

# 5 株与志贺氏菌诊断血清交叉凝集的其他肠杆菌的鉴定与分析

邓峥华, 邓春明\*

祁阳县疾病预防控制中心, 祁阳426100

**摘要:目的** 研究能与志贺氏菌诊断血清发生交叉凝集的细菌, 为实验室细菌鉴定提供参考。

**方法** 对自从业人员健康体检中分离的与志贺氏菌血清交叉凝集的可疑菌落, 依据WS 271-2007《感染性腹泻的诊断标准》进行生化试验和血清学试验, 参考SN/T 1869-2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法》进行ipaH毒力基因检测。**结果** 5株与志贺氏菌诊断血清交叉凝集的肠杆菌, 分别是蜂房哈夫尼亚菌, 弗格森埃希菌, 摩氏摩根菌和2株大肠埃希氏菌, 除侵袭性大肠埃希氏菌(EIEC)外, 其余4株均能通过PCR试验与志贺氏菌进行区别。

**结论** 志贺氏菌鉴定必须血清学结合生化试验结果进行判定, PCR方法可辅助进行鉴定。

**关键词:**志贺氏菌、诊断血清、交叉凝集、鉴定

志贺氏菌又称痢疾杆菌, 是一类革兰氏阴性无芽胞, 无鞭毛, 兼性厌氧杆菌。按照其生化反应与抗原结果可以分为4个群, 分别为痢疾志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌、宋内氏志贺氏菌和福氏志贺氏菌。在志贺氏菌血清鉴定过程中, 有一些抗原相似的肠杆菌与志贺氏菌诊断血清发生交叉凝集。本实验室自从业人员健康体检中分离出5株与志贺氏菌诊断血清交叉凝集的肠杆菌, 现将鉴定分析结果报告如下:

## 1 材料与方法

### 材料

**菌株来源** 2011年-2013年自从业人员健康体检分离的与志贺氏菌诊断血清发生交叉凝集的菌株5株, 福氏志贺氏菌 ATCC 12022 由湖南省疾病预防控制中心馈赠。

**培养基及试剂** 营养琼脂、三糖铁琼脂、革兰氏染色液均购自广东环凯微生物科技有限公司, 志贺氏菌诊断血清(50种)购自宁波天润生物药业有限公司, API 20E 购自生物梅里埃公司, Taq 酶购自大连宝生物工程有限公司, 引物合成自上海生工生物工程股份有限公司, 所有试剂均在有效期内。

### 方法

1.2.1 病原菌分离和生化鉴定 依据WS271-2007《感染性腹泻的诊断标准》<sup>[1]</sup>对可疑菌落进行分离、革兰氏染色镜检和生化鉴定。菌株接种至营养琼脂纯培养后做革兰氏染色和API 20E进一步生化鉴定。API 20E生化试验方法参考产品说明书, 挑取数个纯菌落于5 mL 0.85%生理盐水中, 仔细研匀使细菌悬液达到0.5麦氏浊度, 用吸管接种至生化孔中, 36℃培养24 h后观察结果。

1.2.2 血清学分型 取单个菌落与志贺氏菌多价血清和单因子血清做凝集实验, 同时做盐水对照实验。

1.2.3 PCR鉴定 参考SN/T1869-2007《食品中多种致病菌快速检测方法 PCR法》<sup>[2]</sup>检测志

第一作者: 邓峥华, 主管技师。专业: 微生物检验。

通讯作者: 邓春明, Email: 56749141@qq.com

贺氏菌ipaH基因。引物序列为5’ -gtt cct tga ccg cct ttc cga tac cgt-3’ 和5 ‘-gcc ggt cag cca ccc tct gag agt ac-3’ ，PCR反应程序95℃, 5min; 95℃, 15s, 65℃, 30s, 72℃, 30s, 35个循环; 72℃, 5min。用含0.5g/mL溴化乙锭的1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，紫外灯下照相记录结果。

2 结果

菌落形态与革兰氏染色

5株菌均为革兰氏阴性、无芽孢、无荚膜短杆菌，在营养琼脂上生长良好，在麦康凯琼脂平板上菌落为圆形，湿润，半透明菌落，符合肠杆菌菌落特征。

生化结果

5株菌在TSI中均为斜面变红，底层黄色，均不产H<sub>2</sub>S，菌株B、C和D产气，其余菌株不产气。经API 20E生化鉴定，菌株A为蜂房哈夫尼亚菌，B为弗格森埃希菌，C为大肠埃希氏菌，D为摩氏摩根菌，E为大肠埃希氏菌。具体生化见表1。

表1 5株肠杆菌的API 20E生化结果

生化实验	A	B	C	D	E
邻硝基苯-半乳糖苷 (ONPG)	+	+	+	-	+
精氨酸 (ADH)	-	-	-	-	-
赖氨酸 (LDC)	+	+	+	-	+
鸟氨酸 (ODC)	+	-	-	+	-
柠檬酸钠 (CIT)	-	-	-	-	-
硫代硫酸钠 (H <sub>2</sub> S)	-	-	-	-	-
脲素 (URE)	-	-	-	+	-
色氨酸 (TDA)	-	-	-	-	-
色氨酸 (IND)	-	+	+	+	+
丙酮酸盐 (VP)	-	-	-	-	-
Kohn 明胶 (GEL)	-	-	-	-	-
葡萄糖 (GLU)	+	+	+	+	+
甘露醇 (MAN)	+	+	+	-	+
肌醇 (INO)	-	-	-	-	-
山梨醇 (SOR)	-	-	+	-	-
鼠李糖 (RHA)	+	+	+	-	-
蔗糖 (SAC)	-	-	-	-	-
密二糖 (MEL)	-	-	+	-	-
苦杏仁苷 (AMY)	-	+	-	-	-
阿拉伯糖 (ARA)	+	+	+	-	-
氧化酶 (OX)	-	-	-	-	-
生化鉴定结果	蜂房哈夫尼亚菌	弗格森埃希菌	大肠埃希氏菌	摩氏摩根菌	大肠埃希氏菌
血清凝集结果	福氏IV型	痢疾2型	鲍氏1型	福氏多价	福氏1a

