

蜡状芽孢杆菌与食物中毒及感染症

蔡 妙 英 徐 迪 诚

(中国科学院微生物所) (哈尔滨市防疫站)

(一) 蜡状芽孢杆菌与食物中毒及感染症的关系

蜡状芽孢杆菌是革兰氏阳性的需氧芽孢菌。在需

氧芽孢菌中,除炭疽芽孢杆菌外,曾被认为是非致病菌和污染菌。但在六十年代以来作了大量的工作,逐步认识到它在医学上的重要性。

表 1 蜡状芽孢杆菌食物中毒的型别

	腹 泻 型		呕 吐 型	
	蜡状芽孢杆菌	产气荚膜梭菌	蜡状芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌
潜伏期 (小时)	8—16	8—22	1—5	1—6
病程 (小时)	12—24	12—24	6—24	6—24
腹 泻	极常见	极常见	十分常见	常 见
呕 吐	偶 然	罕 见	极 常见	极常见
毒素对热的敏感性	不 耐 热		耐 热	
结 肠 结 扎 试 验*	阳 性		阴 性	
对恒河猴的病原性	引起腹泻		引起呕吐	

* 免结肠液贮留现象。

表 2 蜡状芽孢杆菌产生的毒素^[3]

毒 素	性 质
a. 呕吐	低分子量(<5,000)肠毒素,在35℃以上不形成。于126℃15', pH2.2 小时, pH11.2 小时,胰蛋白酶和胃蛋白酶稳定。与生芽孢有关。
b. 腹泻毒素 (鼠致死因素 I)	相当不稳定的肠毒素蛋白质,分子量约50,000,等电点4.85,对胰蛋白酶、链蛋白酶敏感,对非胃肠感染也可能有作用。
c. 蜡状芽孢杆菌毒素 (溶血素 I)	硫酸-活性溶细胞毒素,热稳定抗原蛋白,分子量49—59,000,等电点6.3—6.7,对鼠致死。
d. 次生溶血素 (溶血素 II)	热稳定抗原蛋白,分子量29—34,000,等电点4.92,对链霉蛋白酶、胃蛋白酶、胰蛋白酶敏感。
e. 磷脂酶 c (卵磷脂酶)	相当稳定的细胞毒性金属酶(需要Zn ⁺⁺)。抗胰蛋白酶。分子量23—29,000。等电点6.5—8.1,它不能使兔致死或组织坏死。
f. 鼠致死因素 2	不稳定因素,与蜡状芽孢杆菌毒素 I 于分子量和等电点方面非常相像,或许是相同的。
g. Ezepchuk 和 Fluer 毒素	热稳定抗原蛋白质,分子量57,000,60℃20'失活,对鼠和兔致死,静脉注射引起猫的呕吐,可能与a* 有关

* 原文中 a 为 b, 作者认为可能有误。

1906—1949 年曾有文献报道食物中毒与芽孢菌的关系^[1],但对病原菌的描述十分粗浅,常归于“炭疽”或“枯草-肠系膜菌群”,虽然也有除炭疽以外的芽孢菌引起的临床感染,但提不出病原的详细描述和它们的数目。自 1952 年 Smith 等把芽孢菌的分类问题澄清以来,发现有许多芽孢菌在食物中毒和临床感染方面日益重要。尤其在最近十年,大量的报道认为,蜡状芽孢杆菌是食物的腐败菌,并且从腐败食物、患者呕吐物及粪便中都可以分离到;另一方面,在临床感染中应用抗菌素常常无效,也是由于这一类细菌能产生内酯酶,对青霉素产生抗性的缘故,由此也可证明它的致病性。Terranova 和 Blake^[2] 详细描述了由蜡状芽孢杆菌引起的两种类型的食物中毒,并报道了 1966—1975 年有 133 人由 *B. cereus* 引起的消化道侵染,其中七起(98 人)潜伏期在 6—14 小时,以腹泻型为多,占 75% 以上;而呕吐型仅占 23% 左右,病程 20—36 小时。1974 年 Mortimer 和 McCann 也报道了几起由 *B. cereus* 引起的肠道感染,13% 病例的潜伏期为 1—6 小时,全是呕吐型;而大多数病例是腹泻型,潜伏期 8 小时左右,病程一般在 24 小时之内(表 1)。这两种类型的病因,与蜡状芽孢杆菌产生不同的毒素有关,与食物中毒有关的有呕吐、腹泻毒素以及溶血素 I、II。蜡状芽孢杆菌除产生以上毒素外,还可产生卵磷脂酶、鼠致死因素和 Ezepechuk-Fluer 毒素(见表 2)。腹泻肠毒素是对数期的代谢产物,当产生量大时,可引起皮肤或肠粘膜的坏死,因此在食物中毒时,引起腹泻,而在非食物中毒的其它感染时,则是产脓的病因。

