

L 形管培养法用于检测大肠杆菌耐热肠毒素的研究

杨正时 钟 熙 王晓新

(卫生部药品生物制品检定所,北京)

引起人和家畜急性腹泻的产毒性大肠杆菌,产生两种不同类型的肠毒素^[1,2]。一种是不耐热肠毒素(LT),分子量大于80,000的蛋白质,具有良好的抗原性,与霍乱肠毒素有密切的抗原关系,而且其化学结构、功能与致病的作用模式也极其相似,现在已有多种生物学和免疫学体内外测定的方法^[3-7]。另一种是耐热肠毒素(ST),是一种分子量在4000左右的多肽,不具有抗原性,在结构、功能和作用模式方面均不同于霍乱肠毒素。目前虽然已有报道将ST结合到另一种蛋白质上,使其具有抗原性而可制备免疫抗血清^[8,9],但ST的免疫学诊断还处在研究阶段,因此它和LT测定不同,目前唯一公认的方法是乳鼠试验,以肠道和体重的液体积聚比来衡量ST的存在与否。用国内目前常用的

培养方法来制备ST毒素,其阳性检出率很低。本文报告是用一种特制的L形管培养大肠杆菌制备ST,在乳鼠模型上获得满意的结果。

材料与方法

(一) 菌种

大肠杆菌40株是太原儿童医院赠送的。分离自腹泻患儿粪便。曾用鼠肠襻法检定LT和ST,并经其它单位检定。本文用乳胶颗粒凝集试验、Biken试验及平板免疫溶血试验再一次检定这些菌株的LT^[10]。

(二) 培养基

用酪朊-酵母浸膏液体培养基配方:酪朊(Difco)20g,酵母浸膏粉(Difco)10g,NaCl 2.5g,K₂HPO₄15g,葡萄糖5g,微量元素溶液(成

份为 MgSO_4 5%, FeCl_3 0.5%, CoCl_2 2%) 0.5ml, 蒸馏水 1000ml, 水浴加热溶化冷却后, 调节 pH 到 7.5, 然后分装 L 形管中, 每管 2ml, 高压灭菌。

(三) L 形管

L 形管是由北京医科大学临床药理研究所黄念君提供并仿制的(图 1)。

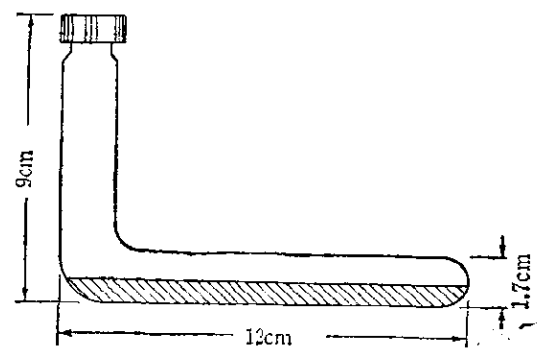


图 1 L 形管(斜线部分示液体培养基)

此管内加入 2ml 液体培养基, 底部水平放置后, 其液面宽度约为 1.2cm, 液体培养基的表面积约为 14.4cm^2 , 上方盖有螺旋帽。

(四) L 形管接种与培养

从半固体保存的菌种接种到普通琼脂斜面, 37°C 过夜培养, 从培养物上挑取菌苔直接接种于 L 形管液体培养基内, 盖上螺旋帽, 不必拧紧。将 L 形管固定于水浴摇床上, 水温 37°C , 使水面淹过 L 形管的底管上方, 底管与往复振荡方向平行, 每分钟往复振荡 120 次。过夜培养 18 小时。

(五) 小管静止培养

此法是国内制备 ST 的常用培养方法, 将斜面培养物接种后, 置 37°C 孵育箱培养 18 小时, 小管 1.0×10 (外径 \times 长度) cm。

(六) 迴旋培养

将装有 2ml 液体培养基的小管, 接种斜面

培养物后, 盖金属帽置于转鼓(迴旋培养器)最外层孔内, 倾斜 10° , 每小时迴转 7.5 次。将转鼓置于孵育箱内, 37°C 培养 18 小时。

(七) 乳鼠灌喂与 ST 判断

将上述各种液体培养物, 3000 转/分离心 30 分钟, 取出上清液, 加 1 滴 1% 伊文思蓝溶液作为观察是否正确灌入胃内的指示剂。方法是用卡介苗注射器及一圆头弯针头轻轻插入食道, 管口进入约 1cm 左右时将培养上清液注入 0.1ml, 每一标本使用 2 只 2—3 日龄乳鼠, 灌入标本后乳鼠置于盛有滤纸的平皿内, 在室温 ($25-28^\circ\text{C}$) 下放置 3 小时后, 打开腹壁, 取出全部肠道放在硫酸纸上, 称取重量后, 再称除去肠道的其余体重, 计算出液体积聚比。

