

蜡样芽孢杆菌肠毒素的研究动态

夏克栋

(温州医学院微生物学教研室, 浙江温州)

通常认为蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 是一种条件致病菌。临床上偶可致脓肿、脑膜炎、肺炎、骨髓炎、心内膜炎及败血症等, 但以引起食物中毒最为重要^[1]。自 1950 年以来, Hauge 曾多次从食物中毒的标本中分离出蜡样芽孢杆菌, 从而证明该菌与食物中毒的关系至为密切。此后世界各地对该菌引起的食物中毒的报道已屡见不鲜^[2,3]。

业已证明, 该菌引起的食物中毒可分为腹泻型和呕吐型。前者发病潜伏期约 8—16 小时, 以腹泻、腹痛为主要症状, 类似于 A 型产气荚膜杆菌引起的食物中毒。后者潜伏期约 1—5 小时, 以恶心、呕吐为主。临床症状酷似金黄色葡萄球菌食物中毒^[1,2,3]。

从食物中毒标本中分离到的蜡样芽孢杆菌能产生多种有毒物质, 诸如卵磷脂酶 A 和 C、溶血毒素、蛋白溶解酶、DNA 胞外酶、肠毒素等。近年来, 国外学者对蜡样芽孢杆菌肠毒素作了深入研究, 指出该菌能产生两种不同性质的肠毒素, 即腹泻型和呕吐型肠毒素, 并且肯定了对食物中毒的致病作用。本文扼要介绍国外在这一领域的研究动态, 以供参考。

(一) 腹泻型肠毒素

1. 产毒条件^[4,5]: 此型毒素由腹泻型食物中毒菌株产生。通常用 B-4ac 株(来源于腹泻病人)作为产毒研究的标准株。所用培养基常为脑心浸出液 (BHI)。加入 1% 的葡萄糖有利于产毒。最佳温度为 30—32℃。最佳 pH 值为 7.0—7.5。当 pH < 6.0 或 > 8.5 时, 毒素产生均受抑制。Spira 等^[4]报道, 用控制 pH 值的发酵法所产生的毒素量较未控制者高 10—20 倍。产毒时还需要一定的氧气, 厌氧或高氧环境均影响产毒。产毒时间主要在对数生长期,

至稳定期逐渐减少, 乃至消失。

腹泻型肠毒素菌株大多数能水解淀粉, 而呕吐型菌株则否^[6,13]。

2. 毒素提纯及理化性状: Fluer 等^[7]首先用硫酸铵盐析、生物胶 (biogel) p-150 层析来提纯毒素。所提取的一种组分不具卵磷脂酶及溶血活性, 但静脉注射小鼠和家兔, 则显示致死作用。并证明该组份是一种不耐热蛋白质, 分子量约 57000。当时命名为外肠毒素 (Exo-enterotoxin)。此后, 其他学者对此毒素也开始提纯研究。Spira 等^[8]将以往分离到的菌株, 经 32℃ 振荡培养 5 小时后, 取培养滤液用硫酸铵沉淀及葡聚糖 G-75 层析, 获得了毒素纯品。并证明此毒素与卵磷脂酶和溶血毒素均不相同, 具有抗原性, 用家兔制备的抗血清能中和其生物学活性。Turnbul^[9]等报道提纯的毒素分子量约 50000, 等电点为 4.92。并表明此毒素与不耐热溶血毒素易于区别。但与耐热溶血毒素的分子量及电荷均较接近, 故两者不易区分。

腹泻型肠毒素理化性状不稳定。55℃ 加热 10 分钟, 其活性保留 26%, 60℃ 加热 10 分钟仅存 10%, 而 80℃ 加热 10 分钟, 活性完全消失。置 4℃ 冰箱 30 天失活, 而在 -20℃ 放置 60 天, 仍可保持活性。在 pH 6—9 范围内较稳定。对胰酶、胃蛋白酶均敏感^[2,10]。

3. 生物学活性

(1) 使肠袢液体滞留: 随着对霍乱弧菌和产毒性大肠杆菌肠毒素的广泛研究, 对该腹泻型肠毒素的研究有促进作用。Spira 等^[11]用家兔肠袢试验来检测该肠毒素, 发现被测的 22 株来自腹泻型食物中毒和实验室保存的菌株中,

