



人工哺育期腹泻婴猴奇异变形杆菌的分离与鉴定

赵 远, 杨凤梅, 陈丽雄, 禹文海, 王俊斌, 和占龙

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所,
云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

【摘要】 目的 对一株人工哺育期引发恒河猴婴猴腹泻的奇异变形杆菌进行了鉴定, 为实验猕猴疾病检测、鉴别诊断提供参考依据。**方法** 通过培养特性、菌落形态、染色、生化试验和血清学诊断鉴别等检查, 对分离菌株进行初步鉴定, 同时, 对分离菌株进行致病性试验及药敏试验。**结果** 通过表型生物学特性鉴定, 并结合血清学诊断鉴别方法, 确证该分离菌株为奇异变形杆菌, 应用药敏试验筛选出了高度敏感的抗菌药, 控制了该病的继续发生, 致病性试验证明, 该分离菌株对小白鼠有高致病性。**结论** 分离到的奇异变形杆菌是导致本次婴猴腹泻死亡的病原菌, 该菌为条件致病菌, 对实验猕猴和研究人员均有潜在的危害, 尽管该菌不是国家标准要求排除的病原菌, 但该菌引发的传染病将对动物实验造成严重影响, 故应引起高度重视。

【关键词】 恒河猴; 婴猴; 奇异变形杆菌; 分离鉴定

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)04-0019-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.04.005

Isolation and Identification of *Proteus mirabilis* from Diarrheic Infant Rhesus Monkeys in the Period of Artificial Feeding

ZHAO Yuan, YANG Feng-mei, CHEN Li-xiong, YU Wen-hai, WANG Jun-bin, HE Zhan-long

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College, Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research & Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To identify the *P. mirabilis* strain isolated from infant rhesus monkeys in the period of artificial feeding, and provide useful data for detection and identification of the bacteria in laboratory rhesus monkeys. **Methods** *P. mirabilis* strains isolated from infant rhesus monkeys were identified by cultural characteristics, colony morphology, staining, motility and biochemical test and serological test. Meanwhile, antibiotic sensitivity, virulence and toxin tests were conducted. **Results** The results of cultural characteristics, colony morphology, staining, biochemical and serological tests showed that the isolate was a strain of *P. mirabilis*. Effective therapeutic drugs were screened by antibiotic sensitivity test, and the disease was effectively controlled. Virulence tests showed that it is a highly pathogenic strain to mice. **Conclusions** The results of this study demonstrate that *P. mirabilis* isolated from infant monkeys is the pathogenic agent leading to their diarrhea and death. This bacteria strain is a conditional pathogen, which may cause some potential harm to researchers and laboratory rhesus monkeys. Although laboratory rhesus monkeys are allowed to be *P. mirabilis* carriers in our country, it is worth to pay high attention to the serious consequence of *P. mirabilis* infection, and it should be considered as an important issue.

【Key words】 Rhesus monkey (*Macaca mulatta*), Infant; *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*); Isolation;

[作者简介] 赵远(1974-), 男, 副研究员, 研究方向: 灵长类实验动物学。E-mail: zy-315@imbcams.com.cn。

[通讯作者] 和占龙(1972-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 灵长类实验动物学。E-mail: hzl@imbcams.com.cn。

Identification.

奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*, *P. mirabilis*) 在自然界中分布很广,为条件致病菌。由奇异变形杆菌引起人类的腹泻,尤其婴幼儿腹泻,或由奇异变形杆菌合并引起新生儿腹泻的报道屡见不鲜^[1,2],但它造成恒河猴婴猴腹泻,尚无报道。尽管实验动物国家标准 (GB14922—2001) 并未将奇异变形杆菌列为实验猕猴必检项目。但仍需指出的是:该菌为条件致病菌,一旦携带者受不良条件影响或外来因素刺激,可能引发传染病,造成严重后果^[3]。2011 年 4 月,本场离乳婴猴 230 只在进行隔离饲养至 1 周岁期间,1 周内先后有 21 只出现重度腹泻,4 只在 4 d 后死亡。本试验从婴猴粪便及肠道内分离到 1 株细菌,经对分离到的细菌进行形态特征、培养特性、生化特性进行鉴定,鉴定为奇异变形杆菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 培养基及试剂:HE、S. S、GN 增菌液、普通营养肉汤、三糖铁琼脂和生化试验用培养基、肠杆菌科细菌生化编码鉴定管及补充生化管(均购自杭州天和微生物试剂有限公司),革兰氏染液(青岛日水生物技术有限公司),药敏纸片(北京天坛生物技术开发有限公司)。

