

肠道杆菌共同抗原 (ECA) 在医学细菌中的鉴定

于 泉 杨正时

(中国药品生物制品检定所, 北京)

摘要 本文报告用间接血凝试验, 对不同的 20 个菌属群共 277 株细菌的肠道杆菌共同抗原 (ECA) 进行检测。检测的 186 株肠杆菌科细菌中, 除 2 株大肠杆菌为 ECA 阴性外, 全部为 ECA 阳性 (阳性率达 98.9%); 非肠杆菌科细菌中, 15 株类志贺邻单胞菌全部为 ECA 阳性 (阳性率为 100%); 气单胞菌属 28 株, 1 株为 ECA 阳性, 其余 27 株为 ECA 阴性 (阳性率为 3.5%); 弧菌属和其它各种细菌共 48 株, 全部为 ECA 阴性 (阳性率为 0)。实验结果证实 ECA 几乎存在于所有肠杆菌科的细菌内, 而非肠杆菌科细菌 (除邻单胞菌属外) 一般不产生这种抗原。

关键词 间接血凝; 肠道杆菌共同抗原 (ECA)

肠道杆菌共同抗原 (Enterobacterial Common Antigen 缩写 ECA) 最初由 Kunin 等人在研究尿道感染的大肠杆菌等过程中发现^[1]。经研究证明这种抗原几乎存在于所有肠杆菌科的细菌内, 而非肠杆菌科细菌一般不产生这种抗原。所以说 ECA 是肠杆菌科细菌的专一性抗原, 它在临床诊断及细菌分类学上的意义是十分明显的。过去由于对其化学性质缺乏认识, 并在鉴定上的混乱, 而使 ECA 的研究进展较慢。间接血凝试验 (HA) 是检测不同细菌中 ECA 存在的一种常用方法。本文报告以间接血凝试验为手段检测不同的革兰氏阴性和革兰氏阳性细菌 20 个菌属、群共 277 株细菌的 ECA 存在情况, 为 ECA 的进一步研究提供参考。

材 料 和 方 法

(一) 菌种来源及培养条件

1. 菌种来源: 大部分实验菌株系中国医学细菌保藏管理中心 (CMCC) 收藏的国家标准

菌, 部分菌株是近几年从全国不同地区收集的, 经全面生化反应及生物学试验确定的地方性菌株。肠杆菌科细菌包括: 埃希氏菌属 (*Escherichia*) 91 株, 志贺氏菌属 (*Shigella*) 13 株, 沙门氏菌属 (*Salmonella*) 17 株, 枸橼酸杆菌属 (*Citrobacter*) 7 株, 克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 8 株, 肠杆菌属 (*Enterobacter*) 10 株, 哈夫尼亚菌属 (*Hafnia*) 3 株, 沙雷氏菌属 (*Serratia*) 7 株, 变形杆菌属 (*Proteus*) 8 株, 摩根氏菌属 (*Morganella*) 2 株, 普罗菲登斯菌属 (*Providencia*) 10 株, 耶尔森氏菌属 (*Yersinia*) 10 株。非肠杆菌科细菌包括: 邻单胞菌属 (*Plesiomonas*) 15 株, 气单胞菌属 (*Aeromonas*) 28 株, 弧菌属 (*Vibrio*) 27 株, 假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 8 株, 链球菌属 (*Streptococcus*) 7 株, 葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 4 株, 芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 1 株, 粪产碱杆菌 (*Alcaligenes faecalis*) 1 株。总计 277 株。

2. 培养条件: 除个别菌说明外, 其余细菌

表1 供试菌株的来源及培养条件

细菌名称*	菌株数	培养条件	来源
埃希氏菌属 (<i>Escherichia</i>)	91	37℃	CMCC**
志贺氏菌属 (<i>Shigella</i>)	13	37℃	CMCC
沙门氏菌属 (<i>Salmonella</i>)	17	37℃	CMCC
枸橼酸杆菌属 (<i>Citrobacter</i>)	7	37℃	CMCC
克雷伯氏菌属 (<i>Klebsiella</i>)	8	37℃	CMCC
肠杆菌属 (<i>Enterobacter</i>)	10	37℃	CMCC
哈天子亚菌属 (<i>Haemofilia</i>)	3	37℃	CMCC
沙雷氏菌属 (<i>Serratia</i>)	7	37℃	CMCC
变形杆菌属 (<i>Proteus</i>)	8	37℃	CMCC
摩根氏菌属 (<i>Morganella</i>)	2	37℃	CMCC
普罗非登斯菌属 (<i>Providencia</i>)	10	37℃	CMCC
耶尔森氏菌属 (<i>Yersinia</i>)	10	28℃	CMCC
邻单胞菌属 (<i>Plesiomonas</i>)	15	37℃	本实验室保存
气单胞菌属 (<i>Aeromonas</i>)	28	30℃	本实验室保存
弧菌属 (<i>Vibrio</i>)			
付溶血弧菌 (<i>V. parahaemolyticus</i>)	10	37℃ 3%盐	CMCC
F群弧菌 (<i>V. fluvialis</i>)	14	37℃ 3%盐	本实验室保存
拟态弧菌 (<i>V. mimicus</i>)	2	37℃	本实验室保存
麦氏弧菌 (<i>V. metschnikovii</i>)	1	37℃ 3%盐	本实验室保存
假单胞菌属 (<i>Pseudomonas</i>)	8	37℃	CMCC
链球菌属 (<i>Streptococcus</i>)	7	37℃ 血 10% CO ₂	CMCC
葡萄球菌属 (<i>Staphylococcus</i>)	4	37℃	CMCC
芽孢杆菌属 (<i>Bacillus</i>)	1	37℃	CMCC
粪产碱菌 (<i>A. faecalis</i>)	1	37℃	CMCC

