

一种新的人兽共患传染病——狐狸阴道 加德纳氏菌病的研究*

Ⅱ. 病原菌的鉴定

蔡妙英 卫 军

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

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 对从狐狸流产胎儿和阴道分泌物中分离得到的16株菌进行了细胞形态、细胞壁显微结构的观察和生化、对人血红细胞具溶血性、DNA的G+C含量等测定。根据它们细胞呈革兰氏阳性到可变,形态从球杆到杆状的多形态性,接触酶和氧化酶均阴性,葡萄糖的O/F测定为发酵产酸,主要产物有乙酸和乳酸等主要产物,归为阴道加德纳氏菌,但由于它们对营养要求不苛求,生长速度快和对氧要求低等,又不同于人体来源的加德纳氏菌。因此,将这群菌另定为一个亚种——阴道加德纳氏菌狐狸亚种(*Gardnerella vaginalis* subsp. *fox*)。模式株为U80。

关键词 阴道加德纳氏菌, 狐狸

近年来,国外有关阴道加德纳氏菌(*Gardnerella vaginalis*)与人的“细菌性非特异阴道炎”的报道甚多^[1,2]。直至1969年由Criswell等用1010活菌感染孕妇阴道,证明了阴道加德纳氏菌的致病性^[3]。但另一方面,根据Frampton等在临床诊断的阴道炎病例中并未都分离到阴道加德纳氏菌^[4]以及20—40%的健康妇女中也可分离到阴道加德纳氏菌的事实,提出对该菌致病性的疑问。因此,阴道加德纳氏菌的致病性至今仍有不同意见的争论,尚未明确^[5]。至于阴道加德纳氏菌对狐狸的感染,至今国内外还未见报道。

1953年Leopold^[6]从前列腺炎和子宫颈炎患者分离到一种革兰氏阴性多形态的小杆菌。两年后,Gardner和Dukes^[7]将它命名为阴道嗜血杆菌(*Haemophilus vaginalis*)。但它不具有嗜血杆菌属独特性状——生长需要X、V因子,和/或其它辅酶生长因子,与嗜血杆菌属定义不符,而排除嗜血杆菌属。Zinemann和Turner^[8]根据在最适的条件下,细胞呈革兰氏阳性反应,胞内有极生的异染颗粒,并以V字排列,这些与棒杆菌属(*Corynebacterium*)类似,而归入棒杆菌属,为阴道棒杆菌,但二者DNA的G+C含量差异悬殊(前者为42—44mol%,而棒杆菌属为57—60mol%),再次被否定。此外,也有人提名乳酸杆菌属、真杆菌属、丁酸杆菌属和丙酸杆菌属等名称^[9],但由于代谢产物各异,而未成立。直至最近,Greenwood和Picket^[10]在对78株临床菌的形态、生理生化的表型特

征进行数值分析,结合 DNA/DNA 杂交、细胞组分的化学分析之后,认为群内有高达95%以上相关性,而与其它属——嗜血杆菌属、巴斯德氏菌属、链球菌属等无相关性,因此提出成立新属、种——阴道加德纳氏菌,并给予定义。与此同时, Peter 等人^[11]以55株阴道嗜血杆菌和61株已定名的其它菌株进行149项特征的数值分析,得到一群关系密切的簇群8,包括32株阴道嗜血杆菌。它与18株接触酶阴性的棒杆菌相似值在80%处相连,比其它属的关系近之外,其它属(例链球菌属、乳酸杆菌属、纤维单胞菌属、利斯特氏菌属、短杆菌属、其它棒杆菌、丙酸杆菌属、嗜血杆菌属等)仅在相似值60—70%处相连,关系较远。这与 Greenwood 和 Pickett 的结果完全一致,继而支持他们所提出的新名称,并为《伯杰氏系统细菌学手册》^[12,13]所采纳。

前文^[14]通过病原分离、人工感染试验已证实了阴道加德纳氏菌是狐狸流产的病原菌。1989—1990年,作者对16株菌的细胞形态、显微结构、生理生化、溶血反应和 DNA 的 G+C 含量等特性进行全面鉴定。

1 材料和方法

1.1 菌株来源和分离

菌株来源和分离方法见参考文献 [14]。

1.2 鉴定方法

1.2.1 细胞壁显微结构的观察^[15]:细胞经磷酸缓冲液洗涤,以戊二醛和锇酸双固定后,用2%琼脂包埋、切块,经乙醇逐级脱水,丙酮置换,经铀-钴双染后,于透射电镜观察。

