严重腹泻病人优势菌的肠毒素研究

林成水 曾昭鸿 郑国桃 黄淑敏 王 斌

（福建省卫生防疫站，福州）

近年来，经常遇到一些严重腹泻成年病人的粪便标本，经多次培养，均未检出肠道致病菌。为了探索这些病例的致泻原因，我们对收集到的58例粪便标本中分离的优势菌进行了研究。

材 料 和 方 法

一、菌株来源

采自成年严重腹泻病人粪便，按常规分离

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

培养肠道致病菌及优势菌。在分离培养中只发现优势菌时，即移种半固体留种。

二、兔肠结扎段试验

优势菌经鉴定后，接种于 20ml pH7.6，3% 胨胨水中，37℃ 孵育。大肠杆菌孵育 4 天[1]，绿脓杆菌、不凝集弧菌和阳性对照菌株孵育 24 小时。其培养液或肠毒素液进行兔肠结扎试验。选择体重 2Kg 左右的健康家兔，麻醉后剖腹，取出小肠分段结扎，每段长 5cm（初期 10cm），两段间隔 2cm，共结扎 15 段左右。试验肠段注入被试菌株的培养液或肠毒素液 1ml；阴性对照段注入 3% 胨胨水 1ml；阳性对照段注入阳性对照菌株培养液 1ml。然后将小肠放回原处缝合腹腔。24 小时剖腹测量各段液体贮留量。在对照组反应正常时，计算每厘米肠段中液体贮留量，每厘米肠段 ≥1 ml 者，即为阳性反应，表示该菌株能产生肠毒素。

三、大肠杆菌肠毒素液的制备：

菌株接种于 pH 7.6 的 3% 胨胨水中，37℃ 孵育 4 天，用 1.2×10^4 rpm 离心 40 分钟，吸出上清液，再次离心，然后加 10^{-4} 硫柳汞，经培养无细菌生长，即为粗制肠毒素液。

四、抗毒素血清的制备

用粗制大肠杆菌肠毒素液，耳静脉免疫健康家兔。按两个程序进行，首先隔三天注射一次，剂量分别为 0.25、0.25、0.5、0.5、1.0、2.0ml。间隔一周后再行第二程序，隔三天注射一次，剂量分别为 1.0、1.0、1.0、2.0、2.0、2.0ml。全程免疫后一周采血分离血清，置 4℃ 冰箱保存。

五、中和试验

用不同稀释度抗毒素血清与肠毒素液混合后，置 37℃ 温箱孵育 30 分钟，然后置室温 4 小时进行兔肠结扎试验。凡在不同稀释度的结扎段中的液体贮留量比肠毒素液减少 50%（或以上）者，即为中和滴度。

六、致病性大肠杆菌抗血清玻片凝集试验

按常规进行。

试 验 结 果

一、优势菌的肠毒素试验

从成年严重腹泻病人分离到 58 株优势菌，经兔肠结扎试验，证实有 28 株能产生肠毒素，占 46.9 %。其中普通大肠杆菌 34 株，有 19 株能产生肠毒素，占 55.9%；致病性大肠杆菌 10 株，有 5 株能产生肠毒素，占 50%；绿脓杆菌 6 株，有 3 株能产生肠毒素，占 50%；不凝集弧菌 3 株，有 1 株能产生肠毒素；产气杆菌和柠檬酸杆菌等不产生肠毒素（见表 1）。

表 1　58 株优势菌产生肠毒素结果

	大肠杆菌		绿脓杆菌	不凝集弧菌	其他	合计
	普通	致病性				
试验菌株	34	10	6	3	5	58
阳性株数	19	5	3	1	0	28
阳性率(%)	55.9	50.0	50.0	33.3	0	46.9

二、不同菌株引起兔肠液体贮留量

能产生肠毒素菌株，普通大肠杆菌引起兔肠液体贮留量，每厘米兔肠段 1.18—3.0ml，平均为 2.03ml；致病性大肠杆菌 1.16—1.69ml，平均为 1.41ml；绿脓杆菌 1.0—2.0ml，平均为 1.33ml；不凝集弧菌为 1.18ml（见表 2）。而不产生肠毒素菌株，除 2 株不凝集弧菌，每厘米肠段分别平均为 0.44 和 0.5ml 外，其余菌株都在 0.1ml 以下。

表 2　能产生肠毒素菌株引起兔肠液体贮留量

菌株	试验菌株数	肠段贮留量（ml/cm）	
		贮留液范围	平　均
普通大肠杆菌	19	1.18—3.00	2.03
致病性大肠杆菌	5	1.16—1.69	1.41
绿脓杆菌	3	1.00—2.00	1.33
不凝集弧菌	1	1.18	1.18

