

嗜碱耐盐奇异变形杆菌病原学实验研究

裴 标 刘玉娥 高 峻 陶墨奎

(江苏省阜宁县卫生防疫站,江苏 阜宁 224400)

摘 要:为了解嗜碱耐盐性奇异变形杆菌的生物学特征及致病力,用生化试验、ELISA、动物试验等方法进行病原学鉴定及毒力试验。该奇异变形杆菌除能在 pH1.0 和 10 % NaCl 的培养基上生长外,其余生理生化特征无特殊表现。内毒素检出率为 100 %,2 株检出 ST;对小白鼠的致病力很强,能产生耐热性溶血素,80 %以上菌株产生超广谱 β -内酰胺酶,3 重以上耐药株发生率 100 %。本组奇异变形杆菌具有嗜碱耐盐性,其生物学特征与变形杆菌标准菌株无特殊区别,具有很强的致病力。

关键词:变形杆菌,奇异 生物学 食物中毒

中图分类号:R15;Q939.121;TS207.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2001)02-0019-03

由奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*,以下简称 Pm)引起食物中毒的报告,国内近几年有所增多。^[1~3]1999 年 8~10 月,我们从一起食物中毒的标本中分离到一组奇异变形杆菌。在进行病原学鉴定时发现,本组菌在 pH 10.0 和含 10 %氯化钠的培养基中能生长,与文献报告的奇异变形杆菌在生化特征上有明显的不同。为了解这类奇异变形杆菌的生物学特性及致病力,我们对其进行了相关的实验研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 标准普通变形杆菌(49102)由江苏省卫生防疫站供给。18 株 Pm 从某饭店的可疑中毒食物(牛肉、肉丸、鸡爪)、砧板和操作台等物体表面,厨师手及患者腹泻便中检获,菌株编号 PL9901-99018。

1.2 菌株鉴定 采用微量生化发酵管,按文献^[4]进行系统生化分型鉴定。微量生化管(批号 990412)由浙江省杭州天和微生物试剂有限公司供给。

1.3 菌株致病力检定

1.3.1 肠毒素与内毒素检测 用 ELISA 法检测 LT 与 ST 肠毒素,用鲎试剂按文献^[3]进行内毒素检测。LT 及 ST 试剂盒购于上海市卫生防疫站。鲎试剂购于上海医学化验所,均按说明书操作。

1.3.2 动物试验 小白鼠毒力试验参照文献^[1]进行。

1.3.3 溶血素检测 将菌株种于胨水中 37 °C 培养 18 h 后,分别接种于用人和羊洗涤后红细胞配制的血平板上,于 37 °C 培养后观察溶血状况。另将培养

物在 56 °C 加热 30 min 后,再做溶血试验,以检测其是否产生耐热或不耐热溶血素。

1.4 拮抗试验 将 18 株 Pm 10 h 培养物分别点种于营养琼脂平皿上,于 37 °C 18 h 后观察各菌株生长融合状况。

1.5 血清抗体检测 取病人发病 3 d 内和一月后血清,与从食物(2 株)、病人(4 株)、物表(2 株)分离的 Pm 进行试管定量凝集试验,检测其特异性抗体。

1.6 药敏试验 采用 K-B 纸片扩散法,按美国 NCCLS 标准判定(1997 年版)。质控菌株大肠杆菌(ATCC25922),由江苏省卫生防疫站提供。药敏纸片购于杭州天和微生物试剂有限公司,有效期内使用。

1.7 超广谱 β -内酰胺酶测定 采用纸片扩散法,按 NCCLS(1999 年)标准进行。用替卡西林/棒酸与头孢他啶两种纸片间距 22 mm 贴于 MH 平板上,若二纸片抑菌环相交处增大,超广谱 β -内酰胺酶为阳性。药物纸片购于中国药品生物制品检定所。