1.1.2 诊断血清:沙门氏菌、志贺氏菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌及肠出血性大肠埃希菌诊断血清(均购自兰州生物制品研究所),所有试剂均在有效期内使用。

1.1.3 仪器设备:Olympus 显微镜(日本),恒温培养箱(上海)。

1.1.4 动物:昆明小鼠,由中国医学科学院医学生物学研究所提供,生产许可证号:SCXK(滇)2010-0003,使用许可证号:SYXK(滇)2010-0007。

1.1.5 样品:采集发病初期婴猴粪便及死亡婴猴肠道内容物。

1.2 方法

1.2.1 临床症状:本场在对离乳婴猴 230 只进行隔离饲养至 1 周岁期间,1 周内先后有 21 只出现腹泻,4 只在 4 d 后死亡。所有患猴呈急性爆发性腹泻,拒食,腹部膨胀,阵发颤抖或精神萎靡。粪便开始为水样或土红色粘液便,后期带血丝,严重者粘液脓血便。患猴体温初始升高,随后两天下降。

部分患猴出现弯腰、抱腹、压迫痛等腹痛症状。病程 3~5 d。

1.2.2 病理剖检变化:腹腔积液,回肠、盲肠和结肠粘膜层出现条状出血斑,浆膜层有密布的网状出血点。肠管充气膨胀,肠壁变薄,呈透明状,腔内充满黑红色胶冻状物。

1.2.3 细菌培养分离:将粪便及肠内容物接种到 GN 增菌液孵育 6 h,分别接种于 HE 琼脂和 S. S 琼脂,37℃ 培养 24 h,观察结果,挑取单个典型菌落转种琼脂斜面,37℃ 培养 24 h。

1.2.4 生化试验:将分离菌株的纯培养物分别接种于肠杆菌科 GYE-11 编码鉴定管进行生化鉴定,补充做 TSI、氧化酶、V-P、MR、半固体、棉子糖、山梨醇、侧金盏化醇、木胶糖、七叶苷、水杨素、明胶、麦芽糖生化试验。

1.2.5 染色镜检:上述病料直接涂片革兰氏染色后镜检,挑取纯培养物涂片、革兰氏染色后镜检。

1.2.6 药敏试验:对分离菌用纸片扩散法进行常用抗菌类药物的敏感性试验,37℃ 培养 24 h,后取出,观察结果并测量抑菌圈大小(mm)。判定标准按美国 CLSI 的抗微生物药物敏感性试验操作方法和判断标准^[4]。

1.2.7 致病性试验:选用分离鉴定好的奇异变形杆菌,肉汤培养 18 h 后,各取 0.5 mL 培养液(菌液浓度均调整到 8×10^9 cfu/mL),腹腔注射于 4 只 17 g~20 g 昆明小鼠,对照组 4 只做 0.5 mL 无菌肉汤注射。

1.2.8 血清凝集试验:采用玻片法。取灭菌玻片,用接种环挑取分离菌株的纯培养物,分别与上述 6 种诊断血清及生理盐水混匀,上下摇动玻片数次,1 mm~3 min 后观察结果。判断标准:阳性—待检菌明显凝集,阴性—待检菌均匀浑浊。

2 结果

2.1 细菌形态

病料直接涂片、染色镜检可见大量革兰氏阴性、两端钝圆,单个或短链状的小杆菌,无芽胞和荚膜;挑取纯培养物,生理盐水适当稀释直接涂片、染色镜检可见与上述形态相同的革兰氏阴性小杆菌。

2.2 培养特性

分离菌株在 SS 琼脂平板形成无色透明菌落,

部分菌落中央呈黑色(产 H₂S),在 HE 琼脂平板呈淡蓝色透明菌落,扁平、湿润、边缘薄,中央呈黑色(产生 H₂S)。

2.3 生化特性

对可疑菌株纯培养物氧化酶阴性,TSI 阳性(三糖铁斜面上呈下部黑色、中部和上部淡红色)。依照肠杆菌科细菌生化鉴定编码册,做以下 11 项生化反应,鉴定值为 AG302,鉴定结果为奇异变形杆菌,补做 13 项生化反应,结果见表 1。

