

炭疽芽胞热休克对分离培养的影响

第四军医大学 过祥豹

以往对炭疽皮毛标本的检验，常用阿斯科利氏试验 (Ascoli's test) 检测炭疽抗原成分。近年来发现该试验特异性不强，敏感性不高，许多单位已改用细菌培养法检验炭疽芽胞。外贸部规定出品“不应附有炭疽菌” (1)。但细菌培养时标本处理是否得当，严重影响着检验结果。

外贸部1962年对绒类WMB12-56(1)规定炭疽菌检验方法如下：“手戴消毒橡皮手套，自每批检来样品之每个小样中抓取2~3克，装入盛灭菌豆汤培养基之锥形瓶（瓶之容积约为250毫升）内，置70~80°C恒温箱或水浴锅中30分钟杀灭非芽胞细菌。待冷至40°C，再移入37°C培养箱中，施以18~24小时增菌培养，培养后将培养之豆汤用铂耳涂于普通琼脂平板培养基上，再行18~24小时，观察发育集落……”。要点是先用含营养的豆汤培养基洗脱芽胞，经70~80°C加温杀灭非芽胞杂菌，再培养炭疽杆菌。许多检验单位执行后都反映此法对炭疽菌的检出率太低，甚至数万份标本无一阳性。某单位十年间检查样品达二十万余份，仅一份阳性。只好将样品直接涂抹于平板上，阳性率就有所提高。这种得不出阳性结果的原因，目前国内尚未见有合理阐明。因而亟需进行探讨，改正技术方案，从而避免政治和经济上的巨大损失。

一、炭疽芽胞出芽时先有一生理学出芽时期：将巴斯德 I 号苗、CTI-1和CTI-3三株保存于蒸馏水中稳定状态的炭疽芽胞，分别接种在普通肉汤或酵母肉汤中，置37°C水浴中，定时取出作涂片和芽胞（抗酸性）染色，显微镜检查。结果都发现：从典型的红色卵圆型芽胞变成典型的正在分裂蓝色繁殖型杆菌，一般需60至90分钟。Swann(2)也有相似报道。但可发现炭疽芽胞在营养液中，只需5分钟就有小部分染成蓝色，经10分钟，蓝色小芽胞约占1/4，15分钟增至1/2，20分钟达3/4。表示芽胞在营养液中经短时间其代谢即开始活跃，水分增多，通透性增加，染料容易进出，染成复染的蓝色。这时芽胞已进入了生理性出芽阶段。如将芽胞置于无营养的蒸馏水中，不论在37°C或室温（15~20°C），时间多长，均无上述变化。

二、芽胞生理性出芽时对热的抗力：将巴斯德 I 号苗稳定状态的炭疽芽胞分别加入各培养基中，使芽

胞浓度每毫升约为4,000~30,000个，在37°C水浴中孵育一定时间取出，用蒸馏水稀释10倍消除养料对芽胞继续作用后，经60°C加热15分钟杀灭已出芽的细菌，再用培养计数法分离残留芽胞。以原芽胞数为分母，死亡的出芽菌数为分子乘100，计算其出芽率。芽胞在无营养的蒸馏水中不出芽。在营养液中只经5分钟即有近90%或以上的芽胞出芽，被60°C加温杀死。对照芽胞形态染色结果，这时芽胞形态依然存在，但其对热抗力低下的生理特性却属于细菌的繁殖型。这种生理性出芽的时间（如5分钟）要比形态学出芽的时间（如60~90分钟）早得多（附表）。

附表 炭疽芽胞于几种营养液中的出芽率 (%)
(60°C, 15' 热休克法测定)

	37°C 水浴中孵育时间			
	5'	10'	15'	30'
普通肉汤			93.8*	99.2*
酵母肉汤	94.4	97.5	97.6	98.7
酵母葡萄糖肉汤	89.3	92.6	95.6	99.0

* 65°C, 30'

Fernelius(3)报道，炭疽芽胞在含氨基酸的培养基中，温度降到15°C室温，经4和8分钟出芽率分别可达77%和93%。说明在室温中短时间内仍有较高的出芽率。

三、“规定”得不出阳性结果的原因：我们进行了模拟试验：将蒸馏水保存的炭疽CTI-1株稳定芽胞，分别用肉汤和蒸馏水稀释，使芽胞最后浓度每毫升为250个左右，放置室温（15°C）中5分钟，再用60°C加热30分钟，取0.1毫升分离培养。40管肉汤稀释的芽胞液加温后培养，全部阴性，而蒸馏水稀释再加温培养者仍全部阳性（应以无营养的液体来洗脱芽胞）。

由此可见，按部订规定操作得不出阳性结果的原因，是用含营养料的豆汤培养基去洗脱样品中的芽胞。在这操作过程中，温度和时间又极易达到芽胞出芽的要求，绝大部分芽胞发生生理性出芽，对热力已变敏感，经热休克而使炭疽菌死亡。

