

我国腹泻患者粪中非脱羧梭勒克氏菌的分离与鉴定

蔡妙英 东秀珠 卫军

(中国科学院微生物研究所, 北京 100080)

杨伏暑 徐迪诚 张慧兰 郑秀英 王世平 金慧心

(哈尔滨市卫生防疫站, 哈尔滨 150010)

1987年从3例腹泻病人粪便中分离出3株产黄色素、发酵分解糖类、氧化酶阴性, 具有周生鞭毛的革兰氏阴性杆菌。经系统生理生化特性鉴定、DNA的G+C mol%测定和DNA/DNA杂交, 确认为非脱羧梭勒克氏菌 (*Leclercia adecarboxylate*)。此外, 还测定了该菌对抗菌素的敏感性, 讨论了与临床感染的关系。

关键词 非脱羧梭勒克氏菌; 分离; 鉴定

这群肠杆菌的归宿问题一直是有争议的。1962年曾被 Leclerc 命名为非脱羧埃希氏菌^[1], Ewing^[2] 等认为是成团肠杆菌的同物异名, 并将其包括在成团肠杆菌的生物群3之中。但通过广泛(203项)的生理生化特性测定, 它们在相似值90%以上单独形成群, 而与成团肠杆菌及其它肠杆菌的相似值仅在75%以下。Gavini(1989年)^[3]在提出成团肠杆菌应独立为广布菌属 (*Pantoea*) 时, 根据 Tamura^[4] 的DNA杂交结果: 成团肠杆菌生物型3——非脱羧梭勒克氏菌与成团肠杆菌的同源值低于13%, 认为这部分菌应独立于肠杆菌属之外, 保留“非脱羧梭勒克氏菌”的名称。该菌多数从临床样品中分离得到, 与临床感染有密切的关系。

我们于1987年在腹泻病原菌的检验中, 从32例病人粪便中分离出3株生物学特性与大肠埃希氏相似的细菌, 鉴定为非脱羧梭勒克氏菌, 鉴于国内尚无有关报道, 现将其鉴定结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株

3株菌编号为8713、8714和8715, 均分离自腹泻病人粪便。AS 1.365 为大肠杆菌菌株K12, 来自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心。

(二) 分离和鉴定方法

将粪便直接分离于SS和麦康凯琼脂平板, 37℃培养18—24小时, 挑取疑似大肠埃希氏菌样菌落, 接种TSI, 37℃过夜培养, 如TSI底部产酸产气、斜面产酸或迟缓产酸者, 则疑为本菌。然后, 另接种半固体琼脂和营养琼脂斜面, 30℃过夜培养, 分别观察动力、色素产生和染色镜检, 观察染色特征、形态、鞭毛并对其生理生化特性进行进一步鉴定^[5-8]。

(三) 药敏试验

用纸片扩散法, 使用MHA培养基, 按常规操作和判断结果。

(四) 动物致病性观察

过夜肉汤培养物, 腹腔注射小白鼠(体重18—20g, 0.3ml/只), 观察其致病性; 肠毒素ST^[9]、LT测定用乳鼠灌胃法和免疫溶血试验。

本文于1990年3月19日收到。

(五) DNA 的 G + C mol% 的测定

根据熔解温度法 (T_m)。

(六) DNA/DNA 同源性的测定

根据 De Ley^[10] 的复性率方法。

结 果

(一) 形态特征

细胞呈革兰氏阴性杆状, 两端钝圆, 单个排列, 大小为 0.4—0.5 × 1.4—2.1 μm, 无芽胞, 无荚膜, 具有周生鞭毛。

(二) 培养特征

需氧及兼性厌氧生长。在 EMB、麦康凯琼脂上生长良好, 在 SS、TCBS 琼脂上不生长; 在营养琼脂平板上, 37℃ 18 小

时, 菌落呈圆形、凸起、光滑、湿润、全缘、半透明, 直径 1.8—3.0mm, 室温放置 3—7 天, 形成淡黄色菌落, 产脂溶性色素; 在麦康凯琼脂上, 菌落为淡红色; 在 EMB 琼脂上, 菌落呈黑色带金属光泽, 似大肠埃希氏菌的典型菌落; 在肉汤中均匀浑浊生长, 无荚膜, 不溶血, 42℃ 可生长, 4℃ 不增殖。

(三) 生理生化特性

发酵分解糖、醇。鸟氨酸、赖氨酸脱羧酶阴性, V-P 反应阴性, 在 KCN 肉汤中能生长, PGUA 阴性, ONPG 阳性, 硝酸盐还原阳性。

(四) DNA 的 G + C mol%

8713 等三株菌 DNA 的 G + C 含量为 51.2—55.4mol%。

表 1 3 株非脱羧勒克氏菌的生理生化特性

Table 1 The physiological and biochemical characteristic of three strains of *Leclercia adecarboxylate*

