

自急性腹泻病人分离鉴定腐败假单胞菌及其病原性的研究

权太淑 李 薇 李乐民 范天锐

(徐州市卫生防疫站)

摘要 本文报道了1982—1985年,我们对1792例急性腹泻患者的粪便进行10多种肠道致病菌的检查,其中检出腐败假单胞菌98株,检出率为5.47%,对分离的菌株除做生物化学鉴定外,还进行了致病性检查,结果表明:腐败假单胞菌能使实验小白鼠在短时间内发病与死亡,对豚鼠眼角膜有较强的侵袭性,部分菌株(6/14)还能产生LT肠毒素。此外,对8例患者的双份血清进行了抗体测定,证实病人恢复期血清中有较高的抗腐败假单胞菌的相应抗体。因此,可认为本菌是致人类腹泻的病原菌。

关键词 腐败假单胞菌;腹泻;致病力

腐败假单胞菌为革兰氏阴性,直杆菌或略带弯曲的杆菌,无芽胞、无荚膜、以极生鞭毛运动,严格好氧,隶属于无芽胞、非发酵革兰氏阴性杆菌群中的假单胞菌属。该菌于1941年由Derby和Hammer首先分离并命名为腐败假单胞菌(*Pseudomonas putrefaciens*),其DNA

的G+C比例为43.5—45.5 mol%^[1]。本菌在自然界分布较广,能使鱼、肉、蛋、奶和冻冷食品污染及腐败,还可引起人类的败血症,中耳炎、

本文承刘乘阳教授审阅,程知义教授提出宝贵意见,江苏省卫生防疫站电镜室裘学昭副主任医师帮助,在此一并致谢。

胫骨感染,创伤后溃疡。可从血液、尿液、脓液、创伤分泌物、粪便、痰及咽拭子分离出来^[2],已经引起临床和微生物工作者的关注。多年来,我国对铜绿色假单胞菌研究的文献较多,但对腐败假单胞菌的研究,国内迄今尚未见报道。我站于1982—1985年采集了急性腹泻病人的粪便1,792件,使用多种培养基,做了10多种肠道致病菌的分离培养,其中分离出腐败假单胞菌98株,现将实验研究的结果报告如下:

材料与方 法

(一) 菌株来源

自肠道门诊急性腹泻患者的粪便中分离。

(二) 分离培养基

采用 BTB 蔗糖高盐(含4%氯化钠)琼脂培养基。

(三) 生化鉴定

所用培养基、试剂和试验方法按文献[3、4]进行。凡原培养基中不含氯化钠者,加入氯化钠,使其最终浓度为1%。

(四) 致病性检查

1. 小白鼠毒力试验: 选体重15—18g小白鼠,腹腔接种24小时肉汤培养物0.3ml(约10亿/ml),每株菌接种3只小鼠,并以无菌肉汤同法作对照,观察发病与死亡情况。2. 肠毒素LT测定: 采用家兔肠攀结扎试验,按WHO规定方法进行,术后18小时剖腹检查,测定每厘米肠段内平均贮留液量。3. 侵袭性检查: 采用Serény法试验。

(五) 病人机体免疫反应检查

分别取单纯感染腐败假单胞菌的腹泻病人急性期(发病4—5天)及恢复期(病后19—26天)血清,各与检出菌抗原("O"菌液,稀释至10亿/ml)做定量直接凝集试验,测其抗体效价,并取正常人血清同法作对照。

(六) 药敏试验

采用纸片弥散法,药物纸片由上海医学化学所供给,共做14种。试验方法及结果判定,按WHO规定方法进行。

实 验 结 果

1792例粪便标本中,有1164例检出各类病原菌,其中包括了一份标本同时检出两种或两种以上病原菌的混合感染93例,(占总阳性病例数的5.18%),标本总检出率为70.14%,其中腐败假单胞菌检出率为5.47%(表1)。

