

河弧菌在腹泻患者粪便和饮水中同时分离 及其病原性意义的探讨

权太淑 李 薇

(徐州市卫生防疫站)

河弧菌 (*Vibrio fluvialis*) 是由 Furniss 于 1977 年首先分离的, 1978 年 Lee 及 Furniss 等正式命名为 *Vibrio fluvialis*^[1]。美国疾病控制中心将这类菌叫做 Group EF₆ 弧菌。英国 Midstone 公共卫生实验室称为 F 群弧菌, 并认为它可能是一个新属^[2]。日本从 1982 年起, 已将河弧菌列为新规定的食物中毒病原菌之一^[3]。近年来在东南亚、西亚和非洲一些国家, 从腹泻病人或疑似霍乱病人粪便中都分离到河弧菌。并有一些报道^[4]。但国内尚未见到分离本菌的报道。我站于 1982—1983 年从肠道门诊病人的粪便中, 及一起腹泻爆发流行病人的粪便及污染的饮水中分离出 35 株弧菌, 经过系统鉴定, 证明符合河弧菌。现报告如下。

材料与方 法

(一) 菌株来源

在一起腹泻爆发中从病人粪便和污染的饮水中分别分离出 11 株及 2 株。自肠道门诊腹泻病人粪便中分离出 22 株, 共为 35 株。

(二) 标本采集和增菌培养

1. 标本采集: 腹泻病人的粪便标本系以无菌棉拭子采集, 插入 Cary-Blair 运送培养基中。水样标本是用无菌的输液瓶, 采集煤矿工人村自蓄水池输入管道后的饮用水, 每一采水点采水 450 ml。

本文承刘秉阳教授、金锦仁教授审阅, 特致谢意。

实验结果

2. 增菌培养: 将粪便标本接种于副溶血性弧菌增菌液管内, 水样增菌是取浓缩 10 倍的副溶血性弧菌增菌液 50ml, 加入盛有 450ml 水样的瓶内, 混匀置 37℃ 有氧环境中培养。粪便标本增菌培养 16—18 小时, 水样增菌培养 24 小时。

(三) 分离培养

挑取增菌管(或瓶)表面的培养物, 划线分离于副溶血性弧菌选择性琼脂平板上, 37℃ 培养 18—24 小时。

(四) 生化鉴定

自副溶血性弧菌选择性琼脂平板上, 挑取可疑菌落, 接种于含 3% 氯化钠的含铁双糖琼脂斜面中, 置 37℃ 培养 18—24 小时。凡在双糖铁琼脂斜面中, 分解葡萄糖产酸不产气或产气不定(水样菌株和少数粪便标本菌株产气)、不分解乳糖、不产硫化氢者, 首先被挑取其琼脂斜面培养物穿刺接种在 Hugh-Leifson 二氏培养基内, 测其葡萄糖代谢类型, 做氧化酶试验, 涂片染色镜检, 暗视野观察动力, 凡符合弧菌属的特性者, 再进一步做系统生化反应: 如尿素酶, 吡哌, MR, V-P, 糖类分解, 氨基酸脱羧酶, 不同氯化钠浓度生长, 硝酸盐还原, 明胶液化, 苯丙氨酸脱氨酶, 西蒙氏枸橼酸盐利用, β -半乳糖苷酶, 43℃ 生长, TCBS 琼脂生长, S.S 琼脂生长等试验(因无 0/129 弧菌抑制剂, 故未做此试验)。

(五) 生化试验用培养基

因河弧菌具有嗜盐性, 故一切生化试验用的培养基, 除按常规法配制外, 均含有 3% 的氯化钠。其中耐盐性试验及 43℃ 生长试验, 是用接种针挑取斜面培养物少许, 接种于无盐和含不同浓度的氯化钠的多价蛋白胨(日本 Polypeptone) 水中, 培养 24 小时观察结果。

(六) 肠毒素测定及对组织的侵袭性试验

按照世界卫生组织肠道感染协作中心方法^[2]进行, 乳鼠灌胃法用以测定菌株的 ST 毒素。LT 测定为兔肠攀结扎法在手术后 18 小时观测结果。对组织的侵袭性试验为 Sercny 试验, 观察 72 小时记录结果。

