

奇异变形杆菌耐热性肠毒素的初步研究

张斐 俞一兵 张平 程纯

(南通医学院微生物教研室,江苏)

摘要 为探讨奇异变形杆菌的发病机理,本文用乳鼠试验检测了从医院内腹泻患儿粪中分离的 36 株奇异变形杆菌肠毒素,结果 4 株呈阳性。对其中 2 株进行了耐热性试验,证明其具有耐热性,同时发现在人工培养条件下通过多次传代或肠毒素经反复冻融,耐热性肠毒素(ST)的活性可随之减弱或丧失。

关键词 奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*); 耐热性肠毒素(ST)

奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*) 系条件致病菌,在一定条件下可引起泌尿道感染、脑膜炎、中耳炎、败血症、食物中毒、腹泻等疾病^[1-5]。曾有学者报道,由泌尿道感染患者尿或粪便中分离的奇异变形杆菌具有细胞侵袭力、溶血活性、小鼠模型中的实验性毒力^[5-10],而该菌能否产耐热性肠毒素(ST),目前国内外尚未见有关报道。本文用乳鼠试验检测了由医院内腹泻患儿粪便中分离的 36 株奇异变形杆菌肠毒素,结果其中有 4 株细菌(11.1%)产生 ST。并进一步对 ST 的产生与传代次数、ST 的活性与温度以及反复冻融次数之间的关系进行了初步探讨。

材料和方法

(一) 菌株来源

36 株奇异变形杆菌是由本院附属医院儿科病房(新生儿病室)腹泻患儿粪便中分离获得。所有菌株在固体培养基上呈“迁徙生长”,克氏双糖上乳糖不分解、葡萄糖产酸产气,尿素酶试验、苯丙氨酸脱氨酶试验和硫化氢试验均阳性,靛基质试验阴性,经临床化验室及上海市卫生防疫站鉴定为奇异变形杆菌。

(二) 肠毒素的制备

1. 离心法:所有菌株冷冻真空干燥保存,

使用前肉汤复苏后接种胱氨酸-乳糖-电解质缺失培养基(CLED),该平板因缺少电解质而抑制变形杆菌迁徙生长,从而获得单个菌落。然后从 CLED 平板上挑取多个菌落接种于 L 形管牛脑心浸液肉汤,37℃ 恒温水浴振荡培养 24 小时,取出 8000 r/min 离心 15—20 分钟,上清液备用^[11,12]。

2. 滤过除菌法:将上述 37℃ 恒温水浴振荡培养 24 小时的菌悬液,经 0.22 μm 微孔滤膜过滤,滤液备用^[12,13]。

(三) 耐热性肠毒素测定

在每只乳鼠胃内灌注 0.1 ml 肠毒素标本,每份共用 3 只 2—3 日龄小白鼠乳鼠。为帮助观察是否正确灌入胃内,标本中均加入 1 滴 1% 伊文思蓝溶液。灌入标本后的乳鼠置盛有棉花的平皿内,室温下放置 3 小时后打开腹腔,称量全部肠重以及除去肠道的其余体重,计算出液体积聚比 FA。

$$\text{液体积聚比 (FA)} = \frac{\text{全部肠道重量}}{\text{除肠道外的体重}}$$

当每组试验 3 只乳鼠的 FA 平均值 < 0.09 则为阴性,大于者为阳性。每批试验设有牛脑

本文承蒙王焕姬教授热情指导,严靖副主任医师、殷之琳主管技师的大力协助,特一并致谢

心浸液肉汤阴性对照及大肠杆菌 ST 阳性对照 (菌株 *E. coli* 130 由上海市卫生防疫站提供)^[14]。

结 果

(一) 耐热性肠毒素的测定结果

36 株奇异变形杆菌中有 4 株产生肠毒素, 菌株号分别为 14、64、150、164, 其肠毒素是采用离心法制备。另外 14*、150* 两株菌的肠毒素是经滤过除菌法制备的滤液。表 1 说明肠毒素制备方法虽略有不同, 却可获得相同结果。

表 1 产肠毒素奇异变形杆菌的乳鼠试验结果 (FA 平均值)

菌株号	对照组		试验组
	阳性	阴性	
14	0.20	0.068	0.095
150	0.20	0.062	0.105
64	0.194	0.066	0.112
164	0.178	0.069	0.119
14*	0.20	0.068	0.106
150*	0.20	0.062	0.104

“*” 表示经滤过除菌法制备的标本

(二) 耐热性试验

64 与 164 号菌株用离心法制备的肠毒素, 分别经加热 60℃30 分钟, 100℃10、30 及 60 分钟后, 再作乳鼠灌胃试验, 结果见表 2。

表 2 两株奇异变形杆菌肠毒素耐热性试验结果 (FA 平均值)

菌株号	对照组	未加热组	加 热 组			
			60℃30'	100℃10'	100℃30'	100℃60'
64	0.066	0.116	0.107	0.102	0.095	0.067
164	0.069	0.199	0.124	0.120	0.108	0.072