* 细菌分类名称参照 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1984)。

** CMCC: 中国医学细菌保藏管理中心。

均于普通琼脂斜面 37℃ 培养。小肠结肠炎耶尔森氏菌于 28℃ 培养。气单胞菌于 30℃ 培养。F 群弧菌(又称河弧菌)、副溶血弧菌和麦氏弧菌生长于含 3% 氯化钠培养基内。肺炎链球菌

生长于 5% 脱纤维羊血琼脂培养基内, 10% CO₂, 37℃ 培养(见表 1)。

(二) ECA 免疫血清的制备及效价测定

1. ECA 免疫血清制备: 大肠杆菌 O14 具有良好的 ECA 免疫原性^[2]。本实验采用大肠杆菌 O14 菌株作 ECA 抗血清免疫原。将 37℃ 培养 12 小时的营养肉汤培养物于 100℃ 水浴加热 90 分钟, 比浊菌悬液浓度为 40 亿/ml 作免疫原。分别以 0.5, 1.0, 1.5 和 3.0 ml 不同剂量, 间隔 4 天, 耳静脉注射免疫家兔, 最后一针后 6 天采血。离心沉淀获免疫血清, 加 0.1% 叠氮钠防腐, 56℃ 处理 30 分钟, 除去部分非特异性物质后于 -10℃ 冷冻保存备用。

2. 效价测定: 分别用间接血凝试验和免疫双扩散试验(按常规法进行), 以大肠杆菌 O14 菌株 100℃ 加热 30 分钟的肉汤培养物上清液(比浊浓度为 20 亿/ml) 为标准抗原测定免疫血清。与标准抗原发生阳性反应的血清最高稀释度即为抗血清效价。用健康兔血清及生理盐水作阴性对照。

(三) ECA 在供试细菌中的检测

1. 被测样品的准备: 被测细菌由斜面转种到营养肉汤, 培养 12—16 小时(不同细菌的培养条件按前述)。菌悬液于 100℃ 加热 30 分钟, 3500 r/min 离心取上清备用。

2. 间接血凝试验检测 ECA: 将 ECA 免疫血清由 1:10 起倍比稀释到 1:5120。间接血凝试验采用新鲜绵羊红细胞作抗原致敏载体, 先用生理盐水将红细胞清洗 2—3 遍, 然后用 PBS 缓冲液(pH 7.2) 将红细胞稀释为 2—3% 浓度, 抗原与红细胞按 2:1 比例混合, 37℃ 水浴作用 60 分钟, 每间隔约 15 分钟振荡一次, 将致敏的红细胞用生理盐水洗 2—3 遍, 最后用 PBS 缓冲液配成所需浓度, 取 ECA 免疫血清和致敏抗原各 25 μl 混合于微量血凝板("U" 形或 "V" 形) 孔内, 于微量振荡器上振荡 1—2 分钟, 32℃ 或室温作用 1—2 小时后, 用肉眼观察结果, 以明显出现血细胞凝集者(血凝效价大于 1:10) 记录 ECA 阳性。

结 果

(一) ECA 免疫血清效价测定结果

检测 ECA 免疫血清所用抗原为大肠杆菌 O14。在间接血凝试验中与一定浓度抗原(标准抗原)发生明显凝集反应的免疫血清最高稀释度为 1:10240, 在免疫双扩散试验中发生沉淀反应的免疫血清最高稀释度为 1:5120。