(一) 形态特征

河弧菌为革兰氏染色阴性, 无芽胞、呈弧状或短杆状, 以弧状居多, 且菌体弯曲自然、两端钝圆, 具有活泼的动力, 暗视野下观察动力穿梭, 电镜观察呈端生单鞭毛(见图 1)

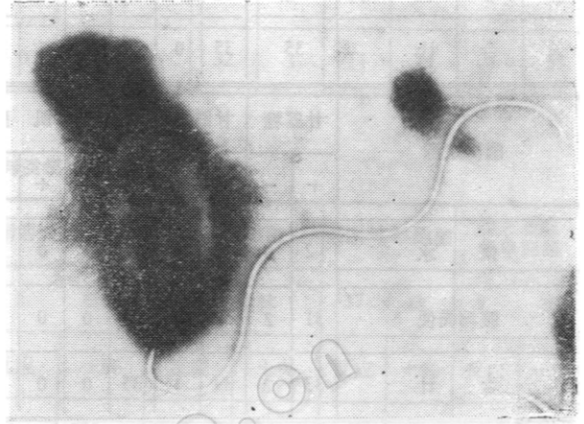


图 1 河弧菌的形态特征 (20,000×)

(二) 培养特性

河弧菌在含有一定浓度氯化钠的普通蛋白胨水中即可生长, 但在无盐胨水中不生长, 即使有少数菌株能生长也发育不佳, 具有明显的嗜盐特性。在 pH 8.0—8.4 环境中适合发育, 在有氧环境中生长良好。在副溶血性弧菌增菌液中, 培养 16—18 小时, 呈均匀混浊, 表面形成菌膜, 37℃ 生长迅速, 43℃ 时, 则大部分菌株不生长。

在副溶血性弧菌选择性琼脂平板上培养 18—24 小时, 菌落直径 1.5—2.0 mm, 圆形整齐, 隆起, 混浊而肥厚, 不扩散, 一般无粘性, 由于分解蔗糖产酸, 菌落呈黄色。在羊血琼脂平板上, 培养 18—24 小时, 菌落湿润, 隆起, 圆形, 整齐, 混浊, 呈淡灰绿色, 直径 2—3 mm, 菌落周围可见透明的 β 溶血圈。在 TCBS 琼脂平板上也能生长, 但在一般肠杆菌科选择平板如 S.S 琼脂、MacConkey 琼脂平板上, 则很少有能生长者。

(三) 生化试验结果(见表 1)

河弧菌的葡萄糖代谢类型为发酵型, 氧化酶试验阳性, 符合于弧菌属的特性, 该菌能迅速

表 1 35 株 F 群弧菌生化试验结果

菌株来源	株数	氧化酶		葡萄糖		葡萄糖产气		乳糖		硫化氢		尿素酶		动力		吲哚		蔗糖		
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
饮用水	2	2	0	2	0	2	0	0	2	0	2	0	2	0	0	2	2	0	2	0
腹泻粪便	33	33	0	33	0	3	30	0	33	0	33	0	33	0	4	29	33	0	33	0
合计	35	35	0	35	0	5	30	0	35	0	35	0	35	0	4	31	35	0	35	0

菌株来源	甘露糖		甘露醇		阿拉伯胶糖		肌醇		水杨素		鼠李糖		棉子糖		β-半乳糖苷酶		赖氨酸脱羧酶		精氨酸双水解酶		
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	
饮用水	2	0	2	0	2	0	0	2	0	2	0	2	0	2	0	0	2	2	0	2	0
腹泻粪便	31	2	32	1	33	0	0	33	0	33	4	29	0	33	33	0	0	33	33	0	33
合计	33	2	34	1	35	0	0	35	0	35	4	31	0	35	35	0	0	35	35	0	35

