

小肠结肠炎耶尔森氏菌依温毒性的研究

郑薛斌 谢春

(广西医学院微生物学教研室, 南宁)

摘要 本文报告了来自不同国家和地区的人和动物的 80 株小肠结肠炎耶尔森氏菌的自凝性和血清抵抗性, 并与前文报道的依钙性^[1]和毒力质粒^[2]对比。带毒力质粒的菌株均 37℃ 阳性和 25℃ 阴性, 而无毒力质粒的菌株 37℃ 和 25℃ 均阴性。从而指出, 带毒力的小肠结肠炎耶尔森氏菌有温度依赖的特性。同时证实, 62 株地方分离株均为毒力株, 具有致病性。本文采用的自凝性和血清抵抗性试验方法具可靠、经济、快速和应用广泛等优点。

关键词 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 温度依赖性; 毒力

现已发现, 小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica* 以下简称 *Y. e.*) 有 54 个以上的血清型, 其中仅有少数对人或动物有致病性。目前我国对 *Y. e.* 的分离和鉴定研究较多, 但作毒力测定的较少, 不能确切判断所分离的菌株是否具有致病性。80 年代初, 国外开始研究用体外法测定 *Y. e.* 的毒力以代替昂贵的动物实验。体外法中最引人注目的是 *Y. e.* 的依钙性、自凝性、血清抵抗性和毒力质粒的测定^[3-6]。由于对此研究历史较短, 在实验的原理和方法上还有不同的见解^[6]。本文对其中的自凝性和血清抵抗性试验进行了研究和改进, 并进一步证明了从人和动物中分离到的 *Y. e.*

菌株具有致病性。

材料和方法

(一) 菌株

共 80 株。1. 国外菌株: (1) 带毒力质粒的菌株 439-80pYV⁺[6,7] 和 WE-26pYV⁺, 以及失去毒力质粒的对应株 439-80pYV⁻ 和 WE-26pYV⁻ 均由比利时 Wauters 教授惠赠, 是血清型 O:9 和 O:3, 生物型 2 和 4, 来源于比利时腹泻病人。(2) 带毒力质粒的菌株 S58、R101、R50、LAB-B182、R459、S64 和 B42 以及无毒力质粒的菌株 B33、S434 和 B396, 由丹麦 Andersen 博士惠赠, 是血清型 O:3, 生

物型4和1,来源于丹麦腹泻病人和正常猪。(3)质粒情况不明的菌株52203,52212,52207和52211,由中国药品生物制品检定所提供,这些菌株原是国际耶尔森氏菌研究中心主席法国巴斯德研究院 Mollaret 教授赠送,血清型O:3、O:9、O:5,27和O:8,生物型4,2和1,从瑞典、比利时、英国和美国的人、狗中分离到。

2. 地方分离株:从南宁地区的腹泻病人和腹泻猪中分离到的62个菌株,血清型O:3和O:9,生物型3^[8,9],由王家睦教授等检测质粒,均带有毒力质粒^[2]。

(二) 培养基和血清

1. 肉汤琼脂及0.5%水解酪蛋白肉汤琼脂:按常规法配制。

2. RPMI-1640 培养液(以下简称1640液):无碳酸氢钠的RPMI-1640粉10.4g,加三蒸水至1000ml,完全溶解后加HEPES 25nmol/L,加碳酸氢钠1.4—1.6g,pH7.2,过滤除菌。加10%小牛血清。

3. Hanks 液:按日本 NISSUI 手册配制。加入0.1%明胶。

4. 营养琼脂(上海产)平板。

5. 草酸镁琼脂平板^[1]。

6. 正常人血清:取3—5个健康人的新鲜血清,混合后定量分装进小试管,立即放入-30℃冰盒内保存。

(三) 方法

1. 自凝试验:(1)测出最适菌浓度:①培养单个菌落:将带有毒力质粒的菌株分别接种肉汤琼脂斜面,于25℃培养24小时。各取少量培养物用生理盐水稀释约 2×10^7 /ml浓度的菌悬液。取0.1ml接种入肉汤琼脂平板,用播散法使菌均匀分布于平板上,放37℃或25℃培养48小时。②取单个菌落中的细菌,用生理盐水制成几种不同浓度的菌液(见表1)。取0.05ml菌液种入含2ml1640液的培养管中,每种浓度菌液接种两管。一管放37℃,另一管放25℃,培养15小时后看结果。按此法每个菌株分别作3个菌落。(2)正式试验:用测出的最适菌浓度作为自凝试验时采用的菌液浓度。80

