

## 地鼠结肠炎模型中难辨梭状芽孢杆菌的分离及其细胞毒素的测定

刘林祥 牛惠珍 李志军 宋红月 张相勇

(中医研究院中药研究所, 北京)

在建立地鼠结肠炎模型的研究中, 进行了地鼠盲肠内容物中难辨梭状芽孢杆菌 (*Clostridium difficile*) 的分离、鉴定及其毒素的测定。几种选择培养基的比较结果表明, 环丝氨酸-噻孢习丁血琼脂分离阳性率最高。根据菌落及镜下形态、对氧敏感性、生化反应、抗生素敏感试验等结果证明分离物为梭状芽孢杆菌。用地鼠肾细胞培养物证明大部分病鼠盲肠内容物中含有该菌的细胞毒素, 该毒素可被索氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium sordellii*) 的抗毒素所中和。

**关键词** 难辨梭状芽孢杆菌

近年来的研究表明, 难辨梭状芽孢杆菌是伪膜性结肠炎和部分腹泻患者的病原菌<sup>[1,2]</sup>, 它能产生引起组织培养细胞病变的细胞毒素<sup>[3]</sup>。用氯洁霉素 (clindamycin) 攻击地鼠可以诱发结肠炎。从患病地鼠的盲肠内容物中可以分离到这种细菌和检测到它产生的细胞毒素<sup>[4]</sup>。这种毒素和人的病原菌所产生的相同, 也能被索氏梭状芽孢杆菌的抗毒素或某些多价抗气性坏疽血清中和<sup>[5]</sup>。

我们在建立地鼠结肠炎模型<sup>[5]</sup>的过程中, 进行了难辨梭状芽孢杆菌的分离、鉴定研究及其毒素的测定。

### 材料及方法

#### (一) 培养基的制备

卡那霉素布鲁氏菌血琼脂 (KBA, 在灭菌后的布鲁氏菌琼脂基础中, 无菌操作加入脱纤维兔血 5%, 每毫升加卡那霉素 75  $\mu$ g、维生素 K1 10  $\mu$ g 及氯高铁血红素 5  $\mu$ g); 哥伦比亚血琼脂 (CBA)、梭状芽孢杆菌琼脂 (RCM) 和硫乙醇酸钠肉汤均按英国 OXOID 公司手册配制; 庖肉液体培养基、选择性血琼脂培养基 (CCA) 按 Chang 的方法<sup>[6]</sup>配制, 其中所用环丝氨酸及甲氧噻吩头孢霉素 (噻

孢习丁) 系美国新英格兰医学中心所赠。其余各项鉴定用培养基按 Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual<sup>[7]</sup> 配制。

#### (二) 抗毒素

索氏梭状芽孢杆菌抗毒素系美国新英格兰医学中心所赠; 两种多价气性坏疽抗毒素分别为长春及兰州生物制品研究所生产。

#### (三) 诱发地鼠结肠炎

用青霉素 G 钾盐及庆大霉素的混合液灌喂 70—90g 雄性地鼠, 每次每只给药量为青霉素 10 万单位, 庆大霉素 1 万单位, 每日 2 次, 共 3 天。停药后 5 天, 将动物拉颈处死, 切开腹壁, 结扎迴肠末端和结肠起端, 无菌操作取出盲肠置无菌平皿内, 称重后迅速移至无菌室进行细菌分离<sup>[5]</sup>。

#### (四) 盲肠内容物中厌氧细菌的分离与鉴定

在无菌室内纵向切开地鼠盲肠壁, 将剖开的盲肠放入无菌三角瓶内, 加入 10 倍于盲肠重的 0.05% (W/V) 酵母粉水, 在液体快速混合器 (江西医疗器械厂产品) 上振摇 15 秒, 使盲肠内容物完全释出成粪便悬液。用酵母水将上述悬液进行 10 倍系列稀释 (加热处理者稀释至  $10^{-4}$ , 不加热处理者稀释至  $10^{-6}$ ), 将稀释液置 80  $^{\circ}$ C 水浴中加热 10 分钟 (或不经加热处理)。在预还原 24 小