菌株来源	鸟氨酸脱羧酶		苯丙氨酸脱氨酶		明胶液化		硝酸盐还原		西蒙氏枸橼酸盐		MR		V-P		43℃生长		TCBS生长		SS琼脂生长	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
饮用水	0	2	0	2	2	0	2	0	2	0	2	0	0	2	0	2	2	0	0	2
腹泻粪便	0	33	0	33	31	2	33	0	31	2	33	0	0	33	6	27	33	0	0	33
合计	0	35	0	35	33	2	35	0	33	2	35	0	0	35	6	29	35	0	0	35

分解葡萄糖(水样菌株及粪便标本的极少数菌株分解葡萄糖产酸产气)能分解蔗糖、甘露糖、甘露醇、阿拉伯胶糖。不分解乳糖、肌醇、水杨素、棉子糖。β-半乳糖苷酶阳性。该菌精氨酸双水解酶为阳性,而赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶为阴性,苯丙氨酸脱氨酶亦为阴性。绝大多数菌株吲哚反应阴性,V-P 试验阴性,MR 阳性,能液化明胶,还原硝酸盐为亚硝酸盐,几乎所有的菌株能利用西蒙氏枸橼酸盐。

该菌还具有明显的嗜盐性(见表 2)在无盐胨水中不生长(仅有两株能生长)在含 3%、4%、6% 的氯化钠胨水中发育丰盛,在含 7% 氯化钠胨水中绝大部分菌株还能生长,在含 8% 的氯化钠胨水中仅有 1/3 左右的菌株能生长,但在

含 10% 的氯化钠胨水中均不能生长。

为与其它相类似菌的鉴别比较,我们将自腹泻病人粪便分离的非 01 群霍乱弧菌、副溶血性弧菌、溶藻性弧菌、亲水气单胞菌,类志贺毗邻单胞菌也做了与河弧菌相同的生化试验项目,其结果见表 3。

(四) 毒力测定结果

ST 肠毒素于乳鼠灌胃后 3 小时剖腹并计算每组鼠的比率平均值,以比值 > 0.083 为阳性,在被试的 20 株菌中,仅有 3 株菌的 ST 比率平均值 > 0.083,LT 测定 15 个菌株,其中有 5 株菌的培养物滤液,能在家兔肠段中产生积液,其比值均 > 1.0,而豚鼠角膜试验,20 株菌全为阴性。结果见表 4。

表 2 35 株河弧菌的嗜盐性试验结果

菌株来源	菌株数	在含不同浓度的氯化钠胨水中生长													
		0%		3%		4%		6%		7%		8%		10%	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
海水	2	0	2	2	0	2	0	2	0	2	0	1	1	0	2
腹泻粪便	33	2	31	33	0	33	0	33	0	30	3	10	23	0	33
合计	35	2	33	35	0	35	0	35	0	32	3	11	24	0	35

