态。有观点认为,鼠疫流行后会出现一段静息期,可能与鼠疫菌转变为 L 型菌有关。鼠疫菌 L 型的存在,对于鼠疫源地的存在与鼠疫的流行有着重要意义<sup>[17-18]</sup>。L 型细菌的培养需加入 3% ~ 5% NaCl、10% ~ 20% 蔗糖或 7% 聚乙烯吡咯酮(PVP)等稳定剂,以提高培养基的渗透压,但还需加入人或马血清<sup>[19]</sup>。在 1971—1980 年曾有研究者从野生啮齿动物中分离 L 型鼠疫菌的过程中,便发现在含有正常马血清和蔗糖的 0.3% 半液体琼脂上只分离到 L 型菌株;而赫金格尔琼脂和 L 型培养基上,均分离到通常的鼠疫菌<sup>[20]</sup>。还有研究证实鼠疫菌 L 型在豚鼠体内可存活 20 ~ 30 天<sup>[5]</sup>。由此其他动物的介入是否会影响鼠疫菌 L 型的转变值得我们思考。我们的实验利用十种动物血液制作的培养基培养 EV<sub>76</sub> 菌,共传十代,镜下观察显示,菌体形态均为通常的鼠疫菌,并未发现其形态的改变。原因分析:该项研究将野生动物的内部器官接种于相应培养基上,分离到 L 型菌株所使用的培养基添加了正常马血清与 15% 蔗糖<sup>[20]</sup>;而我们利用 EV<sub>76</sub> 菌进行模拟,且使用的是添加不同动物全血的赫氏敏感培养基,并没有加入稳定剂。鼠疫菌种资源的保存在鼠疫防控与研究中至关重要,而保存过程中经常会将菌株不断复苏、传代,该过程菌株的性状是否发生改变对于研究结果有很大影响。我们的实验结果初步证实了利用只添加血液刺激剂的赫氏敏感培养基培养鼠疫菌,菌株的性状不会发生 L 型转变,菌株的总体性状是稳定的,这对菌种稳定传代保存有重要意义。

虽然没有观察到鼠疫菌形态的变化,但几种动物血液在体外环境下,对鼠疫菌生长状况的影响敏感程度确有不同。根据实验结果,在确保实验结果的基础上增加了选择血液刺激剂的种类,也可因地制宜、节约成本并节省时间;同时其也为进一步研究鼠疫菌的生长、转变、保存机制提供一定参考和启示作用。此外,有研究指出往血液培养基中加入 Ca<sup>2+</sup> 和 Fe<sup>2+</sup>,能提高鼠疫菌的生长速度,以便快速诊断,因此还可进一步探究相关培养条件<sup>[21]</sup>。关于鼠疫菌 L 型的产生机制、生物学特性以及在自然环境下其他动物的介入对于鼠疫菌的转变是否有影响等问题也需进一步深入研究。

**利益冲突声明** 本研究不存在任何利益冲突

## 参考文献

[1] 浦恩念,苏超,邵宗体,等. 云南勐海县一起人间鼠疫疫情的调查处置分析[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(5):464-468.  
Pu EN, Su C, Shao ZT, et al. Investigation and handling of a human plague epidemic outbreak in Menghai County, Yunnan[J].

Chinese Journal of Zoonoses, 2022, 38(5): 464-468.

[2] 石丽媛,杨桂荣,赵春花,等. 2016 年云南省景洪市一起人间鼠疫疫情判定及处置[J]. 中国卫生检验杂志,2017,27(10):1502-1504, 1507.  
Shi LY, Yang GR, Zhao CH, et al. Determination and disposal of human plague in Jinghong, Yunnan Province, in 2016 [J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2017, 27(10): 1502-1504, 1507.

[3] 中华人民共和国卫生部. WS 279-2008 鼠疫诊断标准[S]. 北京:中国标准出版社,2008.  
Ministry of Health of the People's Republic of China. WS 279-2008 Plague diagnostic criteria [S]. Beijing: Standards Press of China, 2008.

[4] 李存香,冯建萍,李得恩. 鼠疫耶尔森菌培养基在鼠疫防控领域中的应用[J]. 青海畜牧兽医杂志,2017,47(5):63-65.  
Li CX, Feng JP, Li DE. Application of yersinia pestis culture medium in the field of plague prevention and control [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2017, 47(5): 63-65.

