

以豚鼠和家兔的眼睛感染法快速鉴别痢疾杆菌

陈兆云 方志林 曾凝梅

(福建省卫生防疫站,福州)

在防治细菌性痢疾的病原学调查工作中,常遇到一些双糖琼脂斜面反应和生化反应近似痢疾杆菌而诊断血清不凝集的菌株,给鉴别痢疾杆菌带来一定的困难。为了观察这些非痢疾杆菌和痢疾杆菌的致病性,我们使用了注射法和滴入法作动物眼睛的感染试验来鉴别。

材料与 方法

1. 试验动物: 家兔体重 1.5—2.5 公斤。豚鼠体重 400 克左右。动物眼睛无炎症,无明显异常。在试验前首先抽动物血分离血清,与试验菌作血清凝集,选血中无自然抗体存在者备用。

2. 菌株: 非痢疾杆菌七株(编号: 25、26、A8、A14、15、17、22)。痢疾杆菌六株(编号: 宋内氏痢疾菌 2715S1 和 2715S2、福氏痢疾杆菌 1a 型(A11)、福氏痢疾杆菌 2a 型(B2、A3)、福氏痢疾杆菌 3a 型)。菌株均保存于明胶半固体中,每月传代一次。

3. 试验方法:

① 菌种传至第四代,接种在营养琼脂平板上,37℃ 培养 18 小时后,以盐水洗下,每毫升含菌 700—800 亿。或接种在肉汤培养液内

37℃ 培养 18—20 小时,每毫升含菌 30—40 亿。

② 用乙醚麻醉动物至自主肌失去痛觉。

③ 注射法: 用消毒注射器吸取菌液(0.25 毫升配 26 号针头),以手指固定眼球,在角膜上皮内注入 0.02 毫升,形成一个直径约 3 毫米小水泡即可^[6]。

④ 滴入法: 将眼皮提起,滴入菌液 0.04 毫升,轻轻揉动眼球,使菌液布满眼球表面。接种前用消毒棉棒揩干眼泪,然后接种,以免菌液外溢。

⑤ 对侧眼睛以无菌盐水或肉汤作对照。

⑥ 试验动物分笼饲养,每天定时记录眼睛症状(用萤光素检查溃疡面)。

⑦ 每天用消毒棉棒沾湿盐水,轻揩眼睛分泌物和眼球表面,直接涂于中国蓝琼脂平板上,分离试验菌,观察其存活期限。

试 验 结 果

一、非痢疾杆菌的致病性反应

表 1 表明使用滴入法不会使动物眼睛致病,而用注射法也只能引起动物眼睛出现局部短暂、轻微的反应。

表 1 非痢疾杆菌感染豚鼠眼睛后的症状反应(平均天数)

菌 株	试验动物数(只)	注 射 法					滴入法	对 照
		分泌物	充 血	水 肿	角膜混浊	脓 汁		
浓菌液 L*	5	2	5	4	2	—	—	—
25	9	2	5	3	1	—	—	—
26	2	3	5	4	—	—	—	—
肉汤菌液 1L**	2	1	2	2	—	—	—	—
25	4	—	3	2	—	—	—	—
26	2	2	—	—	—	—	—	—

* L 示 A14, 22, 15, 17, A8 五株试验菌;

** 1L 示 A14, A8 两株试验菌。

表2 痢疾杆菌感染动物眼睛后的症状反应 (平均天数)

菌型	试验动物数(只)	注 射 法								滴 入 法							
		分泌物	充血	水肿	混浊	白斑	脓汁	溃疡	闭目	分泌物	充血	水肿	混浊	白斑	脓汁	溃疡	闭目
福氏 2a	豚鼠 3	14	16	16	15	14	8	12	1	11	13	13	12	7	3	6	—
宋内氏	豚鼠 3	7	15	15	11	8	4	11	—	8	14	14	9	10	2	8	—
宋内氏	兔 1	4	13	8	—	4	4	—	3	—	12	8	—	—	—	—	—
福氏 3a	兔 2	8	13	9	6	1	9	—	5	2	3	—	—	—	—	—	—

二、痢疾杆菌的致病性反应

豚鼠和家兔的眼睛感染痢疾杆菌后可患结膜角膜炎。由表2中看出福氏痢疾菌2a型比3a型及宋内氏痢疾菌的致病力强。兔比豚鼠患病轻,病程短。用注射法比滴入法感染的症状严重,注射法感染的眼睛会闭目,时间长,要扩张眼睑才能见到病变。对照眼睛均无病变。