其次是所用杀灭非芽胞杂菌的温度（70~80°C）太高。影响检出率。Jones报道(4)，炭疽芽胞经80°C

(下转208页)

定结果均为O₇₈血清型。

讨 论

一、由产肠毒素大肠菌引起的腹泻，多发生于热带及亚热带国家，主要流行于夏季，约占腹泻病因的20~50%。近年来WHO对腹泻病因的研究很重视，并认为产肠毒素大肠菌是腹泻的重要病因之一。

国内除1983年6月3日人民日报报道上海市卫生防疫站首次成功的分离出一株产肠毒素大肠菌外，至今似乎未见其它兄弟省市的报道。

我省此次流行性腹泻主要发生于冬春季，发病人数较多，流行面较广，经病原学检查，在72份腹泻患者粪便标本中，检出两株产肠毒素大肠菌，未检出其它肠道致病菌。由此看出，即使在冬春季腹泻中产肠毒素大肠菌也是不可忽视的病因之一，应引起今后工作的重视。

二、目前测LT肠毒素方法较多，有生物学方法、免疫学方法及细胞法等。我们采用家兔肠段结扎法做LT肠毒素测定，该方法虽然手续繁琐，但仍不失为有效的方法。此二株产肠毒素大肠菌，经卫生部药品生物制品检定所检定，与我们的检验结果完全一致，从而首次在我省证明了产肠毒素大肠菌是腹泻的重要病因之一。

三、据有关文献报道〔6〕，由于不同的地理分布，产肠毒素大肠菌往往限于少数血清型。我们这次分离的两株产肠毒素大肠菌用O抗原

做血清学鉴定均为O₇₈血清型。

(本文图1、2见插图第4页)

摘 要

本文报告了1983年1~4月，对黑龙江省鸡西市及哈尔滨市两地区成人流行性腹泻病人的72份粪便标本做了肠道致病菌检查，检出产肠毒素大肠菌2株，检出率为2.77%。未检出其他肠道致病菌。此二株产肠毒素大肠菌经测定均为LT、ST阳性株。用O抗原做血清学鉴定结果均为O₇₈血清型。

ABSTRACT

An etiological investigation on epidemic adult diarrhoea was carried out in the cities of jixi and Harbin, Heilongjiang province from January to April, 1983. Out of 72 stool samples examined for identifying enteropathogens, 2 (2.77%) strains of *Enterotoxigenic E Coli* were detected and identified as LT and ST positive strains both belonged to serotype O₇₈. No other enteropathogens were found.

参 考 文 献

1. 黑龙江省卫生防疫站：流行性腹泻资料汇编，内部资料，1983。
2. 本田武司等：コレラ菌と肠毒素大肠菌の検査法，菜根出版，第1版，47~85，1981。
3. 山田登夫等：毒素原性大肠菌の検査法，モダンメディア，26(11)：545~557，1980。
4. 急性肠道感染的试验室诊断规程，35~37页，国家腹泻讲习班讲义，1982。
5. 中丹培训中心讲义：肠道感染的诊断，第10部分，1983。
6. 许新强：国外医学，流行病学传染病学分册，(3)：111，1983。
7. 辽宁省卫生防疫站译：关于肠毒素性大肠菌研究的现状和今后课题，内部资料，1981。

(上接封四)

加热2分钟，相当多的芽胞即死亡；从14份骨粉中分离炭疽芽胞，别的实验室做6份，加热80°C，结果全部阴性，Jones用65°C加热5分钟后分离，14份中有11份阳性，故主张降低温度到65°C。我们体会使用60~65°C加热30分钟，既能杀灭较多的非芽胞杂菌，又能尽量保留炭疽芽胞不使灭活，较为合适。

据悉1962年“暂行标准”系参照苏联标准方法制订的。由此看出，一切要通过试验，不可盲目搬用，“标准”中的原则性错误急需修订更正。

为了提高检出率，有利用洗涤剂加强洗涤效果(5)，选择性平板抑制众多杂菌(6,7)等方法。较彻底

的方法是将皮毛类产品进行环氧乙烷消毒，杀灭其中炭疽芽胞，以培养法检查消毒效果。

(本试验承汪美先教授指导，特此致谢)

参 考 文 献

1. 中华人民共和国对外贸易部：“暂行标准”绒类WMB，12~56，北京，1962。
2. Swann MBR: J Path Bact, 27: 130, 1924.
3. Fernelius AL: J Bact, 79: 755, 1960.
4. Jones ER: J Path Bact, 54: 307, 1942.
5. Beigeleisen JZ Jr et al: Am J Hyg, 75: 230, 1962.
6. Morris EJ: J Gen Microbiol, 13: 456, 1955.
7. 中华人民共和国卫生部：食品卫生检验方法(微生物学部分)，151页，1976。