

非 O-1 群霍乱弧菌的鉴别诊断*

于玺华 黄上缓 魏燕玲

徐国洲 王 丽 夏光明

(解放军三〇二医院微生物研究室)

周 方 马清钧

(军事医学科学院, 北京)

梁士哲 江 怡

(解放军三〇二医院电镜室)

摘要 本文对我院从急性腹泻患者分离的 N-1 菌株进行了一系列鉴定。实验结果表明: 该菌用 LT 编码的基因分子探针测定无产 CT 基因, 亦无 LT 和 ST。但菌体确有毒力, 致病性较强。

电镜观察到该菌体表面有粘液层, 并新发现有纤毛。N-1 菌生化和生物学特性极似 O-1 群霍乱弧菌, 但血清学否定了。气相色谱等试验证实为罕见的非 O-1 群霍乱弧菌。

关键词 非 O-1 群霍乱弧菌; 诊断; 电镜形态。气相色谱; 生物学特性。

世界卫生组织 (WHO) 1980 年曾提出: 所有在生化特性上及能引起霍乱流行的相似弧菌都归属于霍乱弧菌^[1]。近年来分类学家又把霍乱弧菌分成 O-1 群与非 O-1 群^[2]。

非 O-1 群霍乱弧菌确有致病性。它的数

量、流行范围、致病性都有增强的趋势^[3]。因此引起国际上的重视。非 O-1 群霍乱弧菌的确

* 本文得到军事医学科学院高树德教授, 朱厚础助理研究员的帮助, 在此表示感谢!

切诊断只凭血清学方法远远不够。而正确地诊断对治疗、预防和流行病学都有重要意义。

为鉴别诊断该类菌种,本试验使用的方法,除了常规法外,还用了LT分子探针、电镜及气相色谱等分子生物学的技术。鉴别结果如下:

材料和方法

1. 供试菌株: 古典型霍乱弧菌 16017。O-1 群霍乱弧菌埃尔托型 A 与 B 株。非 O-1 群霍乱弧菌 N₅₅, 以上均为实验室参考菌株, 急性腹泻患者新分离的 N-1 菌株。

2. 试验动物: 成年健康豚鼠, 20—25 克成年小白鼠; 出生 1—3 天之乳鼠。以上动物雌雄皆可。

3. 试剂及仪器: O-1 群霍乱弧菌光滑型与粗糙型抗血清(军事医学科学院五所供给), LT 基因编码的分子探针(军事医学科学院三所), DXBI-12 型电子显微镜。Perkin-Elmer SIGMA 115 型气相色谱仪。

4. 电镜观察: 将培养 18 小时之上述菌液滴网, 用 0.5% 的磷钨酸水溶液负染色后, 紫外线消毒, 用电镜观察照相。

5. 气相色谱观察: 菌种接种于普通斜面, 培养 18—24 小时, 用 3ml 普通肉汤洗下, 加入罗氏瓶内, 37℃ 培养 24 小时, 无菌生理盐水洗下, 56℃ 水浴灭活 30 分钟。灭菌后用无菌生理盐水, 以 4000r/min 离心 20 分钟洗 3 次, 真空冷冻干燥。全细胞脂肪酸气相色谱分析法详见文献[4]。

6. 其他观察: 用豚鼠角膜试验测侵袭性, Elek 试验测热敏肠毒素 LT^[5], 乳鼠灌胃测热稳肠毒素 ST^[6]。LT 基因编码的分子探针测霍乱毒素的 CT 基因^[7]。常规法了解其生物学特性, 标准法进行生化和血清学试验, 特殊试验进行鉴别诊断。

试验结果

(一) 致病性

N-1 菌 18 小时肉汤培养物 0.3ml, 其菌浓度 10^{6-7} 个/ml 注射小白鼠腹腔, 6—7 小时死

亡, 解剖发现: 肠红肿充血, 腹腔液分离到该菌。说明 N-1 菌毒力较强。另取一管上述培养物, 3000r/min 离心 10 分钟, 取上清液 0.3ml, 同法注射小白鼠腹腔, 鼠未死。说明: N-1 菌的毒力因子在菌体, 而不在上清液。

(二) 毒素测定:

