

小肠结肠炎耶尔森菌菌种保存 22 年的跟踪调查

覃玉英¹, 曾江凤² (1. 广西壮族自治区柳州市柳江县疾病预防控制中心检验科 545100;
2. 广西壮族自治区柳州市疾病预防控制中心检验科 545000)

【摘要】 目的 为了探索一种简便、实用并能长期保存小肠结肠炎耶尔森菌菌种的方法。**方法** 1988 年将小肠结肠炎耶尔森菌菌种(血清 O:3 型和血清 O:9 型)接种于鸡蛋斜面培养基及半固体培养基复苏后加灭菌液体石蜡,置 4℃ 普通冰箱保存,且每年进行复苏鉴定。**结果** O:3 型菌种可保存 21 年,O:9 型可保存 22 年以上,O:9 型到发稿为止,依然存活。**结论** 鸡蛋斜面保存法和半固体穿刺法-4℃ 保存小肠结肠炎耶尔森菌菌种效果良好,可长时间保存,且不需要反复传代。

【关键词】 小肠结肠炎耶尔森氏菌; 菌种保存; 半固体液体石蜡; 鸡蛋斜面

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2010.18.018

中图分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2010)18-1956-02

Investigation of the long-term preservation method of Yersinia enterocolitica QIN Yu-ying¹, ZENG Jiang-feng². 1. Department of Clinical Laboratory, Disease Prevention and Control Center of Liuzhou county, Liuzhou, Guangxi 545100, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Disease Prevention and Control Center of Liuzhou, Guangxi 545000, China

【Abstract】 Objective To explore a simple, practical and long-term preservation method of Yersinia enterocolitica. **Methods** Yersinia enterocolitica strains (Serotype O:3 and Serotype O:9) were inoculated into egg slant medium and semi-solid medium for resuscitation, then the strains were preserved by sterile liquid paraffin in the refrigerator at 4℃ in 1988 and the strains were selected and tested every year. **Results** The Yersinia enterocolitica Serotype of O:3 can be stored for 21 years. Serotype of O:9 can be stored more than 22 years, and it still survives at the time when the article is published. **Conclusion** The egg slant medium preservation and semi-solid liquid paraffin in the refrigerator at -4℃ are attended with good results for Yersinia enterocolitica. The strains of Yersinia enterocolitica can be preserved by these two methods for a long time, and need't repeated passage.

【Key words】 yersinia enterocolitica; strains preservation; semi-solid liquid paraffin; egg slant medium

小肠结肠炎耶尔森菌是自 20 世纪 80 年代以来引起国际广泛注意的一种人畜共患病原菌,该菌是耶尔森菌属致病菌之一,广泛分布于自然界,是能在冷藏温度下生长的少数几种肠道致病菌之一。在一些寒冷的国家和地区或在寒冷的季节较为常见,因此有人称其为“冰箱病”,它除引起胃肠道症状外,还能引起呼吸系统、心血管系统、骨骼结缔组织等疾病,甚至可引起败血症,造成死亡。该菌还是重要的食源性致病菌,很多国家(包括中国)都已将该菌列为进出口食品的常规检测项目。在许多国家已经证实由小肠结肠炎耶尔森菌引起的感染在人群中是比较常见的,属于全球性疾病,近年来逐渐受到全球重视^[1];我国在 20 世纪 80 年代曾有因 O:3 型和 O:9 型耶尔森菌感染引起人群和乳猪等爆发流行。近年来时有该菌引起的食物中毒,且发现有 40 多种动物感染该菌,包括家禽、家畜、齿动物、爬行动物、水生动物等,尤其是猪、牛、鼠类与人群感染有重要关系^[2]。国内文献报道 10% 腹泻患者粪便中含有小肠结肠炎耶尔森菌,比 20 世纪八九十年代(1%~2%)大为提高^[3],在冻肉食品、冰箱内熟食品和市售生肉等都有被污染的可能,但在日常检测样品中检出率比较低。日常工作加标、带教或培训需要标准菌株,所以探讨摸索一种简单易行的菌种保存方法是非常必要的。

一般常用的菌种保存方法很多:如常规保存法(半固体液体石蜡保存法、斜面保存法、砂土管保存法),低温冷冻保存法(滤纸片低温冷冻保存法、湿牛奶冷冻法、利用细菌鉴定卡保存