三、试验菌的存活期限观察

痢疾杆菌和非痢疾杆菌在豚鼠(或家兔)眼内存活天数差别很大,前者在2—3周内仍可检出,而后者只能存活1—2天,有的甚至24小时后即不能检出。注射法一般比滴入法的排菌期限要长,尤其是2715 S1菌株,注射法比滴入法的存活时间长4倍以上(60天以上)(见表3)。

四、非痢疾杆菌的生化反应和菌落形态

非痢疾杆菌在克氏双糖斜面上的反应如同痢疾杆菌,而诊断血清不凝集的菌株,一般菌苔

表3 痢疾杆菌和非痢疾杆菌的存活期限

试验菌株	存 活 天 数	
	注射法	滴入法
2715S(1)	60	15
2715S(2)	16	15
2715S(1)	12	15
A11 F1a	20	14
B2 F2a	18	15
A3 F2a	14	15
22	2	2
A 8	1	1
25	1	1
A 14	—	—

较厚、混浊。在肉汤管内37℃培养18小时,生长旺盛,有的管壁呈极薄膜状。在SS、麦康克、中国蓝和普通培养基四种琼脂平板上,菌落多数不典型,呈乳白色,在H₂S、明胶、尿素和V.P.试验中均显阴性,在甲基红试验中显阳性,在柠檬酸盐中不长,痢疾诊断血清不凝集,无动力,为革兰氏阴性杆菌。靛基质反应除A14为阴性反应外,其余6株均为阳性反应(见表4)。

表4 七株近似痢疾菌的糖发酵和靛基质反应

菌株号	糖 发 酵														靛基质反应
	葡萄糖	乳糖	麦芽糖	甘露醇	蔗糖	阿拉伯胶糖	山梨醇	水杨苷	肌醇	卫矛醇	鼠李糖	侧金盏花糖	草糖	木糖	
25	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
26	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	+	—	+	+	+
A8	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	+	—	+	+	+
22	+	+	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	+	+	+
A14	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	+	—
15	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	+	+
17	+	—	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	—	+	+

注:“+”不产酸不产气;上角的数字表示发酵天数。靛基质反应中“+”示阳性,“—”示不分解或阴性。

此外,在试验过程中还发现,豚鼠眼睛因注射痢疾菌过深或用爪抓破眼睛而引起继发感染发炎,可使眼部溃疡流血、糜烂而导致眼球萎缩至瞎。有的动物会出现大量脱毛。个别豚鼠感染后潜伏期长,要五天后才出现病变。有的动物会致病死亡。

体 会

1. 豚鼠眼结膜角膜试验是快速鉴别痢疾杆菌和非痢疾菌的一种有效方法。试验中发现,在克氏双糖斜面反应和生化反应中近似痢疾菌而又一时难于确定的菌株,通过眼角膜试验不致病,一般均为非痢疾菌。(七株试验菌用滴入法均不致病;用注射法也只能使动物眼睛局部产生轻微短暂的反应。)而痢疾杆菌则可引起严重的结膜角膜炎,此点与 William 等^[1]的结论一致。非痢疾菌对动物眼睛无致病性,可能与其不产生毒素有关。这次试验中,有些毒力弱的痢疾菌变异株和个别的宋内氏菌,用滴入法也常不易感染。冯振南等^[2,3]曾发现伤寒杆菌、副伤寒杆菌、致病性大肠菌、变形杆菌和链球菌亦

不会使动物眼结膜角膜发生病变。

2. 宋内氏痢疾菌在豚鼠眼内可存活60天以上。Artyukhina 等^[4]用痢疾菌感染蟑螂时,发现宋内氏菌可存活8天,而福氏菌只能存活3天。蟑螂带菌率高,夜间活动不被人注意,城市蟑螂量较多,这可能是造成城市细菌性痢疾流行中宋内氏菌型逐年增高,而福氏菌逐渐下降的原因之一。此点应引起流行病学研究方面的重视。

3. 豚鼠作为试验动物,来源容易,观察时间短,一般1—2天即出现典型症状。试验操作不需特殊设备,简便易行,适于基层开展。

4. 根据近似痢疾菌的非痢疾菌经眼角膜试验无致病性的结果,结合其菌苔和生化反应,可作出非痢疾菌判断。如果有致病性,生化反应典型,而诊断血清不凝集,可能是新型痢疾菌株,应作进一步研究。

参 考 文 献

- [1] William, R. C. et al.: *J. Infect. Dis.*, **122**(5): 394, 1970.
- [2] 冯振南等: 中华医学杂志, **44**: 329, 1958.
- [3] 陈兆云等: 中华卫生杂志, **11**(3): 198, 1966.
- [4] Artyukhina, I. N. et al.: *Microbiology Excerpta Med.* **27**(10): 671, 1974.