

胎儿弯曲菌蛟河株从结肠癌患者血液中的分离及鉴定

李春辉, 孙可歆, 孙风辉

李春辉, 北华大学附属医院肿瘤科 吉林省吉林市 132011
孙可歆, 吉林医药学院检验系 吉林省吉林市 132013
孙风辉, 蛟河市第二人民医院 吉林省蛟河市 132013
作者贡献分布: 李春辉与孙可歆对此文所作贡献均等; 孙风辉提供标本; 此课题由李春辉与孙可歆设计; 研究过程由李春辉操作完成; 研究所用新试剂及分析工具由孙可歆提供; 数据分析由李春辉完成; 本论文写作由李春辉与孙可歆完成。
通讯作者: 孙可歆, 132013, 吉林省吉林市吉林大街5号, 吉林医药学院检验系. sunkexin77@126.com
电话: 0432-62166372
收稿日期: 2010-01-20 修回日期: 2010-04-20
接受日期: 2010-04-27 在线出版日期: 2010-05-08

Characterization of a novel strain of *Campylobacter fetus* separated from the blood sample from a patient with colon cancer

Chun-Hui Li, Ke-Xin Sun, Feng-Hui Sun

Chun-Hui Li, Department of Oncology, the Affiliated Hospital of Bei Hua University, Jilin 132011, Jilin Province, China
Ke-Xin Sun, Department of Medical Laboratory Science, Jilin Medical College, Jilin 132013, Jilin Province, China
Feng-Hui Sun, the Second People's Hospital of Jiaohe City, Jiaohe 132013, Jilin Province, China
Correspondence to: Ke-Xin Sun, Department of Medical Laboratory Science, Jilin Medical College, 5 Jilin Avenue, Jilin 132013, Jilin Province, China. sunkexin77@126.com
Received: 2010-01-20 Revised: 2010-04-20
Accepted: 2010-04-27 Published online: 2010-05-08

Abstract

AIM: To characterize the morphological and biological properties of a novel strain of *Campylobacter fetus* (Jiao he strain) separated from the blood sample from a patient with colon cancer.

METHODS: The morphological, cultural and biochemical characteristics of the isolated strain were studied with routine methods. Bacterial DNA was extracted to amplify 16S rDNA with TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit (Code No. D310). PCR products were then sequenced.

RESULTS: The morphological, cultural and biochemical characteristics of the isolated strain correspond well with those of *Campylobacter fe-*

tus. The sequence of 16S rDNA amplified from the isolated strain is also matched with those of *Campylobacter fetus* deposited in the NCBI database.

CONCLUSION: Jiao he strain may represent a novel subspecies of *Campylobacter fetus* since there are differences in some stably heritable morphological and cultural characteristics between Jiao he strain and subspecies fetus.

Key Words: *Campylobacter fetus*; Colon cancer; Pathogenicity; Jiao he strain

Li CH, Sun KX, Sun FH. Characterization of a novel strain of *Campylobacter fetus* separated from the blood sample from a patient with colon cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2010; 18(13): 1395-1399

摘要

目的: 研究从结肠癌术后患者血液中分离出的病原菌生物学性状并鉴定其种型。

方法: 按常规的鉴定方法进行细菌学实验(包括形态学、培养特性、生化特征等实验); 用碱裂解法提取细菌DNA, 使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No. D310), 以Forward primer/Reverse primer 2为引物, 做16S rDNA PCR扩增及序列测定。

结果: 蛟河株的形态学、培养特性和生化特征等实验符合弯曲菌属胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)鉴定标准; 经16S rDNA扩增及测序结果NCBI上比对结果为胎儿弯曲菌。

结论: 蛟河株为弯曲菌属胎儿弯曲菌; 但比胎儿亚种形态学和生化特征有一定差异, 且可稳定遗传给子代, 可以确定为胎儿亚种的新变种。

关键词: 胎儿弯曲菌; 结肠癌; 致病性; 蛟河株

李春辉, 孙可歆, 孙风辉. 胎儿弯曲菌蛟河株从结肠癌患者血液中的分离及鉴定. 世界华人消化杂志 2010; 18(13): 1395-1399
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/18/1395.asp>