2.4 药敏试验

分离菌株进行抗生素敏感性实验,结果显示该菌株对头孢类(头孢曲松钠、头孢哌酮钠、头孢吡辛钠、头孢噻肟)高度敏感,对阿米卡星、氯霉素和氧氟沙星为中度敏感,而对氨苄西林、诺氟沙星、磺胺异恶唑、庆大霉素、磺胺甲基异恶唑/甲氧苄啶均不敏感,详见表 2。

2.5 血清凝集试验

分离菌与沙门氏菌、志贺氏菌、肠致病性大肠埃希菌、肠产毒性大肠埃希菌、肠侵袭性大肠埃希菌及肠出血性大肠埃希菌属因子血清均不凝集。

2.6 致病性试验

致病性试验结果显示,攻毒组小鼠均在 14 h 内死亡,剖检死亡小鼠发现,肝、脾淤血发黑,肺、心脏有出血点或出血斑。肠管充血膨胀,肠壁变薄呈透明状。十二指肠严重充血水肿,并能从内脏中分离到接种菌;对照组均健活。

3 讨论

从上述细菌形态、培养特性和生化特性可以证实,分离菌为奇异变形杆菌。变形杆菌属为腐败细

菌,在自然界分布甚广,在人和动物的肠道中也经常存在。该属细菌主要有普通变形杆菌、摩根变形杆菌、奇异变形杆菌。容易在受污染并经过放置高蛋白食物中大量繁殖。摄取这种食物容易引起变形杆菌食物中毒^[5,6]。

在以往有关变形杆菌引起猕猴腹泻的报道中,主要是摩根氏(*P. morganii*)和普通变形杆菌(*P. vulgaris*)^[7]。通过实验感染和以普通变形杆菌噬菌体治疗患猴的方法,人们早已证实了普通变形杆菌的致病性。必须指出的是,变形杆菌是猕猴的正常菌群之一,从正常猕猴粪便中均能分离出来,能引起体弱者突发腹泻^[7]。至于奇异变形杆菌,近年来,不断有猴、禽类、小鼠、水貂等多种动物感染奇异变形杆菌病的报道^[8-12],但是,奇异变形杆菌感染引起人工哺育期婴猴群体性发病的报道在国内鲜有报道。

表 1 分离菌株生化鉴定结果

Tab. 1 Biochemical characterization of the isolated *Proteus mirabilis*

项目 Items	结果 Results	项目 Items	结果 Results
葡萄糖产气 (GLU)	+	V-P	-
赖氨酸 (LYS)	+	半固体(动力) (MOT)	+
鸟氨酸 (ODC)	+	棉子糖 (RAF)	-
H ₂ S	+	山梨醇 (SOR)	-
靛基质 (IND)	-	侧金盏化醇 (ADO)	-
乳糖 (LAC)	-	木胶糖 (XYL)	+
卫茅醇 (DUL)	-	七叶苷 (ESC)	-
苯丙氨酸 (PHE)	-	水杨素 (SAL)	-
尿素 (URE)	+	麦芽糖 (MLT)	-
枸橼酸盐 (CIT)	-	明胶 (GEL)	+
三糖铁 (TSI)	+	M - R	+
氧化酶 (OXI)	-		

表 2 分离菌株药敏试验结果

Tab. 2 Results of antibiotic sensitivity test of the isolated *Proteus mirabilis*

抗生素 Antibiotics	规格/μg Specification/μg	抑菌圈直径/mm Bacteriostasis circle diameter/mm	抗生素 Antibiotics	规格/μg Specification/μg	抑菌圈直径/mm Bacteriostasis circle diameter/mm
氨苄西林 (AMP)	10	5	阿米卡星 (AMK)	30	19
诺氟沙星 (NOR)	10	6	氧氟沙 (OFLX)	5	12
氯霉素 (C)	30	15	头孢曲松 (CRO)	30	29
庆大霉素 (CN)	10	6	头孢哌酮 (CFP)	75	32
磺胺异恶唑 (SF)	300	4	头孢吡辛 (CXM)	30	25
磺胺甲恶唑/甲氧苄啶 (SXT)	23.75/1.25	10	头孢噻肟 (CTX)	30	30