表1 1792例急性腹泻患者病原菌检出结果

病原菌	检出菌株数	检出阳性率(%)	构成比(%)
志贺氏痢疾杆菌	479	26.73	38.11
腐败假单胞菌	98	5.47	7.80
溶藻性弧菌	92	5.13	7.32
河弧菌	84	4.69	6.68
空肠弯曲菌	76	4.24	6.04
沙门氏菌	72	4.02	5.73
嗜水气单胞菌	68	3.79	5.41
类志贺毗邻单胞菌	56	3.13	4.46
致病性大肠杆菌	54	3.01	4.30
非O1群霍乱弧菌	51	2.85	4.05
副溶血性弧菌	42	2.34	3.34
铜绿假单胞菌	37	2.06	2.94
结肠炎耶氏菌	22	1.23	1.75
拟态弧菌	7	0.39	0.56
侵袭性大肠杆菌	5	0.28	0.40
弧菌未定型	14	0.78	1.11
合计	1257	70.14	100.00

(一) 菌体形态

98株腐败假单胞菌均为革兰氏阴性无芽胞、直杆状或微弯曲状杆菌,单个偶有成对或短链,部份菌株经鞭毛染色法检查,均为单根端毛菌,暗视野观察,动力活泼,电镜观察,可见菌体一端有无鞘极生鞭毛,并有菌毛(图1,2)。

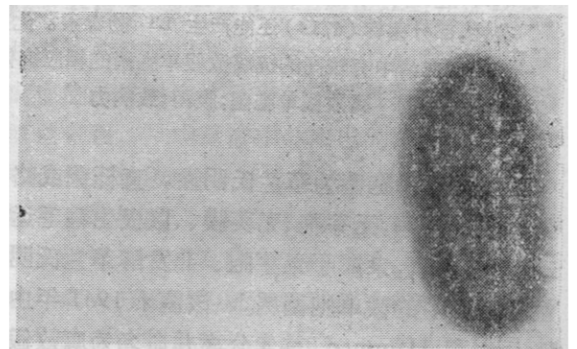


图1 腐败假单胞菌(示极生鞭毛25000×)

表 2 分离培养基上腐败假单胞菌的菌落特征 (37℃ 培育 24 小时)

分离培养基	菌落特征	观察要点
BTB 蔗糖高盐琼脂 (含 4% NaCl)	绿色、圆整、有光泽、湿润、不透明、稍凸， 直径 2mm 左右	不分解蔗糖，菌落中心青绿
麦康开琼脂	淡褐黄色、半透明、湿润，直径 1.5—2 mm，易形成粘液样菌苔和菌落	不分解乳糖，菌落生长处产酸呈黄色
SS 琼脂	无色透明、圆整、较小，直径 1—1.5mm	不分解乳糖、大多不产 H ₂ S 菌落不易 挑起
绵羊血琼脂	灰褐黄色、圆整、湿润、隆起、不溶血直径 2—3mm	在培养基的基底部分、出现暗绿色的变色 晕
普通琼脂	呈淡粉红色、圆整、凸起、湿润、较混有时 有粘性、直径 2mm 左右	置 30℃ 左右，色素易产生，但色素不扩 散

表 3 98 株腐败假单胞菌的生化试验结果

项 目	结 果		项 目	结 果		项 目	结 果			
	+	-		+	-		+	-		
分离培 养基	BTB 蔗糖高盐琼脂	98	0	含 不 同 浓 度 盐 脲 水	0% NaCl 发育	2	96	七叶武水解	6	92
	麦康开琼脂	98	0		3% NaCl 发育	98	0	甲基红	0	98
	SS 琼脂	92	6		6% NaCl 发育	98	0	V-P	0	98
	NAC 琼脂*	0	98		7% NaCl 发育	87	11	靛基质	0	98
KIA	底层(产酸)	0	98		8% NaCl 发育	72	26	尿素酶	16	82
	斜面(产酸)	0	98		10% NaCl 发育	0	98	明胶酶	98	0
	气体	0	98	在 O-E 培 养 基 中 糖 类 氧 化	葡萄糖	89	9	苯丙氨酸脱氨酶	0	98
	硫化氢	98	0		乳糖	0	98	赖氨酸脱氨酶	0	98
非扩散性 色素	金氏琼脂斜面	98	0		麦芽糖	0	98	鸟氨酸脱氨酶	98	0
	半固体琼脂表层	98	0		甘露醇	0	98	精氨酸双水解酶	0	98
生长温度	5℃	39	59		甘露糖	0	98	西蒙氏枸橼酸盐	17	81
	6℃	94	4		蔗糖	0	98	丙二酸盐	0	98
	7℃	98	0		阿拉伯胶糖	0	98	醋酸盐	98	0
	41℃	94	4		肌醇	0	98	葡萄糖铵盐	0	98
	42℃	91	7		水杨素	0	98	DNA 酶	98	0
运动性	98	0	棉子糖		0	98	卵磷脂酶	98	0	
氧化酶	98	0	纤维二糖		0	98	吐温-80 水解	98	0	
细胞色素氧化酶	98	0	鞣糖		0	98	乙酰胺水解	0	98	
触酶	98	0	果糖		32	66	对青霉素敏感 10ug	0	98	
在氯化钾培养基上发育	0	98	乙醇		7	91	对 O/129 感受性 10ug	0	98	
硝酸盐还原	98	0	木糖	3	95	对 O/129 感受性 150 ug	0	98		
产生氨气	0	98	ONPG	0	98	溶血	0	98		

