

社区获得性胃肠炎患者中分离出 香港海鸥形菌的研究报告

任淑华 倪晓平 孙建荣 高炎 项海青 孔庆鑫 赵洪峰 周田美 查捷 李华铭

【摘要】 目的 了解中国内地社区获得性胃肠炎患者是否存在香港海鸥形菌感染。**方法** 于 2005 年 8 月对杭州市第一人民医院肠道门诊就医患者采集粪样,分别接种 SS、XLD、CCDA、TCBS、MacConkey 琼脂(MA)以及改良头孢哌酮 MacConkey 琼脂(CMA)等 6 种平皿,对分离到的可疑细菌进行常规生理生化实验、16S rRNA 基因序列测定、透射电镜(TEM)下形态观察及药敏试验。**结果** 编号为 242 的标本,在 CMA 平皿上生长出无色、透明的微小菌落。该菌为革兰阴性,氧化酶、过氧化氢酶、尿素酶和精氨酸双脱氢酶阳性,鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶阴性,不发酵葡萄糖。经 16S rRNA 基因序列测定,菌株 242 的基因序列长度为 1413 bp,采用 Blast 软件对测序结果进行同源性分析显示,与文献报道的香港海鸥形菌同源值达 100%。TEM 下可见菌体两端有多根鞭毛。药敏试验结果显示,该菌对临床常用的 21 种抗菌药物表现出不同程度的耐药性,其中对青霉素、氨苄西林、头孢哌酮、头孢他啶表现为耐药。**结论** 证实中国内地社区获得性胃肠炎患者粪便中存在香港海鸥形菌。有关该菌引起感染性腹泻疾病的致病地位与流行病学等特征需进一步深入研究。

【关键词】 社区获得性胃肠炎; 香港海鸥形菌; 16S rRNA 基因; 药敏试验

A report on *Laribacter hongkongensis* isolated from a patient with community-acquired gastroenteritis
REN Shu-hua*, NI Xiao-ping, SUN Jian-rong, GAO Yan, XIANG Hai-qing, KONG Qing-xin,
ZHAO Hong-feng, ZHOU Tian-mei, CHA Jie, LI Hua-ming. *Hangzhou First People's Hospital,
Hangzhou 310006, China

【Abstract】 Objective To study the possibility of the presence of *Laribacter hongkongensis* in the community-acquired gastroenteritis in mainland China and to provide evidence for clinical diagnosis of this disease. **Methods** All fecal swabs were freshly collected from outpatients with community-acquired diarrhea in our hospital and immediately plated onto six kinds of culture agars: XLD, TCBS, SS, CCDA, MacConkey agar (MA) and modified cefoperazone MacConkey agar (CMA). Phenotypic characteristics, 16S rRNA gene sequencing, transmission electronmicroscopy (TEM) and drug susceptibility tests were employed to identify the isolated bacteria. **Results** Tiny, colourless, trans colonies growing on CMA of No. 242 sample were found. The colonies were composed of gram-negative bacterium which presented positive to oxidase, arginine dihydrolase, catalase and urease, and negative for lysine decarboxylase and ornithine decarboxylase. Glucose could not be fermented by this bacterium. PCR of the 16S rRNA gene of this bacterium showed fragment with 1413 bp in size. The 16S rRNA gene sequence of this bacterium was analyzed by Blast for a homology search, and the result showing that it had a 100% homology with *Laribacter hongkongensis*. Bipolar tuft flagella were observed by TEM. Drug susceptibility test indicated that this bacterium was resistant to 21 antibiotics at a variety of levels and definitely resistant to penicillin, ampicillin, cefoperazone and ceftazidime. **Conclusion** Data of our research proved the presence of *Laribacter hongkongensis* in the feces of patients with community-acquired gastroenteritis in mainland China. Further study was required on the clinical and epidemiological characteristics of the disease caused by this bacterium.

