

空肠弯曲菌生物学特性上的一些歧异*

吴 润 刘 岗

(甘肃农业大学动物医学系 兰州 730070)

摘 要: 对 195 例不同年龄腹泻患者的粪便、690 只健康和腹泻畜禽的直肠和泄殖腔拭子及 108 份腹泻死亡畜禽的脏器材料进行了空肠弯曲菌培养,共分离鉴定 458 株弯曲菌(其中空肠弯曲菌 445 株、结肠弯曲菌 13 株)就其一些生物学特性进行了观察,采用 Lior 生物学分型法进行了 354 株弯曲菌(空肠弯曲菌 352 株、结肠弯曲菌 2 株)的分型。虽然表明绝大多数生物学性状符合已有文献描述,但也发现在形态、培养和生理生化特性及抗菌药抗性上存有一些歧异,其中最为主要的是 48.3%(215/445)的空肠弯曲菌和 23.1%(3/13)的结肠弯曲菌有萘啶酮酸抗性,1.1%(5/445)的空肠弯曲菌和 7.6%(1/13)的结肠弯曲菌有噻孢霉素抗性,抗菌药抗性与菌株来源有关($P < 0.005$)。352 株空肠弯曲菌生物学分型结果表明在这些动物体内生物型 I(40.9%)和 II(58.2%)占优势,同一动物体内可有该菌的 2 个生物型分布。

关键词: 空肠弯曲菌,生物学特性,生物型,歧异

中图分类号:R37 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2000)05-0453-58

空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)是一种人兽共同感染的病原菌^[1],自 1931 年首次发现并命名为空肠弧菌(*Vibrio jejuni*),1964 年又称其为肝炎弧菌(*Vibrio hepaticus*),1973 年再将其命名为空肠弯曲菌(*Campylobacter jejuni*)^[2]。在伯杰氏手册(1974)^[2]中,Smibert 将其划归弯曲菌属的胎儿弯曲菌空肠亚种(*C. fetus* subsp. *jejuni*),该亚种包括对萘啶酮酸敏感的由 Veron 和 Chatelain 命名为空肠弯曲菌(*C. jejuni*)、结肠弯曲菌(*C. coli*)的弯曲菌和 King 所发现的嗜热性相关弧菌^[3]。在 1984 年出版的伯杰氏手册^[4]中,Smibert 又将空肠弯曲菌和结肠弯曲菌列为两个独立的种,区分两者最可靠得试验是马尿酸钠水解试验,DNA 同源性的研究也表明它们至少为两个种,并将分自海鸥的抗萘啶酮酸嗜热弯曲菌暂列于空肠弯曲菌。1991 年 Vandamme 等在国际系统细菌学杂志上报道空肠弯曲菌可分为空肠亚种(*C. jejuni* subsp. *jejuni*)和多氏亚种(*C. jejuni* subsp. *doylei*)^[5]。国内自 80 年代开始,虽对该菌进行了大量研究,但在该菌形态和培养特性以及主要鉴定性状上未发现存有某些差异,而我们在该菌的研究中发现了一些歧异。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基: 本试验所用各类培养基均按文献[6,7]介绍方法配制。

1.1.2 菌株: 空肠弯曲菌(ISA92006)、金黄色葡萄球菌(C56002)、牛病沙门氏菌、大肠埃希氏菌(44572)和枯草杆菌,均为本研究室保存菌种。空肠弯曲菌 ISA92006 株是鸡源菌,曾由

* 国家自然科学基金资助项目(39570539)