* NAC 琼脂: 奈啉酮酸溴化十六烷基三甲胺琼脂

(二) 生物学特性

1. 该菌为严格需氧菌，行呼吸代谢，对营养要求不高，在 pH 7.0—8.8 范围内生长良好，在 6—42℃ 下大多能生长。2. 具有嗜盐性，在无盐的脲水中绝大多数不生长。3. 在肉汤培养基内于 37℃ 下培养 3—6 小时，呈均匀混浊，

18—24 小时后，表面形成菌膜，若继续延长时间，则形成粘液膜状物而沉于管底。4. 本菌在几种常用的分离培养基上，形成各不相同的菌落特征(表 2)。在金氏琼脂斜面和普通半固体琼脂的表层，于 30℃ 环境下，易产生明显的粉红色色素，但色素不扩散，也不溶于酒精与氯仿

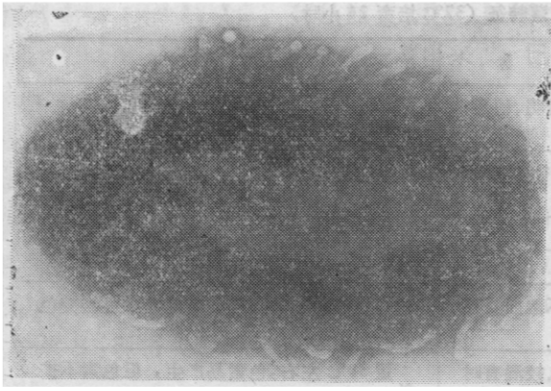


图2 腐败假单胞菌(示菌毛 53000×)

中,仅菌苔本身呈粉红色。

(三) 生化试验结果

分离菌的生化试验结果,符合于假单胞菌属的特性,本菌对糖的氧化能力极弱(表3)。

(四) 致病性检查结果

1. 小白鼠毒力试验: 共做26株,一般在6—10小时后开始发病,10—16小时出现死亡,少数延迟至22—26小时死亡。小鼠起初运动不活泼,厌食,竖毛,弓背,蜷缩成团,排鼻涕状粘液便,最终死亡躯体强直。解剖可见腹腔内有较多的黄褐色粘液胶状腹水,肠腔内有黄

表4 腹泻患者双份血清抗体测定

血清编号	急性期血清效价						恢复期血清效价						对照(NS)
	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	
962	+	-	-	-	-	-	#	#	+++	++	-	-	-
987	++	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-
1057	+++	+	-	-	-	-	#	#	+++	+++	+++	++	-
1153	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++	-	-	-	-
1315	++	-	-	-	-	-	#	+++	+++	++	-	-	-
1486	-	-	-	-	-	-	+++	++	-	-	-	-	-
1595	+++	++	-	-	-	-	#	#	+++	+++	++	-	-
1646	++	-	-	-	-	-	#	#	#	+++	++	+	-

