

综述

致病性大肠杆菌及其肠毒素的检测

第一军医大学流行病教研室 俞守义

产毒性大肠杆菌产生的热敏肠毒素(LT)和热稳定肠毒素(ST)所编码的遗传基因已经分子克隆成“基因探针”并开始用于分子流行病学调查[1,2]。本文就致病性大肠杆菌近年来研究的若干进展和它所产生的肠毒素的检测方法以及ST、LT基因遗传探针在分子流行病学调查中的应用等问题作文献回顾。

一、致病性大肠杆菌的分类：从十九世纪开始发现有一类大肠杆菌能引起家畜腹泻，以后逐渐发现也能引起婴儿、成人、旅游者腹泻，并将这类大肠杆菌称谓“致病性大肠杆菌(EPEC)”。Dupont(1971)在侵越美军的腹泻病人中分离到一种大肠杆菌，它与EPEC的标准诊断血清不凝集，有些还产生肠毒素出现类似霍乱样的急性腹泻综合征，称之为“肠毒素性大肠杆菌(ETEC)”；有些能侵袭肠上皮细胞产生痢疾样症状，谓之“侵袭性大肠杆菌(EIEC)”。Goldschmidt(1976)、Rowe(1977)、Toledo(1980)根据发病机理将致病性大肠杆菌分成三类：EPEC、EIEC、ETEC。也有些菌株既能产生肠毒素又具有侵袭力。

二、致病机理[3]：三类大肠杆菌的致病机理不同。ETEC借助纤毛样表面抗原固定于小肠壁上皮细胞进行增殖，产生肠毒素(LT、ST)刺激上皮细胞并与细胞膜上的神经节苷酯(GM₁)受体结合，使细胞内cAMP酶活性升高，引起腺上皮细胞分泌功能亢进，肠腔积液增多，产生霍乱样腹泻；EIEC主要侵袭大肠粘膜引起炎症反应和上皮细胞脱落产生痢疾样腹泻；EPEC的致病机理至今还不清楚。1982年9月，8个国家50名专家参加的，在美国国家卫生研究院举行的EPEC专题讨论上也没有证实EPEC的致病机理是否与产生肠毒素或侵袭性有关。Rothbaum根据他对EPEC的O₁₁₁血清型所作的临床、病理和细菌学研究的结果认为：O₁₁₁是通过它的特异性菌毛粘附并破坏整个小肠上皮细胞的细胞糖萼和微绒毛、刷状缘和细胞内受损伤，导致肠上皮细胞功能紊乱、粘膜萎缩产生严重腹泻。

三、肠毒素的种类及若干分子遗传学特性[2,4]。

致病性大肠杆菌的某些细菌在生长过程中释放出来的外毒素为大肠杆菌肠毒素。主要有四种：①热稳定肠毒素(ST)分子量较小(约5000~10000道尔顿)，能透析、分离方便；对热稳定，100°C 20分钟不受破坏；无抗原性。主要是刺激鸟苷酸环化酶，降低肠粘膜细胞的吸收，作用迅速而短暂，即时可使家兔肠内容物积蓄，4~6小时达高峰，毒素清除后作用随之消失，肠功能恢复正常。②热敏感肠毒素(LT)分子量较大(约80000道尔顿)，不能透析、分离也困难，有抗原性。65°C 30分钟或100°C 20分钟即被破坏。酸、胃蛋白酶、胰蛋白酶、淀粉酶都能使其失活。主要作用是刺激腺苷酸环化酶使肠腺分泌增加，作用缓慢而持久，3小时后肠腔体液开始积蓄，7~12小时达高峰，至少可持续18小时。③Vero细胞毒素(VT)，此系Konowalchuk(1977)从某些大肠杆菌培养物滤液中分离得到的。它与LT、ST不同，因对非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)有毒性作用而命名。对Y-1和CHO细胞无毒性。不耐热，98°C 15分钟即被破坏。有抗原性，但其作用与LT有明显区别。④血管渗透因子，Evans等(1973)报道它能引起家兔皮肤血管渗透性升高，其有肠毒素作用。与霍乱毒素也有相关抗原，不耐热，56°C 30分钟即被破坏。也不耐酸。有抗原性。致病性大肠杆菌产生的肠毒素虽然主要有这四种，但近来许多资料表明从人和动物急性腹泻患者中分离的细菌主要以LT为主。Echeverria(1977)在美国从非特异性腹泻儿童中分离到的ETEC占83%。大肠杆菌引起致病还必须依赖定居因子对宿主肠壁细胞产生粘附力，它相当于K抗原的一种菌体纤毛。现在已知道的至少有K₈₈、K₈₉、987P、CFA I/II等，前三者与牛、羊、猪发病有关，后二者与人腹泻有关。EIEC的侵袭力决定因子可能与140Md大质粒有关，它的基因产物是与细菌侵袭力有关的一种细菌外膜蛋白。ETEC一般产生LT/ST，LT与霍乱CT有部分同源性，与空肠弯曲菌也有部分相似，但ST与CT无同源性。LT和ST都受ENT质粒控制，但在免疫学和理化性质上各有区别。ETEC多数产生LT，少数有