早在 1963 年, Farrar^[3] 将由“非致病”的芽孢菌引起的感染症分为局部感染、混合感染和扩散感染三种类型,这三种类型同样也适合于蜡状芽孢杆菌的感染症。前两种类型常见于眼科,如结膜炎、全眼球炎、角膜炎、虹膜睫状体炎及泪囊炎等。有报道因输入感染了蜡状芽孢杆菌的血液以后,发生全眼球炎^[4]。Raphall 等^[5] 报告,因减压装置被污染,使患儿续发脑膜炎,从患儿的脑脊液、血液中以及减压管中都培养出蜡状芽孢杆菌。Turnbull 等^[7] 报告,一名关节脱臼手术病人的创伤部位出现气性坏疽,从其分泌物中检出蜡状芽孢杆菌和摩氏变形菌。试验证明,此菌可引起兔迴肠粘膜及荷兰猪皮肤坏死。近年来报告的蜡状芽孢杆菌扩散感染,很多与白血病有关^[6,9],并且并发菌血症,在病人肺部或脑部形成感染病灶。

近年来的工作已经证实 Pearson^[10] 提出的蜡状芽孢杆菌应当看作是人和动物的致病菌的结论是正确的,并且得到了广泛的承认。因此,在我国今后的医疗、卫生防疫工作中,对此菌应当给以足够的重视。

(二) 蜡状芽孢杆菌的分类位置

1. 在 Gordon^[11] 系统中的位置: 蜡状芽孢杆菌是产芽孢的革兰氏阳性杆菌,归入孢囊不膨大的群 1 中。

- 群 1 胞内具颗粒部分的菌株检索表
- A. 葡萄糖洋菜培养基上生长的细胞内,有不着色的球状体(即聚-β-羟基丁酸盐)
- B₁. 严格好氧,不产 V-P。
- 巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)
- B₂. 兼性厌氧,产生 V-P。
- 蜡状芽孢杆菌 (*B. cereus*)
- C₁. 对昆虫致病,有伴孢晶体
- 蜡状芽孢杆菌苏云金变种 (*B. cereus* var. *thuringiensis*)*
- 或
- 苏云金芽孢杆菌 (*B. thuringiensis*)
- C₂. 对昆虫不致病,无伴孢晶体。菌落呈蕈状。
- 蜡状芽孢杆菌蕈状变种 (*B. cereus* var. *myco-*
ides)
- C₃. 对昆虫不致病,无伴孢晶体。菌落不呈蕈状。为炭疽的病原菌。

蜡状芽孢杆菌炭疽变种 (*B. cereus* var. *anthracis*)*

或

炭疽芽孢杆菌 (*B. anthracis*)

注:对“*”者的分类有不同的意见。《Bergey 鉴定细菌学手册第八版》^[12]认为,应当是独立的一个种。

2. 与近似种的鉴别: 群 1 的种和变种所具有的共同特征为: 革兰氏阳性的大杆菌,细胞宽度都在 1 微米以上,芽孢中生,孢囊不膨大,细胞内有聚-β-羟基丁酸盐颗粒。除这些相同特征外,还有一些不同的特征(见表 3)。

3. 蜡状芽孢杆菌的特征: 细胞大小为 1.0—1.2 × 3—5μm,芽孢椭圆,中生到近中生,生长在葡萄糖洋菜上的早期细胞含有球状的类脂类——即聚-β-羟基丁酸盐颗粒为主,还有异染粒,菌体有时呈链状。菌落

表 3 蜡状芽孢杆菌与近似种的鉴别特征

种	巨大芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌	蜡状芽孢杆菌苏云金变种	蜡状芽孢杆菌炭疽变种	蜡状芽孢杆菌蕈状变种
特征					
伴孢晶体	—	—	+	—	—
运动性	d	d	d	—	—
厌氧生长	—	+	+	+	+
V-P	—	+	+	+	+
45℃生长	+	+	+	—	—
10℃生长	+	+	+	—	+
卵黄反应	—	+	+	+	+
溶菌酶生长 (0.001%)	—	+	+	+	+
甘露醇产酸	+	—	—	—	—