三、大肠杆菌肠毒素液的兔肠结扎试验

7 株大肠杆菌毒素液试验结果证实，能引

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

起兔肠液体贮留。每厘米肠段平均贮留量为1.91ml，与培养液引起的液体贮留量相似（见表3）。

表3 7株大肠杆菌培养液和肠毒素液兔肠贮留量 (ml/cm)

菌株号	培养液	肠毒素液
7401	1.15	1.20
7502	2.05	2.00
7604	2.10	2.00
7807	2.00	1.85
7910	2.25	1.85
7914	2.15	2.10
7922	2.25	2.40
合计	1.99	1.91

四、大肠杆菌肠毒素中和试验

无论是用7807、7914菌株抗毒素血清与该菌株的肠毒素液中和；还是用7807菌株的抗毒素血清与7910菌株的肠毒素液中和，其中和滴度都为1:125（见表4）。

表4 抗毒素血清与肠毒素液中和兔肠液体贮留量 (ml/cm)

菌株号	抗毒素血清稀释度						
	1:5	1:25	1:125	1:625	1:3125	1:15625	肠毒素液
7807	0	0.15	0.58	1.58	1.98	2.15	2.20
7910	0	0	1.50	2.00	3.00	—	3.60
7914	0	0	0	2.60	2.80	—	3.60

五、致病性大肠杆菌血清分型

全部大肠杆菌菌株均以OK多价I—V抗血清做玻片凝集试验，其中有10株与致病性大肠杆菌抗血清能凝集，即O_{127}:B_8 3株；O_{114}:KX_2、O_{128}:B_{12} 各2株；O_{25}:K_{11}、O_{26}:B_6、多价各1株。其中只有O_{127}:B_8 3株和O_{114}:KX_2 2株能产生肠毒素，另5株不产生肠毒素。

六、观察不同长度兔肠结扎段对液体贮留量的影响

我们用7904、7922、7932等菌株培养液分别对5cm和10cm兔肠结扎段进行试验，结果三菌株在5cm结扎段液体贮留量分别为3.4、2.6、3.6ml/cm，与在10cm结扎段液体贮留量分别为2.2、2.6、3.6ml/cm相似。

讨　　论

近年来，国内外有些作者证实了大肠杆菌、不凝集弧菌、产气荚膜杆菌、志贺氏菌、沙门氏菌、绿脓杆菌等能产生肠毒素，可引起兔肠结扎段液体贮留[1—4]。并指出，引起腹泻的大肠杆菌中，能产生肠毒素者，其致病机理类似霍乱肠毒素[5]。Gorbach等、Sheer等、Evans等先后证实，产生肠毒素大肠杆菌借纤毛样表面抗原固定于小肠上部，释放肠毒素，刺激肠腺上皮细胞与细胞膜上GM_1受体结合，使细胞中腺苷酸环化酶活性增高，从而导致环单磷酸腺苷水平增高，引起肠腺上皮细胞分泌机能亢进，造成大量水份和电解质在肠腔中积蓄，超过肠管再吸收能力而发生腹泻[5]。本试验分离到的58株优势菌中，有19株普通大肠杆菌、5株致病性大肠杆菌、3株绿脓杆菌和1株不凝集弧菌均能产生肠毒素。58例病人中的46.9%病因是由能产生肠毒素的肠道细菌引起的。说明能产生肠毒素大肠杆菌是引起严重腹泻的主要致病菌，应予以重视。从产生肠毒素的不同细菌所引起的兔肠段液体贮留量也明显不同，其中以普通大肠杆菌引起兔肠段液体贮留量最多，平均为2.03ml/cm，明显多于致病性大肠杆菌、绿脓杆菌和不凝集弧菌。而同种细菌不同菌株所产生液体量也有明显差异，如普通大肠杆菌7909菌株为1.18ml/cm，而7922和7930菌株则为3ml/cm。说明各菌株之间产生肠毒素的能力不同。

大肠杆菌肠毒素液，经兔肠结扎试验，引起兔肠段液体贮留量与培养液相似。说明兔肠液体贮留是由大肠杆菌肠毒素引起的，与大肠杆菌无关。

试验证明，5cm的兔肠结扎段引起兔肠液体贮留量与10cm的相似。故以5cm作为常规结扎段，每只兔可结扎15段左右，减少实验兔的消耗。（下转第57页）

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

（上接第 78 页）

参 考 文 献

[1] 林成水等：流行病学杂志，1(2):125，1980.
[2] Kulbota, Y. et al.: *J. Infect. Dis.*, **123**: 97, 1971.
[3] Sack, R. B. et al.: *J. Infect. Dis.*, **123**: 378, 1971.
[4] Pierce, N. F. et al.: Bacteriol. Rev., **35**: 1, 1971.
[5] 鲍行豪等：微生物学通报，7 (3):125，1980.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn