

空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法 (T/CPMA 006-2019)

中华预防医学会

通信作者:张茂俊, Email: zhangmaojun@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.004

Identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* (T/CPMA 006-2019)

Chinese Preventive Medicine Association

Corresponding author: Zhang Maojun, Email: zhangmaojun@icdc.cn

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0254-6450.2019.09.004

前 言

本标准按照 GB/T 1.1—2009 给出的规则起草。

本标准由中华预防医学会归口。

本标准起草单位:中国疾病预防控制中心传染病预防控制所、国家食品安全风险评估中心、黑龙江省疾病预防控制中心、北京市顺义区疾病预防控制中心、深圳市南山区疾病预防控制中心。

本标准主要起草人:张茂俊、张建中、郭云昌、遇晓杰、段永翔、顾一心、李颖、李薇薇、闫军、马红梅、鞠长燕。

空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验方法

1 范围

本标准规定了空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)、结肠弯曲菌(*Campylobacter coli*)的检验方法。

本标准适用于粪便标本、食品和水样品中空肠弯曲菌、结肠弯曲菌的检验。

2 设备和材料

- 2.1 冰箱:4~8℃、-20℃、-80℃;
- 2.2 恒温培养箱:42℃±1℃、36℃±1℃;
- 2.3 微需氧培养装置:提供微需氧气体条件(5%氧气、10%二氧化碳和85%氮气);
- 2.4 水浴装置:36℃±1℃、100℃;
- 2.5 离心机:离心力≥20 000 g;
- 2.6 天平:感量0.1 g;
- 2.7 显微镜:10~100倍,有相差功能;
- 2.8 培养皿:直径为90 mm或60 mm;
- 2.9 pH计或pH比色管或精密pH试纸;
- 2.10 振荡器;
- 2.11 过滤装置及滤膜(0.22 μm、0.45 μm);
- 2.12 均质器与配套均质袋;
- 2.13 基因扩增仪;

- 2.14 DNA电泳仪;
- 2.15 凝胶成像系统;
- 2.16 弯曲菌分离培养试剂盒。

3 培养基和试剂

- 3.1 粪便标本采集液:见附录A中A.1;
- 3.2 食品样品漂洗液:见附录A中A.2;
- 3.3 增菌液:见附录A中A.3;
- 3.4 哥伦比亚血琼脂平板:见附录A中A.4;
- 3.5 Karmali琼脂平板:见附录A中A.5;
- 3.6 空肠弯曲菌标准菌株 ATCC700819;
- 3.7 结肠弯曲菌标准菌株 ATCC33559。

4 检验程序

空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验程序见图1。

5 检测步骤

5.1 标本及样品采集、运输及前期处理

5.1.1 腹泻患者或者健康人粪便标本

尽量在患者使用抗生素前无菌采集新鲜粪便标本3~5 g(或者黄豆至蚕豆大小),将标本直接置于便盒中,冷藏保存(不可冷冻),当天送检。粪便量小于3 g(黄豆大小)、便拭子或者肛拭子,可放入Cary-Blair运送培养基中,冷藏运输,当天送检。便拭子或者肛拭子也可直接放入弯曲菌的增菌液中,冷藏运输,当天运送实验室或24 h内进行增菌培养。

注:腹泻患者标本采集时,黏液便尽量挑取有脓血和黏液部分。使用便拭子采集时,尽量将沾有标本的棉签部分浸入在运输培养基或者保存液的液面以下,采集标本后应迅速拧紧管口或者盖口。