个菌株,分别培养单个菌落,方法同(1)~①。长出单个菌落以后,每个菌株取5—10个菌落,分别作自凝试验。在37℃培养下长出的菌落有大小两种。取菌时,注意按平板上大小菌落的比例数挑取。在25℃培养出的菌落大小无明显区别,则可随机取5—10个菌落。按上法分别作自凝试验。

2. 血清抵抗试验:(1)准备新鲜培养物:将待测菌接种入0.5%水解酪蛋白肉汤琼脂平板,分别放37℃和25℃培养约20小时,长出单个菌落。(2)分装Hanks液:每管1.8ml。分装前从冰盒取出正常人血清,按10%加入Hanks液中。(3)正式试验:挑取在37℃刚长出的单个小菌落(不要取大菌落,因大菌落为丢失毒力质粒的无毒力变异菌细胞),用生理盐水制成约 10^8 /ml的菌悬液,取0.2ml加入一管无血清的含1.8mlHanks液的管中,混匀后,取0.2ml接种入一管含10%正常人血清的Hanks液中,置37℃孵育。此时菌浓度约为 10^6 /ml。置37℃之前,即在0时,取出0.1ml用生理盐水作系列稀释,种入培养琼脂平板。在37℃孵育后的0.5小时、1小时和2小时,同样取菌稀释后种入平板。所有已接种的平板都放入25℃培养48小时,计算菌落数,求出每个时间每平板的平均菌落数。(4)对照试验:①用25℃培养的菌落代替37℃的菌落。②用灭活人血清代替人血清。

3. 依钙试验:前文已报告75个菌株^[1],本文补充B33、52207、52211、H151和H76等5个菌株,方法同前。

结 果

(一) 自凝试验

1. 测试结果:80个菌株中,有73株阳性,7株阴性。在这73株自凝试验阳性菌株中,一株60%菌细胞阳性,一株80%菌细胞阳性,其余71株90%以上菌细胞阳性。

2. 结果的判断:(1)凝集:管底出现明显凝集,上部液体清亮。(2)不凝:整个液体均匀混浊。(3)如37℃凝集,25℃不凝,为试验

阳性;如37℃和25℃都不凝,为试验阴性。

(4) 37℃和25℃都凝,或25℃凝,37℃不凝,为假凝集,多是由于器材不洁净或生理盐水有问题造成。(5)在5—10套的自凝试验结果中,30%以上阳性,定该菌为自凝试验阳性,10—30%阳性,定该菌为自凝试验弱阳性,10%以下阳性,定该菌为自凝试验阴性。

3. 最适菌浓度: 测试的12个菌落中有3个菌落在任何菌浓度和在两种温度(37℃和25℃)下都不发生凝集。这些是已发生变异的无毒力菌细胞。其余9个菌落发生凝集的情况很近似,其结果归纳于表1。表1显示 6×10^2 /ml或 1×10^6 /ml或 2×10^6 /ml的菌液为最适菌浓度。因此浓度试验可在15—20小时看到阳性结果。如果低于此浓度,20小时看不到生长,但延长孵育时间,仍可看到阳性结果,此为延缓阳性。如高于此浓度,在37℃和25℃都不凝,或在37℃以混浊为主带少量凝集,此为假阴性(见表1)。

表1 自凝试验的最适菌浓度

菌浓度 (菌数/ml)	孵育时间 (小时)	凝集		结果
		37℃	25℃	
6×10^2	20	-*	-*	延缓阳性
	48	+	-	
6×10^3	20	-*	-*	延缓阳性
	40	+	-	
5×10^4	16	-*	-*	延缓阳性
	24	+	-	
6×10^5	18	+	-	阳性
1×10^6	16	+	-	阳性
2×10^6	15	+	-	阳性
5×10^7	16	±	-	可疑阳性
5×10^8	16	-	-	假阴性

“+”凝集;“±”混浊带少量凝集;“-”均匀混浊,不凝集;“-*”液体清亮

(二) 血清抵抗试验

1. 培养基的选择: 据前文依钙试验结果^[4]及本文15株菌的测试结果。(1)15株菌分别

接种在草酸镁琼脂乏钙平板上,37℃培养,绝大多数菌株仅长无毒力的大菌落,而有毒力的小菌落不长。说明此种培养基不能获得有毒力的菌细胞。(2)15株菌接种在肉汤琼脂平板上,37℃培养,能长出大、小两种菌落,但小菌落要培养24小时后才能看到。作抵抗试验时,较多菌被杀死。说明此培养基是不理想的。(3)15株菌接种在0.5%水解酪蛋白肉汤琼脂平板上,在37℃培养20—22小时,能清楚看到大、小两种菌落。其中的小菌落能较好地抵抗人血清的杀菌作用,而大菌落和不带毒力质粒的菌株一样,不能抵抗人血清的杀菌作用。说明该培养基是理想的。

