

从一例多细菌协同性坏疽的标本中分离到肉杆菌细菌*

徐建国 杨红梅 吴纪民 赖心河 刘秉阳

(中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所卫生部分子医学细菌学重点实验室 北京 102206)

提 要:从一例多细菌协同性坏疽患者的临床标本中分离到了一株革兰氏阳性杆菌 Y6 菌株,使用常规方法不能鉴定,通过 16S rDNA 序列分析和同源性检索发现 Y6 菌株 16S rDNA 与肉杆菌属的同源性较高,为 93%~97%。其中 16S rDNA 的特征序列也和肉杆菌属的相同。其它性状也和肉杆菌属的特征相似,但和已经报道的种有明显区别。因此认为 Y6 菌株可能是肉杆菌属的一个新种,暂命名为肉杆菌样细菌。

关键词:肉杆菌,多细菌协同性坏疽,16S rDNA

中图分类号:Q939 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209(2000)01-0021-25

山东省姑娘杨晓霞所患的“怪病”被诊断为多细菌协同性坏疽^[1,2]。从患者的临床标本中共分离鉴定了 8 种细菌:包括溶齿放线菌(*Actinomyces odontolyticus*)、迟缓优杆菌(*Eubacterium lentum*)、延展消化链球菌(*Peptostreptococcus productus*)、低酸链球菌(*Streptococcus acidominimus*)、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和使用常规细菌学方法不能鉴定的 Y6 和 YP 菌株^[1,2,3]。血清流行病学调查和病史分析表明,疾病发生可能和患者曾经用针挑破手指后在某池塘中洗过衣服有关^[4]。从患者发病前曾经洗过衣服的湾水、门前湾水和居住的环境标本里分离到了多株能和患者血清发生明显凝集的细菌,说明此例多细菌协同性坏疽与环境相关的因素不能排除^[5]。研究提示 Y6 和 YP 菌株可能与患者生活环境有关,Y6 菌有可能来源于池塘水中,作为最初病原菌的可能性较大^[1,2]。本文使用分子生物学方法对 Y6 菌株进行了鉴定。

1 材料和方法

1.2 菌株

Y6 菌株由北京友谊医院检验科提供。1995 年从患者左手中指坏疽部位和正常皮肤之间的组织标本中分离。

1.2 培养基

BHIA 血琼脂培养基:取心脑浸液粉[DIFCO 公司产品]37g/L,0.2% 葡萄糖,8Pa 30 min,高压火菌。凉至 55℃ 后加入 5% 脱纤维兔血,制成血平板。PYG 肉汤:蛋白胨 1.5 g,酵母粉 10 g,盐酸半胱氨酸 0.5 g。

* 国家自然科学基金杰出青年基金和国家自然科学基金面上项目资助(39625001,39640001)

作者简介:徐建国(1952-),男,山西省平陆县人,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所研究员,博士,主要从事致泻性大肠杆菌等医学细菌学的研究

收稿日期:1998-09-25, **修回日期:**1999-03-02

1.3 细菌的形态学特征和生化反应

细菌的形态学特征使用常规方法。细菌的生化反应使用美国 Biologo 公司[Biologo Inc. Hayward, CA, USA]的革兰氏阳性细菌鉴定系统[GP Microplate]进行,使用 Biologo Micro Station system 3.50 软件分析。细菌代谢产物使用裂解气相色谱分析方法[日本岛津气相色谱仪 GC-7AG]。使用 48h 的细菌 PYG 肉汤培养物,测定细菌的非挥发性脂肪酸[NVFA]和挥发性脂肪酸。

1.4 细菌的 G + C mol% 的测定和 16S rDNA 序列分析

G + C mol% 的测定采用热变性法进行。为获得细菌的 16S rDNA,合成了细菌 16S rDNA 的通用引物。使用 PCR 方法获得的 1.5kb 的 16S rDNA。根据所获得的序列设计第二对引物,进行 PCR 和序列分析。序列分析使用美国 Applied Biosystems 公司 373A 型的 DNA 自动序列分析仪,从 DNA 链的正、反两个方向分析。为了避免 PCR 错配引起的误差,同时将两份独立的 PCR 产物进行测序。在可读范围内,将两次试验的结果进行比较。将所获得的 DNA 序列,使用 INTERNET 网对 Genbank 等核苷酸序列资料库进行了同源性检索(1998 年 9 月)。

