

一株阴沟肠杆菌致病性的调查研究*

陈恩临** 谭国珠 赖群元

(广西壮族自治区卫生防疫站)

近年,在一次暴发不常见疾病的调查中,从公共生活水源中分离到一株阴沟肠杆菌。经试验认为与该疾病病因有关,但阴沟肠杆菌的致病性目前尚未完全了解。

材料与方法

1. 供试菌株来源: 取发病区生活用水样品 10ml,接种于普通肉汤增菌,伊红美蓝琼脂分离而得,取名“左水”株。

2. 对照菌株: 阴沟肠杆菌 1.57 及 1.58 (获自中国科学院微生物研究所)。

3. “左水”株的鉴定: 按肠杆菌科、属分类的通用标准^[1,2]。各项试验方法按文献[2]进行,但其中赖氨酸及鸟氨酸脱羧酶试验用 Goldschmidt 法^[3],精氨酸双水解酶用 Thornley 法^[4]。

菌体及鞭毛抗原测定参照坂崎氏方法^[5]。O 血清的制备使用 120℃, 2.5 小时处理抗原。免疫 H 血清的抗原为 6 小时肉汤培养物,经福尔马林处理制成盐水悬液。血清均用家兔免疫。凝集吸收试验菌液 H 抗原为 0.1% 福尔马林盐水悬液, O 抗原为 100℃, 1 小时处理盐水悬液。

4. 毒力试验: (1) 小鼠 LD₅₀ 测定: 将试验菌株的普通琼脂培养基 37℃, 16 小时培养物制成盐水悬液,按卫生部药品生物制品检定所比浊管标准,参考伤寒杆菌数值计算浓度。攻击菌数由 0.05—0.30 × 10⁹ 个菌体,按等量间隔分为 6 个剂量,以 0.5ml 做腹腔攻击。每组 5 只小鼠,体重为 20 ± 1g,观察 72 小时。尸体脏器做病理学检查。

(2) “毒素”测定: 为便于“毒素”物质的纯

化,此项试验使用成分为 1/15 M pH 7.2 磷酸缓冲盐水加 1% 葡萄糖, 0.2% 硫酸铵和 1.5% (V/V) 无机盐溶液^[3],制成的液体或固体的综合培养基进行培养。试验证实在该培养基与普通琼脂上培养的菌其毒力相同。

培养液中“毒素”的制备: 将实验株接种于上述液体综合培养基,振荡培养 18 小时过滤除菌。滤液在 4℃ 下用蒸馏水透析至铵离子阴性,继之用 20% 蔗糖溶液反透析浓缩,制备物的总氮量为 9 μg/ml。

菌体“毒素”的制备: 将综合琼脂培养基上生长的实验菌菌苔刮下。生理盐水洗 3 次,制成 400 亿/ml 蒸馏水悬液,以 21 × 10³ 赫超声波处理 6 小时,击碎菌体细胞,过滤取滤液。“毒素”试验的条件与 LD₅₀ 测定相同。攻击剂量各为 0.5、1.0 及 1.5ml。培养滤液同时进行 80℃, 30 分钟处理,做“毒素”的耐热性试验。

(3) 肠毒素试验: 耐热性肠毒素 (ST) 用乳鼠法测定^[6],以胰消化酪朊加酵母膏制备肉汤培养基。接种后,37℃ 转管培养 24 小时。收集菌液用蔡氏细菌滤器除菌。滤液经 65℃ 15 分钟处理,加 2% 伊文思蓝数滴,作 ST 检测。取 0.1ml 滤液注射于 3 日龄乳鼠胃内,25℃ 3 小时,测肠重/尸重。

不耐热肠毒素 (LT) 测定用家兔迴肠结扎法 (De 试验),每肠段注射培养菌液 1ml,分别在接种后 6 及 18 小时观察,测定积存分泌液量。每组试验用家兔两只。

5. 血清流行病学调查: 取发病期 (病程 9—18 天),恢复期 (病程 35—45 天) 和一年后的

* 广西医学院附属医院病理科协助病理学检查, 谨此致谢。

** 现在天津医学院微生物教研室工作。

患者血清,做凝集抗体测定,抗原为“左水”株福尔马林处理菌液。在第一、二次采血同时,以未食同一水源的健康者为对照。

结 果

1.“左水”株的鉴定:本菌株为革兰氏阴性无芽孢杆菌,能运动、氧化酶阴性,糖发酵型。生化反应符合阴沟肠杆菌生物学特性,可鉴定为阴沟肠杆菌(*Enterobacter cloacae*)^[1,2,7]。但在KCN肉汤中不生长,不能发酵鼠李糖及棉籽糖与典型定义略有差异。

通过交互凝集试验研究表明“左水”株与1.57株无共同的O抗原及H抗原。与1.58株的O抗原相同,H抗原各有特异因子(见表1)。

表 1-1 “左水”株与 1.58 株 O 抗原交互凝集反应

血清 抗原	“左 水” O		“1.58” O	
	未吸收	“1.58”吸收	未吸收	“左水”吸收
“左水” O	640	—	320	—
“1.58” O	640	—	640	—

表 1-2 “左水”株与 1.58 株 H 抗原交互凝集反应

血清 抗原	“左 水” H		“1.58” H	
	未吸收	“1.58”吸收	未吸收	“左水”吸收
“左水” H	2560	320	640	—
“1.58” H	640	—	1280	80

