

致病性弓形杆菌属生物学特性及诊断研究进展

毕水莲¹, 孟赫诚²

(1. 广东药学院食品科学学院, 广东中山 528458) (2. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640)

摘要: 弓形杆菌(*Arcobacter*)属于弯曲菌科, 革兰氏阴性, 与弯曲菌(*Campylobacter*)类似。但不同的是, 它在需氧、微需氧和15℃低温条件下均可生长。*Arcobacter*是一种人畜共患的食源性和水源性病原菌, 主要分离自猪肉、牛肉、禽肉等动物性食品和水体。基于对国内外相关文献资料的整理, 综述了*Arcobacter*的生物学特性、分类和分布、分离鉴定方法、致病性和防控措施等方面内容, 为深入开展*Arcobacter*的检测、诊断、防控技术等方面研究提供背景参考。

关键词: 弓形杆菌; 特性; 检验

文章编号: 1673-9078(2013)1-211-214

Biological Characteristics and Diagnoses of Pathogenic *Arcobacter* species

BI Shui-lian¹, MENG He-cheng²

(1.School of Food Science, Guangdong Pharmaceutical University, Zhongshan 528458, China)

(2.School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

Abstract: *Arcobacter* species are Gram-negative organisms belonging to the family Campylobacteraceae that can grow microaerobically or aerobically. *Arcobacter* organisms also have the ability to grow at 15 °C, which is a distinctive feature that differentiates *Arcobacter* species from *Campylobacter* species. *Arcobacter* species have been considered as zoonotic foodborne and waterborne agents. The organism is routinely isolated from a range of foods of animal origin, such as pork, beef and poultry, as well as water sources. Based on the recent researches, this article reviewed the biological characteristics, classification and distribution, isolation and identification, pathogenicity, prevention and control of *Arcobacter* species, which will be useful for the further research on detection, diagnoses, prevention and control of *Arcobacter* species.

Key words: *Arcobacter*; characteristic; detection

弓形杆菌(*Arcobacter*)过去被称为类弯曲菌(*Campylobacter-like*), 是一种与*Campylobacter*形态相似, 亲缘关系很近的新型革兰氏阴性致病菌。目前已发现*Arcobacter*有11个种^[1], 最常见的是嗜低温弓形杆菌(*Arcobacter cryaerophilus*)、布氏弓形杆菌(*Arcobacter butzleri*)、斯氏弓形杆菌(*Arcobacter skirrowii*)和硝化弓形杆菌(*Arcobacter nitrofigilis*)4个种。其中, 前3种与人类和动物的腹泻、菌血症等疾病密切相关。*Arcobacter*广泛分布于自然界, 致病力与弯曲菌相当, 且比弯曲菌更易存活, 引起了许多研究者的关注。但*Arcobacter*的相关文献报道相对较少, 大多数人对该致病菌并不十分熟悉, 国内尚未见该菌的综述性论文。因此, 从生物学特性、分类和分布、分离鉴定、致病性和防控措施等方面对*Arcobacter*进行综述, 将拓展人们对*Arcobacter*基础知识的了解, 为进一步研究*Arcobacter*提供有价值的背景信息。

收稿日期: 2012-09-10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金资助(2012ZZ0083); 广东省自然科学基金项目(10451064101005159)

作者简介: 毕水莲(1982-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品安全

1 生物学特性

*Arcobacter*菌体大小为(0.2~0.9)×(0.5~3) μm, 为革兰氏阴性、无芽孢、无荚膜的弯曲短杆菌, 通常呈S形或螺旋形, 老培养物中出现球形、近似球形或疏松螺旋的丝状体, 可长达20 μm。一端或两端具有单鞭毛, 运动活泼, 可做“投标状”运动。该菌属能够在正常氧气浓度和厌氧环境下生长, 但最适生长于微氧(3~10% O₂)条件, 不需要H₂。最适生长温度为25~30℃, 在37℃和42℃生长不定, 4℃条件下不能生长。