本文承浙江医科大学微生物学教研室罗海波先生审校, 谨此致谢。

有19株细菌培养滤液能引起家兔液体潴留(FA)。尔后,将提纯的肠毒素注入家兔肠袢中,也出现液体潴留,从而进一步证实此肠毒素的作用^[8]。

品川邦汎^[10]等将50 μg提纯的毒素注入小鼠和家兔肠袢内,即能引起积液。以后还分别利用20、50、120和600 IDU(一个IDU=玻片琼脂沉淀反应能检出的最小毒素量)毒素注入小白鼠肠袢,发现其中50和600 IDU使肠袢积液阳性率分别为66.7%和83.3%,而120 IDU的阳性率反而高达89.5%。当用50 IDU,在6小时后肠管积液最多,时间过长积液量逐渐消失。用600 IDU,2小时后及6小时后阳性率不变。

此外,还观察了肠管的组织病理变化。用50 IDU,2小时后肠管粘膜下组织出现轻度水肿,6小时后粘膜固有层及粘膜下组织高度水肿。用600 IDU,2小时后绒毛上皮明显损坏,粘膜固有层高度坏死,嗜中性粒细胞浸润,粘膜下充血,6小时后绒毛上皮粘膜、固有层均显著坏死。相反,用120 IDU,几乎未发现组织变化,仅见粘膜固有层轻度的嗜中性粒细胞浸润。根据上述结果可以推测,由于过多的毒素能导致粘膜细胞大量坏死,因此,反而减少了细胞分泌作用。

Turnbull^[12]曾用腺苷环化酶活性试验来探讨肠毒素的致病机理。发现不同来源的菌株,毒素作用机理不同,至少可将其分为三类:
a. 使肠袢积液,腺苷环化酶活性升高;
b. 能使肠袢积液,但腺苷环化酶活性不高;
c. 使小肠粘膜上皮细胞破坏,产生严重的组织变性,此称为化脓毒素。第一种机理类似于霍乱弧菌和产毒性大肠杆菌肠毒素,可代表此等毒素的作用机理。至于后两者是否与该菌产毒量不同以致有不同的结果,或有其他致病作用,难以定论。

(2) 血管通透性亢进: 来自腹泻型食物中毒的细菌培养液以及提纯的毒素,注射家兔、小鼠、土拨鼠等动物皮内,能使局部毛细血管通透性增高而出现红斑。曾将此毒素称为血管通透因子(VPF)。由于有此种活性,故可利用红

斑试验来检测毒素。品川邦汎^[13]分别从腹泻型、呕吐型食物中毒及正常食品中分离到9、50和113株蜡样芽孢杆菌,经用1%葡萄糖脑心浸液振荡培养5小时后,取上清液注入家兔皮内。结果9株腹泻型细菌皮肤红斑直径均大于15 mm,判为阳性;来自正常食品的细菌,有53株能水解淀粉,其中也有22株(41.5%)呈阳性;而50株呕吐型细菌及60株来自食品的淀粉水解阴性株,红斑均小于10 mm,判为阴性。同时用抗毒素行琼脂扩散试验,证实两者结果一致。用提纯的毒素0.05 μg注入家兔皮内,即可出现阳性反应^[10]。

(3) 对小鼠致死性: 该菌培养物经静脉注射小鼠能使之死亡。最初认为该小鼠的致死毒素(MLT)即为卵磷脂酶。Johnson等^[14]发现致死毒素与卵磷脂酶的产生条件不同,对胰蛋白酶的敏感性及热抵抗力也有差异,表明两者各不相同。嗣后,一些学者用提纯的肠毒素注射小鼠均可致死,从而证实MLT、VPF和FA均属同一物质。品川邦汎^[10]报道纯化的毒素对小鼠的致死量约12 μg。然而,Kamat等^[15]发现能致小鼠死亡的毒素有两种:一种具有溶血活性,即溶血毒素;而另一种为非溶血性的毒素,其本质是蛋白质,即为肠毒素。