(注:表中抑菌圈直径≤10 mm 为耐药;10~20 mm 为中等敏感;≥20 mm 为敏感。)

(Note: Bacteriostasis circle diameter in the table ≤10 mm means drug resistance, 10 - 20 mm means moderately sensitive; ≥20 mm means sensitive)

分析此次腹泻流行的原因,主要是婴猴断奶后进行人工哺育,在人工饲养初期由于来自母乳的营养及抗体可以帮助婴猴抵御疾病以及抗过敏。尽管人工哺育婴猴期间的饲料、牛奶等食物均通过高温蒸煮,且是现配现喂,可以排除食物中毒的可能。然而在人工哺育一段时间后面临着环境和饲料的改变等问题,这些因素可引起婴猴肺炎、抵抗力下降、菌群失调,从而导致奇异变形杆菌诱发腹泻,造成群体腹泻爆发流行。同时,在这一时期,婴猴腹泻、肺炎发病率较高,广谱抗菌素的大量使用,也使得此次分离到的奇异变形杆菌对氨苄西林、诺氟沙星、庆大霉素、磺胺异恶唑、氧氟沙星等常用抗生素耐药,而对头孢类比较敏感。药敏试验的结果指导临床治疗也取得了很好效果,对发病婴猴进行及时隔离,并配合药敏结果给药,合理调整饮食,在一个月內,所有发病动物全部康复,疾病彻底得到控制。

虽然奇异变形杆菌不是实验猕猴所必须排除的病原菌,且一般认为该菌为条件致病菌^[13,14],但从本试验分离到的菌株来看,该菌不但引起婴猴群体性腹泻并造成 4 只婴猴短期内死亡,而且致病性试验结果也显示其对小鼠有较强的致病性。同时,该菌还能在人猴间进行传播^[8],对研究人员和实验动物均有潜在的危害,对动物实验也可能造成不利影响。奇异变形杆菌可引起人类原发性或继发性感染,也能造成人类食物中毒,其作为人畜共患传染病病原,应引起重视。

参考文献:

[1] 朴明教,朴善玉. 3 例奇异变形杆菌所致新生儿腹泻[J]. 白

求恩医科大学学报, 1994, 20(1):30.

- [2] 陈宏. 28 例新生儿奇异变形杆菌性肠炎治疗体会[J]. 铁道医学, 1995, 23(6):374.
- [3] 中华人民共和国国家标[S]. GB14922. 2—2001 实验动物微生物学等级及监测.
- [4] 周庭银,倪语星,主编,临床微生物检验标准化操作[M]. 上海:上海科学技术出版社. 2009:363-365.
- [5] 刘渠,甘莉萍,骆云德,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):208-210.
- [6] 周霞,刘玉娥. 嗜碱耐盐奇异变形杆菌的分离与鉴定及致病性研究[J]. 职业与健康, 2002, 18(11):32-34.
- [7] 袁昆龙. 实验猕猴的疾病防治[M]. 北京:科学出版社,1978:9-30.
- [8] 许海峰. 雏鸡奇异变形杆菌病的诊断[J]. 中国畜禽传染病, 1997, 96(5):45-46.
- [9] 刘国璋,陈旋武,李志雄,等. 奇异变形杆菌引发人猴腹泻爆发的调查研究[J]. 中国人兽共患病杂志,1998, 14(6):79-80.
- [10] 虞德屏,阳艳,朱梦代,等. 肉鸡奇异变形杆菌病的诊断与治疗[J]. 中国家禽, 2005, 27(10):23.
- [11] 高正琴,王春玲,邢进,等. 鼠奇异变形杆菌的鉴别诊断[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(4):46-49.
- [12] 胡传,伟贾赞,简中友,等. 水貂奇异变形杆菌的分离与鉴定[J]. 经济动物学报, 2006, 10(2):77-79.
- [13] 杨履渭主编. 微生物学及检验技术[M]. 广州:广东科技出版社,1987:171.
- [14] 上海第二医学院主编. 微生物学[M]. 北京:北京人民卫生出版社, 1981:193.

[修回日期]2012-01-04