试验项目 Tests	8713	8714	8715
动力 37℃) Motility	+	+	+
4℃ 生长 Growth at 4℃	-	-	-
42℃ 生长 Growth at 42℃	+	+	+
黄色素产生 (3—7d) Yellow pigments	+	+	+
吲哚产生 Indole production	+	+	+
M-R (甲基红) Methyl red test	+	+	+
V-P 反应 Voges-Proskauer test	-	-	-
柠檬酸盐利用 Simmon's citrate utilization	-	-	-
H ₂ S 产生 TSI	-	-	-
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	-	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	-	-
精氨酸双水解酶 Arginine dihydrolase	-	-	-
苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deaminase	-	-	-
脲酶 Urease	-	-	-
明胶酶 Gelatin liquefaction	-	-	-
DNA 酶 DNase	-	-	-
4-硝基吡喃葡萄糖苷酶 PGUA	-	-	-
α-甲基-葡萄糖苷酶 α-Methyl-D-glucosidase	-	-	-
β-半乳糖苷酶 β-D-Galactosidase	+	+	+
Tween 80 水解 Tween 80 hydrolysis	-	-	-
KCN 肉汤生长 Growth on KCN-broth	+	+	+
七叶灵水解 Esculin hydrolysis	+	+	+
粘液酸盐利用 Utilization of mucic acid	+	+	+
葡萄糖盐利用 Utilization of gluconate	+	+	+
丙二酸盐利用 Utilization of malonate	+	+	+

续表 1

试验项目 Tests	8713	8714	8715
乙酸盐利用 Utilization of acetate	-	-	-
酒石酸盐利用 Utilization of tartrate	-	-	-
葡萄糖产酸产气 D-Glucose, acid and gas production	+	+	+
分解下列物质产酸: Hydrolysis and acid production from:			
阿拉伯糖 Arabinose	+	+	+
纤维二糖 Cellobiose	+	+	+
麦芽糖 Maltose	+	+	+
蜜二糖 Melibiose	+	+	+
鼠李糖 Rhamnose	+	+	+
蔗糖 Sucrose	+	+	+
D-木糖 Xylose	+	+	+
蔗糖 Trehalose	+	+	+
水杨素 Salicine	+	+	+
阿东醇 Adonitol	+	+	+
卫矛醇 Dulcitol	+	+	+
苦杏仁甙 Amygdalin	+	+	+
D-阿拉伯糖醇 D-Arabitol	+	+	+
乳糖 Lactose	+	(+)	+
甘露醇 Mannitol	+	+	(+)
山梨醇 Sorbitol	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-
赤藓醇 Erythritol	-	-	-

(+): 为迟缓发酵糖、醇。

表 2 8713 等 3 株菌 DNA 的 G + C mol%

Table 2 The G + C mol% of DNA of three strains

菌株 Strains	T _m (°C)	G + C mol%
8713	74.5	51.2
8714	76.2	55.4
8715	75.0	52.5
AS 1.365	74.0	50.2

(五) DNA/DNA 杂交

8713 和 8715 间的同源性高达 97.3%，而它们与大肠埃希氏菌的同源性分别为 35.7% 和 38.4%。

(六) 动物的致病性

8713 株注射未使小鼠致病，2 天后处死，内脏未检出感染菌。8714 株在注射后有 2 只小鼠分别于第 10、12 小时死亡，解剖发现肠系膜有出血点，小肠水肿，其肝、

脾均检出感染菌。8715 株在注射后，小鼠表现厌食、竖毛，处死解剖发现肠段水肿，内脏可检出感染菌。3 株菌均未检出 ST、LT 肠毒素。

(七) 药敏试验

对 21 种药物敏感试验结果表明，3 株菌对羧苄青霉素、氨苄青霉素、红霉素、丁胺卡那霉素、庆大霉素、氯霉素、多粘霉素 B、卡那霉素、链霉素、先锋孟多、先锋霉素、新霉素、先锋氨基脒、四环素、妥布霉素、呋喃妥因敏感；对青霉素中度敏感；对杆菌肽、新生霉素、苯唑青霉素、林可霉素具抗性。

讨 论

非脱羧勒克氏菌由于具有 IMVCi 的 +++-反应；鸟氨酸、赖氨酸脱羧酶阴性和黄

表3 非脱羧勒克氏菌与近似菌的鉴别特征

Table 3 Differential characteristics of *Leclercia adecarboxylate* and similar bacteria