作者简介:吴润(1958-),男,甘肃定西人,甘肃农业大学动物医学系副教授,从事兽医微生物学与免疫学研究

收稿日期:1999-07-26,修回日期:1999-12-03

本室以标准菌株(22012-2 北京药品生物制品检定所提供)为对照菌进行了鉴定。

1.1.3 抗菌药和药片制备 萘啶酮酸(Nalidixic acid, Sigma), 噻孢霉素(Cefotaxime, Serva), 购自华美生物工程公司; 头孢必(Cefobid, 辉瑞制药有限公司), 头孢菌素 V(哈尔滨制药二厂), 头孢菌素 VK(Cephadrine, 深圳凯程医药化工有限公司), 购自兰州市医药公司。经测定直径 6mm 的滤纸药片每 150 片吸水 1 mL, 按溶解要求分别配制各抗菌药溶液(4.5 mg/mL), 再制备各抗菌药滤纸片(30 μ g/片), 置 37 $^{\circ}$ C 烘干, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.1.4 被检动物和人 兰州市安宁区建国养殖场伊沙褐蛋鸡和伊沙褐后备蛋鸡, 甘肃省计委农业综合开发基地试验农场断奶仔猪, 天祝种羊场羔羊, 天祝种羊场和天祝县石门乡牦牛犊以及兰州医学院附属二院和甘肃省人民医院门诊就诊的不同年龄腹泻患者。

1.2 方法

1.2.1 检样的采取 用灭菌棉拭子从被检动物肛门或泄殖腔擦拭取样, 或蘸取病人的粪样, 以无菌法剖检腹泻死亡蛋鸡和仔猪并采取各脏器检样, 取样过程应保证无交叉污染。

1.2.2 分离培养和鉴定 空肠弯曲菌分离培养和鉴定所使用的分离培养方法及各项生化鉴定试验, 按文献[6]所述方法并参照伯杰氏手册(1984)[4]进行。

1.2.3 药物敏感性试验 按文献[8]所述方法, 以滤纸片扩散法进行新分离鉴定弯曲菌的药敏定性试验, 并以本室保存的各菌种为对照。再随机抽取不同动物来源的空肠弯曲菌 120 株(鸡源菌 82 株、猪源菌 30 株、羊源菌 6 株、牦牛源菌和人源菌各 1 株), 其中经滤纸片扩散法测定萘啶酮酸敏感菌 64 株、抗性菌 56 株, 以固体培养基稀释法进行萘啶酮酸最低抑菌浓度(Minimal inhibition concentration, MIC)的测定。

1.2.4 生物学分型 以 Lior 法[7]对所分离鉴定的 354 株弯曲菌和空肠弯曲菌 ISA92006 株进行了生物学分型, 并以金黄色葡萄球菌作为 DNA 水解试验、牛病沙门氏菌作为快速 H₂S 试验的对照菌。

2 结果和讨论

2.1 形态特征与培养特性

空肠弯曲菌分离菌株的大多数具有新月形、S 形和鸥翅状的革兰氏阴性小杆菌特征, 个别呈螺旋状, 老龄菌易成球形, 特别是初次分离的 48h 培养物也常见着色不均的球形。菌体形态与菌落形态无关。在 Camp-BAP 血平板上微需氧培养 48h 后可形成两种类型的菌落。一种是扁平, 灰色不闪光, 半透明, 大小不均, 形状不规则, 边缘不整齐, 菌落沿划线的方向扩散和趋于密集连片生长; 另一种为圆形, 边缘整齐, 直径 1~2mm, 隆起, 光滑, 灰白色带有闪光的菌落。均不溶血。在初次分离培养时和传代培养中, 两种类型的菌落均可生成, 形成何种类型的菌落与菌株无关, 而与固体培养基表面的湿度有关, 培养基湿润时易形成扩散和融合成片状的菌落甚至呈薄膜状生长, 干燥时形成圆形的单个菌落。此外, 该菌初次分离培养时也见有土黄色或个别呈污粉红色、半透明的单个或片状菌落, 单个菌落直径可达 2~4mm, 边缘常不整齐。在布氏半固体中呈微需氧生长。在改良布氏肉汤中呈混浊生长, 不形成菌膜、菌环, 可形成粘稠沉淀物。

2.2 生理生化特性

458 株所分弯曲菌均为氧化酶和过氧化氢酶阳性, 在 42 $^{\circ}$ C 培养可生长, 而在 25 $^{\circ}$ C 不生长, 在 3.5% NaCl 培养基中不生长, 在 10% 甘氨酸培养基中可生长, TTC 试验阳性(产生

