

小肠结肠炎耶氏菌毒力株血清学鉴定的进一步评价

福建省地方病防治研究所

陈贻镨

于恩庶

李功惠

翁士珍

我们已经报道用0:3和0:9血清型小肠结肠炎耶氏菌毒力株免疫家兔能够获得毒力因子血清,将此血清进行玻片凝集试验,结果与VW抗原检测和毒力质粒的检出一致,可以简易而又敏感特异地检测小肠结肠炎耶氏菌菌株的毒力^[1]。本文通过各地大量菌株的分析,明确毒力表型与质粒的关系,从而对小肠结肠炎耶氏菌毒力因子血清的应用价值进一步评价。

材料与方法

一、试验菌株:为国内一些省市新近从人、猪、鼠、鸡、鸭、鹅和牛等粪便以及水中分离,保存于4℃。

二、毒力因子血清特异凝集试验:参照前文的方法进行^[1]。

三、VW抗原的检测:参照于恩庶等的方法进行^[2]。

四、质粒DNA检测:参照Kado等的方法进行^[3]。

五、对动物致病性:采取小白鼠口服感染试验,观察细菌在肠道定居排菌情况,以判断毒力。具体方法是将试验菌接种于普通营养琼脂平板,23℃过夜培养后,刮下菌苔,用生理盐水配成每毫升10亿菌数,经口灌入健康小白鼠食道内,每个菌株接种5只,每只0.5毫升。于感染后一周,采新鲜大便涂布SS平板,23℃培养48小时,观察生长的菌落。以分离到原感染菌者判为菌株有毒力。

结果

一、各地不同血清型的小肠结肠炎耶氏菌

菌株检测结果:来自全国各地分离的小肠结肠炎耶氏菌共430株,分属不同的血清型。122个0:3和0:9血清型的菌株测出VW抗原者分别为51/107和11/15。这些VW抗原阳性株用毒力因子血清测定亦为阳性,效价达1:128~1:512,同时也都测到一条分子量约为 45×10^6 道尔顿的质粒带。VW抗原阴性株,其毒力因子血清凝集试验均阴性,也未检见质粒。

308个其他血清型的菌株,皆未测出VW抗原,毒力因子血清凝集试验亦阴性。但有22株用Kado法检测出不同分子量的1~2条质粒带。其中0:4,32一株,0:5,27四株,0:7一株,0:7,8二株和0:12,26一株以及未定型二株,检出与毒力质粒分子量大小相当的质粒,即在 $40 \sim 48 \times 10^6$ 道尔顿之间(表1)。

二、对动物的致病性:表1可见,有11个菌株(0:4,32型1株,0:5,27型4株,0:7型1株,0:7,8型2株,0:12,26型1株,未定型2株),未检出VW抗原,毒力因子血清凝集试验阴性,但测出与耶氏菌毒力质粒大小相左的质粒,这些菌株的致病性如何?需要研究。用这11株耶氏菌进行小白鼠口服感染试验,并与已知毒力株和无毒力株进行比较。结果这11株不含VW抗原而有耶氏菌“毒力质粒”的菌株均不能从口服感染的小白鼠粪便中直接分离出耶氏菌,与0:3和0:9型无毒力的衍生株一样(表2)。

三、含质粒的0:5,27和0:7,8血清型菌株“毒力因子血清”的制备:按照小肠结肠炎耶氏菌毒力因子血清制备方法^[1]制备J63和J110“毒力因子血清”。结果与耶氏菌毒力株