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

计算出 2 只乳鼠的 FA 比, 再求其平均值, 小于 0.083 者为 ST 阴性, 大于者为阳性。

结 果

(一) 细菌生长浓度与 ST 阳性乳鼠特征

将同一菌株接种在同批等量的酪朊-酵母浸膏粉液体培养基上过夜培养。三种培养方法所得的细菌生长浓度差异很大, 用标准比浊管方法比浊测定, 在 L 形管中细菌生长浓度平均为 800—1000 亿/毫升, 而迴转培养法为 400—500 亿/毫升, 静止小管培养法则均为 20—40 亿/毫升(表 1)。

用培养上清液灌喂乳鼠 3 小时后, 乳鼠腹部在解剖前即明显隆起, 腹壁绷紧, 皮肤发亮, 透过腹壁肉眼可见肿胀的肠襻, 腹壁可被肿胀的肠襻压印成肠形。个别 L 形管法小鼠在不到 3 小时即排出水样稀便。去腹壁后, ST 阳性菌株的乳鼠肠襻肿胀发亮, 充满液体, 而阴性菌

表 1 培养基表面积对细菌生长浓度与 ST 检出率的影响

方 法	培养管放置	液体表面积 (cm^2) 培养基 (2ml)	细菌生长浓度 (亿/毫升)	ST 检出率 (%)
静 止 法	垂 直	0.785	20—40	10
迴 旋 法	倾 斜	4.0	400—500	20
L 形管法	垂直-水平	14.4	800—1000	45

株肠道正常。

(二) 三种方法测定 ST 的结果比较

40 株大肠杆菌分别用 L 形管法、迴旋培养法与静止培养法培养所获上清液灌喂乳鼠,测定产生 ST 的结果见表 2。L 形管法阳性者 18 株,阳性检出率为 45%,FA 值范围在 0.0033—0.1782, 其中 15 株 FA 比在 0.09 以上, 11 株 FA 比值在 0.1 以上, 18 株 FA 比平均值至少为 0.1168。迴旋培养法阳性 8 株,阳性率为 20%,迴旋培养法阳性菌株与 L 形管法一致。静止法阳性 4 株,阳性检出率为 10%,ST 阳性株与 L 形管法一致,其中 3 株和 L 形管法,迴旋法一致。可见 L 形管法阳性率最高,而迴旋培养法和静止培养法检出 ST 的阳性率仅为 L 形管法的 1/2 和 1/4。

表 2 不同方法检测 40 株大肠杆菌 ST 的结果

菌 号	L 形管法	迴旋法	静止法
1	0.1310	0.1530	0.1075
34	0.122 (已泻)	0.1160	0.1498
39	0.121 (已泻)	0.1287	0.1360
7	0.1763	0.1108	—
15	0.1782	0.1054	—
31	0.1398	0.1274	—
32	0.0833	0.0886	—
36	0.0916(已泻)	0.1685	—
33	0.0935	—	0.1006
2	0.088	—	—
3	0.1172	—	—
11	0.0936	—	—
14	0.0925	—	—
18	0.1100	—	—
23	0.0897	—	—
26	0.1056	—	—
28	0.1054	—	—
35	0.1640	—	—
其余 22 株	—	—	—

(三) 肠毒素存在的形式

产毒性大肠杆菌产生肠毒素 LT 和 ST 的形式有 3 种。①一些菌株仅产生 LT,②有一些菌株仅产生 ST, ③有一些菌株即产生 LT 又产生 ST。根据对这些菌株产生 LT 的检定^[10],说明产生 ST 和 LT 均有质粒所编码的。产生 ST 与 LT 的菌株比率见表 3。