本文于 1984 年 2 月 15 日收到。

时的平板培养基上接种 0.1 ml, 摊开铺匀, 置 GasPak 厌氧罐 (BBL 产) 内, 37℃ 培养 48 小时至一周。观察并记录菌落形态和菌落数。选择不同形态的单个菌落 (在 CCA 上选择黄白至黄色, 形态不规则的菌落) 涂片染色并分别接种 KBA, 硫乙醇酸钠培养基和庖肉培养基, 再置厌氧罐内培养 48 小时。用传代培养物再进行革兰氏染色、生化反应和抗生素敏感性试验。

### (五) 毒素测定和毒素中和试验

将 1:10 酵母水稀释的粪便悬液经 4,000 转/分离心 30 分钟, 上清液通过孔径 0.45μm 的微孔滤膜 (上海医药工业研究院生产) 过滤。在地鼠肾原代单层细胞培养物上接种滤液 0.1ml (每管含乳蛋白水解物培养液 1ml)。同时设只加酵母水和不加滤液与酵母水的细胞对照。37℃ 培养 24 小时后, 在显微镜下观察结果。单层中半数或半数以上细胞拉丝变圆, 即判定为毒素阳性。阳性粪便液标本再在另一批细胞上进行毒素中和试验: 每份标本或每份标本的不同稀释液各分别接种 2 管细胞, 每管 0.1ml, 留 1 管作毒素对照。在另一管中加入 0.1ml 索氏梭状芽孢杆菌抗毒素 (1:40) 或多价气性坏疽抗毒素 (1,000u/ml)。同时以只加抗毒素和不加其他溶液的细胞管作对照。37℃ 培养 24 小时。毒素中和的阳性结果为正常细胞, 不出现病变。

## 结 果

### (一) 分离细菌用培养基的选择

将稀释的盲肠内容物悬液分别接种各种培养基, 比较梭状芽孢杆菌的分离率。结果发现在 CBA 和 RCM 上分离不到梭状芽孢杆菌; 该菌在不加卡那霉素的布鲁氏菌血琼脂 (BBA) 上虽然可以分到, 但在这种培养基上其他厌氧菌也生长良好。在 BBA 加入卡那霉素后 (KBA) 选择性提高, 梭状芽孢杆菌分离率可达 50—100%, 而对照组动物粪便接种的培养基上从未分离到。选择性最强的培养基是含有环丝氨酸和甲氧噻吩头孢霉素的 CCA<sup>[6]</sup>, 该培养基是改良的 George 的 CCFA<sup>[8]</sup>。在 CCA 上

生长的菌落主要为梭状芽孢杆菌 (其中主要为难辨梭状芽孢杆菌), 其他厌氧菌多被抑制。由于我们获得配制所需的两种抗生素的时间较晚, 本文所报道的结果是由 KBA 培养得到的。

### (二) 标本热处理

粪便标本接种前经 80℃, 10 分钟加热处理与未加热处理者进行对比, 前者除使总菌数下降 2—3 个对数外, 并未能提高梭状芽孢杆菌的分离率, 在分离物的种类上也无本质差别。

### (三) 厌氧培养和空气中培养的比较

同一粪便悬液接种后分别置于厌氧罐和普通培养箱中培养。分离物从菌落到镜下形态的大不相同。将本实验中具有意义的细菌在分离成纯培养后, 进一步进行氧耐受性试验时, 在有氧环境下未见生长。