*Arcobacter*生化反应不活泼。乙酰甲基甲醇(V-P)试验和甲基红(MR)试验阴性, 不发酵且不氧化糖类, 能利用有机酸与氨基酸作为碳源, 大多数菌株在0.032%甲基橙存在下可生长, 可被0.1%氯化三苯基四氮唑(TTC)抑制, 在1%牛胆汁, 1%甘氨酸, 1.5%(或3.5%)氯化钠及8%葡萄糖中生长不定。具有氧化酶和触酶活力, 多数菌株具有过氧化氢酶活性, 无脲酶活力。可还原硝酸盐为亚硝酸盐, 吡嗪酰胺水解阴性, 不水解明胶、酪蛋白、淀粉、马尿酸和酪氨酸, 不产

生吡啉和色素。在三糖铁(TSI)琼脂中不产生 H₂S，在半胱氨酸产 H₂S 情况不定。四种常见 *Arcobacter* 的主要特征差异见表 1。

表 1 弓形杆菌属四个种的主要差别特征^[2]

Table 1 Differential characteristics of the 4 species of the genus *Arcobacter*

项目	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. skirrowii</i>
尿素酶	+	-	-	-
α-溶血	-	F	-	+
4%氯化钠	+	-	-	+
头孢吡酮(64 mg/L)	-	+	+	+
在基本培养基的生长	-	+	-	-
在麦康凯琼脂的生长	-	+	-	-

注：+, 95-100% 菌株呈阳性；-, 0-11% 菌株呈阳性；F, 14-50% 菌株呈阳性。

2 分类和分布

2.1 *Arcobacter* 的系统发育分类

Arcobacter 属 DNA 的 G+C 比例为 32~42 克分子%。按照细菌 16S rRNA 基因序列的系统发育相关性水平进行分群归类, ε-变形菌纲下为弯曲菌目, 弯曲菌目又可分为弯曲菌科, 螺杆菌科和“Nautiliaceae”。弯曲菌科包括 *Arcobacter* 属、*Campylobacter* 属、硫磺单胞菌属 (*Sulfurospirillum*) 和暂未分类的 *Bacteroides ureolyticus*。 *Arcobacter* 与弯曲菌科和螺杆菌科的其它细菌之间的系统发育关系见图 1。

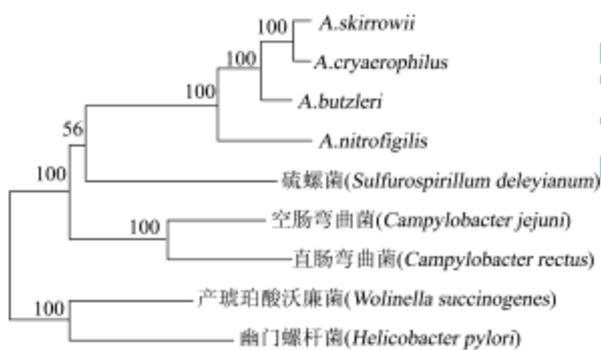


图 1 基于 16S rRNA 基因序列的 *Arcobacter* 系统发育树^[2]

Fig.1 Phylogeny of *Arcobacter* species based on 16S rRNA nucleotide sequences

2.2 *Arcobacter* 的分布

Arcobacter 最重要的人类感染源是食品, 该菌在牛、猪、火鸡、鹅等制品中均可检出, 其中禽类被认为是最大的储存库。此外, 该菌还大量存在于各种水体中, 包括饮用水、湖泊水、地表水、地下水、污水等。它们可通过水体媒介进入人体肠道, 引发一系列的肠道疾病, 危害人类和动物的健康^[3]。研究表明, *Arcobacter* 属是城市污水和城市污水化学生物絮凝池活性污泥中的优势菌群, 且具有致病性^[4,5]。艾明强等^[6]发现大庆油田过渡带文库的细菌群落的优势菌