(二) 呕吐型肠毒素

Melling等^[16]将从呕吐型食物中毒患者分离到的菌株接种于米饭(米和水之比1:4)培养基中,经30℃培养18—20小时后,用淀粉酶消化,再取消化液经口饲喂恒河猴。结果在5小时内即出现呕吐,但无腹泻症状。家兔肠袢试验阴性。作者首次提出了该菌所产生的呕吐型毒素性质与腹泻型肠毒素迥然不同。

对呕吐型肠毒素的研究资料较少。已证明此毒素仅在米饭培养液中易产生,而其他培养基不易成功^[16]。这可解释为何呕吐型食物中毒常见于误食污染大米饭的人群。产毒的适宜温度为25—30℃,以稳定期产量最高。产呕吐毒素的菌株有75%属于血清1型。由于血清1型细菌的芽孢对热的抵抗力明显高于其他血清

(下转第40页)

型,表明产毒与芽孢可能有一定的关系^[17]。

呕吐型毒素也已提纯,为一种多肽,分子量小于5000。对理化因素极稳定,经126℃ 90分钟处理,仍能保存2/3活性。在pH 2或pH 11环境中处理2小时,尚保留3/4活性。用胰酶、蛋白酶处理24小时,均不受影响^[2,17,18]。

除猴外,猫也是敏感动物^[2]。此毒素作用机理可能类似金黄色葡萄球菌肠毒素。由于呕吐型食物中毒者有时也伴腹泻症状,且细菌培养液有时也能使血管通透性增加,或使小鼠致死。因此,少数菌株可能同时产生两种毒素。

(三) 肠毒素的检测

由于该菌广泛存在于自然界中,只有达到一定数量时才能引起食物中毒。因此常规的方法即以每克食品标本中检出 10^6 个菌数作为诊断依据^[1]。从食品或病人标本中直接检测毒素,或检查分离菌株的产毒性来协助诊断,具有重要意义。目前已报道检测腹泻型肠毒素的方法有:家兔肠袢试验、血管通透性试验、组织培养、免疫凝胶扩散试验和血凝试验等^[10,13,17,19]。呕吐型毒素的检测可用饲猴和饲猫试验^[17]。上述各种方法的原理及其步骤类似于其他细菌肠

毒素的检测法。但目前尚无一种理想的方法作为常规的实验室诊断。建立一种简便可靠的检测方法作为常规诊断手段,仍待研究解决。

参 考 文 献

- [1] James C. et al: *Bacillus*, in "Medical Microbiology" (Ed. Baron S), Addison-Wesley Publishing Company, California, 1982, p 271—277.
- [2] 植村等: 日本细菌学雑誌, **39**(5):791, 1984.
- [3] Baddour, L. M. et al.: *Infect Control*, **7**(9): 462, 1986.
- [4] Spira, W. M. et al.: *Appl. Environ Microbiol*, **37**: 109, 1979.
- [5] Glatz, B. A. et al.: *Appl. Environ Microbiol*, **32**: 400, 1976.
- [6] Shinagawa, K. et al.: *J. Vet Sci*, **47**(4): 557, 1985.
- [7] Fluor, F. S. et al.: *Biochemia*, **38**: 136, 1973.
- [8] Spira, W. M. et al.: *Can. J. Microbiol*, **21**: 1236, 1975.
- [9] Turnbull P. C. B.: *Pharmac Ther*, **13**: 453, 1981.
- [10] 品川邦汎等: 日本细菌学雑誌, **40**(1):44, 1985.
- [11] Spira, W. M. et al.: *Appl. Microbiol*, **24**: 341, 1972.
- [12] Turnbull, P. C. B.: *J. Clin. Pathol*, **29**: 941, 1976.
- [13] 品川邦汎等: 日本细菌学雑誌, **37**:960, 1982.
- [14] Johuson, C. E. et al.: *J. Bacteriol*, **94**: 306, 1967.
- [15] Kamat, A. S. et al.: *J. Food Saf*, **8**(2): 71, 1987.
- [16] Melling, J. et al.: *J. Clin. Pathol*, **29**: 938, 1976.
- [17] 董树林摘: «国外医学»卫生学分册, **12**(6):339, 1985.
- [18] 司会等: 日本细菌学雑誌, **40**(2):513, 1985.
- [19] Gorina, L. G. et al.: *Appl. Microbiol*, **29**: 201, 1975.