2 结果

2.1 菌株的分纯

将友谊医院送检的 Y6 菌株,用 BHIA 血琼脂分离,37℃ 厌氧培养 10d 后未见细菌生长。从原始平皿和转种平皿划线处取菌,革兰氏染色后镜检,发现有革兰氏阳性杆菌,菌体弯曲,菌丝长,有时呈打结状,总体印象呈蒙古文状。该菌在 30℃ 生长,37℃ 不生长。

2.2 细菌的形态

Y6 菌株在 BHIA 血琼脂上 30℃ 培养 48 h 后,菌落呈圆形、光滑、边缘整齐、润泽、灰白色、有光泽。培养 18 d 后,菌落呈黄色,中心呈深褐色,边缘不整齐,干燥,有皱折。个别菌株出现溶血现象。在 BHIA 血琼脂上 30℃ 培养 48 h,菌体染色均一,偶见丝状菌体,长度可达 10 μm 以上,培养 20 d,出现少量的革兰氏阴性菌体。镜下可见菌丝,菌丝弯曲、长、并折叠成环、互相扭结(图 1-A)。将呈现丝状菌体的菌落传种到新鲜 BHIA 血琼脂上,30℃ 培养 48 h,形态可恢复至杆状,偶见丝状体,未见扭结状和弯曲状菌体(图 1-B)。取大量培养物接种于 BHIA 血琼脂上,37℃ 培养 48 h,在划线处取菌镜检,可见革兰氏阳性蒙古文状菌体。在 PYG 肉汤 30℃ 培养 48 h 后,未见明显混浊,管底有絮状沉淀,其代谢产物主要为乳酸,偶见少量琥珀酸和乙酸。

2.3 代谢特点

生化反应不活跃。30℃ 培养 48~72 h 后观察,微弱发酵葡萄糖、麦芽糖、纤维二糖、乳糖。触酶阴性。需氧生长,在厌氧条件下生长缓慢。对溶菌酶敏感。根据伯杰氏细菌学分类手册所描述的鉴定特点,不能够鉴定。

2.4 Y6 菌株染色体的 G + C mol% 和 16S rDNA 序列分析

G + C mol% 为 33.7。对 Y6 菌株进行了 16S rDNA 的序列分析。该序列已经送交 GENE BANK,查询号码为 AF113133(图 2)。将获得的资料用电子计算机进行同源性检索,Y6 菌株和肉杆菌属(*Carnobacterium*) 6 个种的同源性在 97.2% 和 93% 之间(表 1)^[6,7]。菌

