

难辨梭菌产毒情况的初步观察

周贵民 谢 灵 张有江

(中国人民解放军总医院微生物科, 北京)

摘要 以分离自临床的 30 株难辨梭菌的培养滤液作了细胞毒性(B 毒素所致)及小白鼠致死性(A 毒素所致)的对比观察。结果表明该菌 B 毒素及 A 毒素产生的一致性: 凡能使细胞产生病变的菌株也能使小白鼠致死,反之亦然。

关键词 难辨梭菌;毒素

已知难辨梭菌(*Clostridium difficile*)毒素分为两种: A 毒素(肠毒素)和 B 毒素(细胞毒素)。A 毒素可引起动物肠粘膜水肿、损伤及出血性积液,腹腔注射可使小白鼠致死。B 毒素引起肠粘膜病变轻微,但有甚强的细胞毒性。一般认为 B 毒素是难辨梭菌引起伪膜性结肠炎的标记物,近年则更注意到了 A 毒素在导致病理改变中的可能重要性^[1]。并相继建立了若干检测毒素的方法。我们以本实验室分离菌株的两种培养基的培养滤液,用组织培养细胞及小白鼠致死试验观察了该菌的产毒情况及其相互关系。

材料与 方法

1. 菌株来源: 自病人粪便中分离到的难辨梭菌 29 株,从金黄地鼠粪中分离的难辨梭菌 1 株,共 30 株。

2. 菌滤液制备: 将在 CCFA 平板上分纯之难辨梭菌菌落移种于两种液体培养基: 庖肉肉汤(以下简称肉汤)及加 0.5% 葡萄糖庖肉肉汤(以下简称加糖肉汤)各 1 管,厌氧条件下 37℃ 培养 72 小时。以 3000 r/min 离心 15 分钟,去沉淀,再以低温离心机 15,000 r/min 离心 15 分钟,小心取其上清备用。必要时再以 0.45 μm 滤膜过滤。将两种培养基中的菌滤液分别进行细胞毒性及小白鼠致死试验。

3. 细胞毒性测定: 使用 HeLa 细胞在微孔塑板上进行。以不同稀释的菌滤液加于组织细胞各孔中,另一排再加索氏梭菌(*Clostridium*

sordellii) 抗毒素血清作中和对照。在 CO₂ 孵箱中孵育 18 小时后观察结果,试验孔细胞 50% 以上产生圆变、聚合,而对照孔细胞正常者为阳性。

4. 小白鼠致死试验: 以菌滤液自腹腔注于 16 g 左右雄性小白鼠,每只 0.5 ml,每份滤液注射 3 只。连续观察 5 天(120 小时),以 5 天内 3 只全部死亡或 2/3 死亡者为阳性,3 只全部存活或 2/3 存活为阴性。

结 果

所有难辨梭菌培养滤液,凡细胞毒性试验阳性者,小白鼠致死试验亦阳性;细胞毒性试验阴性者,小白鼠致死试验亦阴性,两者完全一致。

肉汤及加糖肉汤产毒效果完全相同者 27 株。有 2 株加糖肉汤产毒阳性,肉汤阴性;另 1 株相反。上述结果归纳如表 1。

表 1 两种培养基产毒效果及细胞毒同
小白鼠致死试验之间的关系

小白鼠 致死试验	肉 汤 (细胞毒性)			加糖肉汤 (细胞毒性)			总 计 (细胞毒性)		
	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计	阳性	阴性	合计
阳性	16	—	16	17	—	17	18	—	18
阴性	—	14	14	—	13	13	—	12	12
合计	16	14	30	17	13	30	18	12	30

讨 论

30 株难辨梭菌在肉汤中产毒株数及其细胞毒性滴度和对小白鼠致死能力,同加糖肉汤的

结果,总的说没有明显区别。这和关于添加葡萄糖可使难辨梭菌产毒更好的报道^[2]不同,他们的结果是用1株细菌得到的。这可能与应用的菌株有关,因为在我们的试验中也有少数菌株因培养基不同产毒亦有差别,但只是个别现象。

文献记载10 ng A毒素即可使小白鼠致死,B毒素则需4.4 μg ^[3];而使HeLa细胞产生病变只需B毒素0.08 ng,A毒素则要5.0 μg ^[4]。即对小白鼠致死毒性A毒素比B毒素强400多倍;对HeLa细胞的毒性B毒素较A毒素强60000多倍。所以使小白鼠致死主要是A毒素的作用,而对细胞产生病变则被认为是B毒素所致。由于难辨梭菌的两种毒素在致病及实验室检查中都具有重要性,同时检查两种毒素固然很好,但工作量大耗资亦多。在日常临床实验室工作中,若能通过对其1种毒素的检测来推断该菌总的产毒情况,则会收到事半功倍之效。

我们的30株中,18株细胞毒性阳性,可以认为是B毒素阳性;同时又都能使小白鼠致死,

即A毒素亦为阳性。说明能产生B毒素的菌株同时也能产生A毒素。另12株既不能使细胞产生病变又不能使小白鼠致死。说明凡不能产生B毒素的菌株同时也不能产生A毒素。即对于难辨梭菌某1具体菌株来说,或两种毒素都产生,或1种毒素也不产生。没有发现单独只产生1种毒素的菌株。最近国外也有类似的结果^[5,6],能估计出产毒菌株的培养上清液中B毒素较A毒素的细胞毒性大1,000倍^[6]。因此,只要建立1种快速、敏感、特异的毒素(A或B)检测方法,就能基本满足临床诊断的需要。当然本实验仅是初步的,是否恰当还有待于在临床检验实践中进一步考察。

参 考 文 献

- [1] Bartlett JG and Taylor NS: Antibiotic-Associated Colitis. In: Easman CSF, Jeljaszewicz J. eds. Medical Microbiology Vol. 1, London: Academic Press, 1—42, 1982.
- [2] Bartlett JG et al.: *Gastroenterology*, **75**: 778, 1978.
- [3] Taylor NS et al.: *Infect. Immun.*, **34**: 1036, 1981.
- [4] Donta ST et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **15**: 1157, 1982.
- [5] Laughan EB et al.: *J. Infect. Dis.*, **149**: 781, 1984.
- [6] Lysterly DM et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **17**: 72, 1983.