Sereny 试验阴性, LT 分子探针测定该菌无产 CT 基因, 又 Elek 试验阴性, 故确认 N-1 菌无 LT。乳鼠试验证明亦无 ST。至于其确切毒力因子有待深入研究。

(三) 实验诊断

1. 形态与动力: N-1 菌为 G⁻ 弧菌, 有极端单鞭毛(图版 I-1)。电镜新发现该菌有粘液层和纤毛(图版 I-2)。形态与参考株 N₅₅(图版 I-3) 相似, 粘液层的发现揭示出该类菌粘丝试验阳性的根本原因。

N-1 菌在血平板上有溶菌环及皱褶状菌落, 呈“流星状运动”, 用患者的抗血清中和可出现动力抑制, Mackowiak 试验该菌对鸡血球是

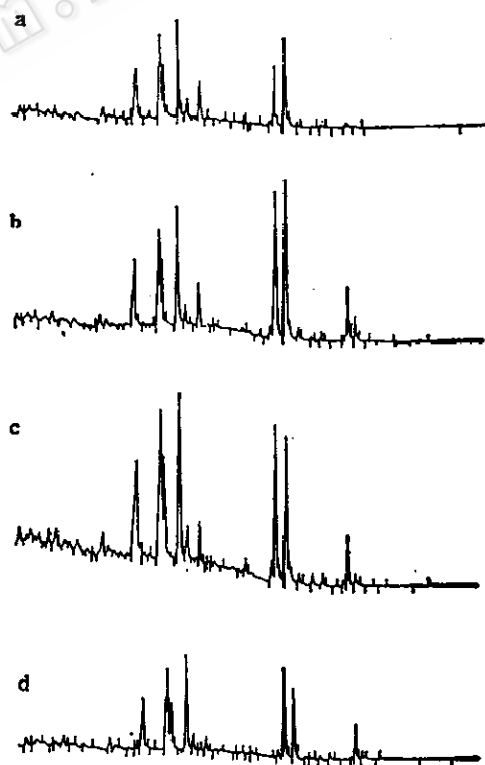


图1 霍乱弧菌的脂肪酸气相色谱图

a. O-1 霍乱弧菌古典型 16017 b. O-1 霍乱弧菌埃尔托型 A c. 非 O-1 霍乱弧菌 N₅₅ d. 新分离株 N-1

表1 N-1菌生化反应及生长鉴别试验

菌 型	生 化 反 应															生长试验						
	葡萄糖	蔗糖	甘露糖	甘露醇	水杨酸	胍基质	枸橼酸	硝酸盐	V P	M R	山梨醇	乳糖	赖氨酸	精氨酸	阿拉伯糖	肌醇	NaCl(%)				43℃	
																	0	3	6	8		
O-1 群 霍乱弧菌	⎧ 古典型 16017 ⎩ 埃尔托型 A	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	/
		+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	/
非 O-1 霍乱弧菌 N ₃₃		+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	/
新分离菌株 N-1		+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+

注: 表中“/”示未测。

表2 N-1菌株生物学特性鉴别诊断试验

菌 型	多粘菌素B试验	鸡血球凝集	溶血试验	第IV组霍乱噬菌体裂解 (pfu/mL)		噬 菌 体 分 型					溶 源 性	对溶源性噬菌体敏感性	山梨醇发酵
				10 ⁴	10 ⁷	V _{P1}	V _{P2}	V _{P3}	V _{P4}	V _{P5}			
古典型 16017	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
埃尔托型 B	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-
N ₃₃	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
N-1	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

碰撞而不是粘着。

2. 生化反应: N-1 菌为 Heiberg II 群与 N₃₃ 相似(见表1)。

3. 血清学试验: 结果表明, N-1 菌不与 O-1 群霍乱弧菌光滑型及粗糙型抗血清起凝集反应。N₃₃ 菌株亦然。说明血清学试验只能证明 N-1 菌不是 O-1 群霍乱弧菌; 不能证实它是什么菌属。即使用非 O-1 群的分型血清, 也因种类繁多, 交叉反应严重, 分型还不够完善, 而无法对这种特殊菌株作出确诊。