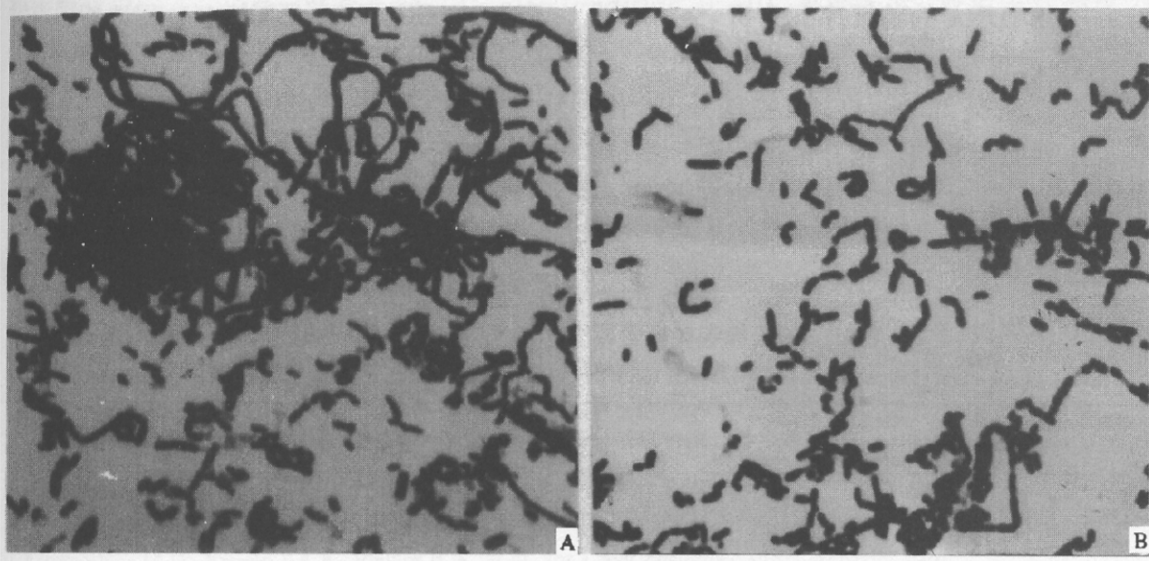


图 1 Y6 菌株的形态特征

Fig.1 Morphological features of Y6 strain

A. 20 days culture on BHI blood agar at 30°C (1×1000); B. 24 h culture of Y6 strain on BHI blood agar at 30°C (1×1000).

1	AACGGTTTCG	GCATGCCTAA	TACTTGCTAG	TCGAACGCTT	TGATTTACAC	GGGTGCTTGC
61	ACCCACCGAA	GTCAAAGAGT	GGCGGACGGG	TGAGTAACAC	GTGGGTAACC	TGCCCATAAG
121	AGGGGGATAA	CATTTCGAAA	CGGATGCTAA	TACCGCATAC	TTCTAATCGC	CTCCTGGCGA
181	ATGGAAAAAA	GGTGGCTTCG	GCTACCGCTT	ATGGATGGAC	CCGCGGCGTA	TTAGTACTTT
241	GGTGAGGTAA	TGGCTCACCA	AGGCGATGAT	ACGTAGCCGA	CCTGAGAGGG	TGATCGGCCA
301	CACTGGGACT	GAGACACGGC	CCAGACTCCT	ACGGGAGGCA	GCAGTAGGGA	ATCTTCCGCA
361	ATGGACGAAA	GTCTGACGGA	GCAATGCCGC	GTGAGTGAAG	AAGGTTTTCG	GATCGTAAAA
421	CTCTGTTGTT	AGAGAAGAAC	AAGGATGAGA	GTAAGTGTCT	ATCCCCTGAC	GGTATCTAAC
481	CAGAAAGCCA	CGGCTAACTA	CGTGCCAGCA	GCCGCGGTAA	TACGTAGGTG	GCAAGCGTTG
541	TCCGATTATA	TTGGGCGTAA	AGCGAGCGCA	GGCGGGTTCT	TTAAGTCTGA	TGTGAAAAGCC
601	CCCGGCTCAA	CCGGGGAGGG	TCATTGGAAG	CTGGAGAACT	TGAGTGCAGA	AGAGGAGAGT
661	GGAATTCCAC	GTGTAGCGGT	GAAATGCGTA	GATATGTGGA	GAACACCAAGT	GGCGAAGCGA
721	CTCTCTGGTC	TGTAAGTGAC	GCTGAGGCTC	GAAAACCGTG	GGAAGCAAAC	AGGATTAGAT
781	ACCCCTGGTAG	TCCACGCCGT	AAACGATGAG	TGCTAAGTGT	TGGAGGGTTT	CCGCCCTTCA
841	GTGCTGCACT	AACGCATTAA	GCACTCCGCC	TGGGGAGTAC	GACCGCAAAGG	TTGAAACTCA
901	AAGGAATTGA	CGGGGACCCG	CACAAGCCGT	GGAGCATGTG	GTTTAATTCTG	AAGCAACGCCG
961	AAGAACCCTTA	CCAGGTCTTG	ACATCCTTTG	ACCACTCTAG	AGATAGAGCT	TTCTTTCGGG
1021	GACAAAGTGA	CAGGTGGTGC	ATGGTTGTCTG	TCAGCTCGTG	TCGTGAGATG	TTGGGTTAAG
1081	TCCCGCAACG	AGCGCAACCC	CTATTATTAG	TTGCCAGCAT	CAGTTGGGCA	CTCTAGTGAG
1141	ACTGCCGGTG	ATAAACCGGA	GGAAGGTGGG	GATGACGTCA	AATTATCATG	CCCCTTATGA
1201	CCTGGGCTAC	ACACGTGCTA	CAATGGATGG	TACAACGAGT	CGCAAGGTCTG	CGAGGCCAAG
1261	CTAATCTTTT	AAAGCCATTTC	TCAGTTCGGA	TTGTAGGCTG	CAACTTGCCCT	ACATGAAGCC
1321	GGAATCGCTA	GTAATCGCGG	ATCAGCACGC	CGCGGTGAAT	ACGTTCCCGG	GTCTTTGTACA
1381	CACCGCCCGT	CACACCACGA	GAGTTTGATA	CACCCGAAGT	CGGTGAGGTA	ACCTTTTTCG
1441	GAGCCAGCCG	CCTAAGGTGG	GACAGATAAT	TGGGGTGAAG	TCGTAACAAG	GTAGCCGT