【Key words】 Community-acquired gastroenteritis; *Laribacter hongkongensis*; 16S rRNA gene; Drug susceptibility test

2001 年 Yuan 等^[1]从香港玛丽医院一名 54 岁

作者单位:310006 杭州市第一人民医院(任淑华、高炎、赵洪峰、周田美、李华铭); 杭州市疾病预防控制中心(倪晓平、孙建荣、项海青、孔庆鑫、查捷)

男性肝硬化患者的血液和胸腔脓液中分离出一株新的细菌,该菌为兼性厌氧,不产芽胞,革兰染色阴性。经鉴定该菌为变形菌门(*Proteobacteria*)、β-变形菌纲(*Beta proteobacteria*)、奈瑟菌科(*Neisseriaceae*)的

一个新属,该细菌因在我国香港首次发现,菌体呈海鸥形,故命名为香港海鸥形菌(*Laribacter hongkongensis*. gen. nov., sp. nov.)。嗣后, Woo 等^[2]在香港地区和瑞士腹泻患者的粪样中检出该菌,并认为是感染性腹泻的潜在病原体。目前,我国内地尚未见有关香港海鸥形菌的检出报道。为此我们于 2005 年 8 月始,对杭州市第一人民医院肠道门诊就诊的社区获得性腹泻患者,进行为期 4 个月的粪便采样检索,结果从一名本地腹泻患者的粪便标本中分离到一株香港海鸥形菌,结果报告如下。

材料与方 法

1. 入选对象:2005 年 8—11 月对来杭州市第一人民医院肠道门诊就诊的腹泻患者填写统一的流行病学调查表,内容包括患者发病的一般症状、腹泻特征、饮食史、外出旅游史等;并做血常规与粪便常规镜检。

2. 细菌培养:使用无菌棉签,在肠道门诊内采取患者新鲜粪便标本,参照文献[3]直接划线 SS、XLD、CCDA、TCBS、MacConkey 琼脂(MA)以及改良头孢哌酮 MacConkey 琼脂(CMA)等 6 种平皿,但本文对 CMA 中的头孢哌酮(cefoperazone)浓度略做调整,其剂量较文献[3]减少 50%,即头孢哌酮在培养基中的含量为 16 mg/L。SS、XLD、TCBS、MA 及 CMA 培养皿置 37℃ 培养箱,48 h;CCDA 培养皿置 5% CO₂ 环境培养,42℃,48 h。上述培养基均采用中国检验检疫科学研究所北京陆桥技术有限责任公司产品,并按使用说明书进行配制。

3. 生理生化实验:可疑细菌生化实验参照文献[1,3]进行,采用微量发酵管法,产品由杭州天和微生物试剂有限公司提供。

4. 16S rRNA 扩增与测序:PCR 模板 DNA 的制备采用接种环挑取在 CMA 培养皿上典型菌落,于 100 μl 无菌生理盐水中,水浴煮沸 10 min,冷却离心(10 000 r/min)5 min,取上清液作为模板。扩增 16S rRNA 基因引物设计参照文献[1],由上海 Sangon 公司合成,所用引物:PLW264, 5'-GAGTTTGAT CMTGGCTCAG-3', LPW265, 5'-GNTACCTTG TTACGACTT-3'。PCR 反应体系(50 μl):1×PCR 缓冲液 5 μl, 25 mmol/L MgCl₂ 4 μl, 2 mmol/L dNTPs 4 μl, 5 U/μl 的 Taq DNA 聚合酶 1 μl, 0.6 mmol/L 的引物各 1 μl, 模板 DNA 2 μl, ddH₂O 32 ml。反应条件:94℃ 5 min;94℃ 1 min, 52℃

1.5 min, 72℃ 1.5 min, 35 个循环;72℃ 10 min。取 8 μl 反应液在含有 0.5 μg/L EB 的 1% 琼脂糖凝胶上电泳,紫外线下观察结果。PCR 扩增产物送上海 Sangon 公司进行序列测定。

5. 药敏试验:药敏实验采用 K-B 纸片法,每批实验均用标准大肠埃希菌 ATCC25922 进行质控,并按美国临床实验室标准委员会(NCCLS)2005 年版标准判断结果。药敏纸片采用英国 OXOID 公司产品;血琼脂、M-H 琼脂平板来源于生物梅里埃公司。