表 2 表明, 奇异变形杆菌肠毒素具有耐热性, 其活性随加热温度升高与加热时间延长而下降以至丧失。

(三) 菌株传代次数与产生 ST 的关系

14 与 164 号菌株不同传代次数产生的 ST

进行乳鼠灌胃试验, 结果见表 3。表 3 说明奇异变形杆菌在人工培养条件下, 经多次传代后该菌产 ST 的活性有减弱或丧失的趋势。

表 3 两株产 ST 的奇异变形杆菌传代次数与 ST 产生的关系 (FA 平均值)

菌株号	第 1 代	第 2 代	第 3 代	第 4 代	第 5 代
14	0.095	/	0.066	0.054	/
164	0.199	0.146	0.144	0.116	0.080

(四) ST 冻融次数与其活性的关系

两株产 ST 的奇异变形杆菌 14 号及 164 号和一株产 ST 的大肠杆菌 *E. coli* 130, 分别将其离心法制备的肠毒素在冻融前和冻融 1、2、3 次后, 再分别进行乳鼠灌胃试验, 结果见表 4。表 4 可见, 无论奇异变形杆菌还是大肠杆菌, 所产 ST 的活性均随冻融次数增加而减弱甚至消失。

表 4 两株奇异变形杆菌产的 ST 冻融次数与活性之间的关系 (FA 平均值)

菌株号	阴性对照	未冻融组	冻 融 组		
			1 次	2 次	3 次
64	0.068	0.095	0.073	0.059	/
164	0.063	0.199	0.132	0.128	0.78
<i>E. coli</i> 130	0.068	0.20	0.178	0.125	0.069

讨 论

菌株产肠毒素的量, 除与菌株、培养基、培养条件有密切关系外, 所选用的测毒试验方法也是关键。乳鼠灌胃试验是唯一公认用于检测肠道细菌是否产 ST 的一种动物试验^[11]。本文应用乳鼠灌胃试验从 36 株奇异变形杆菌中检出 4 株 (11.1%) 阳性。对其中两株肠毒素进行耐热性试验, 结果仍为阳性。当加热 100℃ 1 小时后进行乳鼠试验才表现为阴性。从而证明奇异变形杆菌有些菌株产 ST, 其活性随温度升高及加热时间延长而下降以至消失。我们曾对

其中两株产 ST 的奇异变形杆菌分别采用离心法、滤过除菌法制备肠毒素,乳鼠试验结果均阳性。可见两种方法都适用于肠毒素制备,而且以离心法简便。

奇异变形杆菌传代次数与 ST 产生的关系表明,该菌经人工培养多次传代后产生 ST 的能力可以减弱以至丧失。该现象在空肠弯曲菌中同样存在,这也许是奇异变形杆菌与空肠弯曲菌产生 ST 活性不易被证实的原因之一^[13]。

病毒中有包膜的病毒即使在 -90℃ 长期保存也易失去感染性,对反复冻融特别敏感。奇异变形杆菌产 ST 的活性同样对反复冻融敏感,随冻融次数的增加 ST 活性有下降或消失趋势,大肠杆菌产生的 ST 也有类似现象。这一点提示,用于乳鼠试验的待测标本,切不可反复冻融。这可能是奇异变形杆菌产生 ST 而不易被检出的另一原因。

大肠杆菌产生 ST 的性状是受质粒控制的,编码 ST 基因的质粒具有可转移性,因此仅部分大肠杆菌产 ST。同样,奇异变形杆菌产 ST 的性状也可能受质粒控制,只有携带产 ST 质粒的奇异变形杆菌才能产生 ST。由于质粒具有可转移性,所以某些菌株经多次传代后,产 ST 质粒有可能丧失,使乳鼠试验由阳性转为阴性。

小结: (1) 奇异变形杆菌仅有某些菌株产 ST,其活性随温度升高及加热时间延长而下降以至消失。(2) 离心法与滤过除菌法制备肠毒素可获相同结果。(3) 奇异变形杆菌经人工培养多次传代后产 ST 的能力有减弱、消失趋势。(4) 奇异变形杆菌产生的 ST 经反复冻融,活性可随之下降或丧失。

参 考 文 献

1. Burke J. P. et al.: The New England Journal of Medicine, 284(3): 115—120, 1971.
2. Williams E W et al.: Journal of Clinical Microbiology 18(1): 5—9, 1983.
3. Fowler, J. E. et al.: The Journal of Urology 120(3): 315—318, 1978.
4. Apollonin A V et al.: Ж. М. Э. Н 2:14—18, 1985.
5. Szabo R T et al.: The Journal of Urology, 137(4): 793—797, 1987.
6. Peerbooms P G H et al.: Infection and Immunity, 43(3): 1068—1071, 1984.
7. Peerbooms P G H et al.: Antonie Van Leeuwenhoek, 52: 53—62, 1986.
8. Peerbooms P G H et al.: Infection and Immunity, 36(3): 1246—1248, 1982.
9. Peerbooms P G H et al.: Antonie Van Leeuwenhoek, 49: 1—11, 1983.
10. Peerbooms, P. G. H. et al.: Journal of Medical Microbiology 19(1): 55—60, 1985.
11. 杨正时等: 微生物学通报, 13(1): 22—25, 1986.
12. 陆广珍等: 上海医学检验杂志, 1(1): 43—46, 1986.
13. 顾志学等: 江苏医药, 10(9): 488—490, 1984.
14. 罗海波等: 细菌毒素研究进展, 人民卫生出版社, 北京, 1983年。