■背景资料

细菌的变异现象是细菌的普遍特征之一。在自然界中, 任何微生物都可发生变异。有的是表型变异(非遗传性变异), 有的是基因型变异(遗传性变异)。研究细菌的变异性, 发现新细菌或新变种, 有助于临床工作者对感染性疾病的病原学的深刻认识, 从而提高临床诊治水平, 科学诊断, 科学治疗。该研究直接来源于临床实践, 符合转化医学的科研思路。

■同行评议者

周晓东, 副教授, 南昌大学第一附属医院消化内科

■相关报道

众所周知,目前细菌的分类鉴定均是按照国际惯例,依据新版本“伯杰鉴定细菌学手册”(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)和“伯杰系统(分类)细菌学手册”(Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology)并参阅国内外相应的文献而进行。一方面要做细菌表型特征的鉴定;另一方面要做细菌的遗传学特征(测序)鉴定。目前,国内尚未见有对本菌的这种全方位的鉴定报道文献。

0 引言

弯曲菌属(*Campylobacter*)是一类呈逗点状、S状或螺旋状弯曲的革兰阴性杆菌,广泛分布于温血动物,常定居于家禽及野鸟的肠道内。引起人类肠道感染的菌种主要为空肠弯曲菌和大肠弯曲菌。其中,空肠弯曲菌空肠亚种最为常见。由胎儿弯曲菌引起人类感染的报道甚少。目前,有关胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)引起的结肠癌术后患者的菌血症和败血症,国内尚未见报道,国外报道的病例也甚少^[1-7,13,14]。我们于2009-06从患结肠癌术后来蛟河市二院进行化疗的患者出现败血症时的血液中分离出1株胎儿弯曲菌,现报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料 临床病例:男,71岁,蛟河市天岗乡人,从事养殖野鸡、鸟、家禽等工作。患结肠癌在解放军222医院术后,来蛟河市二院化疗。查体:体温39.1℃,脉搏105次/分,呼吸33次/min,血压18/13 kPa(140/100 mmHg),精神萎靡,四肢末稍厥冷,双肺呼吸音清,未闻及干湿罗音。心律105次/min,律不齐。实验室检查:胸部CT显示:右肺门可见少许肿大淋巴结。血红蛋白100 g/L, RBC $3.01 \times 10^{12}/L$, WBC $20 \times 10^9/L$ 。肝功能ALT 25 U/L、GGT 91 U/L、总蛋白52.6 g/L、白蛋白22.8 g/L、球蛋白29.8 g/L。肾功能正常、粪便隐血(++),尿常规正常。病理诊断:结肠癌,中度分化。仪器与试剂: TaKaRa BIO公司TP3000型PCR仪, ABI公司377XLDNA测序仪, 测序试剂为: ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with Amplitaq DNA Polymerase, FS(Applied Biosystems)。细菌分离培养基: 血平板、普通平板、中国蓝平板。血液增菌培养基为美国BD公司BACTEC成人需氧增菌培养瓶, 血培养系统为BACTEC9050全自动血培养系统。

1.2 方法 细菌的生物学性状检验,包括形态学、培养特性和生化特征,其方法按常规方法进行^[7]。常规碱裂解法提取细菌DNA,对提取的细菌基因组DNA取1 μL 10倍稀释后进行琼脂糖凝胶电泳。以细菌基因组DNA为模板,使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以Forward primer/Reverse primer2为引物,扩增目的片段。取5 μL进行脂糖凝胶电泳。使用TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.2.0(Code No. DV805A)切胶回收目的片段,

取1 μL进行琼脂糖凝胶电泳。以试剂盒提供的Seq Forward、Seq Reverse、Seq Internal为引物对胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)CTA703株的16S rDNA基因序列测定与分析(华大生物工程有限公司进行)。

2 结果

2.1 细菌分离培养及生长特征 送检患者血液标本经BACTEC9050培养系统48 h显示阳性,取阳性培养物无菌操作分别接种血平板、普通平板、中国蓝平板进行分离培养。置于25、37、42℃不同温度环境下需氧纯培养24-48 h,未见细菌生长;72 h后25、37℃纯培养的血平板出现云雾状的生长物,42℃不生长。为微需氧菌,50 g/L CO₂可促进其生长。普通平板和中国蓝平板均无细菌生长。取纯培养物,经3-4次传代肉汤增菌培养后接种血平板,37℃ 24 h就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长,72 h后有部分形成光滑、湿润、灰色的单个菌落。

