

# 一种新的人兽共患传染病——狐狸阴道 加德纳氏菌病的研究\*

## I. 病原菌分离与人工感染试验

严忠诚 阎新华 栾凤英 阎喜军

(中国农业科学院特产研究所 吉林 132109)

**摘 要** 于国内外首次报道采用改良兔血琼脂琼脂培养基, 从狐体及其流产胎儿脏器中, 分离得到阴道加德纳氏菌共 145 株。其中从流产胎儿脏器分离得到 26 株, 分离率为 92.86%。从流产空怀狐阴道分泌物中分离得到 118 株, 分离率 34.01%。从阳性取皮狐鼠腺淋巴结分离得到 1 株, 分离率 2%。血液中未分离到本菌。通过对病原菌的分离, 揭示了该菌在狐体内的存在部位, 优选出最佳的分离途径、时机与方法。人工感染试验结果证实了本菌的致病性。

**关键词** 狐狸, 阴道加德纳氏菌, 病原分离, 人工感染, 人兽共患

80 年代中期, 由于养狐业迅速发展, 国内有关养殖单位频繁地从北欧与北美一些国家大量引进种狐。进养殖场后不久, 发现母狐妊娠前、中期出现不同程度的流产, 危害较重。1987 年经病原菌分离、鉴定及人工感染试验等, 确认该病是由阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis*) 所致。这是国内外关于该菌引起狐狸繁殖障碍传染病的首次报道。

早在 1953 年, Leopold<sup>[1]</sup>首次从前列腺炎和子宫颈炎患者分离到多形态的革兰氏阴性小杆菌。1955 年, Gardner 和 Dukes<sup>[2]</sup>将该菌命名为阴道嗜血杆菌 (*Hemophilus vaginalis*)。后经许多学者证实, 该菌不同于已知属的特征和基因, 因此 Greenwood 和 Pickett<sup>[4]</sup>1980 年建议建立新属, 命名为加德纳氏菌属 (*Gardnerella*)。目前该菌是该属中唯一的种<sup>[8]</sup>。该菌通过性交传染, 在性关系混杂的人群中, 该菌阴道炎有高度的感染率<sup>[7]</sup>。故被列入“性病范畴”<sup>[9]</sup>。但该菌侵袭动物至今尚无报道。狐狸阴道加德纳氏菌 (*Gardnerella vaginalis* of fox), 可从流产胎儿脏器、血液、胎盘、空怀与流产狐的阴道分泌物、尿液、阳性公狐包皮分泌物分离得到。狐感染本病主要引起泌尿和生殖系统疾病, 母狐的阴道炎、子宫颈炎、子宫炎、卵巢囊肿、尿道感染、膀胱炎、肾周脓肿及败血症; 公狐的包皮龟头炎与前列腺炎等。故导致母狐不孕和流产, 严重影响其繁殖力, 给养狐业造成惨重损失。通过对国内主要狐场 18325 只狐狸的血清学检验, 结果表明, 阳性率 0.9—21.9%, 空怀率 3.2—47.5%, 流产率 1.5—14.7%。故该病是当前养狐业的严

\* 农业部畜牧业“八五”重点研究专题。

参加本研究工作的还有吉林省敦化市林业局养殖场尹迎春、王明臣、曲淑梅; 中国科学院微生物研究所蔡妙英; 中国兽药监察所吴福林、毛开荣、黄海波。

本文于 1993 年 8 月 23 日收到。

重疫病, 并引起人兽相互感染。自 1987—1992 年作者对该病进行了病原分离、鉴定、人工感染试验、流行病学调查、血清学特异性诊断、菌株的血清分群定型及免疫等全面研究, 现将病原菌分离和人工感染结果报道如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 分离培养基

胰蛋白胨 (Oxide England) 2.5g, 葡萄糖 1g, 氯化钠 0.5g, 吐温 80 0.02ml, 酵母浸膏 0.3g, 琼脂 2g, 蒸馏水 100ml。上述成分混合溶解后, 调整 pH7.0—7.2, 121℃30 分钟灭菌, 当冷至 50℃时, 加入新鲜兔血 5ml, 倾注平板。