1.2.2 乙酸和乳酸的气相色谱分析:见参考文献 [16]。

1.2.3 DNA 的 G+C 含量测定:DNA 提取采用 Marmur 法^[17];测定参考 T_m 值法,计算根据 Madel^[18]的公式。

1.2.4 其他方法:见参考文献 [19]。

2 结果

2.1 细胞形态及细胞壁的显微结构

细胞呈革兰氏阳性到可变;形态呈球杆、近球、扁平杆状到葫芦杆状等多形态;大小为0.6—0.8×0.7—2.0μm;单个、短链、长链排列,也常有八字形的排列。

细胞壁及中隔都类似于革兰氏阳性的细胞(图版 I)。

2.2 生理生化特性

通过全面鉴定,认为狐狸来源的阴道加德纳氏菌是个同源的种。大多数特征表现出高度的一致性,少数性状随株而异(表1)。它们的主要特征:氧化酶、接触酶均阴性,葡萄糖的 O/F 测定为发酵型产酸,最终产物有乙酸和乳酸;M. R 阳性, V. P 反应、产硫化氢和硝酸盐还原均为阴性;不产脲酶、卵磷脂酶、赖氨酸和鸟氨酸脱羧酶、苯丙氨酸脱氨酶;能在2%NaCl 和5—10%的 CO₂环境中生长(初分离时必须在烛缸培养,几次传代后可在大气中良好生长);对麦芽糖产酸,而对棉子糖、卫矛醇和淀粉不产酸;能水解马尿酸而不水解淀粉。

表1 16株分离物有差异的特性

Table 1 The differential characteristics of 16 isolates

菌 株 Strains	硫化氢产生 H ₂ S	明胶液化 Gelatinase	鼠李糖产酸 Acid from rhamnose
GvF410	—	—	—
U80	—	—	—
GvF206	—	—	—
GvFR144	—	—	—
GvFR66	+	—	—
GvFU150	—	+	+
GvFA60	—	+	—
GvF80	—	+	+
GvF86	—	+	+
GvF168	—	—	—
GvF44	—	—	+
GvF11	—	—	+
GvF11	—	—	+
GvF20	—	—	+
GvF72	—	—	+
GvF130	—	—	—

表2 5株菌的 T_m 值和 G+C 含量Table 2 T_m value and G+C Mol% of DNA of 5 isolates

菌 株 Strains	熔解温度 (T _m)℃ Melting temperature	G+C mol%
GvF20	71.6	43.2
GvF72	71.9	43.9
U80	71.8	43.7
GvF130	71.6	43.2
GvFF410	71.4	42.7

2.3 溶血性

对人血有 β 溶血^[14]，对兔血和羊血大多数菌株不溶血，少数菌株有少量溶血。

2.4 DNA 的 GC 含量

被测5株菌的 T_m 的值十分接近，从71.4—71.9℃。G+C 含量为42.7—43.9mol% (表2)。从基因特性再次证实了由表型特征所显示的高度同源性。

3 讨论

关于阴道加德纳氏菌的细胞壁结构有不同的报道：Reyn 等^[15]认为它们的细胞壁和分隔都与革兰氏阳性菌非常相似；而 Criswell 等^[20]显示出具有多层结构的革兰氏阴性类

型。作者观察结果与 Reyn 的更为接近 (见图版 I)。由于细胞壁结构至今未有定论, 也影响到该菌的归属问题。因此, 在《伯杰氏系统细菌学手册》第一卷 (革兰氏阴性菌) 和第二卷 (革兰氏阳性菌) 中同时出现对该菌的描述。

由于阴道加德纳氏菌细胞呈多形态的杆菌, 革兰氏染色可变, 营兼性厌氧生活, 氧化酶、接触酶均阴性, 水解马尿酸, 麦芽糖能产酸, 硝酸盐不能还原到亚硝酸盐。在人体平板上出现 β 溶血^[14]。DNA 的 G+C 为 42.7—43.9mol%, 诸特征区别于其它类似属、种, 而符合阴道加德纳氏菌^[12,13]。但是它们对营养要求、生长速度、对氧要求等方面都与人体来源的阴道加德纳氏菌有很大的差异 (表3)。群内的特征除少数有差异之外, 极为一致。因此, 提议将这群菌, 另定一个亚种——阴道加德纳氏菌狐狸亚种 (*Gardnerella vaginalis* subsp. *fox*), 模式株为 U80, 该菌株是否为一个独立的种, 还有待于进一步研究。

表3 狐狸来源与人体来源菌株特征的差异

Table 3 Differential characteristics of the strains both isolate from foxes and hamen

特 征 Characteristics	狐 狸 Foxes	人 体 Hamen
生长速度 Growth rate	++	+
需要烛缸培养 b Culture in candle jarb	—	+
溶羊血 Sheep blood homolysis	V	—
淀粉产酸 Acid production from starch	—	+

注: + 阳性; — 阴性; V 群内特征不一致。

Symbols: +, positive; —, negative; V, differs among species.