表 1 各地不同血清型菌株检测结果

血清型	菌株数	VW抗原阳性数	毒力因子血清凝集试验		质粒DNA	
			阳性数	效价(1:)	阳性数	分子量($\times 10^6$ 道尔顿)
0:3	107	51	51	256~512	51	45
0:4,32	24	—	—	—	1	45
0:4,33	2	—	—	—	—	—
0:5	9	—	—	—	—	—
0:5,27	49	—	—	—	4	1.5,41~45
0:6,30	41	—	—	—	—	—
0:6,31	23	—	—	—	—	—
0:7	13	—	—	—	1	28
0:7,8	30	—	—	—	1	45
0:7,19	1	—	—	—	2	61
0:9	15	11	11	128~512	2	48
0:10	11	—	—	—	—	—
0:11	1	—	—	—	11	45
0:12,26	7	—	—	—	—	—
0:16	15	—	—	—	—	—
0:16,29	5	—	—	—	1	—
0:18	1	—	—	—	4	56~77
0:19	1	—	—	—	—	0.9
0:21	1	—	—	—	—	—
0:28	1	—	—	—	—	—
0:36	2	—	—	—	—	—
0:46	8	—	—	—	2	41~45,63
未定	63	—	—	—	2	63
合计	430	62	62	—	84	—

表 3 小肠结肠炎耶氏菌“毒力因子血清”效价测定

免疫菌			血清凝集效价				
菌株	血清型	质粒分子量($\times 10^6$)	吸收前				
			本菌	J63	J110	P6 ⁺	Y15 ⁺
J63	0:5,27	45	1:320	—	—	—	—
J110	0:7,8	61	1:160	—	—	—	—
P6 ⁺	0:3	45	1:20480	—	—	1:5120	1:5120

讨 论

小肠结肠炎耶氏菌菌株的毒力与分子量为 $40\sim 48 \times 10^6$ 道尔顿质粒DNA有关,此质粒编码VW抗原[4]、自凝因子[5]和特异外膜多肽的合成[6],37℃培养时对钙离子的需要[7]以及对动物的致病性等[8],一旦质粒脱失或插入某一DNA片断,则丧失毒力。毒力质粒

表 2 小肠结肠炎耶氏菌小白鼠毒力试验

菌株	血清型	质粒分子量($\times 10^6$ 道尔顿)	VW抗原	毒力因子血清凝集试验	大便培养阳性数
J432	0:4,32	45	—	—	—
J63	0:5,27	45	—	—	—
J65	0:5,27	45	—	—	—
J100	0:5,27	1.5,45	—	—	—
N16	0:5,27	41	—	—	—
N1	0:7	45	—	—	—
Y3	0:7,8	1.0,48	—	—	—
Y39	0:7,8	48	—	—	—
W32	0:12,26	45	—	—	—
W44	未定	41,63	—	—	—
W45	未定	45	—	—	—
P6 ⁺	0:3	45	+	+	5
S77 ⁺	0:3	45	+	+	4
Y15 ⁺	0:9	45	+	+	4
H1 ⁺	0:9	45	+	+	5
P6 ⁻	0:3	—	—	—	—
J62	0:5,27	—	—	—	—
J108	0:7,8	—	—	—	—
Y15 ⁻	0:9	—	—	—	—

注:每菌接种5只健康小白鼠

免疫效果不同,用本型无质粒株吸收后,与VW抗原阳性株P6⁺和Y15⁺及本菌的37℃培养物不出现凝集现象(表3)。

与这些毒力表型是一致的。因此,判定小肠结肠炎耶氏菌菌株的毒力,既可采用测定其表型方法,如草酸镁琼脂平板上测定VW抗原、在组织培养液中自家凝集现象、毒力因子血清的凝集反应和动物试验等,也可采用测定其遗传物质——质粒DNA的方法。目前质粒测定法一般以琼脂糖电泳法检测菌株携带的质粒及其分子量,从而判定菌株的毒力。我们检测0:3和