图 2 Y6 菌株 16S RRNA 序列(GeneBank 查询号码 AF113133)

Fig.2 The 16S ribosomal RNA gene sequence of Y6 strain(GeneBank accession number:AF113133)

株同源性高达 97.2% 的种是 *C. alterfundirum*。和 Y6 菌株 16S rDNA 同源性高达 90% 的细菌还有乳酸杆菌、肠球菌的一些种^[8]。

2.5 16S rDNA 的特征序列分析

Y6 菌株和肉杆菌 16S rDNA 的特征序列比较见表 2。除 443 位碱基外,其它特征序列完全相同。肉杆菌的其它一些种的 443 位碱基也和共有序列有差异^[9]。

表 1 Y6 菌株和肉杆菌属的 16S rDNA 的同源性

Table 1 Similarity of 16S rDNA sequence between Y6 strain and the species of *Carnobacterium*

Y6 strain	Similarity/ %
<i>C. alterfunditum</i>	97
<i>C. funditum</i>	96
<i>C. mobile</i>	93
<i>C. pisiola</i>	95
<i>C. gallinarum</i>	95
<i>C. divergens</i>	95

表 2 Y6 菌株和肉杆菌属 16S rDNA 的特征序列的比较

Table 2 Comparison of signature nucleotide between 16S rDNA sequence of Y6 strain and that of the species of *Carnobacterium*

Position(s)	Y6	Genus <i>Carnobacterium</i>	<i>C. alterfunditum</i>	<i>C. divergens</i>	<i>C. galliarum</i>	<i>V. fluvialis</i>
69	C	C	T	C	C	C
156	U	U	U	U	U	U
166	A	A	A	A	A	G
210	C	C	C	C	C	T
* 310, 377	C, G	C, G	C, G	C, G	C, G	C, G
433, 491	U, A	A, A	A, A	A, A	A, A	A, A
456	G	G	G	G	G	G
458 - 459	AU	AU	AU	AU	AU	GG
474 - 475	AU	AU	AU	AU	AU	AU
592, 647	U, A	U, A	U, A	U, A	U, A	U, G
614, 626	C, G	C, G	C, G	C, G	C, G	C, G
846	G	G	G	G	G	G
1152	G	G	G	G	G	G
1256	U	U	U	U	U	U
1278	U	U	U	U	U	U
1482	A	A	A	NA	NA	NA

* : The nucleotides of all species of *Carnobacterium* are identical; NA: Not available.

3 讨论

使用普通细菌学方法证明 Y6 菌株为革兰氏阳性杆菌,兼性生长,在有氧条件下生长较好。在 30℃ 时生长良好,在 37℃ 条件下不生长,BHI 肉汤的培养物,菌体一端膨大,单个或成对排列,也可排列成 Y 状、V 状(图 1-B)。在 BHIA 血琼脂上 30℃ 培养 20d 后,有大量的菌丝形成(图 1-A)。气相色谱分析表明其代谢产物主要是乳酸,有少量乙酸和琥珀酸。G + C mol% 比值为 33.7。使用常规的细菌学鉴定方法,对 Y6 菌株不能作出明确的鉴定。使用能分析 95 种生化反应的美国 Biologo 公司的革兰氏阳性细菌鉴定系统 Biologo GP Microplate 对 Y6 菌株进行了研究,发现 Y6 菌株的生化反应能力较差,不能够鉴定。

