

革兰氏阴性不发酵杆菌的鉴定及其对抗生素的敏感性

杨暑伏 徐迪诚 张慧兰

(哈尔滨市卫生防疫站, 哈尔滨)

杨素珍 乔秋萍 黄令仪

(哈尔滨市第五医院, 哈尔滨)

本文报道从临床病人和医院内环境分离的 165 株革兰氏阴性不发酵杆菌的鉴定, 以及这些菌对常用抗生素敏感性试验的结果。165 株菌归属为五个菌属: 假单胞菌属、不动杆菌属、莫拉氏菌属、无色杆菌属和产碱菌属。绝大部分菌株对于常用抗生素耐药。讨论了细菌鉴定方法和程序。提出这些菌与临床感染具有密切关系, 耐药菌株对于感染症治疗和医院内感染带来的问题。

关键词 革兰氏阴性不发酵杆菌; 抗生素

随着抗生素和免疫抑制剂的广泛应用, 由革兰氏阴性不发酵杆菌所致的感染症日益增多。近十多年来, 国外大量报道了假单胞菌属、不动杆菌属、产碱菌属、莫拉氏菌属和黄杆菌属等构成病原菌的比例在明显上升^[1-3]。但是, 由于这类菌的鉴定方法比较复杂, 以致长期在分类、命名和鉴定方面十分混乱。自从 Hugh 和 Leifson 氏提出鉴定细菌代谢类型的 O-F 试验培养基以来, 鉴定方法日臻完善, 类属关系也逐渐趋于统一^[4-6]。我国对这方面的研究较晚, 目前尚未建立完整的鉴定程序, 不能适应临床医疗的需要。为调查革兰氏阴性不发酵杆菌与临床感染的关系, 探讨菌的鉴定方法及对常用抗生素的敏感性, 我们将哈尔滨市 1980 年 5 月至 1981 年 8 月收集的 165 株菌, 进行了分类鉴定和抗生素敏感性试验。

材料和方法

(一) 菌株来源

革兰氏阴性不发酵杆菌: 从病人标本和医院内环境分离, 共计 165 株(表 1)。

参考菌株: 卫生部药品生物制品检定所及中国科学院微生物研究所提供。

(二) 菌株分离与保存方法

将血液标本接种 1% 葡萄糖肉汤, 增菌 24—48 小时, 用血琼脂平板分离; 其他标本直接用血琼脂平板分离。分离平板置 37℃ 培养 24—48 小时, 挑取可疑菌落接种三糖铁琼脂, 37℃ 培养 24 小时。如培养基底部不生长或生长不良, 斜面产碱或无变化者, 疑为革兰氏阴性不发酵杆菌, 立即用半固体培养基保存。

(三) 菌种纯化

用血琼脂平板和麦康开琼脂平板分离, 每个平板约有 3/4 以上菌落一致时, 挑取可疑菌落接种营养琼脂斜面和半固体斜面。

(四) 鉴定方法

按《医学细菌鉴定手册》^[5]和《一般细菌常用鉴定方法》^[7]进行。首先根据细胞形态、动力、厌氧生长、细胞色素氧化酶及 O-F 试验初步确定菌属。然后参照 Alexander von Graevenitz 和 Michael Grehn 二氏^[6]的检索方法定群、种。

本文于 1982 年 7 月 20 日收到。

本工作承中国科学院微生物研究所蔡妙英同志指导; 哈尔滨铁路中心医院、哈尔滨市儿童医院检验科协助; 张明、纪舒萍、郑秀英、宋贵竹、张维善、黄明越、李恩华、王晓霞等同志参加部分工作。

表 1 165 株革兰氏阴性不发酵杆菌的来源

Table 1 Sources of 165 nonfermenting gram-negative bacteria in this study

种 类	血液	脑脊液	分泌物	尿	痰	烧伤 创面	脓汁	医院 内环境	来源 不详	计 (株)
假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	10	1	15	2	9	9	70	6	10	132
不动杆菌属 (<i>Acinetobacter</i>)	2	1	8		1	1	4		2	19
莫拉氏菌属 (<i>Moraxella</i>)						1	1			2
产碱菌属 (<i>Alcaligenes</i>)	4			1			1			6
无色杆菌属 (<i>Achromobacter</i>)							2		1	3
King 氏 "Ive" 菌 (King's "Ive" bacteria)					1		2			3
合计(株)	16	2	23	3	11	11	80	6	13	165

