

血液中分离出大肠弯曲菌 1 例

李世花, 刘行超[△], 曾桂芬, 肖慧玲, 莫 姍, 彭 芬(中国人民解放军第一八一医院检验科 541002)

【关键词】 大肠弯曲菌; 药敏试验; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.069 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2015)15-2295-02

弯曲菌广泛分布于各种温血动物体内,其中以家禽、家畜、野禽的带菌量多,人主要通过食用被其污染的食物及其制品和水源患病^[1]。弯曲菌病是一种引起以急性腹泻为主要症状的感染性疾病,也可引起肠道外感染,表现为全身中毒症状,如高热、皮肤黏膜淤斑等,出现败血症^[2-3]。弯曲菌病在出现发热之前,甚至在未进行抗生素治疗的情况下,病情常可能出现缓解^[4]。近年来,弯曲菌感染率在世界各地普遍呈上升趋势,对公共卫生安全构成严重威胁,其中引起人类致病最多的是空肠弯曲菌和大肠弯曲菌,由大肠弯曲菌引起的人类血液感染的报道甚少,桂林地区未见报道。本科室于 2014 年 9 月从 1 例肝硬化失代偿期发热的乙肝患者血液中分离培养出 1 株大肠弯曲菌,进行形态学和生化鉴定,并进行相关药敏分析,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 患者,男性,42 岁,农民。入院前无诱因解黄色稀水样便,每日 3 次,无黏液、脓血及里急后重感。入院诊断:慢性乙肝,肝硬化失代偿期,发热原因待查。入院查体:体温 39.8 °C,慢性肝病面容,下腹部压痛,腹部、双下肢可见散在米粒大小出血点,压之不褪色,肝脾肋下触及不满意,移动性浊音阳性,肠鸣音稍活跃,双下肢中度凹陷性浮肿。红细胞计数 $2.63 \times 10^{12}/L$,白细胞计数 $8.02 \times 10^9/L$,淋巴细胞计数 $0.12 \times 10^9/L$,中性粒细胞计数 $0.85 \times 10^9/L$,总蛋白 56.5 g/L,清蛋白 20.0 g/L,C 反应蛋白 35.56 mg/L。CT 示肝硬化、脾大、腹水大量。腹水李凡他试验阳性,一般细菌培养无细菌生长。无菌采集静脉血行细菌培养。

1.2 仪器与试剂 法国梅里埃 BacT/ALERT 3D 全自动血培养仪及配套成人需氧血培养瓶(批号 1038156);法国梅里埃 VITEK2 Compact 及配套 NH 试卡(20140924A);BA、MAC、CA、MH 平皿购自郑州安图生物;药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。

1.3 方法 无菌采集静脉血进行培养,46 h 阳性报警,取阳性培养物行革兰染色,同时转种后于 25、37、42 °C CO₂ 罐中培养 24~72 h。取菌落进行革兰染色、生化鉴定及琼脂扩散法药敏,各纸片间中心距离、距平皿外缘距离均按美国临床和实验室标准协会第四版规定。

2 结果

2.1 分离培养 弯曲菌为微需氧菌,生长条件较苛刻,最佳气体环境为含 5% O₂、10% CO₂ 及 85% N₂。25 °C 环境下无菌生长,42 °C 环境下血平板上可见灰白、光滑、湿润、扁平边缘不整齐的沿接种线蔓延生长的菌落,37 °C 环境下菌落生长较 42 °C 生长慢。镜下见革兰阴性杆菌,菌体细长弯曲,呈多形性:逗点形、弧形、S 形、海鸥展翅形等。取陈旧培养物行革兰染色可见部分菌体呈现球形及长丝形。

2.2 生化试验 该菌氧化酶、触酶、硝酸盐还原试验阳性,硫化氢试验、尿素酶试验阴性,水解醋酸吡啶酚,不水解马尿酸,不发酵糖类。

2.3 鉴定及药敏 鉴定结果为大肠弯曲菌,编码为 0600002120,鉴定率为 99%。药敏结果:对庆大霉素、红霉素、四环素、克林霉素、头孢他啶、头孢噻肟、头孢哌酮、环丙沙星、左氧氟沙星耐药,仅对氨基青霉素、复方磺胺甲噁唑、氯霉素敏感。

3 讨论

弯曲菌病为动物源性疾病,感染的动物通常无明显症状,但可长期向外界排菌,从而引起人类感染^[5]。发展中国家由于卫生条件有限,水源性传播最常见,河水、溪水、山泉、井水中均可分离出弯曲菌。阳成波等^[6]曾报道南京市场销售的鸡肉、牛奶、牛奶制品及井水存在不同程度空肠弯曲菌感染,如果加工不当或饮食习惯不卫生,会对消费者的健康构成潜在威胁。