血清学结果

挑取菌株A~E在营养琼脂平板上的纯菌落，进行志贺氏菌血清学试验，同时用生理盐水做对照。菌株A与福氏多价、福氏IV型均凝集，菌株B与志贺菌4种多价、

痢疾 2 型均凝集，菌株 C 与鲍氏 1 型凝集，菌株 D 与志贺菌 4 种多价和福氏多价均凝集，菌株 E 与福氏 I 型和福氏群 3, 4 凝集。所有菌株生理盐水均不凝集。

PCR 检测结果

对实验菌株进行 ipaH 基因 PCR 检测，除对照菌株福氏志贺氏菌 ATCC 12022 和菌株 E 的 PCR 检测结果为 ipaH 基因阳性外，其它菌株 ipaH 基因均为阴性，具体见图 1。

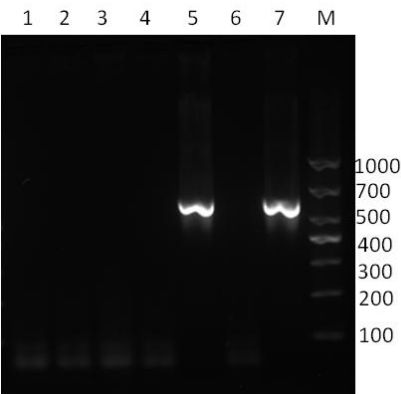


图 1 5 株肠杆菌 ipaH 基因 PCR 结果

1. 菌株 A; 2. 菌株 B; 3. 菌株 C; 4. 菌株 D;

5. 菌株 E; 6. 阴性对照; 7. 阳性对照; M. DL 1000 DNA marker

3 讨论

肠杆菌科各病原菌之间因存在相同的抗原，导致血清交叉凝集现象。国内报道与志贺氏菌血清交叉凝集的肠杆菌有居泉沙雷菌、河土肠杆菌、蜂房哈夫尼亚菌、摩氏摩根菌摩根亚种、阴沟肠杆菌、大肠埃希菌等<sup>[3]</sup>。本研究发现蜂房哈夫尼亚菌、摩氏摩根菌、大肠埃希菌和弗格森埃希菌均与志贺氏菌血清发生交叉凝集，其中一株弗格森埃希菌与痢疾 II 型志贺氏菌血清交叉凝集，弗格森埃希菌属于肠杆菌科的埃希菌属，可引起人和动物创伤感染、尿道感染、菌血症、腹泻和胸膜感染等，是一种条件致病菌<sup>[4]</sup>。

志贺氏菌引起的感染性腹泻和食源性疾病暴发事件经常发生，如桂阳县 2009 年-2012 年因志贺氏菌引起的食物中毒占细菌性食物中毒的 37.5%<sup>[5]</sup>，因此志贺氏菌的鉴定显得尤为重要。志贺氏菌相对其他肠杆菌生化不活泼，各血清型的生化反应也不完全相同，比如宋内氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌 13 型的鸟氨酸脱羧酶为阳性，宋内氏菌和痢疾志贺氏菌 1 型，鲍氏志贺氏菌 13 型的  $\beta$ -半乳糖苷酶为阳性。志贺氏菌与某些不活泼的大肠埃希菌生化特征相似，比如本研究的菌株 E 经生化和血清鉴定为侵袭性大肠埃希氏菌（EIEC），它的大多数生化反应与志贺氏菌相同。在一些食物中毒标本中分离的 EIEC 常与志贺氏菌发生交叉凝集<sup>[6]</sup>，在日常检测中常被忽视或误认为志贺氏菌。而且本实验的 PCR 结果表明 EIEC 与志贺氏菌有同源基因 ipaH，通过 PCR 方法扩增 ipaH 基因不能区分 EIEC 和志贺氏菌，与相关报道结果一致<sup>[7]</sup>。因此志贺氏菌鉴定，应以生化试验结果为基础，结合血清学试验结果进行分型，同时可使用 PCR 方法进行辅助鉴定。

参考文献:

- [1]WS 271-2007. 感染性腹泻的诊断标准[S].
- [2]SN/T1869-2007. 食品中多种致病菌快速检测方法 PCR 法[S].
- [3]郑向梅, 吕均, 李玉芳, 等. 34 株与志贺氏菌血清交叉凝集的其它肠杆菌的鉴定与分析[J]. 公共卫生与预防医学, 2013, 24 ( 3 ):97-98
- [4]陶元勇, 孙铭艳, 李建华, 等. 弗格森埃希菌的生物学特征研究与 16S rRNA 检测[J]. 中国病原生物学杂志, 2013, 8(3):229-232
- [5]张忠诚, 宁红卫, 周红梅, 等. 桂阳县 2009-2012 年细菌性食物中毒特征分析[J]. 实用预防医学, 2014, 21 ( 4 ): 461-462
- [6]高亚色, 梁英. 疑似食物中毒患者标本一株侵袭性大肠埃希菌 O29:K?的分离及实验探讨[J]. 实用预防医学, 2007, 14(1):199-200
- [7]朱水荣, 徐宝祥, 余昭, 等. LAMP 技术应用于志贺菌及侵袭性大肠埃希菌 ipaH 基因快速检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2010, 8(20): 1843-1846