

# 用洁霉素及庆大霉素制备难辨梭状芽孢杆菌的分离培养基

刘林祥 谢念祥 李志军 牛惠珍 宋红月

(中国中医研究院中药研究所,北京)

**摘要** 由伪膜性结肠炎及抗生素性腹泻患者粪便中分离病原难辨梭状芽孢杆菌,国际上普遍采用CCFA培养基。但由于其中所用选择抑制剂国内尚不生产,故需花费外汇进口。我们在实验研究的基础上,以庆大霉素及洁霉素代替环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素,并以国产试剂代替进口培养基基础。经多次试验获较满意结果。比较研究表明,分离的细菌多是芽孢,有利于进一步鉴定,而且价格只及进口培

培养基的十四分之一。

**关键词** 难辨梭状芽孢杆菌;洁霉素;庆大霉素;选择分离培养基

难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)已被确认为抗生素引起的腹泻及伪膜性结肠炎的主要病原<sup>[1-3]</sup>,并且越来越受到重视。近年来,关于该菌的致病性、毒素、流行病学等各方面都进行了大量的研究。研究工作及临床检验首先要解决该菌的分离问题。1979年,George<sup>[6]</sup>设计了一个选择培养基,即CCFA,用环丝氨酸(Cycloserine)及甲氧噻吩头孢霉素(Cefoxitin)作为选择抑制剂。这种培养基目前已经为大多数研究者及临床实验室所接受,成为分离难辨梭状芽孢杆菌最广泛应用的一种选择培养基。后来,其他研究者<sup>[7,8]</sup>又以商品脑心浸粉为基础,简化了制备过程。在我国,对难辨梭状芽孢杆菌的研究刚刚起步,但是由于我国目前尚不生产上述两种抗生素,因此制备选择培养基还需进口试剂。我们在地鼠结肠炎模型的研究中<sup>[9]</sup>,结合我们的实验室实际及国外文献<sup>[10]</sup>中关于难辨梭状芽孢杆菌对于各种抗生素敏感性的记载,试制以国产洁霉素(lincomycin)及庆大霉素(gentamicin)作抑制剂的分离培养基。使用结果尚感满意。本文报道我们的实验结果。

## 材料及方法

### (一) 抗生素

盐酸洁霉素注射液(华北制药厂)、硫酸庆大霉素注射液(大同利群制药厂)、环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素(英国OXOID公司)。

### (二) 培养基

脑心浸液培养基干粉(Difco),难辨梭状芽孢杆菌琼脂基础(OXOID),TSA培养基(OXOID),其他试剂如果糖、琼脂及 $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 等均为国产化学试剂。

### (三) 抗生素敏感试验

本实验所用菌种有:需氧及兼性厌氧菌有金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、福氏痢疾杆菌、变形杆菌、肠球菌及枯草杆菌(以上购自药品及生物制品检定所)。厌氧菌有脆弱拟杆菌(*Bacte-*

*roides fragilis*)、大消化球菌(*Peptococcus magnus*)、厌氧消化链球菌(*Peptostreptococcus anaerobius*)、具核梭状杆菌(*Fusobacterium nucleatum*) (以上系美国VPI赠予)及三株难辨梭状芽孢杆菌的临床分离株(其中一株为地鼠分离株)。试验菌分别接种在TSA平板(需氧及兼性厌氧菌)及脑心浸液血平板上(厌氧菌),分别培养24及48小时。

将抗生素在融化并冷至55℃的TSA或脑心浸液血琼脂培养基中作双倍系列稀释,并倾注平皿制成含不同浓度抗生素的平板培养基。由含菌平板上挑取单个菌落在0.05%酵母粉水制成悬液,比浊至每毫升约含菌10000CFU。用微量加液器于不同浓度的抗生素平板上接种细菌,每菌20 $\mu\text{l}$ ,每块平板上接种6—7种(株)菌。厌氧菌置GasPak厌氧罐内,其他置普通温箱中,37℃下分别培养24及48小时。观察细菌在不同浓度抗生素平板上的生长情况。

### (四) 对比用培养基

我们用五种培养基进行对比试验。五种培养基的基础及选择抑制剂如下:

培养基简称	基础	抑制剂
CCFA	难辨梭菌基础(OXOID)	环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素
CCBHIA	脑心浸液(Difco)	环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素
LGBHIA	脑心浸液(Difco)	洁霉素及庆大霉素
LGFA(1)	难辨梭菌基础(OXOID)	洁霉素及庆大霉素
LGFA(2)	按OXOID配方由本实验室用国产试剂制备	洁霉素及庆大霉素

LGFA(2)的成份是每1000ml含蛋白胨(精解蛋白胨,上海禽类蛋品公司产品)40g,琼脂粉(青岛水产品加工厂)15—20g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 北京化工厂,下同)5g, $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g, $\text{MgSO}_4$  0.1g, $\text{NaCl}$  2g,果糖6g,pH7.4。各种培养基均补充以5%脱纤维兔血。以脑心浸液作培养基基础时,在倾注平板前还要分别加入维生素 $\text{K}_1$ (10