据美国国家食品网的监测,弯曲菌是发病率最高的病原菌,是全球范围内胃肠炎的主要病因,世界卫生组织已将弯曲菌肠炎列为最常见的肠道传染病之一。林玫等^[7]已研究证实广西腹泻患者中弯曲菌已成为重要的病原菌之一。本病例患者曾无诱因解黄色稀水样便,每日 3 次,机体免疫功能严重受损,体质较差(清蛋白低下),常有发热现象,未进行抗感染治疗体温也可正常。说明本病例患者感染大肠弯曲菌与免疫功能低下密切相关,与肝病无直接因果关系。

近年来,弯曲菌对抗生素的耐药性明显增加。其中耐氟喹诺酮类弯曲菌增加尤为明显,弯曲菌对氨基西林普遍耐受。20 世纪 70 年代初,国内外均报道红霉素、庆大霉素对弯曲菌有很强的抑菌活性,并一致公认红霉素为治疗弯曲菌肠炎首选药物。20 世纪 80 年代,仅阿根廷报道了一株耐红霉素弯曲菌^[8]。随着抗生素的使用,不同国家不同地区弯曲菌对红霉素出现了不同程度耐药,而现在,南美、亚洲、非洲等许多国家均发现耐红霉素菌株,且数量增长迅速。许海燕等^[9]曾报道空肠弯曲菌对氨基糖苷类、大环内酯类、青霉素类抗生素较为敏感,而对头孢菌素类、喹诺酮类、磺胺类和四环素类抗生素产生了较强的耐药性。侯凤琴等^[10]经研究报道弯曲菌对头孢类、复方磺胺甲噁唑、四环素、喹诺酮类的耐药率较高,对红霉素、氯霉素、克林霉素耐药率低于 10%。本病例中分离培养的大肠弯曲菌药敏试验与以上两则报道有所差异,说明弯曲菌的药物敏感性不断变化,且存在地域间差异,这提示临床应用抗生素防治弯曲菌病时,必须结合药敏试验结果选择高敏药物或联合用药才能起到预期的效果。

随着家庭饲养宠物的增加,人与动物的亲近及人类食用多种生肉制品,都大大增加了人感染弯曲菌的风险。弯曲菌广泛存在于自然界,大肠弯曲菌和空肠弯曲菌引起的感染多为散发,偶有爆发的报道^[11]。弯曲菌病起病隐匿、症状不典型,往

[△] 通讯作者, E-mail: lxch555@163.com.

往由于检验水平有限,诊断不明确导致误诊或延误治疗。探索弯曲菌的快速检测方法以及对不同来源的菌株进行亲缘性分析,识别爆发流行,为疾病的诊断、控制以及弯曲菌病分子流行病学研究具有十分重要的意义。各国(特别是发展中国家)建立和完善对弯曲菌的监测系统,加强各国之间的技术交流与合作也迫在眉睫。

参考文献

- [1] 朱冬梅,刘书亮,彭珍,等.肉鸡源弯曲菌的分离、多重PCR鉴定及其耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2014,30(4):390-396.
- [2] 侯水平,陈守义.胎儿弯曲菌的感染现状、检测方法和分子分型的研究进展[J].中国人兽共患病学报,2014,30(1):85-88.
- [3] 倪语星,尚红.临床微生物学检验[M].5版.北京:人民卫生出版社,2013:178-180.
- [4] 吴蜀豫,张立实,冉陆.弯曲菌及弯曲菌病的流行现状[J].中国食品卫生杂志,2004,16(1):58-61.
- [5] 黄金林,许海燕,张弓,等.江苏奶牛空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行状况及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,

2007,23(10):1016-1020.

- [6] 阳成波,蒋原,黄克和,等.PCR法和培养法调查食品和水中空肠弯曲菌的比较研究[J].中国人兽共患病杂志,2003,19(1):91-94.
- [7] 林玫,周凌云,王鸣柳,等.广西空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行病学调查[J].中国人兽共患病学报,2012,28(11):1143-1147.
- [8] 吴忠亮.空肠弯曲杆菌感染分布研究[D].上海:上海交通大学,2007.
- [9] 许海燕,黄金林,包广宇,等.扬州市区腹泻人群空肠弯曲菌和结肠弯曲菌流行状况及耐药性分析[J].中国人兽共患病学报,2008,24(1):58-62.
- [10] 侯凤琴,沈宝铨,孙新婷.200株弯曲菌对抗生素敏感性研究[J].中华医学感染杂志,2001,11(6):406-408.
- [11] 龚俊,刘树林.空肠弯曲菌与大肠弯曲菌基因分型研究进展[J].中华微生物学和免疫学杂志,2004,24(5):414-418.