参 考 文 献

- [1] Gardner H L, Duckes C D. *Sciences*, 1954, **120**: 853.
- [2] Gardner H L, Duckes C D. *Am J Obstericus and Gynecology*, 1955, **69**: 962—967.
- [3] Criswell B S, *Obstet Gynecol*, 1969, **33**: 195.
- [4] Frampton J. *J Obstet Gynecol Br Commonw*, 1964, **71**: 436.
- [5] Balows A, Hausler W J, Herrmann K L. *Manual of Clinical Microbiology*, Washington D C: American Society for Microbiology, 1991.
- [6] Leopold S. *United States Armed Forces Medical Journal*, 1953, **4**: 263—266.
- [7] Gardner H L, Duckes C D. *Am J Obstet Gynecol*, 1955, **69**: 962—976.
- [8] Zinemann K, Turner G C. *J Pathol Bacteriol*, 1963, **85**: 213—219.
- [9] Buchanan R E, Gibbons N E. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th ed. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1974.
- [10] Greenwood J R, Picket M J. *Int J Syst Bacteriol*, 1980, **30** (1): 170—178.
- [11] Peter P, Dyck E V, Goodfellow M. *J Gen Microbiol*, 1980, **119**: 373—396.
- [12] Krieg N R. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1984. 587—590.
- [13] Sneath P H A. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: The Williams & Wilkins Co, 1986. 1283—1286.

- [14] 严忠诚, 阎新华, 栾凤英, 等. 微生物学报, 1995, 35 (1): 28—32.
- [15] Reyn A, Birch-Andersen A. *Can J Microbiol*, 1966, 12: 1125—1136.
- [16] Drucker D B, *Microbiological applications of gas chromatography*, Cambridge: Cambridge University Press, 1981. 100—109.
- [17] Marmur J. *J Mol Biochem*, 1961, 3: 208.
- [18] Madel M, Grossman I, Moldav I. *Methods in Enzymology*, Vol 12B. New York: Academic Press, 1963. 195.
- [19] 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, 北京: 科学出版社, 1978.
- [20] Criswell B S, Marston J H. *Can J Microbiol*, 1971, 17: 865—869.

A NEW ZOONOSIS—INVESTIGATION OF *GARDNERELLA VAGINALIS* DISEASE OF FOX

I. IDENTIFICATION OF PATHOGENIC BACTERIA

Cai Miaoying Wei Jun

(*Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

Yan Zhongcheng Yan Xinhua Luan Fengying Yan Xijun

(*Speciality Institute of CAAS, Jilin 132109*)

Abstract 16 strains isolated from aborted foetus and vaginal excretions of foxes were used for examination of cell morphology including fine structure of the cell wall and septa, test for homolysis, biochemical reactions and analysis of G+C content of the bacterial DNA. The cells are pleomorphic bacilli and coccobacilli, Gram stain reaction appear positive to variable, catalase and oxidase-negative, with a fermentative type of glucose metabolism, giving acetic and lactic acid as the major end products of fermentation. It's differentiated from the human strains of *G. vaginalis* by its less fastidious in growth requirements and being facultatively anaerobic to aerobic. We propose the name; a new subspecies—*Gardnerella vaginalis* subsp. *fox*, the type strain is U80.

Key words *Gardnerella vaginalis*, Fox

图版说明

Explanation of plate

分离物的细胞壁和分隔的显微结构: 1. 菌株 GvF72 的细胞壁结构 (×25000); 2. 菌株 GvF130 的分隔 (×25000); 3. 菌株 GvF130 正在分裂的分隔 (×25000); 4. 菌株 U80 的细胞壁结构 (×25000).

Electron micrographs of isolates showing the fine structure of cell-wall and septa: 1. Showing the structure of cell-wall of strain GvF72; 2. Showing the septa of strain GvF130; 3. Showing the dividing septa of strain GvF130; 4. Showing the structure of cell-wall of strain U80.