2. 结果的判断:(1)37℃培养的细菌,70%以上能在含10%正常人血清的溶液中,于37℃存活2小时,而于25℃培养,则不能在含10%正常人血清溶液中存活,在37℃1小时内全部被杀死。说明在37℃培养出来的细菌能抵抗人血清的杀菌作用,而25℃培养出来的细菌则不能。此为血清抵抗试验阳性。(2)在37℃或25℃培养出来的细菌,在含10%正常人血清的溶液中,均在37℃1小时内全部被杀死,说明均不能抵抗人血清的杀菌作用。此为血清抵抗试验阴性。

3. 用几种溶液代替10%正常人血清 Hanks液:(1)用10%正常人血清1640液代替,结果近似。(2)10%正常人血清牛肉汤代替,结果不准确。(3)用含10%正常人血清的5%葡萄糖生理盐水代替,结果不理想(图1)。(4)Hanks液中不加正常人血清或加入经56℃30分钟灭活的人血清,则无杀菌作用(图2)。

4. 结果: 80个菌株中,有73株血清抵抗试验阳性,7株阴性。

(三) 依钙试验

结合前文已报告的75个菌株^[1],总共80个菌株中,73株阳性,7株阴性。73株阳性菌株表现为:在草酸镁琼脂平板上37℃培养24—48小时,细菌不生长,或长出针尖大的小菌落,或长出的大小菌落数量很少,但在25℃培养48小时则长满正常大小的菌落。7株阴性菌株

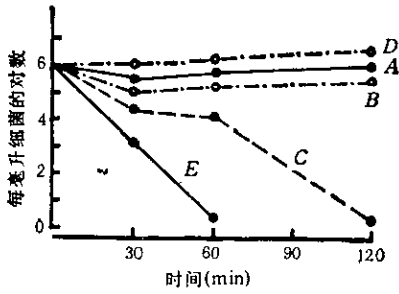


图1 10% 正常人血清 Hanks 液与几种代替液的杀菌效果 (37°C)

A. 10% 正常人血清 Hanks 液, 439-80 pYV+, 37°C。 B. 1640 液, 439-80 pYV+, 37°C。 C. 5% 葡萄糖盐水, 439-80 pYV+, 37°C。 D. 牛肉汤, 439-80 pYV+ 和 pYV-, 37°C 和 25°C。 E. A. B. C. 的 25°C 和 439-80 pYV- 在 A、B、C 溶液的 37°C 和 25°C。“37°C 和 25°C”均指培养待测菌的温度。“pYV+”示有毒力质粒, “pYV-”示无毒力质粒。 B、C、D 中的溶液均指加有 10% 正常人血清。

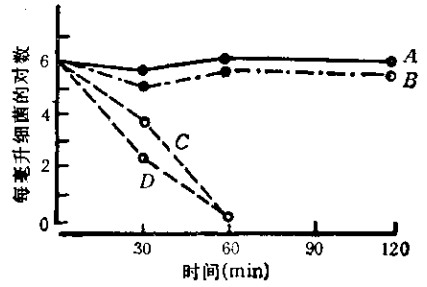


图2 Y. e. 在10%正常人血清 Hanks 液(37°C)的存活情况

A. 439-80pYV+, 37°C, 正常人血清。 B. 439-80pYV+ 和 pYV-, 37°C 和 25°C, 灭活人血清或无血清。 C. 439-80 pYV+, 25°C, 正常人血清。 D. 439-80pYV-, 37°C 和 25°C, 正常人血清。

表现为: 在草酸镁琼脂平板上 37°C 培养 24—18 小时与 25°C 培养 48 小时一样, 都长满正常

大小的菌落。

被测试的 80 个菌株, 在 3 种体外毒力试验(自凝性、血清抵抗性和依钙性)中, 有 73 株是 37°C 阳性, 25°C 阴性, 并已知其中 71 株带毒力质粒。表明有毒力质粒的 Y. e. 有温度依赖