### (四) 分离物中厌氧菌的种类和数量

将粪便悬液直接涂片在显微镜下观察, 实验组多数标本细菌充满视野 (1,000×), 少者每视野可见 10—50 个菌, 对照组却很少。由于革兰氏阴性杆菌被 KBA 中的卡那霉素所抑制, 分离结果与直接镜检所见并不一致。从平板分离物中挑选不同形态的单个菌落接种在硫乙醇酸钠培养基增菌后进行了以下的生化反应: 吲哚生成, 明胶液化, 触酶, 脂酶, 卵磷脂酶, 脲酶, 七叶苷水解, 淀粉水解, 糖发酵试验和抗生素敏感性试验<sup>[7]</sup>。镜检时为梭状芽孢杆菌的各株分离物 (革兰氏阳性大杆菌, 芽孢位置为次极端或中央) 除抗生素敏感性试验外, 其它结果符合梭状芽孢杆菌的特点: 上述生化反应的前 8 项均为阴性反应; 葡萄糖、甘露糖和甘露醇发酵产酸, 乳糖、麦芽糖、蔗糖、阿拉伯糖、木糖、鼠李糖和果糖均无反应。但由于我们尚无标准菌株, 没有抗生素敏感性试验的标准纸片, 鉴定方法还不够完善, 仅根据形态特征和上述生化

表 1 在抗生素作用下地鼠盲肠内容物中厌氧菌的种类和数量  
Table 1 Changes in the types and numbers of anaerobic bacteria in the hamster fecal contents under the influence of various antibiotics

实 验 组 别  Experimental group	动物 数 (只) Number of animals tested	每克粪便中平均菌数 ( $\times 10^3$ ) Mean bacterial counts per gram wet faeces	梭状芽孢杆菌 clostridia			G <sup>+</sup> 无芽孢杆菌 G <sup>+</sup> nonsporing bacilli			G <sup>-</sup> 无芽孢杆菌 G <sup>-</sup> nonsporing bacilli			厌氧球菌 Anaerobic cocci		
			( $\times 10^3$ ) Counts/g	(%) of the total counts	动物阳性数(只) Number of animals positive	( $\times 10^3$ ) Counts/g	(%) of the total counts	动物阳性数(只) Number of animals positive	( $\times 10^3$ ) Counts/g	(%) of the total counts	动物阳性数(只) Number of animals positive	( $\times 10^3$ ) Counts/g	(%) of the total counts	动物阳性数(只) Number of animals positive
青霉素+庆大霉素 Penicillin + Gentamicin	5	212.6	178.0	83.7	5	6.6	3.1	3	—	—	—	28.0	13.1	2
红霉素 Erythromycin	6	80.5	70.5	87.5	6	3.8	4.7	2	1.3	1.6	2	4.8	6.0	2
利福霉素 Rifampicin	6	58.5	14.6	25.0	3	0.6	1.1	2	2.2	3.7	4	40.1	68.6	6
卡那霉素 Kanamycin	6	71.6	16.3	22.7	5	6.0	8.3	4	18.3	25.5	2	51.0	43.2	6
头孢霉素 Cephalosporin	6	217.3	175.8	80.9	6	9.0	4.1	5	23.3	10.7	1	9.1	4.2	4
蒸馏水 Distilled water	6	93.8	—	—	—	93.8	100.0	6	—	—	—	—	—	—

表 2 在地鼠肾细胞上粪便液中毒素的测定

Table 2 Detection of cytotoxin in the fecal suspensions on hamster kidney cells

组 别 Group	培养时间 (小时) Incubation time (hr)	粪便标本号 (以酵母水稀释 10 倍) No. fecal specimens (10-fold diluted with yeast extract water)									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
青霉素+庆大霉素 Penicillin+Gentamicin	24	/	/	+	+	+	+	+	+	+	+
	48			+	+	+	+	+	+	+	+
红霉素 Erythromycin	24	±	±	+	±	+	-	-	+	+	-
	48	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
对 照 Control	24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	±	-	-	±	-	-	-	-	-

注: +: 50%以上细胞出现病变; ±: 50%以下细胞(约 1/4)出现病变;

-: 细胞正常无病变;

正常细胞对照及酵母水对照: 细胞正常无病变。

+: CpE produced in more than 50% of cells;

±: Less than 50% (approx. 1/4) show CpE;

-: No CpE produced;

Controls of cell layers and yeast extract water show no CpE.