鉴别试验 Differential characteristics	非脱羧勒克氏菌 <i>Leclercia adecarboxylate</i>	大肠埃希氏菌 <i>E. coli</i>	成团肠杆菌 <i>Enterobacter agglomerans</i>
吲哚产生 Indole production	+	+	-
V-P 反应 Voges-proskauer test	-	-	+
赖氨酸脱羧酶 Lysine decarboxylase	-	+	-
鸟氨酸脱羧酶 Ornithine decarboxylase	-	+	-
KCN 肉汤生长 Growth on KCN-broth	+	-	-
乙酸盐利用 Utilization of acetate	-	+	-
4-硝基吡喃葡萄糖苷酶 4-nitro-pyranoglucosidase	-	+	-
产酸: Acid production from:			
D-阿东醇 D-Adonitol	+	-	-
山梨醇 Sorbitol	-	+	+

色菌落的特征, 曾被分别定名为埃希氏菌和成团杆菌。但是, 它与这两个属在表型特征上有很多不同之处(见表3), 而且DNA 同源性也有很大的差别, 根据我们测定的结果, 与大肠埃希氏菌的同源性为35.7—38.4%, 而它们之间的同源性可达97.3%, 这与 Tamura^[4] 结果一致。勒克氏菌与大肠埃希氏菌的同源性仅有7.5—29.7%, Brenner^[11] 也有类似结果: 11株测定菌之间的同源值为66.2—100%, 而与大肠埃希氏菌仅有31.3%。以上结果充分说明, 非脱羧勒克氏菌不同于埃希氏菌属和肠杆菌属。

非脱羧勒克氏菌大都从临床标本中检出^[12]。Tamura 报道的86株菌, 其中58株来自病人的血液、痰、尿、粪便和创伤分泌物; 27株来自食品、水和外环境标本, 可见该菌与临床感染症关系密切。我们分离

的3株菌, 均来自自腹泻病人粪便, 在麦康琼脂上呈优势生长, 对小白鼠有一定的致病力; 在32份腹泻粪便中, 未检出引起腹泻的其它病原菌和病毒。因此, 这次多起腹泻看来与非脱羧勒克氏菌有关, 其致病因子有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Leclercq, H.: *Ann. Inst. Pasteur*, 102: 726—741, 1962.
- [2] Ewing, W. H. & M. A. Fife: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 22: 4—11, 1972.
- [3] Gavini, F. et al.: *ibid.*, 39(3): 337—345, 1989.
- [4] Tamura, K. et al.: *Curr. Microbiol.*, 13(4): 179—184, 1986.
- [5] Krieg, N. R. & J. G. Holt: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 1 pp. 409—515, William & Wilkins Baltimore/London, 1984.
- [6] Lennette, E. H.: *Manual of Clinical Microbiology* (4th ed), pp. 263—277, American Society for Microbiology, Washington, 1985.
- [7] Colwell, R. R. et al.: *Methods of Microbiology*

- (Vol. 19), pp. 5—69, Academic Press, 1987.
- [8] 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。
- [9] Dean, A. G. et al.: *J. Infect. Dis.*, 125: 407, 1972.
- [10] De Ley, J. et al.: *Eur. J. Biochem.*, 12: 133, 1970.
- [11] Brenner, D. J. et al.: *The Prokaryotes* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp. 1103—1127, 1981.
- [12] Teramoto, T. & R. Sakazaki: *J. Food Hyg Soc. Jpn.*, 25: 322—328, 1984.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF *LECLERCIA ADECARBOXYLATE* IN CLINICAL ISOLATES IN CHINA

Cai Miaoying Dong Xiuzhu Wei Jun

(*Institute of Micrology, Academic Sinica, Beijing 100080*)

Yang Fushu Xu Dicheng Zhang Huilan Zheng Xiuying Wang Shiping Jin Huixin

(*Harbin Sanitary & Anti-epidemic Station, Harbin 150010*)

1987, 3 strains of gram-negative straight rods were examined from 3 cases of patients with diarrhea. It's producing yellow pigment, fermentative metabolism of carbohydrates, oxidase test negative and motility with the help of peritrichous flagella.

Through systematic biochemical identification, calculation of G+C mol% and homology of DNA/DNA, the species of *Leclercia*

adecarboxylate are identified. While the susceptibility to certain antibiotics and the pathogenity for white mice are tested, and relation of these microorganisms to clinical diarrhea is discussed.

Key words

Leclercia adecarboxylate; Isolation; Identification