群为 *Arcobacter*, 占库容的 50%。在加拿大某低温油田以及我国胜利油田滩涂区土壤中也发现了大量的 *Arcobacter*^[7], 这可能与该菌属中某些种具有硫化物氧化和硝酸盐还原功能有关, 参与了油藏中氮、硫元素的代谢。

Arcobacter 感染人类的研究相对较少。Vandenbergy 等^[8]报道, 在人便样中 *A. butzleri* 在类弯曲菌的种类中列第四, 是一种潜在的食源性致病菌。Taylor 等^[9]在泰国儿童的腹泻样本中分离到的 *A. butzleri* 占全部菌株数量的 2.4%。除 *A. butzleri* 外, 也有从肺炎患者的尿液中分离到 *A. cryaerophilus* 和从 73 岁的持续腹泻两个月的老人瓣膜主动脉上分离出 *A. skirrowii* 的文献报道^[10,11]。

3 分离鉴定

3.1 传统分离培养

Arcobacter 营养要求相对较高, 分离时, 通常需在选择性培养基中加入血液或血清, 同时加入多种抗生素, 将温度控制在 24~30 °C, 以抑制肠道正常菌群, 提高分离方法的选择性。自 1977 年 Ellis 等首次建立了该菌属的分离方法以来, 现已建立了多种不同的增菌、选择性平板和纤维素膜过滤的方法, 主要归结为两大类: 一步法和两步法。一步法是指直接使用选择性培养基进行分离培养, 这类培养基主要有 CIN (cfsulodin irgasan novobiocin) 琼脂、CAT (Cefoperazone amphotericin teicoplanin) 琼脂、Skirrow 琼脂、Butzler 培养基、Campy-BAP 培养基和 mCCD (modified charcoal cefoperazone deoxycholate) 琼脂等。两步法是指先使用液体增菌培养基进行富集培养, 然后再利用固体选择性培养基或纤维素膜的方法进行分离培养。用于增菌的液体培养基主要有 AB (*Arcobacter* broth)、ASB (*Arcobacter* selective broth)、AEB (*Arcobacter* enrichment broth) 和 CAT broth 等。研究表明, 与一步法

相比,采用两步法可以提高*Arcobacter*的分离率。此外,虽然弓形菌在mCCDA和CAT培养基上均可生长,但与mCCDA相比,CAT可以更好地支持*Arcobacter*属中更多种的生长^[12]。

3.2 分子鉴定与分型

传统分离鉴定方法存在步骤复杂和检测周期长等诸多不足。近年来,随着分子生物学技术的不断发展,越来越多快速、特异性检测*Arcobacter*的方法应运而生,其主要代表是聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)。以16S rRNA和23S rRNA为靶基因的多重PCR方法已经成功应用于多种*Arcobacter*的同时检测。Kabeya等^[13]基于*Arcobacter*的23S rRNA建立多重PCR方法,可同时鉴定*A. butzerli*、*A. cryaerophilus* 1A、*A. cryaerophilus* 1B和*A. skirrowii*,弥补了所有表型、生化方法均无法鉴别*A. cryaerophilus*两个组的缺陷。全细胞蛋白的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)方法也被用于鉴定*Arcobacter*属,并成功鉴别法国生物梅里埃弯曲杆菌鉴定系统不能区别的*A. butzerli*和*A. skirrowii*^[14]。

核糖体分型已被证明是鉴定*Arcobacter*的可靠和重要技术手段,但在实验室推广应用受到两个因素制约,首先是实验步骤需要根据样本情况进行细致优化;其次,分型操作涉及危险化学品或放射性同位素。目前已开发了采用胍抽提DNA法和与非放射性地高辛标记探针杂交的核糖体分型方法。使用*PvuII*或*ClaI*消化基因组DNA的16S rRNA探针杂交可以鉴别*Campylobacter*、*Helicobacter*和*Arcobacter*3个属,或是*Arcobacter*属内的不同种。改进的方法有效避免了有害化学物质或放射性同位素的使用,使其更加适用于日常临床或实验室研究^[15]。目前报道的*Arcobacter*分子分型方法还有扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、PCR-限制性片段长度多态性(PCR-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)、随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、肠杆菌基因间重复共有序列-PCR(enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR, ERIC-PCR)和脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE)等^[16,17]。