红色菌落),在硫化氢培养基和 TSI 培养基中未见 H_2S 产生但以醋酸铅纸条法均可测得,可在 TSI 斜面微弱生长,其斜面和底层呈碱性/碱性(K/K)反应,马尿酸钠水解试验 445 株弯曲菌呈阳性、13 株弯曲菌为阴性。此外,有一些菌株的马尿酸钠水解特性需经几次测定才能确定,也有一些菌株在血平板上经几次传代适应后才可在 1% 甘氨酸培养基中生长。

2.3 药物敏感性

空肠弯曲菌 ISA92006 株对萘啶酮酸和噻孢霉素敏感,而对头孢必、头孢菌素 V 和头孢菌素 VI 有抗性,枯草杆菌、大肠埃希氏菌和牛病沙门氏菌对这些抗菌药均敏感,但金黄色葡萄球菌对萘啶酮酸有抗性而对其它 4 种抗生素敏感。

458 株弯曲菌均对 3 种头孢类抗生素有抗性,但对萘啶酮酸(Na)和噻孢霉素(Ct)的敏感性差异较大。由表 1 可见 445 株水解马尿酸钠的细菌中 227 株细菌为 $Na^S Ct^S$ 、213 株 $Na^R Ct^S$ 、3 株 $Na^S Ct^R$ 和 2 株 $Na^R Ct^R$,不同来源菌株的药敏性类型差异极显著($P < 0.005$)。虽然药敏性类型以 $Na^S Ct^S$ 和 $Na^R Ct^S$ 为主(98.9%),但这两类型细菌在蛋鸡和仔猪中的分布有差异($P < 0.001$),健康蛋鸡和腹泻仔猪以 $Na^R Ct^S$ 菌株为多,腹泻蛋鸡以 $Na^S Ct^S$ 菌株为多,而在牦牛源菌中无差异($P > 0.2$);13 株不水解马尿酸钠细菌中未发现不同来源菌株的药敏性类型分布上的差异($P > 0.5$)。就萘啶酮酸抗性(Na^R)而言,水解马尿酸钠菌中的 Na^R 菌株,腹泻仔猪菌为 77.7%(136/175),健康蛋鸡源菌为 62.8%(71/113),腹泻蛋鸡源菌为 0.8%(1/133)和牦牛源菌为 41.2%(7/17),不同来源菌株的萘啶酮酸抗性差异极显著($P < 0.005$);不水解马尿酸钠菌中的 Na^R 菌株,猪源菌为 40.0%(2/5),鸡源菌为 12.5%(1/8),不同来源菌株的萘啶酮酸抗性差异不显著($P > 0.2$)。

表 1 弯曲菌各菌株对萘啶酮酸和噻孢霉素的敏感性

Table 1 Sensitivity of *Campylobacter* strains to nalidixic acid and cefotaxime

Source	No. strain	Hippurate hydrolysis	No. positive/%			
			$Na^S Ct^R$	$Na^S Ct^S$	$Na^R Ct^S$	$Na^R Ct^R$
Healthy laying hens	113	+	3(2.7)	39(34.5)	71(62.8)	— ^a
Diarrheic laying hens	133	+	—	13(9.2)	1(0.8)	—
Diarrheic piglets	175	+	—	3(2.3)	13(7.6)	3(1.1)
Yak calves	17	+	—	1(5.8)	7(41.2)	—
Lambs	6	+	—	6(100.0)	—	—
Diarrheic patients	1	+	—	1(100.0)	—	—
Total	445	+	3(0.7)	227(51.0)	213(47.9)	2(0.4)
Laying hens	8	—	1(12.5)	6(75.0)	1(12.5)	—
Piglets	5	—	—	3(60.0)	2(40.0)	—
Total	13	—	1(7.7)	9(69.2)	3(23.1)	—