褐色液体充盈。自心血、腹腔液、肠内容物取材培养,均获与试验菌相同的纯培养。而对对照组小鼠,观察期间(三天)健康如常。

2. 兔肠结扎试验: 共做14株,有6株菌滤液的值>1.0,表明LT试验阳性,其中有4株菌的兔肠积液量高达1.35—1.52ml/cm。

3. Ser'eny 试验: 共做26株,按经典方法分别将菌株接种于26只豚鼠的眼结膜后,次日观察,发现受活菌感染的豚鼠眼角膜混浊,结膜充血,且大多数的豚鼠眼疾较重,脓性分泌物很多,致使上下眼睑紧闭,与对照的志贺氏痢疾杆菌出现的炎症反应相似。取眼内分泌物检查,均获纯培养生长(原侵袭力试验菌株)。用致病性大肠埃希氏菌作对照的豚鼠眼角膜,观察72小时,无任何炎症反应。

(五) 抗体检查结果

8例患者的恢复期抗体较急性期抗体有明显的增高,而5份正常人血清均表现阴性反应(表4)。

(六) 药敏试验结果

98株腐败假单胞菌对14种抗菌药物的敏感试验结果见表5。

表5 98株腐败假单胞菌药敏试验结果

抗菌药物	药敏试验结果		
	高敏(株)	中敏(株)	低敏或耐药(株)
庆大霉素	98	0	0
卡那霉素	98	0	0
丁胺卡那霉素	98	0	0
新霉素	98	0	0
妥布霉素	96	1	1
多粘菌素B	96	2	0
氯霉素	62	1	35
红霉素	56	9	33
磺胺+增效剂	58	2	38
四环素	4	4	90
链霉素	2	5	91
先锋霉素	0	0	98
氨基苄青霉素	0	0	98
青霉素	0	0	98

讨 论

1. 腐败假单胞菌的分类学位置,迄今尚未定论;根据其 DNA G+C 的组成,一些学者认为它不应属于假单胞菌属^[5-7]。Baumann 等^[8]曾对 218 株好气性海洋细菌进行分类学的研究,他们主张将 DNA G+C 为 43.2—48.0 mol% 的非发酵革兰氏阴性极毛菌,置于一个新确立的属——*Alteromonas* (异单胞菌属)。他们还进一步将假单胞菌属和异单胞菌属的定义作一比较,表明二者之间可用 G+C 含量分开。Lee 等在假单胞菌属的数值分类研究一文中也明确指出:由 Derby 和 Hammer 命名的腐败假单胞菌,实际上应该被认为与腐败异单胞菌 (*Alteromonas putrefaciens*) 新种相同^[9]。但在伯杰氏手册(第八版)中,仍将该菌列入假单胞菌属,不过作者强调了腐败假单胞菌具有的特征,与当时规定的假单胞菌属不尽符合。因此,本菌的分类学位置,还有待进一步明确建立。

2. Mcmeekin 等^[10]从变质的鸡腿肉中分离出腐败假单胞菌。作者从带有臭味的盐腌蛋(引起中毒的食品)、河水、湖水及水产品中也检出过。当时被认为是污染的杂菌。1982 年以来,我们对急性腹泻病人的粪便做多种肠道致病菌的检查时,自发热、粘液和脓血便痢疾样患者的粪便中,常检出呈优势生长的腐败假单胞菌,但未分离到痢疾杆菌或其它肠道致病菌。这一事实对研究该菌引起的腹泻具有重要意义。在检出本菌的 98 例病人中,除少数患者(12 例)有混合感染外,其余未检出其它病原菌,他们为散发病例。对单纯感染腐败假单胞菌的 86 例患者,还进行了流行病学调查,他们中少数(21/86)为轻症自限性疾病,腹泻呈水样和黄色稀便,多数(65/86)呈粘液和脓性血便,症状很象痢疾。病程一般为 2—5 天,少数迁延型腹泻持续至第 17 天,长者 42 天。成年病人检出率占 94.90%,婴幼儿占 5.10%,男女性别无明显差异。感染发病的季节为 5—10 月,但有 74.42%(64/82)的病例是在气温较高的七、八、