表 3 毒素的中和作用

Table 3 Neutralization of the cytotoxin

标本号 No. of specimen	抗 毒 素 Antitoxin	粪 便 液 稀 释 度 Dilutions of the fecal suspensions			
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
1	不加抗毒素(-)	+	-	-	-
	多价气性坏疽抗毒素 (PGA)	±	-	-	-
	索氏梭状芽孢杆菌抗毒素 (SAT)	-	-	-	-
2	不加抗毒素(-)	+	-	-	-
	多价气性坏疽抗毒素 (PGA)	-	-	-	-
	索氏梭状芽孢杆菌抗毒素 (SAT)	-	-	-	-
3	不加抗毒素(-)	+	+	±	-
	多价气性坏疽抗毒素 (PGA)	+	-	-	-
	索氏梭状芽孢杆菌抗毒素 (SAT)	-	-	-	-
4	不加抗毒素(-)	+	+	±	-
	多价气性坏疽抗毒素 (PGA)	+	-	-	-
	索氏梭状芽孢杆菌抗毒素 (SAT)	-	-	-	-

注: 同表 2 注。

same as in Table 2.

PGA: polyvalent gasgangrene antitoxin.

SAT: *C. sordellii* antitoxin.

反应特性未能鉴定到种。动物粪便分离物的种类和数量见表 1。在对照组动物的粪便中, 革兰氏阳性无芽孢杆菌是菌群的主要成份。在多数实验中虽然也可以分离到革兰氏阳性厌氧性球菌和革兰氏阴性杆

菌, 但大多数是革兰氏阳性无芽孢杆菌。

### (五) 地鼠盲肠内容物中细胞毒素的测定

实验初期阶段我们曾用羊、兔、豚鼠和地鼠红血球测定粪便悬液是否具有溶血作

用,结果均为阴性。以后又将病鼠盲肠内容物经腹腔内注射给小白鼠,动物也无反应。在另一次实验中,在切开地鼠腹壁的情况下直接将粪便悬液注入健康地鼠盲肠内,缝合后经一周解剖观察,未发现盲肠异常。最后我们采用国外实验室中最常用的组织培养细胞测定法<sup>[13,9]</sup>,证明了经青霉素和庆大霉素混合液攻击的地鼠盲肠内容物中含有致细胞病变的细胞毒素(表2)。

### (六) 毒素中和试验

由于我们得到索氏梭状芽孢杆菌的抗毒素和多价气性坏疽抗毒素较晚,而且前者的量又很少,所以只在部分标本中进行了中和试验。在青霉素和庆大霉素诱发的地鼠结肠炎中,测试的盲肠内容物中含有难辨梭状芽孢杆菌的毒素,其作用可被索氏梭状芽孢杆菌的抗毒素所中和。但是多价气性坏疽抗毒素(兰州生物制品所产)只能中和这次实验中的一个标本(表3),长春生物制品所产的多价抗毒素无中和作用(表中未列入)。

## 讨 论

难辨梭状芽孢杆菌的分离、培养和鉴定都比较困难。国外许多实验室,大部或全部实验操作均在无氧隔离罩(anaerobic chamber,也称 glove box)中进行,所用培养基也在无氧罩中预先还原,减少或阻止了细菌与氧气接触的机会,细菌分离率高。我们的操作均在空气中进行,虽然尽量加快操作速度,仍然影响着病原菌的分离。由于条件限制,我们只能做到在无氧下培养和培养基在厌氧罐内预先还原一段时间。此外,培养基和鉴定方法也直接影响实验结果。自从选择培养基 CCFA<sup>[8]</sup>问世以来,国外大部分实验室均已采用,难辨梭状芽孢杆菌的分离问题已基本解决。但该培养基中必不可少的抑制剂——环丝氨酸

