

国内产肠毒素大肠杆菌的发现和所进行的 调查研究

林成水 曾昭鸿 曾凝梅 郭维植

摘要 作者于1974年在国内首先从霍乱样腹泻病人中检出产肠毒素大肠杆菌(ETEC)。霍乱样腹泻病人ETEC检出率高达36.48%，急性腹泻病人检出率为20.18%，外环境和海产品检出率为19.74%。产不耐热肠毒素(LT)菌株以37~42℃培养4天产毒量最多；兔肠结扎时，注入兔肠段的培养液或无菌肠毒素液，在肠段中作用24小时积液量最多，且每次试验都出现阳性反应。用5cm或10cm兔肠结扎段检测LT，其结果相似；每5cm肠段注入培养菌液或无菌肠毒素液，以1.00~3.00ml效果较好。pH<4.0或温度>50℃时，对LT有明显破坏作用。

关键词 产肠毒素大肠杆菌 霍乱样腹泻 影响因素

The Detection and Study on Enterotoxigenic Escherichia coli in China Lin Cheng-shui, Zeng Zhao-hong, Zeng Ning-mei, et al. Fujian Provincial Hygiene & Epidemic Prevention Station, Fuzhou 350001

Abstract In this paper, some strains of ETEC were first detected from the stools of the patients with cholerae-like diarrhea in China in 1974. With a detected rate 36.48% of ETEC Detected rates were 20.18% from patients with acute diarrhea, 19.74% from environment and sea foods. ETEC produced most of LT toxin in culture medium when they were incubated at 37-42℃ for 4 days. When Rabbit ileal loop test (RILT) was performed with the culture of ETEC or with germ-free culture supernatant, a large quantity of intestinal fluid in response to LT was accumulated at 24 hour and showed positive reaction at every test. Similar results were gained by using 5cm or 10cm ileal loop of RILT for LT detectoing. Better effects were noticed through injection of 1.0-3.0ml culture of ETEC or germ-free enterotoxin in per 5cm ileal loop. LT could be destroyed by heating at >50℃ or pH<4.0.

Key words Enterotoxigenic Escherichia coli cholerae-like diarrhea Effect factor

我省于1962年传入埃尔托霍乱，1964年疫情消失，但往后每年均报告一批霍乱样腹泻病人，经反复多次粪便培养，均未检出霍乱弧菌和其他常见肠道致病菌，而对这些病例均按霍乱处理，花费大量人力、物力。为了探索霍乱样腹泻病人的致病菌，我们自1974年开始对我省各级医院收治的霍乱样腹泻病人，进行了产肠毒素大肠杆菌(ETEC)的研究。现将结果报告如下。

材料与方法

一、菌株来源：从我省各级医院收治霍乱样腹泻病人和急性腹泻患者分离的ETEC菌株。

二、肠毒素检测：不耐热肠毒素(LT)按常规免肠结扎法检测^[1]；耐热肠毒素(ST)采用乳鼠注胃法检测。

三、肠毒素液制备：试验菌株接种于pH7.6的3.00%胰胨水中，37℃孵育4天，其培养液用5000r/min离心30分钟，上清液过

滤除菌后，加入1/万硫柳汞，接种普通琼脂平板，证实无细菌生长时，即为粗制肠毒素液。

四、活菌悬液制备：ETEC 菌株接种牛肉汤8小时，转种于普通琼脂平板，刮下光滑菌落于生理盐水中，制成每毫升含1亿个活菌的悬液。

结 果

一、我国产肠毒素大肠杆菌的发现：1974年6月我省罗源县医院收治1例按疑似霍乱患者报告的霍乱样腹泻病人。我们赴现场调查和粪便培养，结果未能检出霍乱弧菌，但琼脂平板上生长的菌落均为大肠杆菌。该菌株经多次免肠结扎试验均为阳性，实验证实为ETEC，是在我国首先发现和报告的病例^[1~3]，并于1980年获卫生部科技成果乙级奖。

二、霍乱样腹泻的病原学研究：自发现首例由ETEC引起霍乱样腹泻病人后，即有计划地先后对我省各级医院收治的477例霍乱样腹泻病人进行病原菌的研究，其中有250例患者检出13种病原菌，病例检出率为52.41%，检出病原菌292株，菌株检出率为61.22%，其中ETEC为主要病原菌，检出率为36.48%，其次为副溶血性弧菌、非O1群霍乱弧菌、志贺菌（检出率分别为7.76%、3.35%、3.35%）等。

三、急性腹泻患者ETEC的研究：在我省选择具有代表性的5个县，开展2年急性腹泻患者的ETEC研究。每月定期采集粪便标本分离病原菌，共采集腹泻患者标本4 512份，2 031份检出病原菌，检出率为50.24%，其中674份检出ETEC，检出率为20.18%。

四、外环境ETEC的调查：在龙海和福鼎县的外环境和海产品采样314份，62份检出ETEC，检出率为19.74%，其中水源和泥土检测235份，52份检出ETEC，检出率为22.10%；海产品检测79份，10份检出ETEC，检出率为12.66%。