九月份发病的。病人多数有与水源接触或因食用污染的禽、蛋、奶、鱼、蛙肉、冷饮等食物有关。

3. 为探讨本菌的病原学意义;①我们按上述方法对 813 名饮食从业人员做健康检查时,检查了他们的粪便,结果均未检出腐败假单胞菌。②对单纯感染本菌的病人作了双份血清抗体检查,证实患者恢复期血清中有较高的抗腐败假单胞菌的相应抗体,而正常人血清中无此抗体,或滴度低(1:5, 个别人达 1:10)。③动物实验表明,本菌可使感染的小鼠在短时间内发病与死亡,对豚鼠眼角结膜有较强的侵袭性,部份菌株(6/14)还能产生 LT 肠毒素。因此,可认为分离出的腐败假单胞菌,是患者腹泻的病原菌。此外,本菌在腹泻病原体的组成中,占较高比率(7.8%),值得重视。

4. 对于腐败假单胞菌的感染,长期以来,重视不够,以致目前对本菌的病原学和流行病学资料甚少。在腹泻病原菌检查时,很容易造成漏检。较难作出正确的诊断。

该菌具有嗜盐性,初次分离,可将粪便标本悬浮于 3% 的盐水中进行增菌,然后再用 BTB 蔗糖高盐琼脂进行分离,此法具有良好的效果,并且也适用于外环境的标本。对于本菌的鉴定,最好先通过 KIA 进行初筛,疑为腐败假单胞菌时,再做生化鉴定。本菌在 KIA 的高层,能产生硫化氢,常掩盖其不能发酵但能有氧分解(弱)葡萄糖的特点,再加上它不分解乳糖,因此易误认为沙门氏菌、变形杆菌或枸橼酸杆菌等。在实验中应采用几项具有特征性的试验,将本菌与上述细菌加以区别,在这些革兰氏阴性杆菌中,有两个特性是至关重要的;一是鞭毛的类型,即是端毛还是周毛,二是对碳水化合物分解是氧化还是发酵。腐败假单胞菌氧化酶试验阳性,呼吸型代谢,暗视野悬滴标本检查时,动力活泼,除能缓慢氧化葡萄糖(81/98)外,其它糖类通常不利用或很少利用。该菌具有 DNA 酶,明胶酶,鸟氨酸脱羧酶,有些菌株还具有尿素酶。MR, V-P, 吡啶, 苯丙氨酸脱氨酶均为阴性。此外,本菌能产生非扩散性粉红色色素,也是其重要特征。上述生化试验与易混淆

的肠杆菌科细菌, 尤具鉴别意义。

我们分离的 98 株腐败假单胞菌, 仅能微弱氧化或不氧化分解葡萄糖, 未见有发酵葡萄糖的菌株, 此点与文献 [1、2] 报道的明显不同。

5. 自腹泻患者分离的 98 株腐败假单胞菌, 对庆大霉素、卡那霉素、丁胺卡那、新霉素、妥布霉素, 多粘菌素 B 高敏, 可作为首选药物用于临床治疗。对氯霉素、红霉素和磺胺十增效剂, 约有 60% 的菌株呈高敏。而对链霉素、四环素、先锋霉素、氨基苄青霉素、青霉素呈低敏或耐药。多抗性抗药菌株已在病人中出现。

参 考 文 献

[1] Buchanan RE et al.: *Bergey's Manual of Dete-*

rminative Bacteriology 8th ed. Baltimore, The Williams and Wilkins Company, 310, 1974.

- [2] 李仲兴等: 临床细菌学, 人民卫生出版社, 253, 1986。
- [3] 何晓青主编: 卫生防疫检验 (细菌检验), 第二版, 272, 1980。
- [4] 中国科学院微生物研究所细菌分类组编著: “一般细菌常用鉴定方法”, 科学出版社, 北京, 68, 1978。
- [5] Mandel et al.: *Journal of Bacteriology*, 90: 1492, 1965.
- [6] Mandel et al.: *Journal of General Microbiology*, 43: 286, 1966.
- [7] Shewan J. M.: *Journal of Applied Bacteriology*, 34: 299, 1971.
- [8] Linda Baumann Paul Baumann M. Mandel et al.: *Journal of Bacteriology*, 110: 411, 1972.
- [9] Lee J. V. Giboson D. M. et al.: *Journal of General Microbiology*, 98: 450, 1977.
- [10] McMeekin T. A.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 33: 1244, 1977.