### 1.2 标本来源

流产胎儿及胎盘, 阳性狐脏器 (肝、肾、脾)、血液、尿液、包皮分泌物; 流产与空怀狐阴道分泌物。上述标本于 1987—1991 年分别由吉林省敦化市、长春市、吉林市、黑龙江省集贤县、山东省日照市、辽宁省金州地区等养殖场采集。

### 1.3 诊断液

虎红平板凝集反应抗原、狐狸阴道加德纳氏菌微量凝集反应抗原及狐狸阴道加德纳氏菌高度免疫血清, 系采用抗原性与免疫原性优良的菌株, 均由本研究室制备。

### 1.4 人工感染试验狐来源

选取血清学检验阴性、细菌分离阴性, 妊娠 20—25 天的北极狐 8 只, 由长春市野生动物饲养场提供。

### 1.5 人工感染试验菌种

选用本研究室保存的狐狸阴道加德纳氏菌 44 菌株 (1988 年由流产胎儿分离)。

### 1.6 病原菌分离与初步鉴定

**1.6.1 标本的采集、涂片、染色及检验:** 对流产与空怀狐阴道分泌物, 用特制的两支无菌棉拭子进行采集, 其中一支用于分离培养接种, 另一支作直接涂片用。其它标本直接涂片镜检。

**1.6.2 分离方法:** 流产胎儿脏器及血液、胎盘、阳性狐的脏器, 分别用接种环无菌取样, 分两组接种分离用的培养基。将沾有流产与空怀狐阴道分泌物和包皮分泌物的棉拭子, 同样也分两组分别在分离平板上做 Z 状涂抹, 再用接种环广泛涂划。阳性狐的血液及尿液, 用无菌注射器, 分别由静脉与膀胱抽取, 直接滴加在分离培养基上, 同样做 Z 状接种。上述接种后的分离平板, 一组放入 5—10%CO<sub>2</sub> 烛缸内, 另一组置于普通条件中, 均于 37℃培养 48 小时, 进行分离生长对照观察。

**1.6.3 初步鉴定程序:** 将流产胎儿脏器及血液、胎盘、阴道分泌物, 分别接种于 5% 兔血胰蛋白胨琼脂平板上, 于 37℃ 5—10%CO<sub>2</sub> 烛缸内培养 48 小时。选取典型 β 溶血小菌落, 再转种上述培养基进行纯化培养。菌落涂片、革兰氏染色镜检及细菌形态、菌落特征观察。

**1.6.4 生化鉴定:** 先做氧化酶及过氧化氢酶试验, 如其结果均为阴性, 再进行系统的生化试验。

**1.6.5 血清学鉴定:** 对分离得到的各个菌株分别制成虎红平板与微量凝集抗原, 同已知阳性血清进行凝集试验, 其操作均按常规方法进行。

1.6.6 菌种保存: 采用改良兔血胰琼脂培养基传代, 冻干保存。

## 1.7 人工感染试验

将 8 只妊娠试验狐分为试验和对照两组, 每组 4 只。每天早晚进行基础体温测定, 连测 5 天。第 6 天进行人工感染, 每只试验狐分别皮下注射狐狸阴道加德纳氏菌 44 菌株 40 亿菌 (每 ml 含 20 亿菌), 对照狐每只皮下注射灭菌生理盐水 2ml, 并继续测温观察。当试验狐体温升高时, 分别由静脉采血接种分离培养基, 分离人工感染菌。

## 2 结果

### 2.1 病原菌分离与初步鉴定

2.1.1 涂片、染色及镜检: 流产胎儿脏器与血液、胎盘均可查到本菌。流产与空怀狐阴道分泌物不易识别。阳性狐脏器、血液、尿液及包皮分泌物涂片镜检, 均未查到该菌。