注:“+”为 90% 以上阳性;“d”为 11—89% 阳性;“—”为 90% 以上阴性。

表 4 蜡状芽孢杆菌的生物化学性状^[13]

项 目	性 状	项 目	性 状
接触酶	+	阿拉伯糖	-
卵黄反应	+	半乳糖	-
溶血素	+	山梨糖	-
青霉素酶	+	山梨醇	-
硝酸盐还原	+, -(少见)	甘露醇	-
水解淀粉	+	卫矛醇	-
液化明胶	+	肌醇	+, 或-
胨化牛奶	+	蔗糖	+, 或-
V-P 反应	+	麦芽糖	+, 或-
柠檬酸盐利用	+, -(少见)	甘露糖	-, 或+
分解尿素	-, 或+	甘油	+, 或-
分解糖类:		水杨素(柳醇)	+, 或-
葡萄糖	+	乳糖	+, 或-
果糖	+	纤维二糖	-, 或+
海藻糖	+	七叶灵	- 或 +
木糖	-		

形态在不同菌株间有很大的差异,一种为暗灰、无光泽,边缘不整齐的菌落,与苏云金芽孢杆菌相似,另一种为根状,并扩展于洋菜表面。能产生溶血素、卵磷脂酶、抗青霉素酶等,区别于其它种。其余的生化特性详

表 5 131 株蜡状芽孢杆菌的生物型^[14]

生物型	V-P	蔗糖	淀粉	水杨素	七叶灵	甘露糖	纤维二糖	卵磷脂酶	尿酶
I	+	+	+	+	-	-	-	+	-
II	+	-	-	+	+	-	+	+	+
III	+	-	-	-	-	-	-	+	-
IV	+	+	-	-	-	-	-	(W+)	-
V	+	+	-	-	-	-	-	+	-
VI	+	+	+	-	-	-	-	+	-
VII	+	+	+	+	+	-	+	+	-
VIII	+	-	+	W+	-	+	-	+	+
IX	+	-	+	+	+	-	+	+	-
X	+	-	+	+	-	-	-	+	+
XI	+	+	+	+	-	+	-	+	-
XII	+	-	+	-	-	-	-	+	-

注:“W+”为弱阳性。

见表 4。DNA 的 G + C 克分子%为 32—33 (溶解温度 T_m 法)。在自然界广泛存在,尤其在食物中常见。

4. 蜡状芽孢杆菌的生物型和血清型: 小佐佐学^[14]以 9 项生物学特性将蜡状芽孢杆菌分为 12 个生物型。来自食物中毒的菌株为 II 型,来自牛乳房炎

革兰氏阳性芽孢杆菌^a

聚- β -羟基丁酸盐颗粒染色^b

阳性(群 1) 阴性(群 2 及群 3)

卵黄反应^c、厌氧生长^d

阴性
巨大芽孢杆菌
(*B. megaterium*)

阳性
晶体染色^e

阴性
45℃ 生长^f

阳性
苏云金芽孢杆菌
(*B. thuringiensis*)

阴性
炭疽芽孢杆菌
(*B. anthracis*)
和
蜡状芽孢杆菌菌株变种
(*B. cereus* var. *mycoides*)

阳性
蜡状芽孢杆菌
(*B. cereus*)

注: a. 芽孢观察用革兰氏染色(24 小时培养物)即可。

b. 聚- β -羟基丁酸盐颗粒染色 将常规涂片,以 0.3% 苏丹黑 B 乙醇液(为 70% 乙醇)染 10 分钟,用二甲苯冲洗,至流下液呈无色止,再用 0.5% 番红水溶液复染 1—2 分钟,水洗,镜检。阳性者菌体呈红色内有蓝黑色颗粒。

c. 卵黄反应 见分离部分

d. 厌氧生长 所用培养基(g) 是酪素水解物 20、氯化钠 5、硫基醋酸 2、甲醛次硫酸钠 1、洋菜 15、蒸馏水 1000ml, pH7.0。

接种与观察 用接种小环(外径 15mm)将营养肉汤培养物,穿刺接种于培养基内,必须穿刺到试管底部,30℃ 培养,3 和 7 天后观察,仅在洋菜表面生长者为好氧菌,如能沿穿刺线生长者为兼性厌氧菌。

e. 晶体染色 取 48 小时培养物,用 0.5% 番红染色 1—2 分钟,水洗,镜检,晶体为菱形。

f. 45℃ 生长 将 1 小环营养肉汤培养物,接种于澄清的营养肉汤中,在 45℃ 恒温水浴中培养,分别于 1、3 和 5 天观察生长情况。

为 II 型及 V 型(见表 5)。除 II 型生物型外,还可从血清学角度区分其血清型。Taylor 与 Gilbert^[12] 提出,食物中毒菌株的 H 抗原型,可以作为流行病学调查的一种手段。

