

# 美国有关空肠弯曲菌的研究近况

郑 庆 斯

(北京市卫生防疫站)

空肠弯曲菌 (*Campylobacter fetus* subsp. *jejuni* 简称 *C. j.*) 是近年来重新被认识的一种较常见的肠道致病菌。目前我国有少数实验室开展研究,一些发达国家对此作了较大量的研究工作。兹将美国微生物学会第 82 届年会上发表的几十篇有关报告综述如下。

## 一、临床上的意义

William D. Lebar 描述了两例 *C. j.* 引起的散发病,第一例是以糖尿病的酮酸中毒症进入急诊室的,病人有恶心、腹泻和呼吸困难,入院时血液培养 *C. j.* 阳性,入院后 24 小时的粪便培养也获得阳性,第二个病例以急性阑尾炎症状入院,血和粪便培养都是 *C. j.* 阳性。H. A. Wenner 等观察了儿童中的弯曲杆菌肠炎,在堪萨斯城一所儿童医院的 322 名腹泻病人中,有 16 例粪便培养阳性(4.9%),腹泻是所有病例的突出症状,在病程的第 4、5 天粪中含小量粘液血,有 62.5% 的病例出现明显的血液、37% 发热、有 56% 呕吐不显著。在 10 例用红霉素医治的病人中,有 2 人继续腹泻一周,其它 8 人 48 小时内腹泻减轻,有 2 例复发。两例未治的病人一周内腹泻好转,未见复发。在对家庭接触者作粪便培养时,儿童比成人有较高的阳性率。

J. Y. Broadbelt 等比较观察了三个邻近的成人和儿童医院粪便培养中不同病原的分离率,三个单位均以同样方法测定了 5379 份粪便,在沙门氏菌、空肠弯曲菌、痢疾菌、耶尔森氏菌和付溶血弧菌中,空肠弯曲菌仅次于沙门氏菌而居第二位,儿童的分离率明显高于成人。在 O. Grados 于 Peru 地区的调查材料中,腹泻儿

童粪便培养的 *C. j.* 分离率高达 14—18%,表明 *C. j.* 是 Peru 地区急性腹泻的常见病因。一些研究人员还以雪貂为动物模型,观察了 *C. j.* 的致病作用以及它在鼠和仓鼠中的发病情况。

## 二、实验方法

1. 培养方法:根据 *C. j.* 的特性,常规分离培养要求供给微氧条件(5%  $O_2$ , 10%  $CO_2$  和 85%  $N_2$ ),在 43℃ 培育 24—48 小时。

A. G. Helstaol 等人比较了 42℃ 和 35℃ 的培养效果,在 580 名腹泻病人中,于 42℃ 下培养分离到 48 株 *C. j.* 和 2 株 *C. intestinalis* (100%),而 35℃ 只分离到 66% 的菌株,大多数培养物在 42℃ 比在 35℃ 生长得好和早,因此他们认为必需以 42℃ 作为从粪便中分离 *C. j.* 的培养温度。K. Eisenach 等人的试验也证明了这一点,从 1981 年 3—10 月所有的 *C. j.* 都是在 42℃ 分离到的,只有 1 株在 35℃ 获得。

对于微氧环境的要求,Reiler 等用 Campy Pak II (CP II) 和烛缸法平行培养了 1025 份粪便标本,共分离到 81 株 *C. j.*,两法获得的阳性率和生长速度相似,均为阳性的有 75 株,仅由 CP II 分离到的有 2 株,由烛缸法单独分离到的 4 株,因此认为在他们所处的高度(1609 m)地区,两种方法都能为 *C. j.* 的常规分离提供合适的气压。

此外,由于生牛奶常被认为是传播 *C. j.* 肠炎的媒介,尽管从病人的粪便培养和流行病学调查均证明进食生奶是感染方式之一,但没有人从可疑的牛奶标本中分离到 *C. j.*。J. Lorett 等人以模拟标本设计了一种从生奶中分离 *C. j.* 的方法获得成功。首先将人工接种此菌的生奶

标本(1个菌/ml),以34000转冷冻离心除去上清液,沉渣混悬于布鲁氏菌肉汤\*里,42℃微氧环境培育,分别在24和48小时取出5ml培养物通过0.65 $\mu$ m滤膜过滤,以滤液接种Skirrow's血琼脂平板,微氧环境培养后挑选可疑菌落进行鉴定。

2.培养基: N. J. Stern等通过对改良的Skirrow(含15 $\mu$ g Kef lin/ml)、Campy-BAP和Butzler等培养基的比较试验,认为Campy-BAP阳性率最高。Butzler培养基选择性强、阳性率高,推荐联合使用这两种培养基于食品检验。D. M. Rollins等设计了一种双相系统用于快速生产大量细菌。他们采用30ml容量的组织培养瓶于正常大气压条件下培养,在4ml Brucella或FBP基础琼脂上用6ml相应肉汤覆盖,然后接种少量培养物。通过O. D. 测定和平板计数证明在培养18小时后达到高峰生长( $10^{10}$  CFU/ml);在降低氧压和正常大气压条件下,细菌在形态、生长率和收获量方面相似。他们提出这个系统适于制备,可用于生理学、血清学和形态学特性研究的C. j. 培养物。