[5] 张涛,冯志勇,邱俊荣. 鼠疫高级细菌学[M]. 银川:宁夏人民出版社,2006.  
Zhang T, Feng ZY, Qiu JR. Advanced bacteriology of plague [M]. Yinchuan: Ningxia People's Publishing House, 2006.

[6] 李胜,杨建国,冯建萍,等. 不同保存时间的血液刺激剂对鼠疫菌生长影响的观察[J]. 青海畜牧兽医杂志,2016,46(3):12-13.  
Li S, Yang JG, Feng JP, et al. Observation on effect of different preservation time of blood irritants on Yersinia pestis [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2016, 46(3): 12-13.

[7] 冯建萍,魏绍振,金星,等. 不同刺激剂赫氏培养基对鼠疫菌生长影响的观察[J]. 疾病预防控制通报,2011,26(5):15-16.  
Feng JP, Wei SZ, Jin X, et al. Observation on effect of different irritants in Hershey medium on growth of Yersinia pestis [J]. Endemic Diseases Bulletin (China), 2011, 26(5): 15-16.

[8] 李玉贵,梁占凯,李建法,等. 鼠疫防控实用技术病原学篇[M]. 北京:人民卫生出版社,2016.  
Li YG, Liang ZK, Li JF, et al. Etiology of practical technology for plague prevention and control [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2016.

[9] 谢辉,刘中凯,耿永强,等. 一种选择敏感培养基对腐败材料检测鼠疫耶尔森氏菌检测的应用效果[J]. 中国人兽共患病学报,2022,38(10):906-909, 930.  
Xie H, Liu ZK, Geng YQ, et al. A selective sensitive medium for the detection of Yersinia pestis in corrupted materials [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2022, 38(10): 906-909, 930.

[10] 冯建萍,李千,李胜,等. 鼠疫耶尔森菌赫氏培养基的影响因素及优化研究概述[J]. 中国媒介生物学及控制杂志,2017,28(1):93-95.  
Feng JP, Li Q, Li S, et al. The influencing factors and optimization in preparation of Yersinia pestis Hearst media [J]. Chinese Journal of Vector Biology and Control, 2017, 28(1): 93-95.

- [12] 季钢,王智强,董山山. 青少年体质测评与健康生活方式现状调查分析[J]. 中国健康教育,2020,36(2):134-137.  
Ji G, Wang ZQ, Dong SS. Investigation and analysis on adolescent physical fitness evaluation and healthy lifestyle[J]. Chinese Journal of Health Education, 2020, 36(2): 134-137.
- [13] Ali Da. Knowledge of the relationships between oral health, diabetes, body mass index and lifestyle among students at the Kuwait university health sciences center, Kuwait [J]. Medical Principles and Practice; International Journal of the Kuwait University, Health Science Centre, 2016, 25(2): 176-180.
- [14] Abed alah M, Abdeen S, Selim N, et al. A sociodemographic analysis of the impact of COVID-19-Related schools' closure on the Diet and physical activity of children and adolescents in Qatar [J]. Journal of Epidemiology and Global Health, 2023, 13(2): 248-265.
- [15] Lepp A, Barkley JE, Sanders GJ. The relationship between cell phone use, physical and sedentary activity, and cardiorespiratory fitness in a sample of U. S. college students [J]. The International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity, 2013, 10: 79.
- [16] 丁理浩,陈嘉成. 大学新生身体活动现状的调查——以华中师范大学为例[J]. 湖北体育科技,2020,39(6):554-557.  
Ding LH, Chen JC. A survey on the current situation of physical activity of university freshmen - - taking Huazhong Normal University as an example [J]. Hubei Sports Science, 2020, 39(6): 554-557.
- [17] 徐金红,武文婧. 互联网经济对餐饮业发展的实证分析[J]. 统计与管理,2021,36(5):4-9.  
Xu JH, Wu WJ. Empirical analysis of the development of catering industry by Internet economy [J]. Statistics and Management, 2021, 36(5): 4-9.
- [18] 张霄. 大学生对外卖需求现状的调查分析——以青岛某高校为例[J]. 上海商业,2021(5):27-29.  
Zhang X. Investigation and analysis of the current situation of college students' demand for takeaway - - Taking a college in Qingdao as an example [J]. Shanghai Business, 2021(5): 27-29.
- [19] Vella-Zarb RA, Elgar FT. The 'freshman 5': a meta-analysis of weight gain in the freshman year of college [J]. Journal of American College Health, 2009, 58(2): 161-166.
- [20] 沈梅云,张晴. 2014—2015 年无锡市锡山区食源性疾病预防监测结果分析[J]. 中国校医,2016,30(10):756-757.  
Shen MY, Zhang Q. Analysis of foodborne disease surveillance results in Xishan District, Wuxi City, 2014-2015 [J]. Chinese Journal of School Doctor, 2016, 30(10): 756-757.
- [21] Seo DC, Niu JJ. Trends in underweight and overweight/obesity prevalence in Chinese youth, 2004-2009 [J]. International Journal of Behavioral Medicine, 2014, 21(4): 682-690.
- [22] Bandura A. Social cognitive theory of personality [M]. 2nd ed. New York: The Guilford Press, 1999.