6. 透射电镜观察:对分离到可疑菌株进行透射电镜(TEM)下形态观察,了解细菌大小及带鞭毛与否。

结 果

1. 2005 年 8 月 17 日至 11 月 30 日共采集 274 份粪便标本,并在编号为 242 的平皿上发现可疑菌落。该菌落在 CMA 培养基上呈无色、透明、扁平状,边缘光滑整齐,直径在 0.5~1.0 mm 之间的微小菌落,未见其他菌落;在 MA 上可见少量的上述可疑菌落混杂在众多的粉红色菌落之中;在 SS、XLD 平皿上分别可见大量粉红色、产 H₂S 菌落及黄色菌落;而 CCDA、TCBS 均无菌生长。

2. 经流行病学调查发现,该例患者为男性,58 岁,杭州市人,于 2005 年 11 月 13 日发病,水样便,每日 10 余次,自服“肠胃康”(一种健胃药)无效,于 11 月 15 日来杭州市第一人民医院肠道门诊就医。患者大便呈黄色水样,镜检红细胞、白细胞、化脓细胞、脂肪颗粒及寄生虫卵均阴性;血常规显示白细胞 $5.4 \times 10^9/L$,其中 N 48.5%、L 42.7%、M 8.8%;粪便细菌培养结果志贺菌、沙门菌、空肠弯曲菌、副溶血性弧菌及霍乱弧菌均阴性。临床诊断:肠炎。患者留院用氟罗沙星(fleroxacin)等治疗。第二天腹泻止。该患者入院时无腹痛、无发热、无呕吐、无里急后重;大便无异常气味;发病前 2 周无外出旅游史、无外出饮食、无服用抗生素史、无食淡水产品史,但平时常食海产品,尤以带鱼为多;既往有胃溃疡史,无其他基础疾病;家庭其他成员同期无一例发生腹泻。

3. 细菌生理生化试验结果表明,菌株 242 为革兰阴性菌,氧化酶、过氧化氢酶、精氨酸双脱氢酶阳性;鸟氨酸脱羧酶和赖氨酸脱羧酶阴性;无色素,不发光,不溶血,不发酵葡萄糖(表 1);并有明显的动力。

4. 经 16S rRNA 基因序列测定, 菌株 242 的基因序列长度为 1413 bp, 经采用 Blast 软件对菌株 242 的 16S rRNA 基因序列测序结果的同源性分析, 结果显示菌株 242 与香港玛丽医院 Yuan 等^[1]报道的香港海鸥形菌同源值达 100% (图 1)。本菌株在 GenBank 库中的登录注册号: DQ396525。

表1 菌株 242 生化试验结果

检验项目	结果	检验项目	结果
革兰染色	-	硝酸盐还原	+
氧化酶	+	产色素	-
过氧化氢酶	+	发光	-
鸟氨酸脱羧酶	-	溶血	-
精氨酸双脱氢酶	+	葡萄糖发酵	-
赖氨酸脱羧酶	-	利用柠檬酸盐	-
脲酶	+		

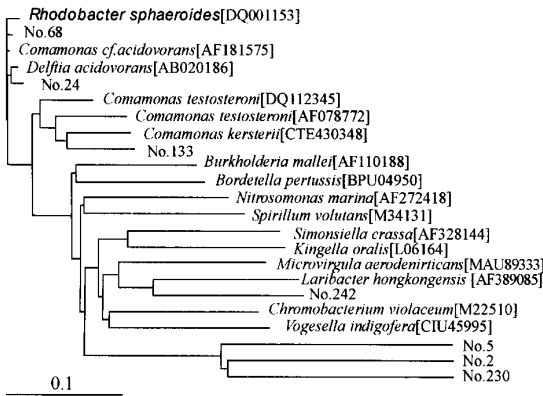


图1 根据 16S rRNA 基因序列同源性构建的系统进化树分析

5. 药敏试验结果显示, 菌株 242 对临床常用的 21 种抗菌药物表现出不同程度的耐药性, 其中对青霉素、氨苄西林、头孢哌酮、头孢他啶表现出耐药性; 对哌拉西林、AMC (阿莫西林/克拉维酸钾)、头孢曲松、头孢噻肟表现为中介; 而对含β-内酰胺酶抑制剂的药物头孢西丁、头孢呋辛、头孢吡肟, 喹诺酮类, 氨基糖苷类以及氨基南、亚胺培南均为敏感 (表 2)。