和甲氧噻吩头孢霉素在国内尚难得到。因此,我们在开始阶段分离细菌工作很不顺利。在细菌鉴定方面,曾有研究者进行过简化<sup>[10]</sup>,但最简便可靠的方法是 Chang<sup>[6]</sup>的改良法。这一方法的依据是“还没有遇到过不产生细胞毒素的难辨梭状芽孢杆菌,也从未由其他梭状芽孢杆菌(肉毒杆菌除外)的培养物中测出过引起细胞病变的毒素。”(注:这一结论现在看来有些绝对了,因为近两年来已有一些临床和实验报道,证明 *Clostridium difficile* 中有非产毒株存在。不过,当今的实验和临床研究测定标本中的毒素仍然是一个重要的指标,并未因有少量非产毒株而失去其在鉴定上的价值。)因此,粪便培养物中如果出现可被索氏梭状芽孢杆菌抗毒素中和的细胞毒素,则可认为是难辨梭状芽孢杆菌的特性。我们在实验中部分采用了这个方法来确定在我们的地鼠模型中,盲肠内容物的分离物中有难辨梭状芽孢杆菌。只要所需抗毒素及选择培养基中所需的抑制剂能够获得,这一方法在我们的实验室是简单易行的。长春生物制品研究所和兰州生物制品研究所生产的多价气性坏疽抗毒素中可能不含有索氏梭状芽孢杆菌的抗毒素,所以不能中和盲肠内容物中出现的难辨梭状芽孢杆菌的毒素。

测定粪便和细菌培养物中的毒素,早期曾使用过地鼠盲肠内直接注入法<sup>[11]</sup>和小白鼠腹腔内注射法<sup>[12]</sup>,近年来上法多已不用。我们用过这两种方法均未取得结果,可能是动物粪便中的毒素含量较低所致。改用组织培养法以后,由于测毒的敏感性提高,鉴定毒素的方法得到解决。

## 参 考 文 献

- [1] Bartlett, J. G. et al.: *J. Inf. Dis.*, 136: 701, 1977.

- [2] George, R. H. et al.: *Brit. Med. J.*, 1: 695, 1978.
- [3] Chang, T. W. et al.: *Infect. Immun.*, 22: 418, 1979.
- [4] Fekety, R. et al.: *Rev. Inf. Dis.*, 1: 386, 1979.
- [5] 刘林祥等: 微生物学报, 25(1): 60—65, 1985.
- [6] Chang, T. T. and S. L. Gorbach: *J. Clin. Microbiol.*, 15: 465, 1982.
- [7] Sutter, V. L. et al.: *Wadsworth Anaerobic Bacteriology Manual*, 2nd ed., 1975. Publ. by Wadsworth Hospital Center, Los Angeles, CA U. S. A.
- [8] George, W. L. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 9: 214, 1979.
- [9] Chang, T. W. et al.: *J. Inf. Dis.*, 140: 765, 1979.
- [10] Borriello, S. P. and P. Honour: *J. Clin. Path.*, 34: 1124, 1981.
- [11] Bartlett, J. G. et al.: *New Engl. J. Med.*, 298: 531, 1978.
- [12] Hafiz, S. L. and C. L. Oakley: *J. Med. Microbiol.*, 9: 129, 1976.

## THE ISOLATION OF *CLOSTRIDIUM DIFFICILE* AND THE DETECTION OF ITS CYTOTOXIN FROM THE HAMSTER COLITIS MODEL

Liu Linxiang Li Zhijun Niu Huizhen

Song Hongyue Zhang Xiangyong

(Institute of Chinese Materia Medica, Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing)

In the study of establishing a colitis model, we have analyzed the major types of the anaerobic faecal flora of the hamsters with colitis. Presumptive identification has been accomplished on the isolates.

Inoculation of the fecal contents on Kanamycin-Brucella blood agar and Cycloserine-cefoxitin selective blood agar resulted in the isolation of clostridia with an isolating rate of 50—100%. We never isolated them from the control animals. By

using tissue culture cells, we detected from most of the filtrates of fecal suspensions the cytopathic cytotoxin that can be neutralized by the *Clostridium sordellii* antitoxin. This showed that these isolates are *Clostridium difficile*, the pathogen of pseudomembranous colitis.

### Key word

*Clostridium difficile*