μg/ml) 及氯高铁血红素 (hemin, 5 μg/ml)。各种抗生素在每毫升培养基中的浓度分别为: 环丝氨酸 500 μg, 甲氧噻吩头孢霉素 16 μg, 洁霉素 100 μg 及庆大霉素 10u。

(五) 分离标本来源

地鼠 (雄性, 80—100g) 经腹腔内注射洁霉素盐水溶液 0.5ml (5mg) 后一周拉颈处死。解剖取出盲肠内容物, 称重, 悬于 0.05% 酵母粉水中使成 10% (W/V) 悬液。混匀后, 以酵母粉水做 10 倍系列稀释至 10<sup>-7</sup>。用微量加液器在各种培养基上点滴接种, 每稀释度三个点, 每点 20 μl, 置 GasPak 厌氧罐内, 37℃ 培养 48—72 小时。难辨梭状芽孢杆菌的菌落呈黄白色, 扁平弥散, 梭状或不规则形, 边缘呈绒毛或细刺枝状。选取可疑菌落做革兰氏染色, 镜检。该菌形态为革兰氏阳性粗大杆菌, 两端平截, 芽孢位于次极端, 直径小于菌体。

(六) 细胞毒素的测定

将人胚肺二倍体细胞在平底微孔板上培养成单层 (每孔含培养液 100 μl, 培养液基础为 Eagle MEM)。取 10% 盲肠内容物悬液, 12000 r/min 离心 10 分钟, 上清液经注射器微孔膜滤器过滤除菌。将滤液加在细胞单层上, 每孔 10 μl, 每份样品滴二孔, 在其中一孔内加 1:40

索氏梭状芽孢杆菌 (*C. sordellii*) 抗毒素 (美国新英格兰医学中心张德汶博士惠赠) 10 μl, 置 CO<sub>2</sub> 温箱内培养, 24 及 48 小时各观察结果一次。单层中 100% 的细胞变圆且能被抗毒素完全中和, 其作用者为毒素阳性。

(七) 细菌分离株的鉴定

用 API 20A 鉴定板 (法国 API SYSTEM S. A.) 进行。

结 果

(一) 细菌对洁霉素及庆大霉素敏感性的测定

抑菌试验的结果表明 (表 1), 洁霉素对需氧菌及兼性厌氧菌 (除金黄色葡萄球菌外) 的抑菌力不强, 浓度在 2 μg/ml 以上时可完全抑制所试的几种厌氧菌, 但浓度在 ≤120 μg/ml 时对难辨梭状芽孢杆菌全无抑制作用。庆大霉素的作用则与洁霉素的恰好相反。根据这个试验结果我们确定按每毫升中洁霉素 100 μg, 庆大霉素 10u 的浓度同时加入分离培养基。

(二) 几种选择分离培养基的比较

盲肠内容物经系列稀释后分别接种在四种培养基上 (CCFA, CCBHIA, LGBHIA 及 LGFA(1)), 无氧培养 48—72 小时。挑取可疑

表 1 洁霉素及庆大霉素注射液的抑菌作用

试验细菌	洁霉素 (μg/ml)										庆大霉素 (u/ml)							
	120	60	30	15	7.5	3.75	1.87	0.93	0.46	66.6	33.3	16.6	8.33	4.16	2.08	1.04	0.52	0.26
金黄色葡萄球菌	—*	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
痢疾杆菌	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+
大肠杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	+	+
变形杆菌	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
枯草杆菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
肠球菌	—	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
厌氧消化链球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
具核梭状杆菌	—	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
大消化球菌	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+
脆弱拟杆菌	—	—	—	—	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
难辨梭菌 9 <sup>#</sup> (人)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
难辨梭菌 18 <sup>#</sup> (人)	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
难辨梭菌 57 <sup>#</sup> (地鼠)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+

\* +: 细菌生长 —: 细菌无生长

菌落涂片染色,并进行菌落计数,计算每克湿便中的细菌数(CFU/g 湿便)。涂片同时接种血平板,培养后接种 API20A 鉴定板进行鉴定。

四种培养基的比较结果表明,用环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素作选择抑制剂的培养基抑制杂菌的能力较强。在培养后的平板上,基本上只有难辨梭状芽孢杆菌的菌落。洁霉素及庆大霉素平板则较差,除难辨梭菌外,还有其他的细菌(主要是厌氧的 G<sup>+</sup>球菌及短杆菌)。几种培养基的分离率不相上下,但不同培养基的分离菌数不同,两种加洁霉素及庆大霉素的培养基的分离总菌数明显高于含环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素的培养基。但由于难辨梭菌的菌落弥散迁徙显著,菌落往往重合,计算不很准确,因此这种差别不一定有重要意义(表 2)。但是差