2.毒力试验:小鼠经腹腔攻击活菌后3—4小时开始出现降低活动,呼吸加深,闭目,卷缩

等表现,但直至死亡无特殊症状。各剂量组小鼠死亡情况(见表2)。按比浊浓度计算LD₅₀=1.38×10⁸以1.58株做对照,小鼠未见明显症状,亦无病死。

表 2 小鼠 LD₅₀ 测定

剂量(×10 ⁹)	0.05	0.10	0.15	0.20	0.25	0.30
死亡数/动物数	0/5	1/5	3/5	4/5	4/5	5/5

从综合培养基培养滤液及超声处理后的除菌滤液所制备的“毒素”对小鼠的毒性见表3。

表 3 不同方法制备的“毒素”对小鼠的毒性

“毒 素”		剂 量 (ml)		
		0.5	1.0	1.5
超声处理	原 液	0/5	5/5	未做
	加 热	0/5	5/5	未做
培养滤液	原 液	0/5	5/5	4/5
	加 热	0/5	2/5	5/5

注:分子=死亡数;分母=实验动物数

从耐热性来看,不同的制备物可能为同一种耐热性“毒素”。按总氮量计算,加热的培养滤液“毒素”LD₅₀相当于含氮量为7.19μg物质。

活菌攻击与超声处理后滤液所致病变相同,主要为心肌浊肿变性,各脏器有不同程度的瘀血或充血,以肺、肝为主,脑及肠道未见明显改变。实验小鼠的病变与一名患者的尸检病理结果基本一致,均无特异性形态改变。

3.血清流行病学调查结果(见表4):

表 4 患者对“左水”株的凝集抗体效价

采血时间	人数	<1:10	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	$\bar{X}G$
患病初期	43	6		8	14	12	3				28.08
恢 复 期	49						1	15	18	15	622.14
一 年 后	23			1	2	7	13				104.92

表4显示了患者血清抗体对“左水”株有特异性的消长。凝集素效价的几何平均($\bar{X}G$),恢复期为初期的22.15倍,一年后降低到不足4倍,而在第一、二次取血时对照的几何平均效价

均在10以下。因而认为患者对“左水”株的抗体是有诊断意义的。每人各取得3次血清的10名患者,其几何平均效价初期为60.62,恢复期为640.00,一年后为129.96亦与上述人群测

的结果有相同的变化规律。

讨 论

1. “左水”株的生物学特性符合肠杆菌科克雷伯氏-产气杆菌簇定义。根据其对肌醇及丙三醇不产气, 纤维二糖产气; 明胶迟缓液化; 赖氨酸脱羧酶阴性, 鸟氨酸脱羧酶阳性, 精氨酸二水解酶阳性而确定为阴沟肠杆菌 (*Enterobacter cloacae*) 其与种内多数菌株不同者为 KCN 肉汤不生长, 不能发酵鼠李糖及棉籽糖。与两株已知菌比较“左水”株与 1.58 株有共同 O 抗原, 应属同一 O 群, 其 H 抗原虽有差异, 但就 1.58 株而言也大部分能为“左水”株吸收。

2. 小鼠试验表明“左水”株有一定的毒力, 而 O 抗原相同的 1.58 株未显示有致病作用。另一株同时分离的阴沟杆菌“水 3”株亦证明无毒力, 说明“左水”株与其它对照菌株在毒力因素方面有量的不同, 或可能有质的差异。试验还初步揭示“左水”株的致病因素是一种耐热性物质。由于活菌感染及超声处理滤液所致病变一致; 加热处理后亦有同样活性, 这些特点与典型的蛋白质性质的外毒素不同^[8], 而近于内毒素。其存在于培养液中者可能来自破碎菌体所释放, 或属于游离内毒素^[9]。

对阴沟肠杆菌的致病性所知尚不全面, 报告较多者是引起医院感染, 产生肠毒素 LT 或

ST 的菌株可引起急性腹泻^[10]。而本次疾病的特点是患者肠道症状轻, 腹泻者不多。一周后普遍有明显的心肌损害, 低血钾, 酸中毒。部分病人伴有肾功能障碍和嗜睡, 视力障碍等症状。病程长达 25—30 天, 发病率亦甚高, 与已知的报道有所不同。

综合上述结果, 在未检出其它致病菌的基础上, 从菌株的分离来源、小鼠的实验病理、患者人群特异性抗体的升高均说明“左水”株与此次疾病的病因有关。

参 考 文 献

- [1] Taylor, J.: Int. Bull. Bact. Nomen Tax., **13**: 69—93, 1963.
- [2] Edwards, P.R. and W.H. Ewing: Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed. p. 301—307. Burgess, 1972.
- [3] Goldschmidt, M. C. et al.: Appl. Microbiol., **22**: 344—349, 1971.
- [4] Thornley, M. J. et al.: Appl. Bact., **23**: 37—52, 1960.
- [5] Sakazaki, R. et al.: Jap. J. Med. Sci. Biol., **13**: 1—12, 1960.
- [6] Giannella, R. A.: Infect Immun., **14**: 95—99, 1976.
- [7] Wasilauskas, B. L.: Appl. Microbiol., **21**: 162—163, 1971.
- [8] Ajl S. T. et al.: Microbiol Toxins Vol. I. p. 67—75. Academic press, 1970.
- [9] Crutehley, M. J. et al.: Nature, **214**: 1052, 1967.
- [10] Klipstein, F. A. et al.: J. Infect. Dis., **136**: 205—215, 1977.