5.1.2 家禽、家畜及其泄殖腔中粪便标本

直接将标本置于便盒中运输,或者无菌挑取黄豆粒大小标本直接放入装有1.5 ml的无菌生理盐水或者PBS缓冲液中,冷藏保存及运输,24 h内进行检测。

5.1.3 整禽胴体及分割肉样品

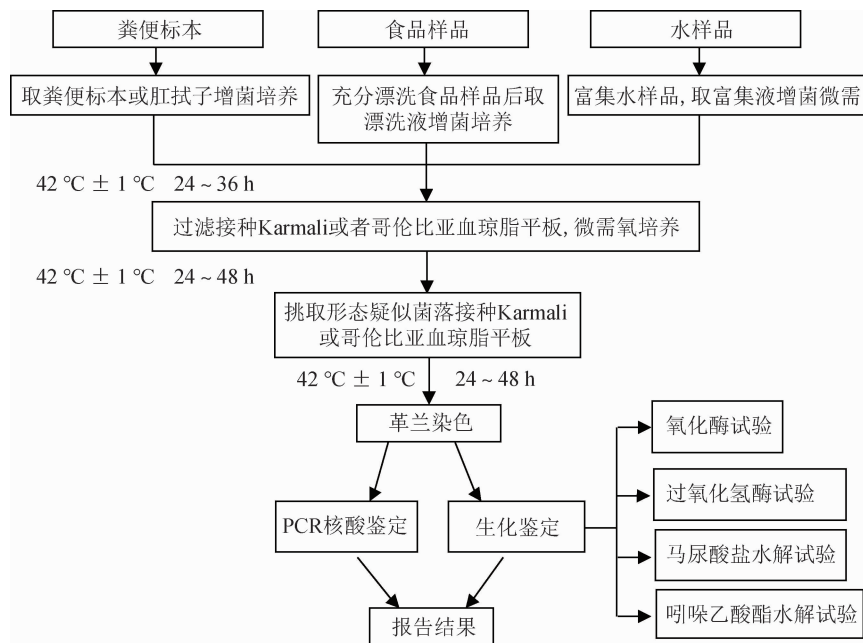


图1 空肠弯曲菌、结肠弯曲菌检验程序

使用无菌均质袋采集整只禽胴体, 冷藏运输回实验室, 加入适量的样品漂洗液淹没样品(一般每1 kg 样品加入500 ml 样品漂洗液), 置于振荡器上, 100 r/min 震荡15 min, 反复揉搓禽胴体5 min(注意各个部位均要揉到)。无菌操作取出禽胴体, 取2 ml 漂洗液进行检测。如果当天不能检测可将禽肉样品浸润在漂洗液中, 放置4 °C 冷藏过夜, 24 h 内再次充分揉搓后, 取2 ml 漂洗液进行增菌培养。

取分割肉1块(大于25 g)放入无菌均质袋中, 冷藏保存运输至实验室, 加入适量样品漂洗液淹没样品, 100 r/min 震荡15 min, 反复揉搓样品5 min, 无菌操作取出禽肉, 取2 ml 漂洗液进行增菌培养。

5.1.4 蔬菜、水果等样品

采集一定量的蔬菜或者水果(样品的采集量可以根据要求确定或者采集100~150 g), 将样品放入无菌均质袋中, 加入样品漂洗液后充分浸润、漂洗(一般每100~150 g 样品加入100 ml 样品漂洗液), 置于振荡器上, 100 r/min 震荡15 min, 取出样品, 取漂洗液进行直接检测或者4 °C 低速(1 500~1 900 g) 离心10 min, 富集污染病原于2 ml 增菌液中, 进行增菌培养。

5.1.5 水样品

废水取20~50 ml, 地面水取100~200 ml, 饮用水取1~4 L。无菌容器采集水样, 将水样用0.22 μm 的无菌滤器过滤富集污染病原, 或者将水样4 °C 低速(1 500~1 900 g) 离心10 min, 富集污染病原于2 ml 增菌液中进行增菌培养。

5.2 细菌培养

5.2.1 培养条件

空肠弯曲菌、结肠弯曲菌皆为微需氧菌, 在微氧(5%氧气、10%二氧化碳, 85%氮气) 气体环境下生长最好。空肠弯曲菌、结肠弯曲菌最适宜的培养温度为42 °C ± 1 °C。空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的增菌培养和过滤培养都可在上述微需氧的环境下, 42 °C ± 1 °C, 培养24~48 h。

5.2.2 粪便标本增菌培养

从便盒中挑取黄豆粒大小粪便标本(水样便300~500 μl), 加入到2~4 ml 的增菌液中, 充分混匀后进行增菌培养; 将便拭子或者肛拭子直接放入2~4 ml 的增菌液中, 充分挤压混匀, 取出棉签后进行增菌培养; 松动增菌液的管口(目的是让微需氧环境的气体进入增菌液培养管中), 在微需氧环境下, 42 °C ± 1 °C 增菌培养24~36 h。