(五) 抗生素敏感试验

将青霉素、链霉素、卡那霉素、金霉素、红霉素、土霉素、氯霉素、四环素、庆大霉素和磺胺嘧啶等 10 种抗生素纸片,贴于划线接种的营养琼脂平板表面。按常规方法观察并判定结果。

结 果 和 讨 论

(一) 形态与染色特征

165 株菌均为革兰氏染色阴性。细胞形态呈杆状的 77 株(占 46.66%),短杆状的 44 株(占 26.67%),球杆状的 44 株(占 26.67%)。鞭毛染色结果,假单胞菌属为极生鞭毛,产碱菌属、无色杆菌属和 King 氏 "Ive" 菌为周生鞭毛,不动杆菌属及莫拉氏菌属无鞭毛。

(二) 培养特征

所有菌株能在血琼脂和麦康开琼脂平板上生长。在 S-S 琼脂平板生长的 149 株,不生长的 16 株:包括假单胞菌 6 株,莫拉氏菌 2 株,无色杆菌 2 株,乙酸钙不动杆菌鲁氏变种 6 株。在有氧和厌氧条件下都能生长的 92 株,在厌氧条件下不生长的 73

株。产水溶性色素的 79 株,绝大部分为假单胞菌。

(三) 属、种的确定

165 株归属于五个菌属:假单胞菌属 132 株,不动杆菌属 19 株,产碱菌属 6 株,无色杆菌属 3 株,莫拉氏菌属 2 株。另有 King 氏 "Ive" 菌 3 株。

根据细胞色素氧化酶、葡萄糖、木糖三项测定结果,我们分离的 165 株菌归于 Alexander von Graevenitz 和 Michael Grehn 二氏的群₁的有 12 株,群₂的有 13 株,群₃的有 114 株,群₄的有 20 株。有 6 株菌不能确定种(群)。

氧化酶(一)、葡萄糖(+)、木糖(+/-)的菌归入群₁。

在鉴定的 165 株菌中,有 12 株属于群₁。其中 6 株为乙酸钙不动杆菌无硝变种,6 株为 "VE" 群假单胞菌(表 2)。群₂中的 "VE" 群假单胞菌尚需同嗜麦芽假单胞菌、洋葱假单胞菌鉴别。我们鉴定的 6 株 "VE" 群假单胞菌,能分解鼠李糖和甘露醇,赖氨酸脱羧酶阴性, DNA 酶阴性,

表 2 乙酸钙不动杆菌无硝变种与“VE”群假单胞菌的鉴别特征

Table 2 Differential characteristics between *Aci. calcoaceticus* var. *anitratu*s and *Ps.* “VE” group

菌名	株数	麦康开平板生长	氧化酶	葡萄糖	木糖	硝酸盐还原	产氮气	色素	动力
乙酸钙不动杆菌无硝变种 (<i>Aci. calcoaceticus</i> var. <i>anitratu</i> s)	6	6	0	6	6	0	0	0	0
“VE”群假单胞菌 (<i>Ps.</i> group “VE”)	6	6	0	6	6	5	0	3 (黄)	6

故可排除嗜麦芽假单胞菌和洋葱假单胞菌。6株“VE”群假单胞菌中,3株能在S-S琼脂平板上生长,根据本鉴定提供的生化项目,不能区分这6株菌是“VE-1”群还是“VE-2”群菌,需要增加其他生化试验项目^[8]进一步区分。

氧化酶(一)、葡萄糖(一)、木糖(一)的菌归入群₂。

在鉴定的165株菌中,有13株菌符合群₂的特征,定为乙酸钙不动杆菌鲁氏变种。它们的共同特征是:细胞色素氧化酶阴性,不分解糖类,无动力,不产生DNA酶和卵磷脂酶,不液化明胶。其中1株产褐色素。