1.8 变形杆菌计数 按文献^[5]方法进行。

2 结果

2.1 生物学特征 18 株 Pm 均为革兰氏阴性杆菌。在 TCBS、血平板上呈迁徙性生长,具有特殊的生姜味;在 SS 培养基上为无色不透明有黑心的单个菌落,边缘整齐;在 MC 上亦能形成较大不透明的菌落,边缘极不规则。18 株 Pm 运动活泼,VP、H₂S、KCN、葡萄糖、蔗糖、木糖、尿素、苯丙氨酸为阳性。麦芽糖、乳糖、靛基质、ONPG 为阴性。鸟氨酸和赖氨酸脱羧酶,前者为阳性,后者为阴性。本组菌在

pH=8.0~10.0的碱性蛋白胨水中生长良好,呈均匀混浊生长。在1%~10%的NaCl的溶液中均能生长,表明该菌具有嗜碱耐盐性。

2.2 毒素检测 18株Pm内毒素检出率为100%。从病人粪便中检获的4株菌中,2株检出ST肠毒素。未检出LT肠毒素。

2.3 拮抗试验 将18株Pm分别点种于普通营养琼脂平板上,37℃18~24h后,所有菌株的菌落都能互相融合生长,证明来自不同标本的菌株为同型菌。

2.4 血清抗体滴度 对12例病人的双份血清与8株Pm进行试管定量凝集,病初血清几乎无抗体,仅一例抗体滴度为1:2,而一个月后的血清中抗体滴度为1:4~1:32,11例病人血清抗体滴度大于4倍增长,其中8倍以上增长的有6例。证明该菌是引起本起食物中毒的致病菌。

2.5 毒力试验 分别取来自病人(2株)、牛肉(1株)、鸡爪(1株)、肉丸(1株)和物表(2株)的7株Pm的新鲜肉汤培养物0.5mL,注射于22~30g健康小白鼠腹腔内,每组3只,同时以无菌生理盐水为阴性对照,观察动物的发病情况。接种30min后,试验组小白鼠均出现后腿抽筋强直,呼吸困难,鼻部充血,于4~7h内死亡。对照组5d后无任何症状。取死亡小鼠腹腔液体培养获Pm纯培养物。

2.6 药敏结果 所试的18株Pm对丁胺卡那霉素、庆大霉素、氟哌酸全都敏感,对青霉素G、氨苄青霉素、羧苄青霉素、先锋V、氯霉素、链霉素、SMZ全部耐药。对万古霉素的耐药率达61.11%(11/18)。三重耐药株为100.00%。

2.7 溶血能力 将所有检获的Pm菌株点种于人和羊红细胞血平板上,2h后在穿种点即可见到较小溶血环,至18h溶血环直径达0.2mm,为 α -溶血。产生的溶血素为耐热性溶血素。

2.8 Pm计数结果 9份可疑食物中Pm计数,3份牛肉平均为 7.42×10^7 cfu/g,最高达 4.45×10^9 cfu/g。4份肉丸平均为 3.88×10^5 cfu/g,2份鸡平均为 4.66×10^6 cfu/g。

3 讨论

3.1 由奇异变形杆菌引起的食物中毒近年来逐渐增多,本次检获具有嗜碱耐盐的Pm,在生化反应上与以往报道基本一致,在SS、麦康凯、血平板上的菌落与标准奇异变形杆菌也极为一致。所不同的是本组菌能在10%氯化钠和pH>10.0的环境中生长,

而标准变形杆菌在氯化钠浓度>6%、pH>8.5时即生长不良。由于该菌株具有嗜碱耐盐的特点,用偏碱性增菌液进行选择性地增菌,以高盐培养基进行分离可提高其检出率(我们正在研究中,结果另文报告)。