6. TEM 下观察, 菌株 242 呈海鸥形弯曲, 菌体长为 2.5~3.5 μm, 菌体两端长有鞭毛, 最长达 5 根, 鞭毛长约 9.0 μm (图 2)。

讨 论

目前, 全球范围内相关香港海鸥形菌的报道少见。我们在杭州市社区获得性胃肠炎患者的粪便中分离到一株可疑菌株, 根据测定其主要的生理生化特征, 结合该菌 16S rRNA 基因序列在系统进化树

中的位置, 并与 GenBank 中香港海鸥形菌的 16S rRNA 基因序列比较, 两者的同源值高达 100%。

表2 菌株 242 对 21 种抗菌药物的药敏试验结果

药物名称	药敏结果	药物名称	药敏结果
青霉素	R	头孢呋辛	S
氨苄西林	R	头孢吡肟	S
哌拉西林	I	左氧沙星	S
阿莫西林/克拉维酸钾	I	阿米卡星	S
哌拉西林/三唑巴坦	S	庆大霉素	S
替卡西林/克拉维酸钾	S	复方新诺明	S
头孢哌酮	R	氯霉素	S
头孢他啶	R	美罗培南	S
头孢曲松	I	氨基南	S
头孢噻肟	I	亚胺培南	S
头孢西丁	S		

注: R 耐药; I 中介; S 敏感

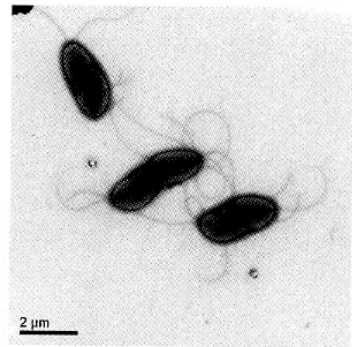


图2 菌株 242 的 TEM 照片 (15 000 ×)

一项为期 4 个月的多中心病例对照研究结果显示^[4], 3788 例社区获得性胃肠炎患者中有 17 例粪样中分离到香港海鸥形菌, 1894 例对照组则无一例检出 ($P=0.001$); 粪便培养阳性者中 10 例 (59%) 有近期外出旅行史, 而对照组的 34 人中仅有 2 人 (6%) ($P<0.0001$); 阳性者中 16 例 (94%) 有近期食用淡水鱼史, 而对照组则为 19 人 (56%) ($P=0.009$); 其临床腹泻多呈水样便 (约占 80%), 而血水样便则为少数 (约 20%)。

Teng 等^[5]近期开展的香港海鸥形菌生态流行病学调查结果发现, 在数种淡水鱼肠道检出该菌, 其平均阳性率为 24% (86/360), 并以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、大头鱼 (*Aristichthys nobilis*) 的检出率最高, 分别为 60% (36/60) 与 53% (32/60); 而 750 份猪、牛、鸡、鸭、鹅等家禽家畜及 360 份数种海水鱼的粪检均为阴性。上述结果提示, 香港海鸥形菌为社区获得性胃肠炎的潜在病原体, 其感染的危险因素包括食用淡水鱼及外出旅行。

本例患者系杭州市本地人,临床上呈水样性腹泻,日腹泻次数达 10 余次;无发热、腹痛、里急后重等症状;粪样镜检无殊发现;经流行病学调查,发病前无外出旅行、无食用淡水产品史;氟罗沙星治疗有效。

菌株 242 在 MA、CMA 培养皿上呈无色透明的微小菌落,在 MA 培养皿上混有粉红色菌落,而在 CMA 培养基中因含有头孢哌酮,故仅见无色透明的微小菌落。因在本次调查初期了解到多数来院就医的腹泻患者均有自行服用抗菌药物史,故这些患者的粪便标本在 SS、XLD、TCBS 以及 MA 上的菌落生长均受到一定程度的影响,为此我们根据这一特点,参照文献[3]在配制 CMA 培养基时,调整头孢哌酮在 CMA 中的浓度,其在培养基中的含量为 16 mg/L。另外,根据本实验室的经验,MA 与 CMA 均适用于对香港海鸥形菌的培养与分离,但用于分离培养时建议使用 CMA,以获得较高的分离率;而传代培养则可使用 MA 或普通营养琼脂,以减少对细菌生长的影响。