4. 脂肪酸气相色谱图(图1): 图1表明, N-1 菌的脂肪酸(C₁₀-C₂₄)色谱图(d)不同于 O-1 群霍乱弧菌中的古典型(a)和埃尔托型(b); 而与非 O-1 群中的 N₃₃ 菌株相近(c)。例如图中 16017 株(a)所含 18 碳酸的量均小于 20%, N₃₃ 与 N-1 菌相近, 它们的非饱和-16 碳

酸的含量均大于饱和的 16 碳酸; 而埃尔托型的菌株 A 则相反, 或相近。

5. 生物学特性的鉴别诊断: 表2说明: N-1 菌与 O-1 群霍乱弧菌十分相似; 13 项试验中有 10 项与古典型相同, 9 项与埃尔托型相同。即使鉴别率很高(96% 以上)的多粘菌素 B, 鸡血球凝集及噬菌体裂解试验, 也无法将它与 O-1 群霍乱弧菌鉴别开来。由此可见, 不借助其它技术是无法确诊 N-1 菌。说明了该菌株的特殊性。

讨 论

众所周知, 与非 O-1 群霍乱弧菌相似的类属菌 10 余种。河弧菌与弗尼斯弧菌为 Heiberg III 群, 邻单胞菌为 VI 群; 副溶血和溶藻弧菌都能在 8% 盐胨水中生长; 拟态弧菌又发酵蔗糖,

气单胞菌不分解赖氨酸；麦氏与鳕弧菌能发酵精氨酸。这些特性都与 N-1 菌不符。再加上其他性状综合判断，这 9 种类属菌可除外。

虽然 N-1 菌与 O-1 群霍乱弧菌很相似，但不属于此类弧菌，而是非 O-1 群霍乱弧菌中极少见的一种菌株。原因是：①血平板上的新鲜培养物出现了皱褶菌落。②有的作者把埃尔托型弧菌的 5 株分型噬菌体用于非 O-1 群霍乱弧菌的噬菌体分型中。190 株非 O-1 群霍乱弧菌中 98% 是噬菌体 VI 型以下，无噬菌体 I 型的菌株。而 N-1 菌却为噬菌体 I 型菌株。③ 94.2% 的非 O-1 群霍乱弧菌对 Mukerjee 的霍乱第 IV 组噬菌体不敏感，而 N-1 菌却属敏感株。它还可被 10^6 pfu/ml 浓度的噬菌体裂解。以上三点说明：N-1 菌是一种罕见的特殊菌株，尽管它有许多特性与 O-1 群霍乱弧菌相同；从综合判断说明 N-1 菌为非 O-1 群霍乱弧菌是可信的。至于该类菌是否为 O-1 群与非 O-1 群之间的中间型，还有待进一步研究。

目前对某些非 O-1 群霍乱弧菌的致病因子尚未完全搞清，机理也未确定。O'Brien (1984)

提出该类菌有的可产生志贺氏菌毒素样的细胞毒素，引起血性腹泻，毒素在菌体部份，不在上清液中^[8]。N-1 菌株的毒力因子也在菌体，是否与此有关，值得深入研究。

Gallut 和 Quiniou 证实，埃尔托型菌对古典型有抑制，而非 O-1 群对埃尔托型抑制更显著。他们认为，某些 O-1 群霍乱弧菌的消失，正是由于非 O-1 群霍乱弧菌流行的影响，因此，对非 O-1 群霍乱弧菌特别注意，深入探讨在我国流行的规律有着深远的意义。

参 考 文 献

- [1] WHO: Guidelines for Cholera Control, CDD/SER, p. 3, 1980.
- [2] Kaper, J. et al.: *Appl. Environ. Microbiol.* 37(1): 91, 1979.
- [3] Bockemuhl, J. et al.: *J. Appl. Bacteriol.* 60(5): 435—442, 1986.
- [4] 周方等: 微生物学报, 27(2): 95—104, 1987.
- [5] Honda, T. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 13(1): 1—5, 1981.
- [6] Giannella, R. A.: *Infect. Immun.* 14: 95, 1976.
- [7] Kaper, J. B. et al.: *J. Clin. Microbiol.* 16(1): 129, 1982.
- [8] O'Brien, A. D. et al.: *Lancet*, 1(8368): 7, 1984.