为了明确 Y6 菌株的分类学位置,我们使用 PCR 方法获得了 Y6 菌株的 16S rDNA 片段,对其进行了序列分析(图 2)。将获得的 16S rDNA 的序列进行同源性检索,发现和 Y6 菌株的 16S rDNA 同源性最高的属是肉杆菌属(表 1)。肉杆菌属的不同种之间的同源性多在 96% ~ 98% 之间^[10]。Y6 菌株与肉杆菌属的相同点有:革兰氏阳性杆菌,以乳酸为主要代谢产物,不产芽胞,G + C mol% 为 33,触媒阴性^[11]。Y6 菌株的 16S rDNA 的特征序列也和肉杆菌属的相同(表 2)。在肉杆菌属中,和 Y6 菌株的 16S rDNA 同源性最高的是 *C. alterfunditum*。*C. alterfunditum* 是从南极的一个湖里分离到的。但是,Y6 菌

株和 *C. alterfunditum* 明显不同。*C. alterfunditum* 在 30℃ 不能生长, 最适生长温度为 22℃~23℃, 而 Y6 菌株在 30℃~35℃ 可以生长, 最适生长温度为 30℃^[8]。将从美国 ATCC 购买的 *C. alterfunditum* 模式株和 Y6 菌株进行比较, 发现它们之间在菌落形态、菌体形态、生长特性、生化反应等方面有明显的区别, 不是一个种。Y6 菌株有可能是肉杆菌属中的一个新种。肉杆菌属是 1987 年才命名的一个新的属, 多从鱼、水、真空包装的肉类标本中分离到, 部分种对鱼等有致病性, 目前还没有从临床标本分离的报道^[10]。

参 考 文 献

- [1] 徐建国, 赖心河, 付晓丽, 等. 科学通报, 1997, 42: 426~429.
- [2] Xu Jianguo, Lai Xinhe, Yang Hongmei, et al. Chinese Science Bulletin, 1997, 42(6): 511~515.
- [3] 徐建国, 赖心河, 付晓丽, 等. 中华微生物学和免疫学杂志, 1997, 17(4): 239~243.
- [4] 杨红梅, 徐建国. 中国流行病学杂志, 1997, 18(1): 22~25.
- [5] 徐建国, 赖心河, 付晓丽, 等. 中国人兽共患病杂志, 1997, 13(5): 179~181.
- [6] Collins M D, Farrow J A E, Phillips B A, et al. Int J Syst Bacteriol, 1987, 37: 310~316.
- [7] Stiles, M E, Holzapfel W H. Int J Food Microbiol, 1997, 36: 1~29.
- [8] Franzmann P D, Hopfl P, Weiss N, et al. Arch Microbiol, 1991, 156: 255~262.
- [9] Wallbanks S, Martinez Murcia A J, Fryer J L, et al. Int Syst Bacteriol, 1990, 40: 224~230.
- [10] Champomier M C, Montel M C, Talon R. J Gen Microbiol, 1989, 135: 1391~1394.
- [11] Baya A M, Toranzo A E, Lupiani B, et al. Appl Environ Microbiol, 1991, 57: 3114~3120.

A CARNOBACTERIUM-LIKE ORGANISM ISOLATED FORM A PATIENT WITH MULTIPLE BACTERIAL SYNERGISTIC GANGRENE

Xu Jianguo Yang Hongmei Wu Jimin Lai Xinhe Liu Bingyang

(Priority Laboratory of Molecular Medical Bacteriology, Ministry of Health, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy for Preventive Medicine, Beijing 102206)

Abstract: An atypical lactic-acid producing gram positive rod Y6 strain was studied in this report, which was isolated from clinic sample of a patient with multiple bacterial synergistic gangrene, and could not be identified by routine method. A 1.5kb of 16S rDNA of Y6 strain was synthesized and sequenced. Comparative 16S rDNA sequence analyses revealed that strain Y6 is most closely related to the genus of *Carnobacterium*. The overall similarity value between Y6 strain and *Carnobacterium* species are 93% to 97%. The signature nucleotides in 16S rDNA primary sequence of strain Y6 and that of genus of *Carnobacterium* were identical. The biological features of Y6 strain are very similar to that of *Carnobacterium*, such as lactic acid as main end product of in PYG broth, no gas produced from fermentation of glucose, catalase negative, no motility. Data suggested that Y6 strain is very similar to the genus of *Carnobacterium*, of which no strain has been isolated from clinical sample so far. Based on the results obtained, we name Y6 strain as *Carnobacterium-like organism*.

Key words: *Carnobacterium*, Multiple bacterial synergistic gangrene, 16S rDNA