ST, 也有两者兼之。有的ENt质粒还带有抗药基因, 通过结合转移作用在细菌间相互传递从而增加了对环境的适应性并给流行病学预防工作造成了新的困难。ENt质粒是隐蔽性大质粒, 分子量60~90Md, 无遗传标志, 拷贝数也很少。除组织培养法和动物试验法以外尚没有简易的检测方法。制备相应基因探针是新发展起来的一个有效方法。目前应用重组DNA技术对LT的研究较深入, 证明它有A、B二个亚基组成, 都位于1.8Kb的DNA片段内, 该片段分子量1.2Md, 足于编码600个氨基酸的LT蛋白。这二个亚基作为一个单位转录成mRNA, 启动子位于A亚基的氨基端, 该处有一18个氨基酸组成的信号肽序列, 其翻译产物通过细胞膜分泌到胞外, 再由二个亚基蛋白聚合成完整的LT毒素。对ST了解不太多, 它的基因是易位子, 与LT构成高频易位子结构, 在N端有信号肽, 所以也能分泌到培养液中。用生物学方法测定发现ST有二种: ST-I可使乳鼠体液积聚; ST-II只对断乳仔猪及家兔结扎的回肠有作用。对它的生物合成和调控机理也了解不多。

四、肠毒素的检测方法及评价[5]: 自七十年代以来测定肠毒素的方法很多, 也出现一些混乱, 许多学者已发出呼吁在八十年代应该解决这些问题。本文重点介绍LT基因遗传探针检测法, 其余方法见附表。

五、ETEC肠毒素基因遗传探针在分子流行病学调查中的应用[6,7]: ETEC肠毒素基因遗传探针现有LT、ST-I、ST-II三种, 国内已制成LT。它是利用编码LT/ST DNA的酶切片段进行分子克隆, 经核素标记而成。Smith(1971)首先证实了ETEC中有携带ST、LT遗传信息的质粒。Dallas(1979), SO(1980)分离到LT和ST二种结构基因并制成遗传探针应用于临床标本的分离鉴定。Moseley(1980、1982)制成了第二种ST探针。他们首先提取相应的质粒DNA, 经酚抽提乙醇沉淀、酶切、体外³²P标记、缺口翻译而获得LT(EW299)、ST-I、ST-II三种探针。Moseley等从农村、城市的粪便、水样中取来含有CTEC的标本, 再人为加入其它细菌以检测本法的敏感性和特异性, 用LT+ST+E coli、LT-ST+E coli、LT-ST-E coli作对照与标准的测毒方法——Y-1细胞法(测LT)、乳鼠试验(测ST)作比较, 证实有很好的特异性和敏感性。目前在分子流行病学调查中应用较普遍。Peter(1982), Seriwatana(1983)用三种基因探针在孟加拉、泰国等地对当地儿童、成人腹泻作分子

试验方法	ST	LT	评价
兔肠袢结扎试验			已被广泛使用。但操作繁琐, 敏感性与兔皮肤试验相同。
6小时	+	±	
18小时	-	+	
乳兔肠腔试验	+	+	应用较少。主要测ST。
大白鼠空肠灌注法	+	+	操作繁琐, 仅适用于有条件的实验室。
兔皮肤试验	-	+	较敏感, 易操作
乳鼠灌胃试验	+	-	易操作, 是测ST的标准方法, 但耗鼠量大, 一次不能测太多标本, 也不能对全部ST作测定
Y-1细胞法	-	+	敏感性高, 能测出微量LT(0.2μg/ml), 一次可测大量标本, 是测LT的准标方法, 已被普遍使用。但需要专门的组织培养技术, 细胞保存较困难。
CHO细胞法	-	+	很敏感。已被普遍使用, 细胞保存也较方便。
Vero细胞法	-	+	细胞易保存, 但对LT不太敏感。
被动免疫溶血试验(RPIH)	-	+	敏感性比Y-1细胞法略差, 需纯化的LT抗体, 目前, 应用还不广泛。
固相放射免疫法(SPRIA)	-	+	敏感性高, 能检出ng/ml毒素, 可标准化, 自动化。但需要特殊设备。
酶联免疫吸附试验(ELISA)	-	+	敏感性高, 是测定LT很有前途的方法。
微量神经节苷酯ELISA	-	+	比Y-1细胞法敏感性稍差, 但二者有很好相关性。结果易判断且比较客观, 但需GMI。
改良Elek试验	-	+	操作简便, 重复性较好, 适于临床应用。与CHO、PIH结果一致。但需要高纯度的LT抗血清。

流行病学调查, 发现泰国农民中LT-ST+E. Coli菌株只与ST-H(人源)基因探针同源不与ST-P(猪源)同源, 而首都曼谷分离的菌株与ST-H或ST-P或二者都同源。Moseley(1980)还研究了大肠杆菌的LT和ST基因与肠道其它革兰氏阴性细菌如耶氏菌、气单胞菌(G. Aeromonas)、沙门氏菌中编码肠毒素基因之间的相互关系。我们今年用北京军事医学科学院基础所研制的LT基因遗传探针对广州地区致儿童腹泻的大肠杆菌作了初步的分子流行病学调查, 证实基因遗传探针确是一种流行病学调查的有用工具。

致病性大肠杆菌已引起各国学者的广泛兴趣, 对其毒素的研究进展很快。尤其是应用分子生物学和遗

传工程技术已证实肠毒素是受质粒控制的,而且对决定菌毛表面抗原的定居因子及产生肠毒素的基因都克隆成功,为发展人工活菌苗预防腹泻开辟了崭新的途径。基因遗传探针的应用也在逐渐推广。并已证实是分子流行病学调查的有用工具。

参 考 文 献

1. Moseley SL et al: J Infect Dis, 146 (6) : 863, 1982

2. Ruiz-Palacios GM, Lacent, II (8344) : 250, 1983
3. Edelman R et al: J Infect Dis, 147 (6) : 1108, 1983
4. Mills SD et al: Infect Dis, 43 (2) : 739, 1984
5. 鲍行豪等: 细菌毒素研究进展, 第一版, 第96~116页, 人卫, 1983
6. Seriwatana J et al: Infect Immun, 42 (1) : 152, 1983
7. Lee CH et al: Ibid, 42 (1) : 244, 1983

(本文承于光烈教授指导,陈锦光同志协助,黄翠芬同志审稿,特表致谢)

(接358页)

三、BALB/C小鼠免疫:用登革病毒3型以脾内注射法进行免疫,注射后第四天取脾制备脾细胞,供细胞融合用。

四、细胞融合: NS-1小鼠骨髓瘤细胞比免疫小鼠脾细胞=1:10,在50%PEG1000的作用下进行融合,待融合细胞长成较大细胞集落时,用间接免疫荧光法检测培养液中的抗体,阳性的凹孔用有限稀释法传代克隆化。

五、单克隆抗体制备: BALB/C小鼠腹腔注射0.5ml Pristane,一周后腹腔注射10⁶杂交瘤细胞。约2周可产生腹水,收集腹水离心后上清液为所得高滴度单克隆抗体。

六、抗体检测: 将登革病毒3型(包括交叉滴定用的其它病毒)感染的鼠脑组织冷冻切片和感染的C6/36细胞分别滴加在载玻片的凹孔中,用丙酮固定后-20°C保存。试验时往凹孔中滴加不同稀释度的单克隆抗体(腹水上清液)置37°C30分钟然后PBS洗3次,再加荧光素标记的兔抗鼠IgG,置37°C30分钟, PBS洗3次,荧光镜检。以凹孔出现阳性荧光的腹水抗体最高稀释度的倒数为抗体滴度。

七、杂交瘤细胞染色体检查: 传代后24小时收集杂交瘤细胞悬液3ml,加秋水仙素2μg/ml 2滴,置37°C 6~8小时,离心弃上清,加0.56% KCl置室温15分钟,离心弃上清加固定液(甲醇:冰乙酸=3:1),10分钟再用固定液洗2次,制片,姬姆萨染色镜检。

八、结果:

1. 用NS-1小鼠骨髓瘤细胞与用登革病毒3型脾

内注射免疫后4天的BALB/C小鼠的脾细胞进行融合:共接种了24个培养凹孔,有20个凹孔产生了融合细胞生长的集落,融合率为80%,其中9凹孔产生了抗登革病毒3型抗体,阳性率为45%,经有限稀释传代后有4株丧失了分泌抗登革病毒抗体的能力。其余5株从融合至四个月余仍能分泌抗登革病毒3型抗体。将这5株杂交瘤细胞腹腔注射BALB/C鼠则可诱发腹水,其上清为抗体。用间接免疫荧光检测抗登革病毒3型抗体,其滴度为1:1600~1:3200。

2. 五株杂交瘤细胞诱发的抗登革病毒3型腹水抗体的滴定及交叉滴定结果:从病毒感染的鼠脑组织冷冻切片加在镀膜玻片的凹孔中作为抗原载体,用间接免疫荧光法对小鼠腹水抗体进行滴定及交叉滴定。试验结果表明,诱发腹水的杂交瘤细胞,C₇、A₁₁、B₆、1F₆、2F₆分泌的3型登革病毒的单克隆抗体具有型特异性。与登革病毒3型的滴度分别为1:3200、1:3200、1:1600、1:1600、1:1600,而与奇孔根雅病毒及乙脑病毒均无交叉反应,唯独1F₆与登革病毒2型有1:400的型间交叉。

同时做了以病毒感染的C6/36细胞为抗原、用间接免疫荧光法对腹水抗体进行滴定及交叉滴定,结果同上。

3. 杂交瘤细胞的染色体检查:小鼠骨髓瘤NS-1细胞的染色体为65个,小鼠脾细胞染色体为40个,杂交瘤细胞为78~82个,平均为80个。可见所建立的细胞系为杂交的细胞系。