菌种、商品化菌种保存管),冷冻真空干燥保存法等^[4]。一般菌种最好的保存方法为冷冻干燥-20℃ 保存,但是冷冻干燥设备要求比较高,方法复杂,一般微生物学实验室难以达到此要求^[5]。因此,选择一种简单易行、对设备要求不高的菌种保存方法成了每个微生物检验工作者的共同愿望。本科室于 1988 年开始对小肠结肠炎耶尔森菌菌种的保存方法进行探索,采用比较简单常用易行的半固体液体石蜡和鸡蛋斜面保存法,不需要反复传代,每年均进行一次复苏鉴定,一直跟踪观察到发稿为止,作者对这一跟踪观察研究过程进行分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种来源 1986 年 5 月广西壮族自治区卫生防疫站举办小肠结肠炎耶尔森菌培训班发放给各单位学员的菌株,为小肠结肠炎耶尔森菌血清 O:3(以下简称 O:3)和血清 O:9 型(下简称 O:9),保存于半固体中。

1.1.2 培养基和试剂 鸡蛋斜面、半固体、血平板、麦康凯平板、SS 平板、克氏双糖铁、各种生化培养基或生化管、灭菌液体石蜡、诊断血清,每种培养基均按常规方法配制或购买成品,且在有效期内使用。

1.1.3 仪器设备 普通冰箱、恒温培养箱、生化培养箱、生物显微镜、VITEK2COMPACT 全自动细菌鉴定仪及 VITEK 2 GN 鉴定卡试剂条由法国梅里埃公司提供。

1.2 方法

1.2.1 保存 将菌种保存于一4℃普通冰箱,1988年11月16日转种1986年5月学习培训带回来的O:3和O:9菌种,即将O:3和O:9分别接种到3支鸡蛋斜面培养基和3支半固体培养基,并对其进行编号。O:3接种到鸡蛋斜面培养基为1、2、6号,接种到半固体上为7、8、9号;O:9接种到鸡蛋斜面培养基为3、4、5号,接种到半固体为10、11、12号。将以上菌种保存管置于(24±1)℃恒温培养箱中培养24 h后,半固体菌种保存管均以无菌操作加入灭菌的液体石蜡,高度约1 cm,封存,鸡蛋斜面菌种保存管不加液体石蜡;置于一4℃普通冰箱保存。

1.2.2 培养鉴定 每年均进行一次复苏培养鉴定,但不进行传代。其步骤:从冰箱取出所有菌种保存管,取菌苔直接划线到两套血平板、麦康凯平板和SS平板,分别置于(24±1)℃恒温培养箱和(36±1)℃培养箱中培养24~48 h,从血平板上挑取典型菌落用全自动细菌鉴定仪进行系统分析鉴定;从麦康凯和SS平板上挑取典型菌落进行革兰染色并接种克氏双糖铁、半固体培养基置于上述两种不同温度的培养箱培养,进一步做生化试验、玻片凝集试验,根据菌落形态、生化反应特征及“O”因子凝集试验结果与初次结果相符,判断该保存管菌种存活;对无菌生长的保存管再次取菌苔接种血平板、麦康凯和SS平板,连续两次取菌苔培养,均无菌生长判断该保存管菌种死亡。

1.3 统计学方法 数据采用SPSS13.0软件进行统计分析。

2 结 果

2.1 菌种复活情况 细菌保存后的22年内每年对菌种进行复苏,结果显示O:3在鸡蛋斜面培养基1、2号管存活20年、6号管存活21年,在半固体培养基7、8、9号管存活7年;O:9型在鸡蛋斜面管培养基上4号存活至今,3号、5号管分别存活20、21年,在半固体培养基11、12号管存活7年,10号管存活至今。

2.2 每年从上述12支菌种保存管中挑取培养物进行复苏鉴定,转种在血平板、麦康凯和SS平板上生长良好,形态染色、菌落、生化特性及血清学鉴定,初始结果一致。在血平板上形成直径为1~2 mm、圆形光滑、凸起的菌落。在麦康凯和SS平板上菌落为半透明、光滑、湿润、偏平、1~3 mm,革兰阴性杆菌,在克氏双糖铁上K/A、H₂S(—)、不产气。动力(25℃培养48 h阳性、37℃培养后阴性)、尿素酶试验(+)、ONPG(+)、鸟氨酸脱羧酶试验(+)、赖氨酸脱羧酶试验(—)、蔗糖试验(+)、山梨醇试验(+)、鼠李糖试验(—)、枸橼酸盐试验(—)、L(—)阿拉伯糖试验(—)、“O”因子血清试验(+)。2008年12月、2010年2月对存活的菌株(4号与8号管)进行复苏培养鉴定,采用全自动细菌鉴定仪进行系统分析鉴定,符合率达99%,生化反应报告详见表1、2。