从分离阳性率或分离菌数上均无差别。

表 3 CCFA 及 LGFA(2) 分离难辨梭状芽孢杆菌结果的比较

培养基	分离阳性数	lgCFU/g 湿便 (m±SE)	测验
CCFA	8/10	6.88±1.14	P<0.5
LGFA(2)	9/10	6.87±0.90	

(四) 细胞毒素测定及分离物鉴定

细胞毒素的阳性率在我们的实验中总低于细菌的分离率,本研究也是如此。但盲肠内容物滤液的细胞毒性均可被索氏梭状芽孢杆菌的抗毒素所中和。分离物接种 API20A 鉴定板,结果也证明为难辨梭状芽孢杆菌。

讨 论

在我国已经有不少医疗及科研单位开展了有关难辨梭状芽孢杆菌的分离<sup>[4]</sup>及研究。但是现在国际上广泛应用的分离培养基是以环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素为选择抑制剂的。这两种抗生素我国目前尚不生产。进口的难辨梭状芽孢杆菌培养基价格颇昂贵。配制 1000ml OXOID 培养基的费用为 97.98 元(按我们购进的价格计算,不包括兔血费用),而本研究用国产试剂配制 1000ml 培养基只需 6.61 元,两者相差 14 倍。自制的不但便宜,而且容易购到。从本研究的结果看,自己配制的培养基除选择性较差外,在细菌分离率、细菌产毒等方面均不逊于进口培养基。而且具有一个突出的优点,即分离物在镜下检查时,大部分细菌均生成芽孢,很容易辨认,有助于进一步的鉴定。CCFA 则不具备这个特点。这种培养基经使用一年多,分离结果是稳定的。

在分离培养中出现杂菌并不影响我们的实验目的。一则难辨梭菌的菌落及细胞形态均较特殊,具有迁徙形菌落伴随难辨梭菌菌落出现的通常只有一种,而且色泽不同,镜下观察为无芽孢的 G<sup>+</sup>短杆菌;再则在无氧条件下培养,需氧菌及一般的兼性厌氧菌也不能或不易生长。

用不同来源,不同厂家生产的试剂配制的

表 2 四种培养基分离难辨梭状芽孢杆菌结果的比较

培养基	难辨梭状芽孢杆菌			平板上杂菌	分离菌数, 测验*
	分离阳性数	lgCFU/g 湿便 (m±SE)	芽孢		
CCFA	8/8	8.05±0.19	—	少或无	P>0.5
CCBHIA	8/8	8.11±0.16	—	少或无	
LGBHIA	8/8	8.75±0.18	+	有	P<0.025
LGFA(1)	8/8	8.51±0.09	+	有	P=0.05

\* 以 CCFA 为对照, 分别与各组相比。LGFA 与 LGBHIA, CCFA 与 CCBHIA 间相比, 无统计学意义。

别较大的是镜下形态。在 LGBHIA 及 LGFA (1) 上分离到的细菌均有芽孢, 而另两种培养基上分离到的细菌几乎找不到生成芽孢的。

(三) 以国产试剂制备培养基基础与进口培养基基础的比较

前面实验所用的培养基基础都是进口试剂,如脑心浸粉是美国 Difco 产品,难辨梭状芽孢杆菌基础为英国 OXOID 产品。CCFA 的基础并不复杂。我们用国产的试剂按 OXOID 的配方(The Oxoid Manual, 1982 年版)配制培养基基础。以洁霉素及庆大霉素为选择抑制剂与英国产的 CCFA 进行了对比。将结肠炎地鼠的盲肠内容物如前操作分别接种到 CCFA 及 LGFA(2) 上,培养计数。结果(表 3)两者无论

培养基分离效果是否不同,我们还未进行研究。在基础培养基各成分中蛋白胨可能是最关键的。目前我国生产的蛋白胨品种很多,成分各异,应该进行对比研究。

LGFA 是一种经济、容易制备、试剂易得、便于推广,分离效果也较好的分离难辨梭状芽孢杆菌的培养基。在我国目前还不生产环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素的情况下,不失为一种好的培养基。

### 参 考 文 献

[1] Bartlett, J. G. et al.: *J. Inf. Dis.*, 136: 701—705,

1977.

- [2] Bartlett, J. G.: *Rev. Inf. Dis.*, 1: 530—539, 1979.
- [3] Bartlett, J. G. et al.: *Gastroenterology*, 75: 778—783, 1978.
- [4] George, W. L. et al.: *Curr. Microbiol.*, 1: 55—58, 1978.
- [5] 刘林祥: 国外医学微生物学分册, 6: 153—158, 1983.
- [6] George, W. L. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 9: 214—219, 1979.
- [7] Willey, S. H. and J. G. Bartlett: *J. Clin. Microbiol.*, 10: 880—884, 1979.
- [8] Chang, T. W. and S. L. Gorbach: *J. Clin. Microbiol.*, 15: 465—467, 1982.
- [9] 刘林祥等: 微生物学报, 25: 60—65, 1985.
- [10] Nakamura, S. et al.: *Microbiol. Immunol.*, 26: 25—30, 1982.
- [11] 周贵民等: 中华老年医学杂志, 2: 221—223, 1983.