五、影响ETEC产生LT的因素研究：

1. 培养时间对产生LT的影响：用5株ETEC进行13次不同时间实验培养，观察对产生LT的影响。结果培养1天者，每厘米免肠段平均积液量为1.10ml，2天者为1.94ml，3天者为2.40ml，4天者为2.80ml。证明随着培养时间的延长，其产生LT量也在增加($P < 0.01$)。培养4天者，不仅免肠积液量多，而且每次试验都呈阳性反应。

2. 不同培养温度对产生LT的影响：试验菌株接种于3.00%胰胨水中，在17℃培养4天，其培养液能使每厘米免肠段平均积液0.75ml，27℃为1.55ml，37℃为1.71ml，40℃为2.03ml，42℃为1.96ml。实验结果表明，在17℃培养时，产生LT的量明显少于27~42℃($P < 0.05$)。以37~42℃培养较适宜。

3. 不同酸碱度培养液对产生LT的影响：实验证明，pH4.0的3.00%胰胨水培养液，能使每厘米免肠段积液量为0.12ml；pH5.0~9.0培养液，积液量为2.08~2.28，见表1。说明ETEC菌株在pH4.0胰胨水中培养，产生LT量明显低于pH5.0~9.0的培养液($P < 0.01$)。

表1 不同pH对产生肠毒素的影响

菌株号	试验 次数	pH及其积液量 (ml/cm)					
		4.0	5.0	6.0	7.0	8.0	9.0
7915	1	0.60	3.10	3.00	3.00	3.10	3.40
7922	1	0.00	1.20	1.40	1.50	1.50	1.60
	2	0.30	1.60	1.60	1.50	1.60	1.50
7926	1	0.00	3.00	3.10	3.10	3.10	3.20
	2	0.20	1.50	1.60	1.60	2.00	1.70
平均		0.12	2.08	2.14	2.14	2.28	2.28

六、免肠结扎法测定LT的影响因素研究：

1. 试验液在免肠段作用时间对肠积液的影响：用不同菌株的培养液、活菌悬液和肠毒素液分别注入免肠段中，以不同时间观察免肠积液量。培养液注入免肠后3小时，平均每厘米肠段积液量为0.65ml，6小时为

1.38ml, 12小时为2.11ml, 24小时为3.03ml。说明培养液注入兔肠后6小时, 大部分菌株可呈阳性反应。但随着时间之延长, 肠积液量逐渐增加, 以24小时的积液量为最高, 所有菌株均呈强阳性结果 ($P<0.01$)。活菌悬液注入兔肠段后3小时, 平均每厘米肠段积液量为0.13ml, 6小时为0.32ml, 12小时为0.53ml, 24小时达2.75ml, 见表2。明显高于3~12小时的积液量, 肠毒素液注入兔肠后, 随着时间之延长, 积液量增加。注入3小时为0.51ml, 6小时为1.11ml, 12小时为1.82ml, 24小时为2.23ml。

表2 活菌悬液作用时间对肠积液的影响

菌株号	试验 次数	作用时间(小时)			
		3	6	12	24
7922	1	0.00	0.46	0.64	2.66
	2	0.00	0.32	0.48	3.08
7926	1	0.20	0.54	0.62	1.80
7927	1	0.20	0.28	0.20	2.26
7930	1	0.22	0.26	0.40	3.00
7931	1	0.18	0.08	0.86	3.70
平均		0.13	0.32	0.53	2.75

2. 注入量对兔肠积液的影响: 实验结果每5厘米肠段注入培养液0.10ml者, 平均每厘米肠段积液量为1.49ml; 注入0.30ml者, 平均积液为1.71ml; 注入0.50和1.00ml者平均积液为2.14和2.73ml; 注入1.50~3.00ml者, 其积液为3.05~3.25ml。随着注入量的增加, 积液量也增多 ($P<0.05$)。

3. 酸碱度对LT的影响: 观察不同pH对ETEC菌株产生LT的影响: 结果LT对pH2.0~3.0很敏感, 其活性几乎全部被破坏, 对pH4.0部分破坏, 对pH5.0~11.0范围内不受影响, 但对pH12.0有较大影响。

4. 温度对LT的影响: 用不同温度加热20分钟, 观察对LT的耐热试验。加热45℃时, 对LT活性有不同程度的破坏, 平均每厘米肠段积液1.88ml, 比未加热LT的积液2.74ml有明显减少。加热50℃时, LT活性破

坏更多; 加热55~60℃时, LT活性几乎全部破坏; 加热60℃以上时, 全部破坏。

5. 兔肠结扎段的长度对积液量的影响: 7株ETEC试验11次。用培养液1.00ml注入5cm兔肠段; 2.00ml注入10cm兔肠段。结果5cm肠段中平均每厘米积液2.20ml; 10cm肠段平均积液2.01ml。两者无差异。说明5cm结扎段可替代10cm结扎段, 节省家兔的用量。