2.2 细菌的形态学特征 取阳性肉汤培养物直接涂片镜检:(1)瑞氏染色镜检,结果发现有细菌(图1A);(2)美蓝染色镜检发现细菌(图1B);(3)取阳性肉汤培养物滴于载玻片上,加上盖玻片,高倍镜下观察,发现有大量运动相当活跃的菌体,油镜下观察,发现有螺旋状且运动活泼的菌体。

取血平板生长的细菌涂片革兰染色镜检发现革兰阴性,菌体细长,弧形或两菌体相连形成弯曲的螺旋状、“S”形、海鸥展翅形(图2),旧培养物可呈现球状。细菌的大小,长为0.5-5 μm,无芽胞。鞭毛染色可见菌体一端或两端有单鞭毛,有的则为一根侧鞭毛(图3)。

2.3 细菌的生化特征 氧化酶阳性,触酶阳性,还原硝酸盐,对糖类不氧化也不发酵,甲基红阴性,V-P试验阴性,不液化明胶,尿素酶阴性,脂酶阴性,H₂S阴性,枸橼酸盐利用试验阴性。不产生色素。

2.4 细菌的基因组DNA 16S rDNA扩增及序列测定 提取细菌基因组DNA,并以此为模板使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310),以该试剂盒提供的Forward primer/Reverse primer2引物,扩增目的片段。取5 μL进行脂糖凝胶电泳,结果如图4。

待测菌株16S rDNA PCR产物琼脂糖凝胶电泳显示,扩增产物约1 500 bp左右。阳性对照试剂盒提供的细菌通用16S rDNA阳标,由于细菌种类不同,与待测菌株扩增片段大小有差别。PCR产物经切胶回收,纯化,以试剂盒提供的Seq

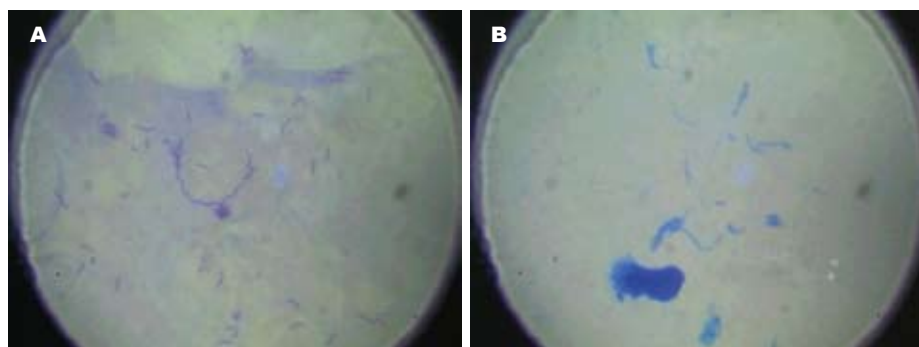


图 1 肉汤培养物所见($\times 1000$). A: 瑞氏染色; B: 美蓝染色.



图 2 血平板 24 h培养物涂片镜下所见(革兰染色, $\times 1000$).



图 3 鞭毛染色所见(鞭毛染色法 $\times 1000$).

Forward、Seq Reverse、Seq Internal为引物测序. 2.5 待测细菌16S rDNA基因序列测定结果及NCBI基因库数据比对结果 由华大生物工程有限公司测得的基因序列, 经BLAST分析, 结果与胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)CTA703株的16S rDNA基因部分序列(基因登录号GI: 116248040)100%一致, 全长1 435 bp, 表明待测菌株为胎儿弯曲菌.

3 讨论

众所周知, 目前细菌的分类鉴定均是按照国际惯例, 依据新版本“伯杰鉴定细菌学手册”(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)和“伯杰系统(分类)细菌学手册”(Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology)并参阅国内外相应的文献而进行的. 一方面要做细菌表型特征的鉴定; 另一方面要做细菌的遗传学特征(测序)鉴定. 其中后者是确定细菌类缘关系的最理想方法. 我们从一患结肠癌术后患者的血液中分离出的菌株, 用常规碱裂解法提取细菌DNA, 使用TaKaRa 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Code No.D310), 以Forward primer/Reverse primer2为引物, 做PCR扩增和16S rDNA扩增及序列测定结果NCBI上比对结果为100%符合弯曲菌属胎儿弯曲菌.