Note: Na^S Nalidixic acid susceptible, Na^R Nalidixic acid resistance; Ct^S Cefotaxime susceptible, Ct^R Cefotaxime resistance; ^aNo detection

萘啶酮酸 MIC 的测定(64 株萘啶酮酸敏感菌的 $MIC \leq 16 \mu g/mL$ (MIC 为 $16 \mu g/mL$ 者 17 株、 $8 \mu g/mL$ 者 39 株、 $4 \mu g/mL$ 者 7 株和 $2 \mu g/mL$ 者 1 株),56 株抗性菌的 $MIC \geq 64 \mu g/mL$ (MIC 为 $64 \mu g/mL$ 者 4 株、 $128 \mu g/mL$ 者 39 株和 $128 \mu g/mL$ 以上者 13 株)。

依据文献 4、5 所述弯曲菌的鉴定特征和各菌株的鉴定结果,可将 445 株水解马尿酸

钠的细菌确定为空肠弯曲菌, 13 株不水解马尿酸钠的细菌确定为结肠弯曲菌(*C. coli*), 未发现海鸥弯曲菌(*C. lari*)。

2.4 生物学分型与其分布

以对照菌对 Lior 生物学分型法各项试验进行测试, 金黄色葡萄球菌 DNA 水解试验阳性, 牛病沙门氏菌快速 H₂S 试验阳性, 空肠弯曲菌 ISA92006 株马尿酸钠水解和 DNA 水解试验阳性划归生物型 II。由表 2 可见, 352 株不同来源的空肠弯曲菌中生物型 I、II、III 和 IV 分别为 40.9%、58.2%、0.3% 和 0.6%。2 株结肠弯曲菌中生物型 I 和 II 各 1 株。

表 2 弯曲菌各菌株的生物学分型结果

Table 2 Results of biotyping of *Campylobacter* strains

Source	<i>C. jejuni</i>				<i>C. coli</i>			
	No. strain	I ^a	II	III	IV	No. strain	I	II
Healthy laying hens	100	65(65.0) ^b	32(32.0)	1(1.0)	2(2.0)	— ^c	—	—
Diarrheic laying hens	131	68(51.9)	63(48.1)	—	—	—	—	—
Diarrheic piglets	114	11(9.6)	103(90.4)	—	—	2	1(50.0)	1(50.0)
Lambs	6	—	6(100.0)	—	—	—	—	—
Diarrheic patients	1	—	1(100.0)	—	—	—	—	—
Total	352	144(40.9)	205(58.2)	1(0.3)	2(0.6)	2	1(50.0)	1(50.0)

Note: ^aBiotype; ^bNo. positive(%); ^cNo detection

空肠弯曲菌各生物型在不同动物中的分布差异极显著 ($P < 0.005$), 其中以生物型 I 和 II 为主(99.1%), 健康蛋鸡源菌的生物型 I(65.0%) 多于生物型 II(32.0%), 腹泻蛋鸡源菌的生物型 I(51.9%) 和 II(48.1%) 相当, 腹泻仔猪源菌则以生物型 II(90.4%) 多于生物型 I(9.6%), 绵羊源菌和人源菌仅检出生物型 II, 这两型菌在健康蛋鸡和腹泻仔猪中的分布差异极显著 ($P < 0.001$)。另外, 还发现同时检出生物型 I 和 II 菌的动物 49 只(其中蛋鸡 40 只, 仔猪 9 只) 检出生物型 II 和 IV 的蛋鸡 1 只。

2.5 生物型与药敏性的相关性

由表 3 可见, 生物型 I 菌以 Na^S Ct^S 菌株的比例(57.6%) 高于 Na^R Ct^S 菌株(40.3%), 生物型 II 菌以 Na^R Ct^S 菌株的比例(55.6%) 高于 Na^S Ct^S 菌株(42.9%), 生物型 I 和 II 菌的药敏性类型差异显著 ($P < 0.05$), 但各生物型间的药敏性类型差异不显著 ($P > 0.25$)。