讨 论

Sack等^[4](1971)在印度加尔各答霍乱流行期间, 从传染病医院腹泻患者中发现17例未检出霍乱弧菌, 但分离到大肠杆菌者, 将其培养上清液注入兔肠段中, 结果能产生液体积聚, 证实为产肠毒素性大肠杆菌。随后国外许多学者也进行了调查研究。我国于1974年进行ETEC研究, 并取得一些成果^[1~3]。

ETEC是引起急性腹泻病的主要病原菌, 霍乱样腹泻患者的检出率很高。我省477例霍乱样腹泻患者ETEC检出率为36.48%, 与Shore^[5]等报告旅行者腹泻有36.00%是由ETEC引起的相似。调查结果也表明, 急性腹泻患者ETEC检出率为20.18%。说明ETEC是我省急性腹泻病的主要病原菌; 同时外环境ETEC检出率为19.74%, 说明外环境和海产品污染严重, 在卫生设施不够完善的情况下, 人们容易感染发病, 应引起有关部门重视。

ETEC菌株产生LT时, 受许多因素的影响, 如培养时间、培养温度、培养基pH和营养成分等。

兔肠结扎法检测ETEC, 是目前世界上公认最好的方法, 敏感性和特异性高, 易重复试验, 能同时测定多种细菌肠毒素。为此, 我们对兔肠结扎法测定LT的影响因素进行了多项研究, 研究结果对今后用兔肠结扎检测肠毒素将有较好的实用价值。

参 考 文 献

- 1 林成水, 曾昭鸿, 郑国槐, 等. 大肠杆菌肠毒素引起严

- 重腹泻的研究. 流行病学杂志, 1980, 1:105.
- 2 林成水, 曾昭鸿, 郑国槐, 等. 大肠杆菌肠毒素引起严重腹泻的报告. 中华预防医学杂志, 1981, 15:101.
- 3 林成水, 曾昭鸿, 郑国槐, 等. 严重腹泻病人优势菌的肠毒素研究. 微生物学通报, 1982, 9:76.
- 4 Sack RB, Gorbach SL, Banwell JG, et al. Enterotoxigenic Escherichia coli isolated from patients with severe

- cholera-like Disease. J Infect Dis, 1971, 123:378.
- 5 Shore EG, Dean AG, Holik KJ, et al. Enterotoxin-producing Escherichia coli and Diarrheal Disease in Adult Travelers: A prospective study. J Infect Dis, 1974, 129:577.

(收稿: 1996-06-05 修回: 1996-06-25)

西安地区戊型肝炎及其与其他型病毒性肝炎重叠感染的调查

李光玉¹ 任君萍² 周永兴¹ 张文彬¹ 陈朝霞¹

为了调查西安地区戊型肝炎(HE)及其重叠感染情况, 给临床诊治提供参考, 我们对259例病毒性肝炎患者作了血清病毒学标志检测。

1. 在受检的259例患者标本中, 抗-HEV IgM阳性者共25例, 其中男20例, 女5例, 年龄21~57岁, 平均38.10岁, 以40~50岁年龄组最多(11例)。单一HEV感染者3例, 占12.00%; 双重病毒感染者16例, 占64.00%; 三重病毒感染者6例, 占24.00%。

2. 25例HEV感染者的重叠感染情况及与临床的关系: 单纯HE 3例; 二重感染分HE与HA、HE与HB、HE与HC 3种, 分别为3、12、1例; HE并HA、HB, HE并HB、HC三重感染均为3例, 以HE并HB最多。从肝炎的临床情况看, HE并HB可在肝炎的各个阶段均可并发, 甚至在乙型肝炎肝硬变仍有3例并发。

3. 急性HE患者主要临床症状体征出现率: 急

性HE中, 巩膜、尿及皮肤黄染发生率较高, 分别为85.71%、85.71%及78.57%; 此外, 乏力、食欲不振、恶心和肝区痛症状出现率也较高, 均在70.00%以上。

4. HE经肠道传播, 是一种自限性疾病。我们从259例患者中检出HE 25例, 占9.65%, 证实了西安地区散发性存在单一HE, 也存在HE与其他型病毒性肝炎重叠感染。重叠感染多可能是疾病加重及慢性化重要原因。

5. 单一HE 3例, HE与HA二重感染3例, 均为急性肝炎, 其中黄疸型肝炎占83.33%(5/6)。HE可发生于慢性肝炎、重型肝炎及肝硬变, 我们认为其原因是由于HB或HC所致, 主要是HB, 而与HE无关。

6. HE表现为急性肝炎, 临床症状类似于急性HA, 但与HA明显不同的是: HA以青少年为主, 而本组病例年龄分布则以中年人为主; HE患者男性多于女性, 为4:1, 而HA患者则男女之比相近。

(收稿: 1996-05-03 修回: 1996-06-04)

1 第四军医大学唐都医院传染科 西安 710038

2 第四军医大学微生物学教研室