表2 80株 Y. e. 菌株的主要特性*

菌株	来源	地区	血清型	生物型	毒力质粒	依钙性	自凝性	血清抵抗性	小结(毒力株)
439-80pYV+	腹泻病人	比利时	O:9	2	+	+	+	+	+
439-80pYV-	上菌使去毒力质粒	同上	O:9	2	-	-	-	-	-
WE-26pYV+	腹泻病人	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
WE-26pYV-	上菌失去毒力质粒	同上	O:3	4	-	-	-	-	-
B33	猪	丹麦	O:3	1	-	-	-	-	-
S58	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
R101	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
R50	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
LAB-B182	腹泻病人	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
S434	猪	同上	O:3	4	-	-	-	-	-
B396	猪	同上	O:3	4	-	-	-	-	-
R459	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
S64	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
B42	猪	同上	O:3	4	+	+	+	+	+
52203	人	瑞典	O:3	4	不明	-	-	-	-
52212	人	比利时	O:9	2	不明	+	+	+	+
52207	狗	英国	O:5,27	2	不明	+	+	+	+
52211	人	美国	O:8	1	不明	-	-	-	-
P01*	腹泻猪	南宁	O:3	3	+	+	+	+	+
P1	同上	同上	O:9	3	+	+	+	+	+
P7	同上	同上	O:9	3	+	+	+	+	+
P123	同上	同上	O:3	3	+	+	+	+	+
H151	腹泻病人	同上	O:9	3	+	+	+	+	+
H76	同上	同上	O:9	3	+	+	+	+	+

* 来自南宁地区腹泻猪的 56 株 Y. e. 未列入表内, 均是血清型 O:3, 生物型 3, 四项毒力试验均“+”

性,并具有毒力。另外7株在两种温度下都是阴性,已知其中5株不带毒力质粒,表明无毒力质粒的 Y. e. 无温度依赖性,无毒力(表2)。

讨 论

我们在南宁地区从腹泻病人和腹泻猪中分离到的62株 Y. e.^[8,9] 自凝、血清抵抗、依钙和毒力质粒等四个毒力试验全部都是阳性,证明这些菌株全为毒力株,具有致病性。

本文采用的实验方法有以下几个特点:

1. 血清抵抗试验:国内尚未见有报道。(1)本试验培养基是自己配制的0.5% 水解酪蛋白肉汤琼脂平板。这是一种含钙培养基,而国外大多强调必须乏钙。根据我们的对比试验,有毒力的菌株在乏钙培养基上,37℃培养,绝大多数菌株长出的是无毒力的菌细胞(大菌落),而有毒力的菌细胞(小菌落)生长受到抑制。其结果与 Gemski^[3,6] 报道相一致,表明毒力菌株能抵抗血清的杀菌作用与其带有毒力质粒及在37℃培养有关,与培养基是否含钙无明显关系。这与Perry的报告^[10]相一致。(2)用自凝试验配制的1640液代替 Hanks 液,在国外未见报道。它对仅测少数菌株的实验室是一个方便,可省去另配 Hanks 液。(3)国外报告新鲜人血清须放-70℃保存,而我们放普通双门冰箱-30℃冰盒内,可保存一个月,结果仍很好。

2. 自凝试验:(1)待测菌必须来自单个菌

落。国内有个别实验室作自凝试验,用的是斜面培养基上的菌苔,一个菌株仅作一套。据国外报道及我们的经验,发现 Y. e. 在保存过程中易发生变异(特别在37℃培养时)。如果取菌苔作试验,就有毒力细胞和无毒力细胞相混的可能,试验结果将不准确。(2)掌握好最适菌浓度是实验成败的关键,而且要注意浓度过低的迟缓阳性和浓度过高的假阴性。(3)所用的吸管、试管等玻璃器材必须经硫酸或清洁剂处理,并彻底洗净,所用的生理盐水和1640液均需用新鲜的三蒸水配制,否则结果不准。

3. 本试验结果显示,采用体外法测定 Y. e. 毒力,比动物实验法经济、快速,而且结果准确,应用范围广,可适用于多种血清型别和多种来源的 Y. e. 菌株。

参 考 文 献

1. 郑蔚斌等:中国畜禽传染病, 3: 111—113, 1989.
2. 王家睦等:广西医学, 7(5): 231—233, 1985.
3. Gemski P et al.: *Infect Immun*, 27(2): 682—685, 1980.
4. Laird W et al.: *J Clin Microbiol*, 11(4): 430—431, 1980.
5. Pai C H et al.: *Infect Immun*, 35(2): 605—611, 1982.
6. Cornelis G et al.: *Rev Infect Dis*, 9(1): 64—87, 1987.
7. Laroche Y et al.: *Plasmid*, 12: 67—70, 1984.
8. Zheng X B: *J Appl Bacteriol*, 62: 521—525, 1987.
9. 郑蔚斌等:广西医学, 6(6): 296—298, 1984.
10. Perry R D et al.: *Infect Immun*, 40(1): 156—171, 1984.