

大肠杆菌不耐热肠毒素的 检测方法及其评价 (综述)

微生物学教研室 姜国强 罗海波 吴清明 审核

肠毒素性大肠杆菌(ETEC)是人类和家畜感染性腹泻的主要病菌,它产生不耐热肠毒素(LT)和耐热肠毒素(ST)。前者系一种蛋白质,与霍乱肠毒素(CT)有密切的抗原关联,其结构功能和作用方式也酷似CT。ETEC与普通大肠杆菌在形态、生化反应方面并无区别,血清型虽有不同,但也非绝对可靠,因此ETEC鉴定的最好方法是检测ST和LT。自70年代以来,各国学者介绍了不少有关大肠杆菌LT的测定方法,近几年来各种检测LT的新方法大量涌现,种类多,难易不一,一般用生物体内法(家兔肠袢试验)、组织培养法(Y-1肾上腺细胞、CHO细胞)、免疫化学法和LT探针技术和膜过滤法。本文对几种主要检测方法作一简介。

1 生物体内法

1.1 家兔肠袢试验(RILT) Pierce等^[1]
(1972)按Burrows改良法进行试验。其原理为LT与肠壁上皮细胞膜上GM₁受体结合后,使细胞内腺苷酸环化酶(AC)活性增高,促使cAMP水平增高,导致肠上皮细胞分泌功能亢进,造成肠腔中大量液体蓄积,测定每厘米肠袢内液体量可知LT的作用。RILT是一种经典的LT检测方法,其敏感性、特异性均较高,无需任何特殊设备,但需消耗实验动物,价格较贵,不宜作为常规检测方法。

1.2 大白鼠空肠灌注法 Klipstein等^[2]
(1976)推荐用大白鼠空肠灌注法检测LT。取体重200g左右的大白鼠,麻醉后,

选取20cm空肠段,用蠕动泵每分钟注入无菌滤液,30分钟后,每隔30分钟收集肠液一次(共收集6次),测定PEG 4000的浓度,即每30分钟每厘米肠段对肠液的运输量。本法十分敏感,即使肠毒素量少至每毫升1ng也可测出,但方法复杂,仅适用于特殊的实验室。

2 组织培养法

2.1 Y-1肾上腺细胞组织培养法 Donta等(1974)及Sack等(1975)先后提出^[3],大肠杆菌LT可致小白鼠肾上腺皮质细胞变形(由扁平变成立方上皮)及类固醇形成,与霍乱弧菌肠毒素所致病变相似。取Y-1肾上腺细胞于96孔的微量反应板上,然后加活培养物,5分钟后用微量吸管吸出含菌的组织培养液,继续孵育,18~24小时观察结果。以发生形态变化的细胞百分率大小来判断结果。Sack认为采用Y-1肾上腺细胞测定大肠杆菌LT,是一种快速、敏感、特异性高、适于筛选的方法,每天可测数百株大肠杆菌的LT,且可测出微量(0.2μg/ml)LT。杨正时等(1987)认为^[4],该法虽敏感,但也有许多影响因素,特别是细胞培养基的pH在8.0以上,易引起细胞的非特异性形态改变。且并非所有细菌的肠毒素均可用组织培养法检测,因某些细菌同时产生细胞毒素,后者能干扰肠毒素的检出,故用该组织培养法以检测肠毒素时,应同时作抗毒素中和试验予以验证。

2.2 中国地鼠卵巢(CHO)细胞试验 Dorna等(1975)与Guarrant等(1975)

先后报道CHO细胞的形态学改变与细胞内cAMP浓度增高有关^[6,6]。大肠杆菌的LT如同霍乱弧菌肠毒素能刺激CHO细胞中AC的活力,从而增高cAMP的浓度,导致CHO细胞形态变化(细胞伸长、呈纺锤形及结节样突起)。此法简单易行,并较肠祥试验敏感。