细菌的变异现象是细菌的普遍特征之一. 在自然界中, 任何微生物都可发生变异. 有的是表型变异(非遗传性变异), 有的是基因型变异(遗传性变异). 根据BERGEYS分类细菌学手册记

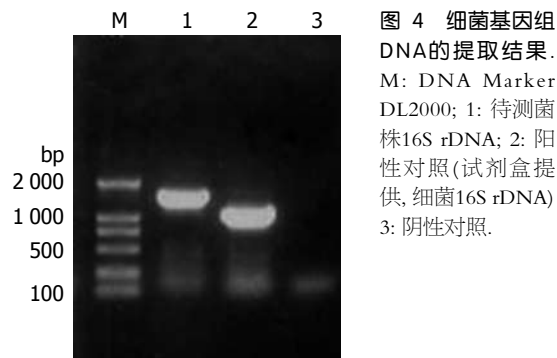


图 4 细菌基因组 DNA的提取结果. M: DNA Marker DL2000; 1: 待测菌株16S rDNA; 2: 阳性对照(试剂盒提供, 细菌16S rDNA); 3: 阴性对照.

载^[9], 胎儿弯曲菌(*Campylobacter fetus*)又分为胎儿亚种(*C. fetus Subsp. fetus*)和性病亚种(*C. fetus Subsp. venerealis*). 我们从结肠癌患者血液中分离出的弯曲菌属胎儿弯曲菌符合胎儿亚种的基本特征, 因此确认他为胎儿亚种. 但是, 我们对所分离出的菌株比对上述两个亚种, 发现他在生物学特征上又有与胎儿亚种、性病亚种不同之处, 具有自己的特点. 首先在形态学特征上, 胎儿亚种和性病亚种均为一端或两端单鞭毛, 我们分离出的菌株有的尚有一端丛鞭毛和侧单鞭毛. 其次在培养特点上, 42℃性病亚种不生长, 胎儿亚种不一定, 我们分离出的菌株则不生长. 而且这些特性, 经多次传代后在其子代仍保持不变, 能稳定的遗传下去. 显然, 这个菌株发生的变异为遗传性变异. 可以确定他是胎儿弯曲菌胎儿亚种的新变种. 由于我们对所分离的菌株的DNA序列测序只测定了16S rDNA这一保守序列, 尚未测定其全部序列. 因此所分离的菌株是否为新的亚型有待进一步研究.

■创新盘点

本研究从结肠癌患者血液中分离出的弯曲菌属胎儿弯曲菌符合胎儿亚种的基本特征, 因此确认他为胎儿亚种. 但是, 对所分离出的菌株比对上述两个亚种, 发现他在生物学特征上又有与胎儿亚种、性病亚种不同之处, 具有自己的特点. 而且这些特性, 经多次传代后在其子代仍保持不变, 能稳定的遗传下去. 显然, 这个菌株发生的变异为遗传性变异. 可以确定他是胎儿弯曲菌胎儿亚种的新变种.