表 1 (4 号管)的纯培养物 VITEK 2GP 鉴定结果

缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果
APPA	—/—	ADO	—/—	PyrAP	+/+	lARL	—/—	dCEL	—/—	BGAL	—/—	ProA	+/+
H ₂ S	—/—	BNAG	—/+	AGLTP	—/—	dGLU	+/+	GGT	—/—	OFF	+/+	LIP	—/—
BGLU	—/—	dMAL	—/—	dMAN	+/+	dMNE	+/+	BXYL	—/—	BALap	—/—	PLE	—/—
TyrA	+/+	URE	+/+	dSOR	+/+	SAC	+/+	dTAG	—/—	dTRE	+/+	CIT	—/—
MNT	—/—	5KG	—/—	lLATK	—/—	AGLU	—/—	SUCT	—/—	NAGA	—/—	AGAL	—/—
PHOS	—/—	GlyA	—/—	ODC	+/+	LDC	—/—	lHISa	—/—	CMT	—/—	BGUR	—/—
O129R	+/+	GGAA	—/—	lMLTa	—/—	ELLM	—/—	lLATa	—/—				

表 2 (8 号管)的纯培养物 VITEK 2GP 鉴定结果

缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果	缩写	结果
APPA	—/—	ADO	—/—	PyrAP	+/+	lARL	—/—	dCEL	—/—	BGAL	—/—	ProA	+/+
H ₂ S	—/—	BNAG	+/+	AGLTP	—/—	dGLU	+/+	GGT	—/—	OFF	+/+	LIP	—/—
BGLU	—/—	dMAL	—/—	dMAN	+/+	dMNE	+/+	BXYL	—/—	BALap	—/—	PLE	—/—
TyrA	+/—	URE	+/+	dSOR	+/+	SAC	+/+	dTAG	—/—	dTRE	+/+	CIT	—/—
MNT	—/—	5KG	—/—	lLATK	—/—	AGLU	—/—	SUCT	—/—	NAGA	—/—	AGAL	—/—
PHOS	—/—	GlyA	—/—	ODC	+/+	LDC	—/—	lHISa	—/—	CMT	—/—	BGUR	—/—
O129R	+/+	GGAA	—/—	lMLTa	—/—	ELLM	—/—	lLATa	—/—				

注:斜杠上和斜杠下分别为2008年12月和2010年2月份进行鉴定的生化结果(2008/2010),—表示阴性,十表示阳性。缩写:是VITEK 2GP鉴定卡成分名称英文缩略语。

3 讨 论

3.1 保存菌种的目的就是使细菌保持在活体的状态,其生长繁殖受抑制,并且保证不受污染、不发生变异或突变,尽可能维持在原来的分离状态。细菌菌种的保存对于病原学的调查、系统地分析流行菌株的生物学、分子学特征和耐药性的变迁,以及对新药临床研究是非常重要的。疾控系统基层细菌实验室,保存好菌种对实验室质量控制、病原菌的调查、实验室技术人员的培训,提高检验人员的技术水平等均有重要的意义。一般的细菌,在液体培养基低温保存菌种可1年至数年;半固体保

存3~6个月;冷冻真空干燥一般3~5年,可长达10年以上,鸡蛋斜面培养保存法,可保存3~6个月^[6]。

3.2 本次跟踪观察研究小肠结肠炎耶尔森菌菌种保存方法是基层试验室都有条件实施的最简易最普通的菌种保存方式即半固体液体石蜡保存法和鸡蛋斜面保存法,不需要反复传代,保存的时间可长达7~23年之久,在鸡蛋斜面培养基上存活时间比在半固体上相对长些,半固体液体石蜡保存法与鸡蛋斜面保存法保存小肠结肠炎耶尔森菌,适用于基层实验室和医院,在有冰箱的条件下就可使用此法长时间保存该(下转第1960页)