4 致病性和致病机理

*Arcobacter*是一种人畜共患的食源性和水源性病原菌^[18],与人类胃肠炎和菌血症有关,可危及老年人生命。与畜类的胃肠炎和流产有关。*Arcobacter*引起胃肠炎的临床症状与弯曲杆菌病类似^[19],主要表现为

持续性腹泻,伴有腹痛、胃痉挛、恶心呕吐和发热等症状,但引起腹泻的频率和持久性比*Campylobacter*更高,且暂时性的感染率难以评估。

目前,国内尚未发现*Arcobacter*致病机理和潜在毒力因子相关报道,国外此方面报道也很少,实验研究主要集中在两方面:①对Vero和CHO细胞的细胞兴奋型肠毒素、细胞毒素型肠毒素和细胞致死性分析研究;②对HeLa和Intestine 407细胞的粘附、定植能力测试。实验结果表明分离自环境、食品、动物和人体的*A. cryaerophilus*, *A. butzerli*和*A. skirrowii*均显示出不同程度的致病性表型,某些菌株可能具有潜在的毒力。

5 防控措施

*Arcobacter*感染的途径可能包括人对人(宿主对宿主)的直接接触、食入被污染的饮用水或食物,其中家禽产品的污染率极高,此外,未经杀菌处理的奶类产品也是造成*Arcobacter*传播至人类的重要途径之一。因此,在预防控制*Arcobacter*引发人类疾病的措施上,建议从消灭或减少食物链中*Arcobacter*入手。在屠宰线上屠体受到的污染危害与牲畜粪便中携带的食源性致病菌密切相关^[20]。为了减少人畜共患病对消费者健康的潜在风险,在肉类生产过程中保证屠宰卫生,避免各种污染源对屠体的污染是至关重要的。在日常生产加工中,应依据HACCP原则,建立“过程控制”和定期微生物监测系统,加强对动物性食品加工过程中重点环节的监督管理,加大监测力度,及时掌握食品的动态卫生质量。

采取以预防为主的手段也是非常必要的,如加强食品生产经营单位以及从业人员的卫生知识的培训,推行持证上岗制度;加工从业人员应注意个人卫生,完善并执行卫生管理制度;加强食品卫生知识宣传,提高群众的卫生安全意识;实施良好生产规范守则等。

此外,同其它致病菌相似^[21],柠檬酸和乳酸可以抑制*Arcobacter*的生长繁殖,乳酸链球菌素(500 IU/ml)可杀死约50%*Arcobacter*^[22]。磷酸三钠和乙二胺四乙酸(EDTA)(单独或与乳酸链球菌素结合)作为一种短期控制手段,对杀灭*Arcobacter*纯培养物具有一定效果^[23]。需要注意的是,尽管*Arcobacter*与*Campylobacter*有很多相似点,目前也有许多杀灭和抑制*Campylobacter*的方法,但有些方法对控制*Arcobacter*的效果却不太理想。例如,*A. butzerli*相比*C. jejuni*对辐照处理和低温的耐受性更强等。