■同行评价

本文方法可靠,为进一步发现人类致病的新菌株进行了有益的探索。

据文献记载,胎儿弯曲菌是微嗜氧菌,必须使用少数经过评估的优化的血液分离培养弯曲菌的方法^[8,9]。BACTEC系统(需氧瓶)和Septi-check系统均适于常见弯曲菌生长^[11,12]。其他方法,如厌氧肉汤培养基或裂解离心分离法(lysiscentrifugation),可能不太敏感^[10]。绝大多数弯曲菌是微需氧的,含50 mL/L O₂、100 mL/L CO₂和850 mL/L N₂的空气能达到最佳的分离培养效果^[8]。但我们在有氧的条件下进行培养也可生长。要探讨这个问题还需要从何谓厌氧菌及微嗜氧菌说起。厌氧菌(anaerobes)是一大群要求在降低氧压的条件下才能生长,而不能在含有10% CO₂(空气中含180 mL/L O₂)的固体培养基表面生长的细菌总称。他又分为极度厌氧菌(系指一些要求在低于5 mL/L O₂条件下才能生长,在空气中暴露10 min即死亡的细菌)和中度厌氧菌[系指能在2%-8%(平均3%)的氧分压环境中生长,在空气中暴露60-90 min尚能存活的细菌]两种。而微嗜氧菌(*microaerophilic bacteria*)或称微需氧菌系指能在50-100 mL/L CO₂空气中的固体培养基表面生长的细菌(如:弯曲菌属)。我们的实验基本是在有氧条件进行的,那本菌为什么会生长呢?我想有以下几种可能,供参考。(1)我们在临床实验室所使用的血液增菌培养基为美国BDBACTEC成人需氧增菌培养瓶,血培养系统为BACTEC9050全自动血培养系统。这个全自动血培养系统每次可培养120个血液标本。在发现这株菌前,我们并不知他对培养条件的要求,因此首先选用需氧培养。结果是经24-48 h未见细菌生长,48 h后才见生长。按照文献记载,弯曲菌生长速度不是缓慢型,通常经37 °C 18-24 h即可生长。本菌经24-48 h未见细菌生长,48 h后才见生长,这是否与随着培养时间的增长,整个培养箱内氧的消耗逐渐加大(每次培养临床血标本都在50-100份),箱内氧的减少了,达到了本菌生长的基本要求有关?有待于进一步探讨。(2)取阳性培养物无菌操作接种血平板,置于25、37、42 °C不同温度环境下需氧培养24-48 h,未见细菌生长;72 h后25、37 °C的血平板出现云雾状的生长物。由于本菌不存在生长缓慢的特性,这是否也是与随着培养时间的增长,整个培养箱内氧的消耗逐渐加大,箱内氧的减少了,达到了本菌生长的基本要求有关?(3)我们的实验还表明,本菌经3-4次传代肉汤增菌培养后接种血平板,37 °C 24 h就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长,72 h后有部分形成

灰色单个菌落。由此可看出,本菌的微嗜氧特性不是绝对的。生活环境的改变,一部分不适应新的环境的细菌发生死亡,另一部分细菌为了生存,就要适应新的环境条件,这就是细菌的适应性变异。细菌对环境等因素的适应性也是细菌生命活动的基本特性之一。

本菌株来自于结肠癌患者的血液,经BACTEC9050系统48 h显示阳性,初次分离血平板不生长,经2-3次传代肉汤增菌培养后接种于血平板,37 °C 24 h需氧环境下就可以出现云雾状而且沿接种线扩展生长的现象,培养72 h后部分形成灰色小菌落,培养时间和环境与资料要求的微需氧环境有所差别。该血液阳性肉汤培养物直接涂片镜检,采用革兰染色最初未查到细菌,这很可能是与血液中的RBC碎片掩盖所致,或由于菌量少且沉于瓶底,取样时未取瓶底的样本所致。而采用瑞氏染色和美蓝染色均发现有螺旋弯曲状杆菌。因此我们认为,BACTEC9050系统报道阳性,取血液培养物涂片革兰染色镜检阴性时,需要进一步涂片做瑞氏染色和美蓝染色镜检为佳,以免漏检。该菌株在血平板上,随着暴露空气时间的变化(1-7 d),其形态有较大的变化。该菌株在15、42 °C环境中不生长,在25、37 °C环境中生长,生化反应与胎儿弯曲菌基本一致。

据文献报道,胎儿弯曲菌主要引起肠外感染。其中胎儿亚种为主要的人类致病菌。我们从一患结肠癌手术后进行化疗后出现高热的高龄患者血液中分离到本菌,说明胎儿弯曲菌与结肠癌的发生无直接因果关系。菌血症和败血症的出现,很可能是由于患者高龄,肿瘤手术后又进行化疗,机体的免疫功能严重受损,胎儿弯曲菌趁机而入,借助于鞭毛和特异性外膜蛋白与肠上皮细胞结合,在肠上皮细胞内生长繁殖后入血,引起菌血症,细菌进一步在血液中大量繁殖并产生毒性产物引起全身性中毒症状(如高热,皮肤黏膜瘀斑等)出现败血症。我们采用抗生素和改善免疫功能疗法收到了明显的疗效。有关胎儿弯曲菌的致病性有待于进一步研究^[13,14]。