2.3 Vero细胞毒素测定法 Speirs等(1977)应用Vero细胞测定大肠杆菌LT^[6],其原理是大肠杆菌LT作用于Vero细胞,不但能增加AC的活力,且cAMP的水平增高还可促进 Δ -4-3酮类固醇的合成,以上两种改变均伴有细胞形态的变化,因此可作为简易诊断手段。试验时,培养板每孔加入细菌培养物(或滤液),再加Vero细胞。对照组为PBS或培养基加Vero细胞,培育18~24小时观察细胞病变。本法较Y-1肾上腺细胞法和CHO细胞法更为简便,且较经济。

组织培养法简便、经济,并较生物体内法和免疫化学方法更为敏感,不需要免疫学方法所要求的高效价特异性试剂,但要求有专门的组织培养技术和细胞保存技术。

3 免疫学方法

鉴于常规的生物测定如家兔肠祥试验等复杂、费时,组织培养法如Y-1肾上腺细胞法和CHO细胞法等则又不能准确测出LT量,故70年代中期以来,大量免疫学方法先后问世。

3.1 固相放射免疫试验(SPRIA) Ceska等(1978)^[7]用¹²⁵I标记的大肠杆菌LT与待检测大肠杆菌LT,分别加抗毒素,观察两者竞争抗毒素的能力,从而测出ETEC释放至培养基中的毒素量。本法可测出每毫升检材中ng级水平的毒素量。因而是一种灵敏、特异、准确、迅速的测定方法,但需特殊仪器。

3.2 微量神经节苷脂酶联免疫吸附试验(ELISA) Sack等(1980)使用该法检测大

肠杆菌LT^[8]。本法具有敏感性较高,特异性强的特点,并能定量测定和进一步了解肠毒素与神经节苷脂的结合。其方法是将1 μ g/ml GM₁神经节苷脂包被微量反应板后,经吐温-20 PBS洗涤,加入未稀释或用1%胎牛血清PBS稀释的待检标本,室温过夜,洗涤,加入豚鼠LT抗血清,37℃作用1小时,再经洗涤,加入酶标羊抗豚鼠球蛋白作用后,洗涤并加底物显色,在分光光度计中测定。本法可测出每毫升中285pg粗制LT,其敏感性略低于用Y-1肾上腺细胞检出量,但两种方法测定结果相关性好。ELISA对结果的判断容易且客观,如果再做标准肠毒素对GM₁神经节苷脂的抑制试验,还可定量检测LT。由于用ELISA测定抗毒素重复性好,所需标本量少(5 μ l),故适合现场应用及流行病学调查。

3.3 GM₁红细胞免疫测定法(GEIA) Johnson等(1984)根据ELISA的原理建立了GEIA法^[9]。GEIA以红细胞代替酶,虽其敏感性不如其它血清学方法,其优点是在检测LT时不需要多粘菌素B制剂或其它细菌提取物,且操作简单,无需特殊设备,用肉眼即可观察。但GEIA法需用两种不同种类动物(羊和豚鼠)的抗体,故有增加非特异性反应的可能。

3.4 被动免疫溶血试验(PIH) Evans等(1977)以PIH法检测大肠杆菌LT^[10],这是由于红细胞的细胞膜表面具有霍乱肠毒素的受体—神经节苷脂GM₁,因此霍乱肠毒素能结合于红细胞膜上。大肠杆菌LT有与霍乱肠毒素相似的B亚单位,故LT也能结合于红细胞(LT-SRBC)上,使之致敏,当与特异性抗体结合,且有补体存在时,即产生特异性溶血反应。尔后有人作了若干改进,改变红细胞稀释液与添加能使补体活化的Ca²⁺、Mg²⁺,使免疫溶血反应更为灵敏。但PIH需要一定的设备,需用紫外光光度计逐管测定血红蛋白的含量,操作较为繁琐。1978年Bramucci在固体培养基上,用辐射