药敏结果显示,菌株 242 对 21 种抗菌药物表现出不同的耐药谱,尤其表现出对青霉素类和三代头孢菌素类药物的耐药性;而对含 β -内酰胺酶抑制剂的药物,二代、四代头孢菌素类、喹诺酮类、氨基糖苷

类、碳青霉烯类及单环菌素类的药物敏感。药敏试验结果也进一步解释,CMA 培养基有利于香港海鸥形菌的分离培养,并对其他肠道细菌的生长达到有效抑制作用。

本研究首次证实杭州市社区获得性胃肠炎患者中检出香港海鸥形菌,但该菌在社区感染性胃肠炎中的作用地位有待进一步深入研究,其临床学、流行病学特征也有待进一步阐述。

参 考 文 献

- 1 Yuan KY, Woo PCY, Teng JLL, et al. *Laribacter hongkongensis* gen. nov., sp. nov., a novel gram-negative bacterium isolated from a cirrhotic patient with bacteremia and empyema. J Clin Microbiol, 2001, 39: 4227-4232.
- 2 Woo PCY, Kuhnert P, Burnens AP, et al. *Laribacter hongkongensis*: a potential cause of infectious diarrhea. Diag Microbiol Infect Dis, 2003, 47: 551-556.
- 3 Lau SKP, Woo PCY, Hui WT, et al. Use of cefoperazone MacConkey agar for selective isolation of *Laribacter hongkongensis*. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4839-4841.
- 4 Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, et al. Association of *Laribacter hongkongensis* in community-acquired gastroenteritis with travel and eating fish: a multicentre case-control study. Lancet, 2004, 363: 1941-1947.
- 5 Teng JLL, Woo PCY, Ma SSL, et al. Ecocpidemiology of *Laribacter hongkongensis*, a novel bacterium associated with gastroenteritis. J Clin Microbiol, 2005, 43: 919-922.

(收稿日期:2006-03-20)

(本文编辑:张林东)

· 疾病控制 ·

一起类志贺邻单胞菌间歇性腹泻的调查

王增朝 裴以东 张艳

2005 年 5 月 15 日郑州铁路局某供电工区职工中出现慢性腹泻,经调查为一起类志贺邻单胞菌感染引起的间歇性腹泻。该工区为铁路沿线独立院落,饮用水为自备深水井,职工就餐为自己设立的团体伙食,食品均为自己加工,存在生熟混用、混放现象。工区院内有一鱼塘,职工经常在此钓鱼,有用手直接抓鱼的习惯。工区现有职工 22 人,均为男性。5 年来常有间歇性腹泻发病。主要症状为腹痛、腹泻,腹泻持续 2-3 天,腹泻者每天约 2-5 次,呈水样、脓样便。每次出现以上症状均是在上班后。近 5 年来患者每年出现上述症状 5-10 次及 10 次以上各占 50%。58.3% 的腹泻者需用抗生素治疗。腹泻患者与未腹泻者个人卫生习惯差异无统计学意义。发病无季节性差别。饮用水分析,除铁超标外其他

各项均不超标。鱼塘水采样检出类志贺邻单胞菌。对所有职工大便肛拭增菌培养,4 人培养出类志贺邻单胞菌,其中间歇性腹泻患者及无症状者各 2 人。此后采取饮用水加氯消毒、食堂整改、全体职工抗生素投药预防性治疗、开展卫生科普知识讲座等综合防治措施,经半年追踪调查,未再发生以上腹泻现象。

综合分析,由于长期监测生活饮用水不超标,经水传播的可能性不大。食堂存在食品生熟混放、混用,个人卫生习惯不良,职工钓鱼后有直接手拿活鱼的习惯,鱼塘中监测出类志贺邻单胞菌。经鱼塘鱼体传播到人,经慢性带菌者水平传播,污染的食品及食具传播均存在可能。采取综合措施后发病得以终止,说明分析判断和处理措施是正确的。

(收稿日期:2005-12-27)

(本文编辑:张林东)