

大肠杆菌肠毒素的研究

林成水 曾凝梅 叶荣华 郑金凤 郭维植

(福建省卫生防疫站,福州)

大肠杆菌产生不耐热肠毒素(LT),国内外报道较多^[1-3],而产生耐热肠毒素(ST),国内尚未见报道。近年来,我们从急性腹泻病人粪便分离的菌株进行了肠毒素的研究。其结果如下。

材 料 和 方 法

一、菌株来源

从严重腹泻病人粪便中分离到56株大肠杆菌。从门诊腹泻病人粪便中分离到52株。

二、兔肠结扎试验

按常规法进行^[4]。

三、乳鼠试验

被检菌株接种于pH 7.6的3%豚豚水中,置37℃孵育4天,分别用培养液、加热100℃培养液、离心无菌上清液和每毫升加2滴1%中国蓝培养液,各0.1 ml,注入2—3日龄健康乳鼠胃内,每一菌株同时注入5只乳鼠,4小时杀死乳鼠,分别称肠道重量和剩余体重,计算肠重与体重比率,其比率 >0.083 者为阳性反应,说明该菌株能产生ST^[5]。

试 验 结 果

一、肠毒素试验

从严重腹泻病人粪便中分离到的56株大肠杆菌经兔肠结扎试验,证实有33株能产生LT,占58.9%。其中能引起每厘米兔肠段积液1.0—1.5 ml者有3株;积液1.51—2.0 ml者有2株;积液2.01—2.5 ml者有6株;积液2.51—3.0 ml者有10株;积液 >3.0 ml者有12株。经乳鼠试验证实有22株能同时产生ST,其肠重与体重比率(E/W)为0.086—0.100者有11株; ≥ 0.101 者有11株(见表1)。从门诊腹泻病人粪便中分离到的52株大肠杆菌,经兔肠结扎试验和乳鼠试验,仅有1株能产生LT和ST,其余菌株均不产生肠毒素。

二、不同保存方法对菌株产肠毒素的影响

33株能产LT大肠杆菌分别用半固体室温和冻干4℃保存。其中7株用半固体室温保存3年,有3株丧失LT活性;26株保存1.5年,有1株丧失LT活性。22株能同时产生ST菌株用半固体室温保存1.5—3年,共有6株丧失ST

表 1 33 株大肠杆菌肠毒素试验

菌号	兔肠结扎试验 (ml/cm)	乳鼠试验 (E/W)	菌号	兔肠结扎试验 (ml/cm)	乳鼠试验 (E/W)
1	2.92	0.119	18	2.44	0.108
2	3.08	0.096	19	2.50	0.087
3	1.29	0.094	20	1.56	0.091
4	3.26	0.100	21	1.26	0.086
5	3.02	0.117	22	2.72	0.101
6	1.64	0.086	23	2.96	0.072
7	2.12	0.113	24	2.78	0.068
8	2.68	0.088	25	3.06	0.061
9	3.60	0.096	26	2.66	0.071
10	3.46	0.115	27	2.20	0.056
11	1.30	0.117	28	2.64	0.079
12	3.26	0.108	29	2.96	0.077
13	2.12	0.103	30	3.06	0.072
14	2.98	0.100	31	4.84	0.058
15	3.62	0.096	32	3.14	0.068
16	2.50	0.102	33	2.62	0.063
17	3.82	0.103			

表 2 不同保存法对肠毒素活性影响

保存年限	产生不耐热肠毒素菌株			产生耐热肠毒素菌株		
	菌株数	半固体	冻干	菌株数	半固体	冻干
1½	26	25	26	19	14	19
3	7	4	7	3	2	3
合计	33	29	33	22	16	22

活性。而用冻干菌种于 4℃ 保存 1.5—3 年，无论是对产 LT 或 ST 都无明显影响。说明用冻干保存菌株，其肠毒素活性不易丧失（表 2）。

三、用不同接种液测定 ST 的效果比较

用产 ST 和只产 LT 菌株的培养液、加热 100℃ 15 分钟培养液、无菌上清液和加中国蓝培养液进行乳鼠试验。ST 菌株的上清液呈阳性 (> 0.083) 时，其加热培养液、培养液和加中国蓝培养液均呈阳性；产 LT 菌株的上清液乳鼠试验呈阴性，其他三种培养液亦呈阴性，见表 3。结果说明用这四种接种液进行乳鼠试验，其结果是相似的，不需要用无菌上清液作试验。

讨 论

1. 本试验发现从严重腹泻病人分离的 56 株大肠杆菌中，有 33 株能产生 LT，其中有 22

株能同时产生 ST；而肠道门诊腹泻病人分离的 52 株大肠杆菌中，仅 1 株既能产 LT 又能产 ST 菌株。严重腹泻病人检出率明显高于肠道门诊病人。说明产 LT 大肠杆菌是引起严重腹泻的病原菌之一。

2. 我们用半固体室温保存和冻干菌种 4℃ 保存产肠毒素性大肠杆菌，结果证明冻干 4℃ 保存 1.5—3 年，均未发现肠毒素活性丧失。而用半固体室温保存，产 LT 菌株有 18.1% 丧失活性；产 ST 菌株有 27.3% 丧失 ST 活性。Ryder 等报道^[7]，致病性大肠杆菌冻干保存 7 年，大多数菌株的 ST 质粒不丧失；用血琼脂斜面保存 6 年，大多数菌株的 ST 质粒已丧失。这些研究均证明了用冻干法保存产肠毒素性大肠杆菌较适宜。

3. 兔肠结扎试验是测定 LT 活性最好方

表3 不同接种液测定 ST 的效能比较

菌 株	菌 号	无菌上清液	加热培养液	培 养 液	加中国蓝培养液
产 ST 菌株	2	0.104	0.106	0.106	0.101
	4	0.094	0.092	0.116	0.087
	8	0.087	0.088	0.101	0.086
	12	0.087	0.104	0.111	0.117
	15	0.089	0.097	0.094	0.120
	18	0.103	0.094	0.121	0.090
	22	0.101	0.115	0.101	0.101
平 均		0.095	0.099	0.107	0.100
产 LT 菌株	27	0.056	0.056	0.052	0.056
	29	0.061	0.057	0.062	0.066
	31	0.058	0.067	0.054	0.056
	32	0.071	0.064	0.054	0.074
	33	0.063	0.066	0.071	0.059
平 均		0.062	0.062	0.059	0.062

法^[6], 但不够经济, 费时间。乳鼠试验是目前测定 ST 常用的方法。国外在培养液中加入 0.001% EVans 蓝染料作标记^[2]。我们用中国蓝代替 EVans 蓝作乳鼠胃内注入液的标记, 实验证明对 ST 活性无影响。

参 考 文 献

[1] 林成水等: 微生物学通报, 9(1):18, 1982。

- [2] Shore et al.: *J. Infect. Dis.*, 129 (5): 577, 1974.
 [3] Sack et al.: *J. Infect. Dis.*, 123 (4): 378, 1971.
 [4] 林成水等: 中华预防医学杂志, 15(2): 101, 1981。
 [5] Okamoto et al.: *Infect. Immun.*, Feb. p554—559, 1981.
 [6] WHO Scientific working group: *Bull. WHO*, 58 (1): 23, 1980.
 [7] Ryder et al.: *J. Infect. Dis.*, 140 (4): 626, 1979.