氧化酶(+)、葡萄糖(+)、木糖(+/-)的菌归入群₃。

在鉴定的165株菌中,有114株菌属于群₃。其中铜绿假单胞菌110株,洋葱假单胞菌1株,无色杆菌3株(表3)。

在群₃中,需要同铜绿假单胞菌鉴别的

有荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌、施氏假单胞菌等。110株铜绿假单胞菌为单极毛,能在42℃生长,可与具丛极毛、42℃不生长的荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌相区别。铜绿假单胞菌的淀粉水解酶为阴性,精氨酸双水解酶阳性,麦芽糖通常阴性,可与施氏假单胞菌相区别。无色杆菌在《伯杰氏鉴定细菌学手册》(第八版)中已与产碱菌属合并,但两者对糖的分解力不同,我们沿用 Alexander von Graevenitz 氏等的分类法,将其单独列出。

氧化酶(+)、葡萄糖(一)、木糖(一)的菌归入群₅。

在鉴定的165株菌中,符合群₅特征的有产碱假单胞菌9株,粪产碱菌6株,King氏“IVe”菌3株,不液化莫拉氏菌2株(表4)。

由表4可见,群₅的主要特征是具有氧化酶,不氧化分解糖类。其中产碱假单胞菌与粪产碱菌的区别,在于前者为单极毛,

表 3 铜绿假单胞菌、洋葱假单胞菌、无色杆菌的主要特征

Table 3 Main characteristics of *Ps. aeruginosa*, *Ps. cepacia* and *Achromobacter* sp.

菌名	株数	氧化酶	在麦康开平板上生长	色素	葡萄糖	木糖	硝酸盐还原	S-S平板上生长	42℃生长	动力	鞭毛
铜绿假单胞菌 (<i>Ps. aeruginosa</i>)	110	110	110	74	110	110	110	109	110	110	单极毛
洋葱假单胞菌 (<i>Ps. cepacia</i>)	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	丛极毛
无色杆菌 (<i>Achromobacter</i> sp.)	3	3	3	0	3	3	2	2	2	3	周毛

表 4 群 5 中 20 株菌的鉴别特征

Table 4 Differential characteristics of 20 strains in this group 5 bacteria

菌名	株数	氧化酶	麦康开 平板上 生长	色素	葡萄糖	木糖	硝酸盐 还原	产气	明胶 液化	S-S 平板上 生长	尿素酶 (4 小时)	动力	鞭毛
产碱假单胞菌 (<i>Ps. alcaligenes</i>)	9	9	9	0	0	0	4	0	0	3	0	9	单极毛
粪产碱菌 (<i>Alc. faecalis</i>)	6	6	6	0	0	0	2	0	0	6	0	6	周毛
King 氏 “IVe” 菌 (King’s “IVe” bacteria)	3	3	3	0	0	0	3	3	0	2	3	3	极毛长 侧毛
不液化莫拉氏菌 (<i>Moraxella nonliquefa- ciens</i>)	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	无鞭毛

后者为周生鞭毛。粪产碱菌与 King 氏 “IVe” 菌的区别是,前者尿素酶(4 小时)阴性,后者阳性。不液化莫拉氏菌无鞭毛,无动力,容易与前三种菌相区别。

另外,还有 6 株未能定种的极毛菌,暂列为其他假单胞菌,待继续鉴定。

(四) 抗生素敏感试验

在 165 株菌中,对 9 种抗生素和磺胺嘧啶全部耐药的有 26 株(占 15.8%),均为铜绿假单胞菌。多数菌株对青霉素、链霉素、卡那霉素、金霉素、红霉素、土霉素、氯霉素、四环素和磺胺嘧啶耐药。只有 58.2% 的菌株对庆大霉素敏感。耐药菌株最多的是铜绿假单胞菌、粪产碱菌,最少的是乙酸钙不动杆菌无硝变种和不液化莫拉氏菌。