2.1.2 分离培养: 流产胎儿脏器及血液、胎盘、流产和空怀狐阴道分泌物, 于改良兔血胰琼脂平板上, 无论 5—10%CO<sub>2</sub> 或普通环境培养, 均有细小菌落出现, 并且生长较好。培养 24 小时菌落呈微小点状, 培养 48 小时菌落呈灰色、凸起、半透明、光滑, 形似露滴状、无粘性、易被接种环挑起, 菌落直径为 0.5—1mm, 48 小时后生长能力显著变慢。菌落周围出现明显的  $\beta$  溶血环 (图 1)。其直径约 14—17mm。菌落涂片, 染色镜检为革兰氏着色可变的球形到杆状菌, 无鞭毛、无荚膜、无芽胞, 单个、成双或成堆排列。

通过对比培养证明, 该菌为需氧或兼性厌氧菌。试验证实, 未查到混合感染致病菌。

采用上述培养基, 从国内主要狐场共分离得到该菌 145 株。其中流产胎儿脏器分离得到 26 株, 分离率 92.86% (26/28), 流产与空怀狐阴道分泌物分离得到 118 株, 分离率 34.01% (118/347), 阳性狐鼠蹊淋巴结分离得到 1 株, 分离率 2% (1/50), 其血液未分离到该菌 (0/90), 人工感染狐的血液及其流产胎儿分离得到 4 株, 分离率为 100% (4/4)。

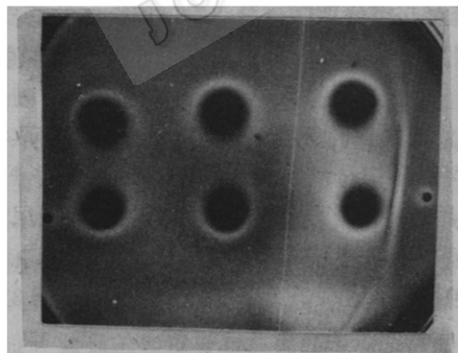


图 1 狐狸阴道加德纳氏菌在 5% 兔血琼脂平板 37℃ 培养 48 小时菌落周围的  $\beta$  溶血

Fig. 1  $\beta$  haemolysis around colony of *Gardnerella vaginalis* of fox on rabbit blood in 5 percent agar plate was incubated at 37℃ for 48 h

2.1.3 生化特性: 氧化酶 (—), 过氧化氢酶 (—), 葡萄糖为发酵型产酸, 符合阴道加德纳氏菌属的特性。

2.1.4 血清学鉴定: 通过虎红平板及微量凝集试验, 分离得到的 145 个菌株与狐狸阴道加德纳氏菌高度免疫血清, 均呈现典型的凝集, 同标准阴性血清不出现凝集。

### 2.2 人工感染试验

试验狐与对照狐的基础体温为 38.5—38.9℃, 试验狐于人工感染后的第 3 天体温上升到 39.9—40.5℃, 平均升高 1.4—1.6℃, 稽留 3 天。此间, 静脉采血接种分离平板, 结果 100% (4/4) 分离到与人工感染菌株同样的细菌。人工感染后的第 7—12 天, 4 只试验狐全部流产。对其流产胎儿脏器进

行分离菌, 也同样分离得到与人工感染相同的细菌。而对照狐无异常表现, 全部产仔。

### 3 结论和讨论

本试验首次从狐体及流产胎儿脏器中, 分离出阴道加德纳氏菌。通过病原菌分离, 揭示了该菌在机体内存在的部位, 分离时机及方法。流产胎儿脏器与流产空怀狐阴道分泌物为最佳的分离途径。145 株分离菌中, 经细菌形态、染色、菌落特征、培养特征、生理生化特性及血清学鉴定, 均为阴道加德纳氏菌。菌株鉴定结果下文论述<sup>[6]</sup>。

选用狐狸阴道加德纳氏菌 44 菌株, 对 4 只妊娠 20—25 天北极狐进行人工感染, 复制出与自然感染相似的病例, 充分证实了该菌的致病性。当人工感染狐体温高热期, 可从血液分离到本菌, 证明该菌能产生菌血症。同时, 从其流产胎儿脏器 100% (4/4) 重新分离到该菌, 表明狐狸阴道加德纳氏菌是引起狐狸流产的病原体。