5.2.3 禽肉、蔬菜、水果等样品漂洗液增菌培养

直接取2 ml 样品漂洗液或者样本富集液, 加入到4 ml 的增菌液中, 充分混匀后进行增菌培养。

5.2.4 水样品富集液增菌培养

将富集后的0.22 μm 滤膜用2 ml 的无菌生理盐水或者PBS 缓冲液反复冲洗, 将冲洗液加入到4 ml 的增菌液中, 充分混匀后进行增菌培养; 使用无菌剪刀将滤膜剪碎后直接放入4 ml 增菌液中, 充分混匀后进行增菌培养; 或者直接将富集的沉淀悬浮于2 ml 的无菌生理盐水或者PBS 缓冲液中, 充分混匀后加入到4 ml 的增菌液中, 充分混匀后进行增菌培养24~36 h。

5.2.5 过滤培养

取出冷藏保存的Karmali 平板和哥伦比亚血琼脂平板, 室温平衡40~60 min。无菌操作, 用镊子取

一片 0.45 μm 的滤膜,将滤膜轻轻贴在平板的中央表面(光滑面朝上),使滤膜与培养基的表面充分贴合,注意不要产生气泡。如有气泡,可用镊子弯头背面或者无菌玻璃棒轻轻抚平。或者使用商用试剂盒时,按照试剂盒的说明操作,制备带有滤膜的 Karmali 和哥伦比亚血琼脂平板。

取出增菌培养物,拧紧管口,轻轻混匀,拧开管口,取 300~500 μl 的增菌培养物(样品不做增菌,直接过滤培养时,可直接取稀释后的样品 300~500 μl),分成 4~6 点,呈梅花样滴加于滤膜上,注意滴加的液体不能超过滤膜的边缘。在生物安全柜中,等待滤膜上的液体充分透过滤膜(约 45~60 min),迅速揭掉滤膜,翻转培养平板,置于微需氧环境中 42℃±1℃,培养 24~48 h(细菌培养 24 h 后如细菌生长缓慢或者菌落很小,可增加培养时间至 48 h,72 h 后仍无疑似菌落判断为阴性)。

注:不同种类标本、样品运输至实验室后,可采用商用的空肠弯曲菌、结肠弯曲菌培养检测试剂盒(过滤法)进行分离培养,培养步骤按照试剂盒的说明进行。

5.3 菌种鉴定

5.3.1 菌落形态及革兰染色鉴定

空肠弯曲菌和结肠弯曲菌典型菌落形态一般有两种,一种呈圆形透明,光滑,针尖状或水滴状,直径 1~3 mm,边缘整齐、有光泽的单个菌落;另一种呈浅灰白色,半透明,扁平或稍凸起,形状常呈不规则圆盘状,直径 2~5 mm 的单个菌落,培养时间增加,菌落直径变大。对疑似菌落进行革兰染色,空肠弯曲菌和结肠弯曲菌革兰染色阴性,革兰染色菌体形态弯曲,有如半个括号状,或者呈 S 形、螺旋状或海鸥展翅状。

5.3.2 生化试验鉴定

5.3.2.1 氧化酶试验

挑取 3~5 个疑似菌落,划线接种到 Karmali 或者哥伦比亚血琼脂平板进行分纯培养 24~48 h 后进行生化试验鉴定。用无菌棉签蘸取疑似菌落,将氧化酶试剂直接滴加到棉签的菌上,如果在 10 s 内出现紫红色、紫罗兰色或深蓝色为阳性。

5.3.2.2 过氧化氢酶试验

挑取 3~5 个菌落,加到干净玻片上的 3% 过氧化氢溶液中,如果在 30 s 内出现气泡则判定结果为阳性。空肠弯曲菌、结肠弯曲菌和海鸥弯曲菌为阳性。

5.3.2.3 马尿酸盐水解试验

挑取单菌落纯培养物(10 μl 取菌环约半环),加到盛有 0.4 ml 的 1% 马尿酸钠的试管中制成菌悬液。混合均匀后在 36℃±1℃ 水浴中温育 2 h 或培养箱中温育 4 h。沿着试管壁缓缓加入 0.2 ml 茚三酮溶液,不要振荡,在 36℃±1℃ 的水浴或培养箱