表 3 F 群弧菌与类似细菌的鉴别

试验项目	F 群弧菌		非 O1 群霍乱弧菌		副溶血性弧菌		溶藻性弧菌		亲水气单胞菌		类志贺邻单胞菌	
	35 株		46 株		7 株		31 株		17 株		9 株	
	反应	+%	反应	+%	反应	+%	反应	+%	反应	+%	反应	+%
氯化酶	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
葡萄糖产酸	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
葡萄糖产气	v	9.09	-	0	-	0	-	0	v	94.11	-	0
赖氨酸脱羧酶	-	0	+	100	+	100	+	100	-	0	+	100
鸟氨酸脱羧酶	-	0	v	55.65	+	100	+	100	-	0	+	100
精氨酸双水解酶	+	100	-	0	-	0	-	0	+	100	+	100
乳糖	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
蔗糖	+	100	+	100	-	0	+	100	+	100	-	0
甘露糖	v	90.91	+	100	+	100	v	93.54	+	100	-	0
甘露醇	v	96.97	+	100	+	100	v	87.09	v	64.71	-	0
阿拉伯胶糖	+	100	-	0	v	85.71	v	25.81	v	52.94	-	0
水杨素	-	0	-	0	-	0	-	0	v	41.17	-	0
肌醇	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	+	100
棉子糖	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0	-	0
苯丙氨酸脱氨酶	-	0	-	0	-	0	-	0	v	35.29	-	0
β-半乳糖苷酶	+	100	+	100	-	0	-	0	v	35.29	v	66.66
吲哚	v	12.12	+	100	+	100	v	83.87	v	82.35	+	100
V-P	-	0	v	34.78	-	0	v	87.09	v	29.41	-	0
明胶液化	v	93.94	+	100	+	100	+	100	+	100	-	0
1% 氯化钠胨水	v	6.06	+	100	-	0	-	0	+	100	+	100
3% 氯化钠胨水	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100	+	100
6% 氯化钠胨水	+	100	v	8.69	+	100	+	100	-	0	-	0
7% 氯化钠胨水	v	90.91	-	0	+	100	+	100	-	0	-	0
8% 氯化钠胨水	v	30.30	-	0	v	14.28	+	100	-	0	-	0
10% 氯化钠胨水	-	0	-	0	-	0	+	100	-	0	-	0
西蒙氏枸橼酸盐	v	93.94	v	91.30	+	100	+	100	+	76.48	-	0
43℃ 生长	v	18.18	+	100	+	100	+	100	-	100	+	100
扩散生长	-	0	-	0	-	0	v	87.09	v	0	-	0

注: (v): 不定; (+): 阳性; (-): 阴性。

表4 部分河弧菌毒力测定结果

试验菌株号	小鼠 ST 试验每组鼠的比率平均值	兔肠攀结扎 LT 值	豚鼠眼角膜试验
1054	0.121	0.80	—
934	0.081	0.70	—
984	0.076	1.45—1.74	—
980	0.093		—
41	0.067	0.67	—
2—4	0.063	0.93	—
1—2	0.061	0.82	—
959	0.070	0.50	—
959	0.051	1.67—1.85	—
1048	0.078	0.80	—
37	0.071	0.59	—
42	0.078	1.24—1.38	—
916	0.066		—
1044	0.063	0.56	—
1021	0.132	0.91	—
884	0.073		—
1009	0.082		—
29	0.059		—
1070	0.072	1.55—1.90	—
1213	0.074	0.90—1.12	—
对照菌株	产毒大肠菌 0.118		志贺氏痢疾菌: +

讨 论

1. Lee 和 Jensen 曾对河弧菌的分类学位置作过深入的研究,他们在1978年和1980年指出,该菌在分类学上的位置介于弧菌属和气单胞菌属之间,其DNA_G+C含量平均为50mol% (组成的范围在49.3—50.6 mol%),高于弧菌属(40—50mol%),而低于气单胞菌属(57—63 mol%),但对河弧菌所致腹泻的病原性,流行病学、病理学、临床特点及免疫机制等方面尚未完全弄清。据国外文献报道,该菌广泛分布在淡水环境、港湾水、污水及鱼贝中,从腹泻病人的粪便中也分离到。我们于1982—1983年腹泻病例的粪便中及我市郊区一起爆发的腹泻中都分离到该菌。为查明发病原因,除进行肠道病毒分离外,还进行了沙门氏菌、志贺氏菌、01群霍乱弧菌、副溶血性弧菌、致病性大肠杆菌、亲水气单胞菌、类志贺毗邻单胞菌等致病菌的分离培养,但结果肠道病毒和上述病原菌均未检出。流行病学调查证明,该起流行是因饮用了

污染的水而发病的;自爆发点采水6份,有2份分离到河弧菌,从26份病人粪便中,有11份河弧菌阳性。在肠道门诊465份粪便中分离到22株。病人临床表现均为腹痛、腹泻、水样便、恶心呕吐,个别患者有发热、粘液便,腹泻次数平均为6—10次/日,重症者30余次/日,类似霍乱样腹泻,病程持续3—6天,为探讨河弧菌的病原性,我们还检查了642份健康者的粪便,结果未曾检出上述弧菌。对新分离的菌株,曾将菌液腹腔注射给小白鼠,对试验小鼠有很强的毒力,大多于6—8小时内死亡。对部份河弧菌又做了肠毒素及对组织的侵袭性试验,其结果热稳定肠毒素(ST)阳性率低(3/20),热敏肠毒素(LT)阳性率略高些(5/15),而对组织的侵袭性试验全为阴性(0/20)。坂崎利一曾指出,河弧菌能引起腹泻,几乎所有的菌株都产生细胞毒性肠毒素,推测该毒素是与腹泻有关的物质。目前尚应寻找适宜的动物模型来研究其发病机理,从而证实该菌为引起腹泻的病原体。