(收稿日期:2015-03-15 修回日期:2015-05-20)

人外周血淋巴细胞染色体标本的制备研究

徐本锦,刘玲(山西医科大学汾阳学院,山西汾阳 032200)

【关键词】 外周血淋巴细胞; 染色体; 分裂相; 秋水仙素

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.15.070 文献标志码:B 文章编号:1672-9455(2015)15-2296-03

1960年,Moorhead等建立了一套比较完整的外周血体外培养和染色体制备方法,该技术能够清晰的显示染色体数目和结构上的变化,对于常见遗传性疾病的快速诊断,提高人口素质具有十分重要的作用,对我国优生优育工作意义重大^[1]。但该技术对细胞的培养时间较长,使得实验易受温度、pH、溶血和凝血等因素影响而导致失败^[2]。为了临床上能高效、快速、准确地诊断遗传性疾病,有学者已经报道了该技术的一些心得体会^[3-5]。本研究立足于获得高质量的人外周血染色体标本和提高实验教学的可操作性,对该技术的4个影响因素进行了优化,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选取8名健康男性和8名健康女性进行外周血采集,使用肝素抗凝。

1.2 仪器与试剂 培养箱,光学显微镜,香柏油,乙醇灯,离心机,恒温培养箱,人外周血淋巴细胞培养液(湖南湘雅基因技术有限公司),秋水仙素(20 μg/mL),低渗液(0.075 mol/L氯化钾溶液),固定液(甲醇:冰醋酸=3:1),Giemsa染液,500 U/mL肝素。

1.3 方法

1.3.1 实验方法 采血:采用10 mL一次性注射器吸取少量肝素润湿针管,将多余肝素排出。接种:在无菌条件下,用注射器针头刺透培养瓶橡皮塞,向培养瓶内注入成年男子全血26滴,或成年女子全血28滴,轻轻摇匀。培养:将培养瓶放入37℃恒温培养箱内培养72 h^[6]。细胞同步化:外周血淋巴细胞培养68~70 h后,用5 mL注射器针头加入5滴20 μg/mL秋水仙素,然后接着培养3~4 h^[6]。细胞收集:从培养箱拿出

培养瓶,摇匀之后直接倒入10 mL刻度离心管,以2 000 r/min离心10 min。低渗:弃上清,用注射器加入8 mL 37℃水浴的低渗液,混匀后37℃恒温水浴30 min^[6]。预固定:低渗结束后,立即加入1 mL固定液,混匀之后以2 000 r/min离心10 min。固定:弃上清,加入8 mL固定液,混匀后室温固定30 min,然后以2 000 r/min离心10 min,弃上清。再固定:加入8 mL固定液,用吸管吹打,充分混匀后室温静置30 min或过夜。滴片:再次以2 000 r/min离心10 min,弃上清,然后每个离心管里加入5~6滴新鲜配制的固定液,吹打混匀制成细胞悬液。将细胞悬液3滴,滴到冰冻的载玻片上,滴片高度30 cm,随即吹开,酒精灯上烘干,贴标签。染色:用1:10 Giemsa染液37℃条件下染色10 min,自来水冲洗,晾干后镜检^[6]。

1.3.2 实验原理 培养:人外周血淋巴细胞在体外培养72 h,大部分淋巴细胞处于增殖周期内。同步化:培养期间,利用秋水仙素对细胞进行同步化处理,使大部分细胞都停滞在有丝分裂的中期。低渗:淋巴细胞经低渗液处理,会吸水而胀破,释放出染色体。固定:利用低渗液对染色体进行固定,有助于维持其完整的形态。染色:利用Giemsa染液对染色体进行着色,便于显微镜下观察。

1.3.3 关键因素优化 通过文献资料和笔者长期的实验经验,本研究选取了4个影响实验结果的关键因素进行条件优化,分别对秋水仙素加入时间、低渗时间、固定时间和染色时间设定梯度,其他条件保持不变,通过多次尝试和反复摸索,找到最佳时间组合,确定最优实验条件。具体时间梯度如表1所示。

2 结果

通过对秋水仙素加入时间、低渗时间、固定时间和染色时