

大肠杆菌耐热肠毒素产毒条件的研究

李学良 刘素珍 江孝明

(云南省畜牧兽医研究所,昆明)

王子坤 李炳云

(玉溪地区兽医站) (玉溪市畜牧兽医站)

产生耐热肠毒素是致病性大肠杆菌的重要特征之一。乳鼠灌胃试验(IMGT)虽是鉴定致病性大肠杆菌的有效方法,但只有掌握好耐热肠毒素(ST)的产毒条件,才能充分发挥该试验的效能。因此,筛选适宜的产毒条件,在人畜大肠杆菌病的诊断和防治上都具有十分重要的意义。本文就产毒的不同培养基、培养环境以及乳鼠灌胃时的取样方法进行了研究,现将结果报道如下。

材 料 和 方 法

(一) 试验用菌株

系来源于腹泻仔猪粪便的大肠杆菌,代号为078、079、84-3、081、001、002、086-1和95-2。应用大肠杆菌国际标准株制备的K88因子血清进行鉴定,上述8个菌株均为K88阳性;又应

用乳鼠灌胃试验证实这些菌株均产生耐热肠毒素。

(二) 产毒用培养基

选用脑心浸液肉汤^[2]和马丁肉汤(pH7.5)^[6]两种培养基,分别分装于50 ml的三角烧瓶内,每瓶10 ml,高压灭菌备用。

(三) 耐热肠毒素的制备

将被检菌分别接种于脑心浸液肉汤及马丁肉汤,37℃水浴中振荡培养(使用振幅为60mm,频率为120次/分的往复式定时振荡机、下同)或静止培养6小时,取2 ml菌液转接在相应的培养基内,继续振荡培养或静止培养18小时,所获得的全菌液或经1700g离心20分钟的无菌体上清液,即可用于耐热肠毒素的测定。

(四) 耐热肠毒素测定

1. 试验动物: 用2—6天健康小白鼠。试

验前临时从母鼠窝中取出,透过菲薄的腹壁见到胃内充满白色的乳汁者,即可混合编组,用于试验。表格中每个数据用小白鼠 5 只。

2. 乳鼠灌胃试验^[1]: 作法是每只 2—6 天的乳鼠灌胃接种 0.1ml 全菌液或无菌体上清液, 4 小时后置玻缸中乙醚麻醉致死, 取出解剖, 移出肠段称重, 计算肠重与剩余尸体重的比值。判定标准: 肠与剩余尸体比值 0.070 以下为耐热肠毒素阴性; 0.071—0.084 为可疑; 0.085 以上为阳性。凡可疑菌株均进行复试。

试验结果

产毒条件的研究表明: 试验菌用脑心浸液肉汤(产毒用常规培养基)或马丁肉汤作为产毒培养基, 耐热肠毒素测试结果, 二者无显著差异 ($P > 0.05$), 因此这两种培养基的任何一种, 都可以用作试验, 不一定局限于常用的脑心浸液肉汤(见表 1)。用全菌液与上清液作试验, 对比结果亦无显著差异 ($P > 0.05$), 这提示我

表 1 两种不同培养基的产毒比较

菌株	脑心浸液肉汤比值	马丁肉汤比值
078	0.089	0.138
079	0.112	0.129
84-3	0.127	0.121
081	0.080	0.119
001	0.136	0.115
002	0.092	0.087
86-1	0.098	0.134
95-2	0.125	0.120
均数	0.107	0.120

表 2 全菌液与上清液产毒比较

菌株	全菌液比值	上清液比值
078	0.111	0.104
079	0.145	0.137
84-3	0.126	0.143
081	0.134	0.143
001	0.122	0.127
002	0.100	0.083
86-1	0.149	0.116
95-2	0.153	0.146
均数	0.130	0.121

表 3 不同培养方法产毒情况比较

菌株	振荡培养比值	静止培养比值
078	0.097	0.063
079	0.105	0.086
84-3	0.117	0.091
081	0.112	0.093
001	0.092	0.087
002	0.095	0.058
86-1	0.112	0.065
95-2	0.105	0.065
均数	0.104	0.076

们可以省去长期来都要进行离心处理的常规过程, 用不经离心处理的全菌液直接作灌胃试验, 大大简化了操作程序(见表 2)。但振荡培养明显优于常规的静止培养 ($P < 0.01$), 8 个菌株经振荡培养耐热肠毒素均为阳性, 而静止培养只 4 个菌株为阳性。振荡的阳性率比静止培养高一倍(见表 3)。因此, 大肠杆菌耐热肠毒素的检查, 用脑心浸液肉汤或马丁肉汤作产毒培养基, 在 37℃ 水浴中振荡培养后, 用全菌液直接作乳鼠灌胃试验, 既省工省事又能提高产毒菌株的检出率。

讨论

1. 乳鼠灌胃试验中灌胃前胃内一定要充满乳汁。有作者主张在灌胃的菌液中每 1ml 应先加入 2 滴 0.5% 伊文思蓝溶液, 肠道染成蓝色的才用作试验, 否则废弃不用。上面两点是试验中应注意的问题, 也是检查我们灌胃是否正确的一个指示。但我们没用伊文思蓝, 我们的体会是只要在实验开始前临时从母鼠窝中取出小白鼠, 透过菲薄的腹壁看到胃内已充满白色的乳汁, 即可用作试验, 在解剖时再检查一下鼠的姿势, 凡仰卧或侧卧, 膀胱无积尿多为阳性。只要注意这些问题, 实验都能一次成功, 一般很少有反复。因此用不用伊文思蓝作指示, 并不妨碍实验数据的取得。

2. 产毒菌株的保毒是个大问题。现在还没有办法在人工培养基上把菌株的毒力长期保持下去。据报告^[3], 保存于蛋白胨琼脂斜面上的培养物, 放在 4℃ 环境下, 半年后有 50% 的菌

株失去了毒力。现在他们改用石蜡密封加塞保存于室温下,尚不知是否会好一些。其他作者^[4]也发现大肠杆菌容易失毒的问题,使得大量腹泻病例难于查出产毒菌株。最近有作者^[5]指出,这问题的出现主要是肠毒素质粒变异造成的,久贮及多次传代,一些菌株就会丧失它们具有的质粒及产生肠毒素的能力。因此他们认为当前要筛选出产耐热肠毒素的大量细菌,还是一项非常艰巨的工作。也正由于这个原因,通常在文献中报道的产肠毒素大肠杆菌的例数都有限。今后,应进一步研究保存肠毒素菌株的

方法,同时分离菌株后应及时进行肠毒素测定。

参 考 文 献

- [1] Dean, A. G. et al.: *J. Infect. Dis.* **125**: 407—411, 1972.
- [2] Sam Frankel, et al.: *Gradwohl's Clinical Laboratory methods and diagnosis*, 7 ed. the C. V. Mosby Co. P. 1083, 1090, 1970.
- [3] Mundel, D. H.: *Infect and Imm.* 383—388, 1976.
- [4] Gangarosa et al.: *N. Engl. J. Med.* **296**(21): 1210, 1977.
- [5] Sack, R. B.: *J. Infect. Dis.*, **142**(2): 279, 1980.
- [6] 甘肃农业大学主编: 兽医微生物学实验指导, 农业出版社,北京,109页,1980年。