表 3 空肠弯曲菌生物型与药敏性的关系

Table 3 Relationship between biotypes and susceptibility of *C. jejuni*

Biotype	Susceptibility types				Total
	Na ^S Ct ^R	Na ^S Ct ^S	Na ^R Ct ^S	Na ^R Ct ^R	
I	2(1.4) ^b	83(57.6)	58(40.3)	1(0.7)	144
II	2(1.0)	88(42.9)	114(55.6)	1(0.5)	205
III	— ^b	1(100.0)	—	—	1
IV	—	2(100.0)	—	—	2
Total	4(1.1)	174(49.4)	172(48.9)	2(0.6)	352

Note: Na^S Nalidixic acid susceptible, Na^R Nalidixic acid resistance; Ct^S Cefotaxime susceptible, Ct^R, Cefotaxime resistance; ^a No. positive/%; ^b No detection

3 讨论

3.1 生物学特性的异同

445 株空肠弯曲菌的形态特征、培养特性和生理生化特性基本与有关文献^[2,4-7,9-12]记述相似,但也发现一些未见记载的差异,主要是:初次分离培养的幼龄菌常见呈着色不均的球形,初次分离培养时也见有土黄色或污粉红色、半透明的单个或片状菌落,单个菌落直径可达 2~4mm,边缘常不整齐,部分菌株马尿酸钠水解特性不稳定,需经多次试验才能测得,部分菌株需经多次在血平板上传代适应后才在 1% 甘氨酸培养基中生长;48.3%(215/445)的菌株对萘啶酮酸有抗性,1.1%(5/445)的菌株对噻孢霉素有抗性。

有人^[5]将空肠弯曲菌分为空肠亚种和多氏亚种,所测 445 株空肠弯曲菌对萘啶酮酸和噻孢霉素敏感性差异较大,药敏性符合空肠亚种者仅 3 株,符合多氏亚种者有 227 株,但 227 株菌在 42℃ 可生长这又与多氏亚种不符,215 株菌具有萘啶酮酸抗性与两亚种都不符。具有萘啶酮酸抗性这也与伯杰氏手册^[4]对空肠弯曲菌的描述不符。空肠弯曲菌具有萘啶酮酸抗性,在国内的一些相关研究^[6,9,10]中未曾发现,但国外有文献^[7]报道 3.7% 的空肠弯曲菌对萘啶酮酸有抗性、1.8% 的结肠弯曲菌有抗性,并认为因以萘啶酮酸敏感性作为鉴定空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的一个特性,一些实验室可能将这些萘啶酮酸抗性菌株错误地抛弃。本研究发现这么多的萘啶酮酸抗性菌株,揭示萘啶酮酸和噻孢霉素敏感性试验可否作为弯曲菌鉴定的依据是值得深思的问题,这需通过对萘啶酮酸敏感性遗传机制探讨,并与标准菌株进行 DNA 同源性分析和相关表型性状比较才能确定。

鉴定弯曲菌要进行头孢菌素 I 的敏感性试验^[4],本研究测定 458 株弯曲菌(包括空肠/结肠弯曲菌)对头孢必、头孢菌素 V 和头孢菌素 VI 均有抗性,这与空肠/结肠弯曲菌抗头孢菌素 I 的结果吻合,但能否替代头孢菌素 I 还需与其它弯曲菌进一步试验。

3.2 生物型分布

352 株空肠弯曲菌可划分为 I~IV 4 个生物型,其中以生物型 I(40.9%)和 II(58.2%)为主,这与已有文献^[7,10-12]报道相似。生物型 I 和 II 在不同动物中的分布与动物健康状况有关,健康蛋鸡以生物型 I 为主,而腹泻畜禽则生物型 II 分布比例升高或以其为主。另外,在同一动物体内发现有 2 个生物型的空肠弯曲菌分布,至今未见报道。