参考文献

- [1] Kiehlbauch J A, Brenner D J, Nicholson M A, et al. *Campylobacter butzleri* sp. Nov. isolated from humans and animals with diarrheal illness [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1991, 29(2): 376-385
- [2] Garrity G M. Bergey's manual of systematic bacteriology [M]. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag, 2005: 1161-1165
- [3] Lelner A, Tasama T, Stephan R. Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen [J]. International Journal of Food Microbiology, 2005, 102(5): 127-135
- [4] 王峰,傅以钢,夏四清,等.PCR-DGGE 技术在城市污水化学生物絮凝处理中的特点[J].环境科学,2004,25(6):75-79
- [5] 吴春笃,许小红,宁德刚,等.城市污水细菌多样性及其生物安全性研究[J].中国安全科学学报,2008,18(1):119-122
- [6] 艾明强,李慧,刘晓波,等.大庆油田油藏采出水的细菌群落结构[J].应用生态学报,2010,21(4):1014-1020
- [7] Grabowski A, Nercessian O, Fayolle F, et al. Microbial diversity in production waters of a low-temperature biodegraded oil reservoir [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 54(3): 427-443
- [8] Vandenberg O, Dediste A, Houf K, et al. *Arcobacter* species in humans [J]. Emerging Infectious Diseases, 2004, 10(10): 1863-1867
- [9] Taylor D N, Kiehlbauch J A, Tee W, et al. Isolation of group 2 aerotolerant *Campylobacter* species from Thai children with diarrhea [J]. Journal of Infectious Diseases, 1991, 163(5): 1062-1067
- [10] Fera M T, Giannone M, Gugliandolo A, et al. Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean sea [J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1271-1276
- [11] Snelling W J, Matsuda M, Moore J E, et al. Under the microscope: *Arcobacter* [J]. Letters in Applied Microbiology, 2006, 42(1): 7-14
- [12] Atabay H I, Unver A, Sahin M, et al. Isolation of various *Arcobacter* species from domestic geese (*Anser anser*) [J]. Veterinary Microbiology, 2008, 128(3-4): 400-405
- [13] Kabeya H, Kobayashi Y, Maruyama S, et al. One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species [J]. International Journal of Food Microbiology, 2003, 81(2): 163-168
- [14] Ridsdale J A, Atabay H I, Corry J E L. Prevalence of campylobacters and arcobacters in ducks at the abattoir [J]. Journal of Applied Microbiology, 1998, 85(3): 567-573.
- [15] Kiehlbauch J A, Cameron D N, Wachsmuth I K. Evaluation of ribotyping techniques as applied to *Arcobacter*, *Campylobacter* and *Helicobacter* [J]. Molecular and Cellular Probes, 1994, 8(2): 109-115.
- [16] Houf K, De Zutter L, Verbeke B, et al. Molecular characterization of *Arcobacter* isolates collected in a poultry slaughterhouse [J]. Journal of Food Protection, 2003, 66(3): 364-369
- [17] Rivas L, Fegan N, Vanderlinde P. Isolation and characterization of *Arcobacter butzleri* from meat [J]. International Journal of Food Microbiology, 2004, 91(1): 31-41
- [18] Ho H T K, Lipman L J A, Gastra W. *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent [J]. Veterinary Microbiology, 2006, 115(1-3): 1-13
- [19] 毕水莲,陈妙瑞,张志刚,等.*Fla*-DGGE法对食品中空肠弯曲菌和结肠弯曲菌的检测和分型[J].现代食品科技,2010, 26(10):1148-1152
- [20] Beach J C, Murano E A, Acuff G R. Prevalence of *Salmonella* and *Campylobacter* in beef cattle from transport to slaughter [J]. Journal of Food Protection, 2002, 65(11): 1687-1693
- [21] 毕水莲,李琳,唐书泽,等.变形杆菌属食物中毒的特点与防控措施[J].现代食品科技,2009,25(6):690-695
- [22] Phillips C A. The effect of citric acid, lactic acid, sodium citrate and sodium lactate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* [J]. Letters in Applied Microbiology, 1999, 29(6): 424-428
- [23] Phillips C A, Duggan J. The effect of EDTA and trisodium phosphate, alone and in combination with nisin, on the growth of *Arcobacter butzleri* in culture [J]. Food Microbiology, 2001, 18(5): 547-554