0:9血清型的菌株时,结果确是如此,质粒与毒力的这些表型是一致的。但检测其他血清型菌株时,两者不完全一致,0:4,32、0:5,27、0:7,8和0:12,26等血清型的一些菌株也存在 $40\sim 48\times 10^6$ 道尔顿的质粒,但他们VW抗原阴性、毒力因子血清凝集试验阴性、免疫家兔也没有获得特异的毒力因子血清,而且口服感染不能引起小白鼠排菌,显然这些菌株是无毒力的。这些菌株尽管携带的质粒大小与耶氏菌毒力质粒相当,看来基因结构有差异。因此仅以测出 $40\sim 48\times 10^6$ 道尔顿质粒来判定小肠结肠炎耶氏菌菌株的毒力是不全面的。

质粒是细菌染色体外遗传物质,耶氏菌属毒力质粒不稳定,易脱失或插入一DNA片断。Portnoy等(1981)报道,在草酸镁琼脂平板上获得的鼠疫耶氏菌钙不依赖株,有的失去此毒力质粒,有的在此质粒上插入一2.2Kb的DNA序列^[9]。国外报道某些0:4,32和0:5,27等血清型菌株有毒力^[10],我们检测的0:4,32、0:5,27和0:7,8等血清型菌株有的含 $40\sim 48\times 10^6$ 道尔顿的质粒,可能就是由于插入了一个DNA小片断,而引起毒力的丧失。因此测定菌株的毒力,以测定其表型更为客观。毒力因子血清是小肠结肠炎耶氏菌毒力株特异外膜蛋白的免疫抗体,用毒力因子血清凝集试验方法对430株耶氏菌进行毒力测定,结果与VW抗原的测定及动物致病性试验一致。这次检测的菌株来自国内一些省市,用本省地方株免疫家兔获得的毒力因子血清适用于各地待检菌株,说明该血清有很大实用价值。毒力因子血清完全可以作为小肠结肠炎耶氏菌菌株毒力测定的可靠而又方便的方法。

摘 要

用小肠结肠炎耶氏菌毒力因子血清对我国一些省市不同血清型的耶氏菌430株进行毒力测定,结果与VW抗原和动物致病性试验一致,进一步证实该因子

血清凝集试验是测定小肠结肠炎耶氏菌毒力可靠而又方便的一种方法。同时发现,一些血清型的菌株携带有 $40\sim 48\times 10^6$ 道尔顿的质粒,与耶氏菌毒力质粒分子量相当,但不具毒力。

Further Evaluation on Serological Assay for Virulent Strains of *Yersinia enterocolitica*
Chen Yikai, et al., Fujian Institute of Endemic Diseases, Fuzhou

The results which 430 different serotype strains of *Y. enterocolitica* isolated from some areas were checked by using the antiserum against virulence factors were identical to the detection of VW-antigens and the animal experiments. And it further confirms that the slide agglutination test by using the antiserum is the reliable and convenient method in detecting virulence in *Y. enterocolitica*. At the same time, we found that some strains of *Y. enterocolitica* contained the 40-48 Md plasmid are avirulent.

参 考 文 献

1. 陈贻错,等. 小肠结肠炎耶氏菌毒力株的血清学鉴定, 中华微生物学和免疫学杂志 1986, 6:160
2. 于恩庶,张宝英. 耶氏菌属的毒力决定体, 中华微生物学和免疫学杂志 1983, 3:190.
3. kado CI, et al. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol 1981; 145:1365.
4. Carter PB, et al. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1980; 28:638.
5. Skurnik M, et al. Virulence plasmid-associated autoagglutination in *Yersinia* spp. J Bacteriol 1984; 158:1033.
6. Chang MT, et al. Identification of specific outer membrane polypeptides associated with virulent *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1984; 43:472.
7. Gemski P, et al. Plasmid associated with pathogenicity and calcium dependency of *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1980; 27:682.
8. Zink DL, et al. Plasmid mediated tissue invasiveness in *Yersinia enterocolitica* Nature(London) 1980; 283:224.
9. Portnoy DA, et al. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. J Bacteriol 1981; 148:877.
10. Doyle MP, et al. Serological relatedness of mouse-virulent *Yersinia enterocolitica*. Infect Immun 1982; 37:1234.