4 参考文献

- 1 Monno R, Rendina M, Ceci G, Rizzo C, Luzzi I, Francavilla A, Rizzo G, Ierardi E. Campylobacter fetus bacteremia in an immunocompromised patient: case report and review of the literature. *New Microbiol* 2004; 27: 281-285
- 2 Glover SG, Smith CC, Reid TM, Khaund RR. Opportunistic Campylobacter bacteraemia in a patient with malignant histiocytic medullary

- reticulosis. *J Infect* 1982; 4: 175-177
- 3 Tilse MH, McAlister TV. Isolation of *Campylobacter* fetus from blood cultures. *Med J Aust* 1981; 2: 337-338
- 4 Longfield RN, Crane JM, Pasquale DN. *Campylobacter* fetus subsp jejuni bacteremia in diffuse lymphoma. *Mayo Clin Proc* 1981; 56: 582-583
- 5 Fick RB Jr, Isturiz R, Cadman EC. *Campylobacter* fetus septic arthritis: report of a case. *Yale J Biol Med* 1979; 52: 339-344
- 6 Krutchik AN, Velasquez W. *Campylobacter* fetus infection in a patient with Hodgkin's disease. *JAMA* 1977; 238: 1810-1811
- 7 杨小敏, 陈海. 新亚型胎儿弯曲菌引起败血症1例报道. 中国病原生物学杂志 2008; 3: 79
- 8 李影林. 中华医学检验全书(上卷). 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 1028-1034, 1574-1575
- 9 Garrity GM. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd Edition. New York: Springer Science, 2005: 1148-1151
- 10 Kasten MJ, Allerberger F, Anhalt JP. *Campylobacter* bacteremia: clinical experience with three different blood culture systems at Mayo Clinic 1984-1990. *Infection* 1991; 19: 88-90
- 11 Lastovica AJ, Le Roux E, Penner JL. "*Campylobacter upsaliensis*" isolated from blood cultures of pediatric patients. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 657-659
- 12 Wang WL, Blaser MJ. Detection of pathogenic *Campylobacter* species in blood culture systems. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 709-714
- 13 Ohnita K, Isomoto H, Honda S, Wada A, Wen CY, Nishi Y, Mizuta Y, Hirayama T, Kohno S. *Helicobacter pylori* strain-specific modulation of gastric inflammation in Mongolian gerbils. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1549-1553
- 14 Takatsu M, Ichiyama S, Nada T, Iinuma Y, Toyoda H, Fukuda Y, Nakashima N. *Campylobacter* fetus subsp. fetus cholecystitis in a patient with advanced hepatocellular carcinoma. *Scand J Infect Dis* 1997; 29: 197-198

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2010年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

2009年《世界华人消化杂志》编委审稿总结

本刊讯 《世界华人消化杂志》(*World Chinese Journal of Digestology, WCJD*)编辑委员会共计400人,全部为副教授及副主任医师以上。*WCJD*编委会审稿费结算工作于次年01-05开始。本次统计为2008-01-01/2009-12-31编委审稿费费用,共计40 850元,数据以稿件审回日期为准。*WCJD*共计审稿1 418篇,其中送审专家377位,共计送审次数2 094次,成功审回次数1 634次,成功率78.03%。其中审稿次数排前三位的为:西安交通大学医学院第二附属医院感染科党双锁教授和福建医科大学附属协和医院消化内科王小众教授并列第一位,各17篇;南京医科大学附属南京第一医院肿瘤中心曹秀峰教授第二位,16篇;中国医科大学附属第一医院消化内科王炳元教授和苏州大学附属第一医院消化科陈卫昌教授并列第三位,各15篇。

*WCJD*编辑部感谢各位编委2009年对*WCJD*工作的支持,同时希望各位编委更加积极主动的配合我们今后的工作。审稿费已经通过邮局汇款,如有审稿费未收到或者审稿稿件有误差,请各位编委与编辑部联系,联系电话:010-85381892,联系人:李军亮。(编辑部主任:李军亮 2010-04-20)