(三) 蜡状芽孢杆菌的分离培养和鉴定

1. 分离培养

①培养基制备(g): 蛋白胨 10、氯化钠 5、肉膏 3、洋菜 15、蒸馏水 900ml。加热溶解,调 pH 至 7.0 左右,121℃ 灭菌 20 分钟。50℃ 左右时,无菌加入 20% 卵黄生理盐水 100ml (无菌取出卵黄),同时按每 ml 10μg 加入多粘菌素 B,制成平板。

②分离方法: 根据临床标本含菌的数量而定,如含数量多应先行稀释,再涂平板;反之,先进行增菌,再涂平板。35℃ 培养 13—24 小时,挑取卵黄阳性的菌落。因本菌具有卵磷脂酶,能使卵黄中卵磷脂分解成不溶性脂肪,故在菌落周围有不透明的圈。

2. 鉴定

①鉴定程序: 挑取平板上不透明的菌落,若遇透明圈看不清者,可辅以厌氧培养试验,以厌氧培养生长者为准。然后,按下列程序进行。

②辅助测定: 根据以上六项试验,绝大多数菌株可鉴定到种,如有少数不能确定的,可辅以 V-P 反应和对葡萄糖、阿拉伯糖、木糖和甘露醇的发酵反应来测定,予以确定。

a. V-P 反应 所用培养基与用于鉴定肠道菌的相同。30℃ 培养 2 天后,加入等量 40% 氢氧化钠和少许肌酸,快速振荡,2—10 分钟后,出现红色为阳性。

b. 糖类发酵 培养基由磷酸氢二铵 0.1g、氯化钾 0.02g、硫酸铵 0.02g、酵母膏 0.02g、洋菜 1.5g、蒸馏水 100ml 组成。培养基的 pH 调至 7.0,加入 1.5 ml 0.04% 溴甲酚紫溶液。定量分装试管,每管装入 4.5ml,121℃ 灭菌 30 分钟。用前融化,加入各种糖液(10% 溶液,过滤灭菌) 0.5ml/每管,混匀。冷却,

穿刺接种,30℃ 培养 2、5 和 7 天,培养基变黄色者为阳性。

为进一步研究生物型或血清型,可参阅文献^[14,15]。

参 考 文 献

- [1] Gilbert, R. J.: *Bacillus cereus gastroenteritis*. In «Foodborne Infection and Intoxication» Second Edition (eds. H. Remarm and F. L. Bryan) p. 495—518, New York. Academic Press. 1979.
- [2] Terranova, W. and Blake, P. A.: *New England J. Medicine* 298: 143—144, 1978.
- [3] Gilbert, R. J. et al.: «The Aerobic Endospore-forming Bacteria Classification and Identification» p. 308, Academic Press. 1981.
- [4] Farrar, W. E.: *American J. Medicine* 34: 134, 1963.
- [5] Kerkennozov, N.: *Brit. J. Ophth.*, 37: 632, 1953.
- [6] Raphael, S. Donaghue, M. et al.: *Canad. Med. Ass. J.*, 115: 207, 1976.
- [7] Turnbull, P. C. B. et al.: *Brit. Med. J.*, 1: 1628, 1977.
- [8] Pennington, J. E.: *JAMA*, 235: 473, 1976.
- [9] 寺島英一·他: 感染症学会志, 51: 438, 1977.
- [10] Pearson, H. E.: *American J. of Clinical Pathology*, 53: 506—515, 1970.
- [11] Gordon, R. E. et al. (蔡妙英等译): «芽孢杆菌属» p.107, 农业出版社, 1983.
- [12] Buchanan, R. E. Gibbons, N. E. et al.: «Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Eightth Edition)» The Williams and Wilkins Comp/ Baltimore p. 534, 1974.
- [13] Geopfert, J. M. et al.: *J. Milk Food Technol.*, 35: 213, 1972.
- [14] 小佐佐学·他: 東京兽医畜产学志, 25: 38, 1978.
- [15] Taylor, A. J. and Gilbert, R. J.: *Med. Microbiol.*, 8: 543, 1975.