状被动免疫溶血试验检测肠毒素突变的菌落。1981年Sarafin也有类似报告,但均未能应用于临床。

3.5 平板免疫溶血试验 (PIHT) 杨正时等(1987)根据被动免疫溶血试验的原理,结合乳胶颗粒凝集试验中从固体培养物提取肠毒素的方法^[4],创建了平板免疫溶血试验以检测大肠杆菌LT,获得十分满意的结果。该法具有Biken试验相同的优点:简便、快速、经济、重复性好。一般8小时得结果,较Biken试验提早3天;与乳胶颗粒凝集试验比则需时略长,但结果清晰,容易观察,并可保存较久,便于核对,具有临床应用价值。本法结果判断标准:凡有溶血圈者,无论其大小,均为产毒株(LT⁺),无溶血圈者为(LT⁻)株,溶血圈直径的大小反映毒素的多寡。本试验用于定量检测时,必须考虑操作的标准化,特别是必须严格控制菌数,这是比较困难的,故本试验主要用作定性检测。

3.6 改良Elek试验 (Biken试验) 利用LT和抗LT在琼脂中扩散并形成肉眼可见的沉淀线的原理来检测LT。Hondal等(1981)首次用本法检测大肠杆菌LT^[11]。该试验操作简单、反应清楚、结果易于判定,较生物体内法(兔肠袢试验)和组织培养法(Y-1肾上腺细胞)易于推广。该法的缺点是需96小时才能获得结果;不能定量;有时因抗血清效价不高等因素,可出现假阴性。

3.7 乳胶颗粒凝集试验 (LPAT) Mathewson (1986)利用抗体致敏的乳胶颗粒与抗原结合时发生凝集的原理来检测LT^[11]。杨正时(1987)首次创用固体培养基检测肠毒素,并可直接检测肠道菌各种常规培养基上生长菌落的LT,该法敏感性较近年各国使用的Biken试验强1000倍,可在数分钟内获得结果。因此LPAT是目前测定肠毒素方法中最快速而可靠的简易方法之一。

3.8 夹心红细胞免疫试验 (SERIA) Ger-

mani (1987)用SERIA检测大肠杆菌LT^[12]。以绵羊红细胞-抗体交联物作试剂,试验时用抗LT IgG包被V型聚苯乙烯板,每孔加抗LT,经孵育、洗涤,加入抗体致敏的羊红细胞和无菌滤液,室温下静置2~4小时后肉眼观察结果。如所测滤液不含有肠毒素,红细胞成团沉于孔底;如含有肠毒素,则致敏红细胞可以通过抗LT IgG与已经结合在包被抗体上的LT结合,于孔底形成均匀细胞层,细胞层的直径随抗体效价减低而减小。根据细胞层的形成与否及直径大小,可以确定LT的有无及效价。作者认为,该法简便,不需细胞培养装置和经特殊培训的人员,费用也相对较低,而敏感性较高,且可进行大量标本检测,故特别适合现场实验室应用。

3.9 膜过滤法 Jomuna等(1988)报道用膜过滤法检测LT^[21]。试验时先用纤维素-醋酸盐过滤膜将菌落分离,然后移种到含有抗LT或抗CT的琼脂培养基上孵育,细菌产生的LT通过滤膜扩散,并与抗LT混合,在琼脂培养基上形成肉眼可见的沉淀带。该法所需试剂、材料、实验设备都很简单,反应结果清楚,易于判断,且与ELISA和DNA-DNA探针检测法结果一致,值得推广。

4 LT探针技术

LT探针系晚近发展以检测ETEC LT⁺的快速诊断方法,为第四代检测技术。探针系利用分子生物学技术,从携带有LT质粒的工程菌中分离、纯化LT遗传基因,利用缺口翻译方法(nicktranslation),将[α -³²P] dNTP标记于LT遗传基因上所制成。然后根据同源DNA碱基在一定条件下能互相配对(杂交)的原理,检测待检标本中与LT DNA分子结构相同的基因,而不似其它检测方法必须测定肠毒素。由于LT探针是在基因水平上作检测,故其特异性较高,敏感性较强,比经典的Y-1肾上腺细胞法敏感一万倍,该法不仅一次可检测数