中再温育 10 min 后判读结果。若出现深紫色则为阳性;若出现淡紫色或没有颜色变化则为阴性。

5.3.2.4 吡啶乙酸酯水解试验

挑取多个菌落至羧基吡啶醋酸盐纸片上,再滴加一滴灭菌蒸馏水。如果吡啶乙酸酯水解,则在 5~10 min 内出现深蓝色;若无颜色变化则表示没有发生水解。

5.3.2.5 生化试验结果判定

根据表 1 中的生化反应结果判定菌种。

表 1 重要食源性弯曲菌生化试验结果

| 特征 | 空肠弯曲菌 (<i>C. jejuni</i>) | 结肠弯曲菌 (<i>C. coli</i>) | 海鸥弯曲菌 (<i>C. lari</i>) | 乌普萨拉弯曲菌 (<i>C. upsaliensis</i>) |
|-----------|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| 氧化酶试验 | + | + | + | + |
| 过氧化氢酶试验 | + | + | + | —或微弱 |
| 马尿酸盐水解试验 | + | — | — | — |
| 吡啶乙酸酯水解试验 | + | + | — | + |

注: + 表示阳性; — 表示阴性; 根据生化鉴定可报告生化鉴定结果,PCR 核酸检测鉴定方法可作为第二法或者核实鉴定的方法

5.3.3 核酸检测鉴定

5.3.3.1 DNA 模板制备

无菌接种环挑取适量纯培养细菌,在 200 μl 无菌纯水中充分混匀,于 100℃ 金属水浴加热 10 min 后,13 000 g 离心 3 min,取上清液作为菌株鉴定的 DNA 模板。或者取一定量的纯培养细菌,按照商品化试剂盒的操作说明,使用 DNA 提取试剂盒提取纯培养细菌 DNA,作为菌株鉴定的模板。所有提取的 DNA 模板可在 -20℃ 条件下保存备用。

5.3.3.2 多重 PCR 鉴定

a) 多重 PCR 引物序列、产物大小及菌种判定见表 2。

表 2 多重 PCR 鉴定的引物序列、产物大小及菌种判定

| 引物名称 | 引物序列(5'~3') | 产物长度 (鉴定菌种) |
|----------|---------------------------|---------------------|
| 16S-F | ATCTAATGGCTTAACCATTAAAC | 857 bp(空肠弯曲菌、结肠弯曲菌) |
| 16S-R | GGACGGTAACTAGTTTAGTATT | |
| mapA-CJF | CTATTTTATTTTTGAGTGCTTGTG | 589 bp(空肠弯曲菌) |
| mapA-CJR | GCTTTATTTGCCATTTGTTTTATTA | |
| ceuE-CCF | ATTTGAAAATTGCTCCAACATATG | 462 bp(结肠弯曲菌) |
| ceuE-CCR | TGATTTTATTATTGTAGCAGCG | |

b) 多重 PCR 反应体系(20 μl)的设置见表 3。多重 PCR 鉴定体系需要设置阳性对照(空肠弯曲菌标准菌株 ATCC700819,结肠弯曲菌标准菌株 ATCC33559 的 DNA 模板或者相应克隆靶基因)、阴性对照(其他

表 3 多重 PCR 反应体系(20 μl)

| 试剂成分 | 终浓度 | 试剂成分 | 终浓度 |
|-----------|------------|------------------|------------|
| 2×PCR 反应液 | 1× | ceuE-CCF | 0.2 μmol/L |
| 16S-F | 0.4 μmol/L | ceuE-CCR | 0.2 μmol/L |
| 16S-R | 0.4 μmol/L | DNA 模板 | 约 50 ng |
| mapA-CJF | 0.2 μmol/L | H ₂ O | — |
| mapA-CJR | 0.2 μmol/L | | |

非弯曲菌菌株的DNA模板)以及空白对照。

c) 多重PCR反应程序:95℃预变性5 min,95℃变性1 min,55℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环后72℃延伸5 min,4℃保存。

d) 琼脂糖凝胶电泳:用0.5×TBE制备1.5%的琼脂糖凝胶(含0.5 μg/ml的Goldview)。取5 μl的PCR产物(可包括适量的上样缓冲液),用DNA分子量标记物做参照,电压110 V,电泳45~50 min(根据实验室仪器情况确定具体电泳条件)。使用凝胶成像系统对电泳结果进行保存和分析。

e) 结果判定:阴性对照未出现条带,阳性对照出现预期大小的扩增条带条件下,如待检菌落出现857 bp和589 bp大小的扩增条带,则可判定该菌落检验结果为空肠弯曲菌;如待测菌落出现857 bp和462 bp大小的扩增条带,则可判定该菌落为结肠弯曲菌;如果阴性对照出现条带和/或阳性对照未出现预期大小的扩增条带,本次待测菌落的检测结果无效,应重新进行试验,并排除污染因素。