(二) ECA 在供试细菌中的分布

用间接血凝试验对 277 株细菌检测表明, 肠杆菌科细菌 186 株, 除 2 株大肠杆菌(O37 和 O93)为 ECA 阴性外, 其余全部为 ECA 阳性, ECA 阳性率为 98.9%; 在非肠杆菌科细菌中, 邻单胞菌属 15 株全部为 ECA 阳性, 阳性率为 100%; 其它 76 株非肠杆菌科细菌中除一株为 ECA 阳性外, 全部为 ECA 阴性, 阳性率仅为 1.3%。其中气单胞菌属 28 株, 1 株为 ECA 阳性, 其余为 ECA 阴性。各种弧菌(包括副溶血弧菌、F 群弧菌、拟态弧菌和麦氏弧菌)及其它细菌(包括链球菌, 假单胞菌、葡萄球菌、粪产碱杆菌和枯草杆菌)共 48 株, 全部为 ECA 阴性(见表 2)。表 2 结果表明除邻单胞菌外, ECA 只限于肠杆菌科细菌中, 非肠杆菌科细菌一般不存在这种抗原。

表 2 277 株细菌的 ECA 检测结果

名 称	菌株数	ECA 阳性数(%)	ECA 结果
肠杆菌科	186 ^a	184(98.9)	+
邻单胞菌属	15	15(100)	+
气单胞菌属	28 ^b	1(3.5)	-
弧菌属	27	0(0)	-
其它细菌	21	0(0)	-

^a 其中两株为 ECA 阴性, ^b 其中一株为 ECA 阳性

⁺ 血凝效价一般大于 1:1280, ⁻ 血凝效价小于 1:10

讨 论

1. 用大肠杆菌 O14 制备的 ECA 免疫血清以间接血凝试验检测了 277 株供试细菌。实验证明该免疫血清用于 ECA 的检测具有良好的特异性, 用该血清检测细菌中的 ECA 存在虽

然不能排出可能存在的 O 抗原交叉, 但这并不影响 ECA 的检测结果。如大肠杆菌 O14 抗原交叉主要集中在大肠杆菌 O 抗原内和少数志贺氏菌 O 抗原内, 这些菌均为 ECA 阳性菌。

2. 间接血凝试验是检测 ECA 最为有效和敏感的方法。本实验采用新鲜绵羊红细胞为载体, 用于抗原致敏获得了满意结果。分别用保存一个月左右不同批的绵羊红细胞试验均获得一致结果, 血凝效价保持在 1:5120 以上。但红细胞放置时间过久, 操作过程中易出现溶血现象, 影响实验结果, 若基层临床使用, 最好采用醛化的红细胞, 使红细胞的保存期大大延长。分别用“U”形和“V”形血凝板试验得到了一致结果。在比较致敏血球所用抗原量时, 发现抗原与红细胞悬液(2—3%)按 2:1 混合, 可获得最佳的致敏效果。

3. 在检测的肠杆菌科细菌中, 发现两株大肠杆菌 O37 和 O93 为 ECA 阴性, 推测可能是由于长期保存菌株的突变所致。有人^[3,4]分别在大肠杆菌、沙门氏菌和其它肠杆菌科细菌中发现 ECA 阴性突变体。遗传学研究表明至少有三个基因 *rfe*、*rff* 和 *rfb* 参与 ECA 的合成, 这些基因的突变, 导致了 ECA 生物合成的缺陷。

在非肠杆菌科细菌中, 被测的 15 株类志贺邻单胞菌均为 ECA 阳性, 这一结果与国外文献相符^[2]。该菌的特殊名称表示了它与志贺氏菌的关系, 实际上类志贺邻单胞菌的生化特性与肠杆菌科很相似^[5], 其 O 抗原与志贺氏菌有明显的交叉反应。曾有人建议重新考虑该菌的分类地位^[2]。另外一株非肠杆菌科的 ECA 阳性菌株是气单胞菌, 生化鉴定该菌为杀鲑气单胞菌 (*A. salmonicida*)^[6], 由于菌株数量关系, 目前尚不能解释其原因, 但本菌的生化特性与其它气单胞菌(如亲水气单胞菌, 豚鼠气单胞菌等)差别较大, 另外认为该菌不引起人类疾病。

肠道杆菌共同抗原做为肠杆菌科的特异性抗原, 人们已将它用于细菌的分类, 做为细菌鉴定和分类的附加依据。关于 ECA 是否为毒力因子, 其临床意义如何? 都需要进一步研究。

(下转第 284 页)

(上接第 262 页)

参 考 文 献

- [1] Kunin, CM et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 111: 160, 1962.
- [2] Makela, PH and H. Mayer: *Bacteriol. Rev.* 40: 591,

1976.

- [3] Lew, HC et al.: *J. Bacteriol.* 136: 227, 1978.
- [4] Meier, U et al.: *J. Bacteriol.* 163: 756, 1985.
- [5] Sakazaki, R. et al.: *Methods in Microbiology*, Vol. 16, P. 259, 1984.
- [6] 于泉等: *微生物学通报*, 14(3): 114, 1987。
- [7] Ramia, S et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.* 32: 395, 1982.

• • 284 •