本文采用的定属和定种相结合的方法,可以鉴定出临床标本中常见的革兰氏阴性不发酵杆菌。在 165 株菌中,已定种的有 159 株(占 96.37%),包括铜绿假单胞菌 110 株,产碱假单胞菌 9 株,洋葱假单胞 1 株,“EV” 群假单胞菌 6 株,King 氏 “IVe” 菌 3 株,乙酸钙不动杆菌无硝变种 6 株,乙酸钙不动杆菌鲁氏变种 13 株,粪产碱菌 6 株,无色杆菌 3 株,不液化莫拉氏菌 2 株。未能定种的 6 株(占 3.63%)。

我国对革兰氏阴性不发酵杆菌的鉴定虽有少数报道^[9],但无系统的鉴定方法。我

们采用的定属和定种相结合的方法,可以用较少的检查项目,在较短时间内将 95% 以上的菌株鉴定到种。因此,我们认为此种鉴定方法可以推广应用。采用 Alexander von Graevenitz 氏等的方法定种,对少数生化性状不典型的菌株,有时难以鉴别。这个问题需要进一步加以研究。

我们鉴定的 165 株菌,绝大多数是由病人分泌物、脓汁、烧伤创面标本分离的。在脓汁中,这些菌是混合感染的病原菌。它们在烧伤病人的创面标本中,几乎经常呈现纯培养。特别值得指出的是,从血液和脑脊液中检出假单胞菌、粪产碱菌和不动杆菌 18 株,占鉴定菌株的 10.9%^[10]。它们都是来自新生儿高烧患者,且多数菌株耐药。尤其是引起烧伤创面感染和菌血症的铜绿假单胞菌、粪产碱菌,对抗生素耐药性很强,势必增加临床治疗上的困难。另外,从医院内环境也检出 6 株假单胞菌,说明这类菌存在的广泛性和造成医院内感染的危险性。因此,今后需要进一步从临床和病原学方面,对于革兰氏阴性不发酵杆菌进行深入研究。

参 考 文 献

[1] 中川圭一: 诊断と治疗, 66(3): 16, 1977.
[2] Владелец В. В. и Х. И. Лехокова Жмди, 8: 7, 1978.

- [3] Шендеров, Б. А. Г. П.: Серкова Жмди, 2: 18, 1979.
- [4] Hugh, R. and E. Leifson: *J. Bacterial*, 66: 24, 1953.
- [5] Cowan, S. T. and K. T. Steel: *Manual for the Identification of Medical Bacteria*, Cambridge University Press, London, 1975.
- [6] Alexander von Graevenitz und Michael Grehn: *Zentralblatt Bakteriell. Parasitenkd Infektionskr. Hyg. I Abt.*, A236 (4): 513—530, 1976.
- [7] 中国科学院微生物研究所细菌分类组: «一般细菌常用鉴定方法», 科学出版社, 北京, 1978。
- [8] Lennette, E. H.: *Manual of Clinical Microbiology* (3rd ed.), American society for Microbiology, Washington, pp. 315—316, 1980.
- [9] 刘桂芝等: 微生物学报, 12(1):1, 1966。
- [10] 富冈一他: 最新医学, 32(8): 7454, 1977。

IDENTIFICATION OF NONFERMENTING GRAM-NEGATIVE BACTERIA AND DETERMINATION OF THEIR SENSITIVITIES TO ANTIBIOTICS

Yang Shufu Xu Dicheng Zhang Huilan
(Harbin Sanitary and Anti-epidemic Station, Harbin)

Yang Suzhen Qiao Qiuping Huang lingyi
(Harbin 5th Hospital, Harbin)

Identification of 165 strains of nonfermenting gram-negative bacteria isolated from patients and hospital internal environment and determination of their resistance to common antibacterial drugs are reported. The results showed that the 165 strains belong to five genera: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Achromobacter* and *Alcaligenes*. Most of the strains are resistant to antibacterial drugs.

According to the method and procedure of identification, it is suggested that there is close relation between these bacteria and clinical infection and that the difficulties for treatment of infection are related to that these strains are resistant to certain antibacterial drugs.

Key words

Nonfermenting gram-negative bacteria; Antibiotics