6 结果报告

根据5.3.2.5和(或)5.3.3.2的结果,报告标本/样品中检出或未检出空肠弯曲菌和(或)结肠弯曲菌。

7 生物安全

按照我国《人间传染的病原微生物名录》空肠弯曲菌、结肠弯曲菌皆属于三类病原微生物,生物危险程度为Ⅱ级,活菌的操作以及相关动物实验可在BSL-2实验室戴相应基础防护规范操作。

附录A

(规范性附录)

培养基和试剂的成分及制法

A.1 粪便标本采集液的成分及制法

| | |
|---------|----------|
| 酪蛋白酶解物 | 10.0 g |
| 动物组织酶解物 | 10.0 g |
| 葡萄糖 | 1.0 g |
| 酵母浸膏 | 2.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 亚硫酸氢钠 | 0.1 g |
| 蒸馏水 | 1 000 ml |

将上述各成分溶解于蒸馏水中,校正pH值至pH 7.0±0.2,加入25%~30%的甘油,充分混匀后121℃灭菌15 min,备用。

A.2 食品样品漂洗液的成分及制法

| | |
|---|----------|
| 蛋白胨 | 10.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 磷酸氢二钠(Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O) | 9.0 g |
| 磷酸二氢钾 | 1.5 g |
| 蒸馏水 | 1 000 ml |

将上述各成分溶解于蒸馏水中,校正pH值至pH

7.0±0.2,121℃灭菌15 min,备用。

A.3 增菌液的成分及制法

A.3.1 基础培养液成分及制法

| | |
|-------|---------|
| 牛肉提取物 | 10.0 g |
| 蛋白胨 | 10.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 蒸馏水 | 1000 ml |

将上述各成分溶解于蒸馏水中,校正pH值至pH 7.0±0.2,121℃灭菌15 min,备用。

A.3.2 生长添加剂成分及制法

| | |
|-----------|--------|
| 丙酮酸钠 | 0.25 g |
| 焦亚硫酸钠 | 0.25 g |
| 硫酸亚铁(水合盐) | 0.25 g |
| 灭菌水 | 4 ml |

将上述成分溶解于灭菌水中。

A.3.3 抗生素成分及制法

| | |
|-------------------|------------|
| 多粘菌素 | B 5 000 IU |
| 利福平 | 10.0 mg |
| 甲氧苄啶 | 10.0 mg |
| 两性霉素 | B10.0 mg |
| 乙醇-灭菌水(50+50,V+V) | 4 ml |

将上述成分溶解于乙醇-灭菌水混合溶液中。

A.3.4 增菌液的成分及制法

| | |
|-------|----------|
| 基础培养液 | 1 000 ml |
| 生长添加剂 | 4 ml |
| 抗生素溶液 | 4 ml |

将上述A3.1~A3.4各成分无菌混匀后加入5%的脱纤维羊血,分装备用。

A.4 哥伦比亚血琼脂平板成分及制法

| | |
|---------|----------|
| 动物组织酶解物 | 23.0 g |
| 淀粉 | 1.0 g |
| 氯化钠 | 5.0 g |
| 琼脂 | 10.0 g |
| 蒸馏水 | 1 000 ml |

将上述各成分溶解于蒸馏水中,校正pH值至pH 7.0±0.2,121℃灭菌15 min,冷却到56℃后,加入5%的脱纤维羊血,摇匀后倒入无菌平皿中,90 mm平皿或者60 mm平皿,22 ml/皿。4℃保存,备用。

A.5 Karmali琼脂平板成分及制法

| | |
|----------|----------|
| 哥伦比亚琼脂基础 | 39.0 g |
| 活性炭 | 4.0 g |
| 氯化血红素 | 0.032 g |
| 蒸馏水 | 1 000 ml |

将各成分溶解于蒸馏水中,校正pH值,121℃灭菌15 min,冷却到56℃后,加入无菌平皿中,90 mm或者60 mm平皿,22 ml/皿。4℃保存,备用。

(收稿日期:2019-08-19)

(本文编辑:李银鸽)