2. 直到本世纪60年代,人们一直认为霍乱弧菌是主要的致病弧菌,而将其它的弧菌误认为非霍乱弧菌或非凝集弧菌。近20年来逐渐分离出多种弧菌。目前认为除01组和非01组霍乱弧菌外,尚有对人类致病或可能致病的嗜盐弧菌,包括副溶血性弧菌、*V. fluvialis*、*V. vulnificus*、*V. minicus*、*V. hollisae*、*V. alginolyticus*、*V. metsch-nikovii*、*V. damsela*^[6]。河弧菌是新近被认识的一种嗜盐弧菌,我们是对腹泻粪便标本进行副溶血性弧菌分离时发现的,通过实验对它有了逐步的认识。近几年我国屡有急性感染性腹泻爆发,尽管腹泻病因复杂,但为了搞清腹泻病例的病原学,除做其它实验室检查外,遇有疑似霍乱样腹泻的病例,河弧菌的实验室检查应考虑在内,故在进行霍乱弧菌与有关细菌分离培养时,最好使用TCBS琼脂及副溶血性弧菌选择性琼脂平板,才能发现此种弧菌。该菌具有嗜盐性,在增菌、分离和生化鉴定中,应含有一定量支持其生长的氯化钠,我们认为分离与鉴定此种弧菌,氯化钠的浓度以3%为宜。

3. 通过35株河弧菌的鉴定,提示氨基酸、耐盐性试验在弧菌的鉴别上有重要意义。利用赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶试验及精氨酸双水解酶试验,可与01群霍乱弧菌、副溶血性弧菌等相鉴别,对氯化钠耐受性的显著差别,可与弧菌科中的气单胞菌相鉴别。此外氧化酶、糖类分解、V-P、吲哚、 β -半乳糖苷酶、43℃生长等试验,都是生化鉴定中必不可少的项目。

4. 35株河弧菌的生化反应,基本上与坂崎利一所列举的生化试验结果相符合^[1],其生化结果有一定的规律性,但也表现了菌株的不同生化类型;据美国疾病控制中心指出:河弧菌可分为两个生物型:生物型1只包括由人体或外环境分离的不产气菌株,生物型2一般产气,只见于外环境。本文报道的35株河弧菌其生物型与分离来源之间也有一定的关系;来源于水的菌株,为分解葡萄糖产酸产气的菌株,来源于

腹泻病人的菌株绝大多数为不产气的菌株,但也有少数菌株产气。世界卫生组织在《临床实验室能检出的弧菌和其它有关细菌的特点》一文中所列的试验项目中,论述该菌在43℃时不生长,可是在被鉴定的35株菌中,却有6株能够生长,但生长不佳,这6株菌均符合于河弧菌的生化特性。

参 考 文 献

- [1] J. V. Lee, P. Shread, A. L. Furniss: *Journal. of Applied Bacteriology*, **50**: 91, 1981.
- [2] WHO Scientific Working Group: *Bull. WHO.* **58** (3): 353, 1980.
- [3] 坂崎利一: *食品卫生研究*, **32**(6): 41, 1982.
- [4] 岛田俊雄、坂崎利一: *Japan. J. Med. Sci. Biol.* **36**: 315, 1983.
- [5] 世界卫生组织肠道感染协作中心: 《国家腹泻病实验诊断讲习班》资料之一, 34, 1982.
- [6] Shandera W. X. et al.: *Ann. Intern. Med.* **99**(2): 169, 1983.