3.3 生物型、菌株来源与其药敏性的相关性

健康蛋鸡源菌 Na^R Ct^S 菌株占 62.8%、以生物型 I 菌为主(65.0%),腹泻蛋鸡源菌 Na^S Ct^S 菌株占 99.2%、生物型 I 菌(51.9%)和生物型 II 菌(48.1%)的比例相当,腹泻仔猪源菌 Na^R Ct^S 菌株占 76.6%、以生物型 II 菌为主(90.4%),这些结果并不与生物型 I 菌以 Na^S Ct^S 菌株为多(57.6%),生物型 II 菌以 Na^R Ct^S 菌株为多(55.6%)的分析相吻合,故初步认为该菌药敏性与菌株来源有关而与生物型间的相关性可能是一种巧合。

参 考 文 献

- [1] 吴 润,赵晋军. 中国兽医科技,1995,25(7):16~18.
- [2] R.E. 布坎南,N.E. 吉本斯等编(中国科学院微生物研究所译). 伯杰细菌鉴定手册. 第八版. 北京:科学出版社,1984.260~267.
- [3] Smibert R.M. *Ann Rev Microbiol*, 1978, 32: 673. 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

- [4] Krieg N R , Holt J G. *Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore : Williams & Wilkins , 1984. I : 111 ~ 118.
- [5] 赵乃昕 , 岳启安 . 医学细菌名称及分类鉴定 . 济南 : 山东大学出版社 , 1996. 69 ~ 72.
- [6] 吴 润 , 方永祥 . 甘肃农业大学学报 , 1993 **28**(2) : 105 ~ 111.
- [7] Lior H. *J Clin Microbiol* , 1984 **20**(4) : 636 ~ 640.
- [8] 韩文瑜 , 何昭阳 , 刘玉斌 . 病原细菌检验技术 . 长春 : 吉林科学技术出版社 , 1992. 76 ~ 84.
- [9] 吴 润 , 方永祥 . 甘肃农业大学学报 , 1993 **28**(3) : 215 ~ 219.
- [10] 付海燕 , 贾明和 , 蔡润河 . 中华流行病学杂志 , 1991 **12**(1) : 25 ~ 28.
- [11] Adesiyun A A , Kaminjolo J S , Loregnard R , *et al.* *Br Vet J* , 1992 **148**(6) : 547 ~ 556.
- [12] Cabrita J , Rodrigues J , Braganca F , *et al.* *J Appl Bacteriol* , 1992 **73** : 279 ~ 285.

SOME DIFFERENCES ON BIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF *CAMPYLOBACTER JEJUNI*

Wu Run Liu Gang

(*Department of Veterinary Medicine , Gansu Agricultural University , Lanzhou 730070*)

Abstract : Fecal samples from 195 diarrheic patients in different age , rectal and cloacal swabs from 656 normal and diarrheic animals and poultry , 108 visceral materials from the dead animals with diarrhoea were cultured for *Compylobacter jejuni* . A total of 458 strains of campylobacters (445 strains of *C. jejuni* , 13 strains of *C. coli*) were isolated and identified , and some biological characteristics of these strains were observed. Lior 's biotyping scheme was used for biotyping 354 strains of campylobacters (253 strains of *C. jejuni* and 2 strains of *C. coli*). The results showed the most biological characteristics of these campylobacters accorded with that previously described in the literatures , but it were also found that there were some differences on morphological , cultural , physiological and biochemical characteristics and antibiotic resistances. In these differences , the most main differences were that 48.3% (215/445) of *C. jejuni* and 23.1% (3/13) of *C. coli* were resistant to nalidixic acid , and that 1.1% (5/445) of *C. jejuni* and 7.6% (1/13) of *C. coli* were resistant to cefotaxime. There were relationships between antibiotic resistances and strain sources ($P < 0.005$). The result of biotyping 352 strains of *C. jejuni* indicated that biotype I (40.9%) and II (58.2%) were predominant in the bodies of these animals , and there were two biotypes distributed in the body of same animal.

Key words : *Campylobacter jejuni* , Biological characteristics , Biotype , Difference