收稿日期:2024-02-03

(上接第 2241 页)

- [11] 冯建萍. 基础培养基在鼠疫检测中的作用及质控措施[J]. 青, 2019,49(5):62-63.  
Feng JP. The role of basic culture medium in plague detection and quality control measures [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2019, 49(5): 62-63.
- [12] 秦长青,许磊,张荣祖,等. 中国鼠疫自然疫源地分型研究 V. 鼠疫宿主生物学特征[J]. 中,2012,33(7):692-697.  
Qin CY, Xu L, Zhang RZ, et al. Ecological-geographic landscapes of natural plague foci in China V. Biological characteristics of major natural reservoirs of Yersinia pestis [J]. Chinese Journal of Epidemiology, 2012, 33(7): 692-697.
- [13] 刘振才,程治国,张雁冰,等. 我国鼠疫自然疫源地染疫动物种类及其分布[J]. 现代预防医学,2002,(6):768-770.  
Liu ZC, Cheng ZG, Zhang YB, et al. Type and distribution of animal of catching plague in the plague nature foci of China [J]. Modern Preventive Medicine, 2002, (6): 768-770.
- [14] 冯建萍. 鼠疫菌培养基及培养条件的优化[J]. 青海畜牧兽医杂志,2024,54(1):60-61.  
Feng JP. Optimization of yersinia pestis medium and culture conditions [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2024, 54(1): 60-61.
- [15] 王虎. 青海地方病预防与控制读本 [M]. 西宁:青海人民出版社,2006.  
Wang H. Textbook on prevention and control of endemic disease in Qinghai [M]. Xining: Qinghai People's Publishing House, 2006.
- [16] 冯建萍,王梅,李存香,等. 不同敏感培养基对鼠疫菌生长作用的效果评价[J]. 青海畜牧兽医杂志,2023,53(5):9-11, 38.  
Feng JP, Wang M, Li CX, et al. Effects of different sensitive medium on the growth of yersinia pestis [J]. Chinese Qinghai Journal of Animal and Veterinary Sciences, 2023, 53(5): 9-11, 38.
- [17] 王波,王鹏. 鼠疫耶尔森氏菌 L 型菌株的研究进展[J]. 现代预防医学,2019,46(9):1677-1679, 1683.  
Wang B, Wang P. Advance on the L-form of Yersinia pestis [J]. Modern Preventive Medicine, 2019, 46(9): 1677-1679, 1683.
- [18] Breneva NV, Maramovich AS, Klimov VT. [Clonal structure of Yersinia pestis populations in experimental soil ecosystems] [J]. Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, i Immunobiologii, 2007, (1): 12-17.
- [19] Malek MA, Bitam I, Levasseur A, et al. Yersinia pestis halotolerance illuminates plague reservoirs [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40022.
- [20] 白常乐,费来玺,张仁明. 从自然疫源地的野生啮齿动物中分离鼠疫菌的 L-型[J]. 地方病译丛,1983,(3):29-31.  
Bai CL, Fei LX, Zhang RM. Isolation of L-forms of Yersinia pestis from wild rodents in natural foci [J]. Translation of Endemic Diseases, 1983, (3): 29-31.
- [21] Makdasi E, Atiya-Nasagi Y, Gur D, et al. An improvement in diagnostic blood culture conditions allows for the rapid detection and isolation of the slow growing pathogen yersinia pestis [J]. Pathogens, 2022, 11(2): 255.

收稿日期:2024-01-25