表 3 ST, LT 毒素产生形式

类 型	株 数	%
LT ⁺	11	27.5
ST ⁺	10	25
LT ⁺ ST ⁺	9	22.5
—	10	25

讨 论

检测大肠杆菌不耐热肠毒素 ST 比检测 LT 困难得多,主要由于 ST 是分子量较小的多肽,不具有抗原性,因此使用一般的免疫学检验方法便受到了限制。某些大肠杆菌的性状是由质粒所控制的,如编码 K₈₈ 的基因与发酵棉子糖 (Raf⁺) 的基因存在同一质粒的 DNA 上。分离到的大肠杆菌,只要能发酵棉子糖,就可初步判定为 K₈₈ 阳性^[10]。利用此种特性可检测 K₈₈ 的质粒 DNA 是否存在。大肠杆菌产生 ST 的性状也是由质粒所控制的。但是编码 ST 基因的质粒不具有标记,也不存在连锁基因,因此不能用生物化学的方法鉴别质粒的存在。另外由于编码 ST 基因的质粒具有可转移性,因此 ST 可存在于多种血清型的大肠杆菌中。这样血清学鉴别方法仅能作为诊断 ST 的参考而不能肯定其存在,虽然基因探针试验可适用 ST 的诊断,但因技术和设备上的困难限制了它的应用,它仅能应用于个别实验室。因此 ST 的鉴定目前仍以动物试验为主,尤以乳鼠灌喂试验为依据。

应用乳鼠试验测定肠毒素,首先由 Deam^[11]于 1972 年创立的。当时已知在大肠杆菌中存在着类似霍乱样肠毒素 (CT) 的不耐热毒性物质 LT,但是当时对 ST 尚不清楚,在发现大肠杆菌能引起乳鼠肠道肿胀反应的同时,又发现 CT 对乳鼠肠道不起反应,因而笼统地认为 CT 和

LT是不同的。其实当时所使用的菌株不是单纯的LT株而是ST株。不久,其他作者的试验证明了Dean氏的乳鼠肠道试验不适用于LT株,仅仅对ST有特殊的鉴别作用。到目前为止也只有用乳鼠试验来确定ST,但是乳鼠试验过程中的影响因素太多,不易掌握,于是在1976年Giannella^[12]对测定ST的操作条件作了详细的比较研究,确定了乳鼠试验适宜的条件,并推荐培养基最好把美国常用的胰酶消化大豆肉汤改为本报告中所应用的酪朊-酵母浸膏粉液体培养基,并建议由三角瓶振荡培养基改为本试验中应用的迴旋培养法。但是从国内检测ST的情况来看,试验方法缺乏标准程序,忽视了培养方法与条件,因此本文改用L形管法,并与迴旋培养法作了比较,从本文报告的结果来看,L形管培养法阳性检出率比迴旋试验法高一倍多,比国内常用的静止培养法高4倍,这可能是由于在相等量的培养液中,L形管能扩大液体的表面积,使之达 14.4cm^2 ,而静止法的表面积仅 0.785cm^2 与空气接触,在10度倾斜的迴旋培养中,液体成一斜面,培养表面积约为 4cm^2 ,并且L形管在往复振荡中,使培养液液面形成不规则的高峰和低谷状态,扩大了液面的表面积。另外,由于液体的冲击式运动,带动液面上方空气的流动,L形管的垂直管部分

不断供氧,使细菌发育生长更良好,促使ST毒素的生成与分泌。在测定ST的程序中,若其它实验条件一致,仅改用L形管培养法即可使ST检出阳性率提高2—4倍,因此,用L形管法培养检测大肠杆菌耐热肠毒素ST是一个值得推广的方法。

参 考 文 献

- [1] S. L. Gorbach, B. H. Kean, et al.: *N. Engl. J. Med.* 292: 933—936, 1975.
- [2] R. B. Sack: *Annu. Rev. Microbiol.* 29: 333—353, 1975.
- [3] T. Honda, M. Arita, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 16: 60—62, 1982.
- [4] S. L. Moseley, P. Echeverria, et al.: *J. Infect. Dis.* 145: 863—869, 1982.
- [5] T. Tsukamoto, Y. Kinoshita, et al.: *J. Clin. Microbiol.* 12: 768—771, 1980.
- [6] R. A. Finkelstein, and Z. S. Yang (杨正时): *J. Clin. Microbiol.* 18: 23—28, 1983.
- [7] R. A. Finkelstein, and Z. S. Yang (杨正时) et al.: *J. Clin. Microbiol.* 18: 1417—1418, 1983.
- [8] F. A. Klipstein, R. F. Engert and J. D. Clement: *Infect. Immun.* 37: 550—557, 1982.
- [9] H. W. Moon, A. L. Baetz and R. A. Giannella: *Infect. Immun.* 39: 990—992, 1983.
- [10] W. Gastra and F. D. Graaf: *Microbiol. Rev.* 46: 129—161, 1982.
- [11] A. G. Dean, Y. Ching et al.: 125: 407—411, 1972.
- [12] R. A. Giannella: *Infect. Immun.* 14: 95—99, 1976.