3.2 Pm对人类移行细胞具有很强的粘附性和较强的侵袭力,毒素与侵袭力是该菌主要致病因子。^[6]张斐等^[7]和刘渠等^[3]报告,他们在对奇异变形杆菌致病性研究中均检出内、外毒素和ST毒素。我们所检获的18株Pm,内毒素检出率为100%,从病人粪便中分离的2菌株还检出ST。动物试验也证明,该菌具有很强的致病力,毒素是其主要致病因子。此外18株嗜碱耐盐性Pm能产生耐热性溶血素,具有较强的溶血能力,能迅速地溶解人与羊的红细胞。所以,溶血毒素可能是该菌的重要致病因子。本次检出的Pm对多种抗菌素不但耐药率高,且耐药谱宽,耐3种以上药物的菌株为100%,但耐药类型与标准变形杆菌则基本相似。

3.3 变形杆菌广泛存在于自然界,在食物中当Pm达到 1×10^5 cfu/g时就有可能引起中毒。^[3,5]在本次食物中毒的可疑食物中,9份标本Pm计数平均达 5.04×10^6 cfu/g,尤其是牛肉,高达 4.45×10^9 cfu/g,为中毒量的近5000倍。这进一步证实Pm易在高蛋白的食物中生长繁殖,且具有嗜碱耐盐特性的Pm,有更广泛的适应能力和生长繁殖能力。我们的实验结果证明,Pm在食品中大量繁殖和环境中的广泛污染,是本次食物中毒的主要原因。

参考文献:

- [1] 郑佩芳,史海根. 食物中毒标本中奇异变形杆菌的分离与检定[J]. 中国卫生检验杂志,1995,5(6):375.
- [2] 商慧,王润霞,赵立芹,等. 一起由粘液变形杆菌引起的食物中毒[J]. 中国卫生检验杂志,1999,9(3):235.
- [3] 刘渠,甘莉萍,骆自德,等. 变形杆菌引起食物中毒的初步研究[J]. 中国卫生检验杂志,1998,8(4):208.
- [4] 北京市卫生防疫站编. 卫生防疫微生物检验操作规程(上)[M]. 北京:人民卫生出版社,1991,101.
- [5] 陈森,麻郁峰,李俊华,等. Vitek-AMS技术在食物中毒实验诊断的初步应用[J]. 中国卫生检验杂志,1995;5(3):135.
- [6] Szabor. Adherence of *Escherichia coli* and *proteus mirabilis* to human transitional cells[J]. J Urol,1978,137(4):793.
- [7] 张斐,张平,程纯,等. 奇异杆菌毒素研究[J]. 南通医学院学报,1991,11(2):99.

Study on *Proteus mirabilis*/Pei Biao ,Liu Yu è , Gao Jun ,et al. //Chinese Journal of Food Hygiene. - 2001 ,13
(2) :19 ~ 21

Abstract: To study *Proteus mirabilis* 's (Pm) biological characteristics and possibility of causing disease ,biochemical method ,ELISA and animal test were used to pathogenically appraise and toxicity test. Pm can grow at pH 10.0 in 10 % NaCl,the physiological and biochemical characteristics is normal. Endotoxin was detected in all Pm. ST was found in 2 of them. The Pm could catch mouse a disease and produced heat resistance hemolysin. 80 % Pms produced superbroad-spectrum B-lactamase. 100 % Pm resisted 3 kind of drugs. the Pm was addicted to alkali and resisted salt.

Author 's address:Pei Biao ,Health and Anti-epidemic station of Funing County Jiangsu Province 224400 PRC.

Key Words: *Proteus mirabilis* Biology Food Poisoning

《中国食品卫生杂志》建立作者数据库的通知

2001 年《中国食品卫生杂志》将建立作者数据库。请作者在来稿时 ,说明第一作者、通讯作者(课题负责人)的姓名、性别、年龄、职务、职称、工作单位、专业特长(专业中的某方面)、精通何种外语、联系地址、邮政编码、电话以便编入数据库。

作者同志 :

您好。本刊将建立《中国食品卫生杂志》作者数据库 ,现请您填写以下内容寄编辑部顺致谢意 !

《中国食品卫生杂志》编辑部

作者数据库资料

姓 名	性 别	出生年月	职 称	职 务
单 位	地 址	邮政编码	专业特长	精通何种外语
备 注				