由于本菌营养要求苛刻, 在普通培养基及营养较丰富的培养基上均不生长。文献介绍的哥伦比亚基础培养基、戈司曼基础培养基<sup>[5]</sup>, 在我国均无此商品出售。为了探索培养条件, 作者以含 0.02% (V/V) 吐温 80 胰肠汤为基础, 分别加入 5% 的兔血、马血制备平板接种细菌后, 于厌氧和普通环境下进行对比培养。发现该菌在含兔血的培养基上, 于烛缸和普通环境中 37℃ 培养 48 小时, 可形成典型的菌落。菌落周围出现明显的  $\beta$  溶血。Greenwood 等<sup>[3]</sup>认为, 只有加德纳氏菌才能在含人或兔血培养基上有这种类型的扩散溶血环的出现。

鉴别狐狸阴道加德纳氏菌与阴道分泌物中的其它细菌并不困难。本试验 347 份标本中除分离得到狐狸阴道加德纳氏菌 118 株外, 还检出真菌、大肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌、 $\beta$  溶血性链球菌及革兰氏阳性小杆菌。其中真菌、大肠杆菌、变形杆菌、葡萄球菌均极易与狐狸阴道加德纳氏菌区别。 $\beta$  溶血性链球菌的溶血情况与狐狸阴道加德纳氏菌相似。但其溶血程度、菌落特征均不同, 尤其是细菌形态的不同最易鉴别。有的文献报道加德纳氏菌最不易于过氧化氢酶阴性的革兰氏阳性小杆菌相区别<sup>[10]</sup>。但据从 347 份标本中检出的 8 株该菌的观察, 认为可根据在 5% 兔血胰肠琼脂平板上产生  $\beta$  溶血的情况不同加以区别。

### 参 考 文 献

- [1] Leopold S. *US Armed Forces Med J*, 1953, 4: 263—266.
- [2] Gardner H L, Dukes C D. *Am J Obstet Gynecol*, 1955, 69: 962.
- [3] Greenwood J R, Pickett M J, Martin W J *et al. Health Lab Sci*, 1977, 14: 102.
- [4] Greenwood J R, Pickett M J, *Int J Systemat Bacteriol*, 1980, 30: 170.
- [5] Piot P, Van Dyck E, Totten P A *et al, J Clin Microbiol*, 1982, 15: 19.
- [6] 蔡妙英, 卫 军. 微生物学报, 1995, 35 (1): 33—37.
- [7] 马子行, 殷恭嘉. 国外医学——微生物学分册, 1986, 6: 266.
- [8] 姜内英子. 临床と微生物, 1986, 13 (1): 22.
- [9] Krieg N R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: The Willimas & Wilkins Co, 1984. 587—590.
- [10] 姜内英子. 临床と微生物, 1988, 15 (5): 557.

**A NEW ZOONOSIS—INVESTIGATION OF  
GARDNERELLA VAGINALIS  
DISEASE OF FOX  
I. CAUSATIVE AGENT ISOLATION  
AND ARTIFICIAL INFECTION**

Yan Zhongcheng Yan Xinhua Luan Fengying Yan Xijun  
(Speciality Institute of CAAS, Jilin 132109)

**Abstract** It is the first time that this paper reports on using improved rabbit blood agar culture medium to isolate 145 strains *Gardnerella vaginalis* from the foxes and their abortion fortus organs of main fox farms. Among the strains, 26 strains were isolated from the abortion foetus organs, isolation rate was 92.86%; 118 strains were isolated from the vaginal excretion of the abortion and empty foxes, isolation rate was 34.01%; 1 strain was isolated from inguinal lymph node of the pelted positive fox, isolation rate was 2%. None was isolated from blood.

By causative agent isolation, we revealed the bacterium survival position in vivo, and the best isolation route isolation opportunity and isolation methods were selected. By artificial infection test, we have proved pathogenicity of the bacterium.

**Key words** Fox, *Gardnerella vaginalis*, Causative agent isolation, Artificial infection, Zoonosis