3.药敏试验:由于C. j. 对培养条件的特殊要求,在文献里几乎没有有关药敏试验的报告。S. Welkos研究了用于弯曲菌的肉汤纸片药敏试验(简称B-D法),试验用的基础培养基:在布鲁氏菌肉汤里添加0.13%琼脂和0.05%硫酸亚铁、焦亚硫酸钠、丙酮酸钠,5ml分装试管。加入抗菌素纸片,然后接种C. j. 培养物,该培养物事先在上述肉汤里37℃培养22—24小时,用分光光度计调整浓度为 $2-4 \times 10^8$  CFU/ml,每个B-D管内加入1—2滴培养物,37℃培养48小时,同时点种标准的Mueller-Hinton琼脂稀释平板,在微氧条件下培养作为对照。B-D法结果观察分为敏感(S—缺乏生长或只有痕迹样生长)、抵抗(R—生长超过对照的50%)或中度敏感(生长不一或在S和R间)。B-D法可以重复并对对照有93—100%一致。B-D法似乎是一种可靠而简便的测定C. j. 对药物敏感性的方法。

4.保存方法: C. Mills等比较了冷冻干燥,

10%甘油保存慢冷冻(1℃/分)至液氮温度(−150℃),在冷冻机慢慢冷冻到−65℃和在−5℃冰箱的冷冻器里冷冻四种保存方法,结果以液氮保存效果最好,存活率达92%,保存12个月后不失活;冷冻干燥的方法,随保存时间的延长而存活力逐步降低;以10%甘油保存在−65℃30天后,存活率为66%,而在−5℃只有37%。N. W. Luechtefeld等以模拟粪便标本试验,每份标本增殖液分装于灭菌塑料试管里冷冻在−20℃和−70℃,然后定期融化和计数C. j.。在−20℃,C. j. 数量下降很快,所有14个标本37天全转阴,其中有2个标本冷冻3天就检查不出来;在−70℃,所有18个标本30天仍阳性,60天时17%标本阴性,90天3%阴性。

关于在运送培养基中的情况,P. J. Quinn等人测定了C. j. 在Cary-Blair(CB)保存培养基中于4℃、25℃和32℃的效果,结果在4℃可存活6天,在25℃可存活48—72小时,在32℃不超过24小时,在培养基中添加硫酸亚铁、焦亚硫酸钠和丙酮酸钠(CB-FBP)可延长存活时间24—48小时,沙门氏菌、痢疾菌和耶尔森氏菌在CB-FBP中保存8天仍存活。因此他们认为用CB作为C. j. 的运送培养基在25℃超过48小时或32℃超过24小时是不适宜的,CB-FBP可使C. j. 的存活时间延长24—48小时。

5.鉴别亚种和毒素测定: D. A. Ferguson用聚丙烯酰胺电泳(PAGE)检查了37株弯曲菌的可溶性蛋白提取液,同时作生化试验,结果电泳蛋白区带谱表明和生化试验一致,各个亚种可由明显的蛋白区带谱可供识别。

W. F. Campbell用兔肠结扎试验、乳鼠试验和细胞毒性试验检测了16株C. j.。所用三个细胞系是人胚肺成纤维细胞(MRC-5)、Y-1肾上腺细胞和人肠(407)细胞,结果所有被测的标本C. j. 均为阴性,因此未能证实这些菌

\* 布鲁氏菌肉汤成份: 硫酸亚铁0.025%,焦亚硫酸钠0.025%,丙酮酸0.025%,万古霉素15mg/L,三甲氧苄二氢嘧啶7.5mg/L,多粘菌素B5000u/L。

株具有肠毒素。

### 三、其它

1. 消毒剂: 由于 *C. j.* 已被证明是人类常见的地方性或流行性腹泻的病原, 已经有过水型爆发的报告, Wil Wang 等研究了氯和其它常见消毒剂杀灭 *C. j.* 的效果。试验菌株与消毒剂接触 (25℃) 1'、15'、30'、60' 和 240', 菌株浓度为  $10^{-6}$ — $10^{-7}$ /ml (高浓度)、 $10^3$ — $10^4$ /ml (低浓度)。用氯试验, 此菌低浓度组在 1.25ppm 1' 和 0.625 ppm 30' 杀灭, 高浓度组的 *C. j.* 菌与 2.5 ppm 氯接触 30' 后全部死亡, 其它常用消毒剂如 70% 乙醇、0.15% 苯化合物、1/50,000 季铵化合物等能在 1' 内死亡; 2.5% 福尔马林在 15' 内杀灭 *C. j.*。结果表明这些消毒剂的常用浓度对于处理 *C. j.* 的污染物是安全有效的。

2. *C. j.* 对血清杀菌活力的敏感性: 菌血症是 *C. j.* 急性胃肠炎的一个罕见特性, 为了研究血清杀菌力(SBA)作为宿主防御机制的作用, N. Clumeck 等人比较了血和粪便分离的 *C. j.* 对正常人血清(NHS)的敏感性。*C. j.* 24 小时培养物和 80% 新鲜的正常人血清 (NHS) 于 42℃ 下作用 60', 22/24 粪便和 21/22 血标本的分离物对 NHS 敏感(存活低于 10%)。NHS 和菌血症病人自体血清的比较表明病原菌对 NHS 敏感而对患者自体血清抗拒。NHS 用 *C. j.* 吸收证明杀菌抗体是型特异性的, 尽管存在一些交叉抗原。他们认为 *C. j.* 和其它革兰氏阴性菌感染相反, *C. j.* 菌血症是由于血清敏感性菌株所致, 并表明菌血症可能是营养不良引起而不是由于某些菌株具有较高的毒力。