百份样品,且可直接从粪便标本中进行检测,节省时间、试剂药品和器材,更适合于流行病学的现场调查和实验室诊断。然而基因探针所用同位素半衰期短,能污染环境,并且需要较高的技术条件等,目前在国内尚难推广应用。

综上所述,近20年来大肠杆菌LT检测方法的研究进展迅速,原有的方法不断得到改进,新的方法相继问世。尽管由于种种条件的限制,许多LT检测方法还存在某些缺点,如有的方法需要一定的设备和技术条件;有的所需时间较长;有的敏感性、特异性不高,不易为临床推广使用。但LT检测的前景还是十分乐观的,目前正向微量、敏感、特异、快速和简便的方向发展。

参 考 文 献

1. Pierce WF, et al. *Gastroenterol* 1972; 63(3): 439
2. Klipstein F A, et al. *Infect Immun* 1976; 14(4): 1004
3. Donta ST, et al. *Science* 1974; 183(4122): 334
4. 杨正时,等. 肠毒素的检测. 病原性大肠杆菌研究论文选编. 中国药品生物制品鉴定所, 1987: 98~100 (内部资料)
5. Dorner F, et al. *Infect Immun* 1975; 11(3):

- 429
6. Speirs J I, et al. *Infect Immun* 1977; 16(2): 617
7. Ceska M, et al. *J Clin Microbiol* 1978; 19(2): 347
8. Sack D A, et al. *J clin Microbiol* 1984; 11(1): 35
9. Johnson WM, et al. *Lancet* 1984; 1(8367): 76
10. Evans D J, et al. *Infect Immun* 1977; 16(2): 604
11. Mathewson J J, et al. *J Infect Dis* 1986; 154(3): 524
12. Germani Y, et al. *Med Microbiol Immunol* 1987; 176(1): 89
13. Maroues L R, et al. *J Infect Dis* 1986; 154(2): 338
14. 罗海波, 等主编. 细菌毒素研究进展. 第1版, 北京: 人民卫生出版社, 1983: 109~110
15. Honda T, et al. *J Clin Microbiol* 1981; 13(1): 1
16. Finkelstein R A, et al. *J Clin Microbiol* 1983; 18(1): 23
17. Lee CH, et al. *Infect Immun* 1983; 42(1): 284
18. 谢奉瑜, 等. 中华流行病学杂志 1984; 5(4): 206
19. 林成水, 等. 微生物学通报 1984; 11(2): 71
20. Moseley S L, et al. *J Infect Dis* 1980; 142(6): 892
21. Jomuna, et al. *Lancet* 1988; 3: 1007
(1988年3月22日收稿, 1989年1月4日修回)

(紧接第83页)因素有关。

我国1986年对近百万名大中小学生体质与健康的调查资料^[4]表明,我国青少年生长发育水平虽已得到大幅度提高,但体重不足、视力不良仍是突出问题。为此,有关专家呼吁:促进与提高我国青少年儿童生长发育,增强体质,是一项关系到中华民族素质,具有重大战略意义的基础工作。因而,全社会都必须共同关注,并努力设法改善儿童少年体质与健康,特别要努力抓好青春发育突增期的快速增长波段的重要时机,开展有利于身心健康的各种活动,积极引导与发挥他们的内在作用;举办形式多样的卫生宣教

活动,大力普及科学营养知识,加强营养指导,合理膳食;并积极鼓励参加适当的社会生产实践,以达到提高和增强少年儿童生长发育的目的。

参 考 文 献

1. 李长春,等. 浙江省学生体质健康调研成果. 杭州: 浙江省教育出版社, 1985: 163
2. 杭州市卫生防疫站. 杭州市中小学生学习发育调查报告. 1972: 33
3. 厚生省保健医疗局健康增进栄養课编. 日本人の栄養所要量. 東京: 第一出版株式会社 1984: 161
4. 国家教委,等. 我国984872名7~22岁大、中、小学学生的体质与健康调查. 北京: 健康报, 198: 84, 19
(1987年12月5日收稿, 1988年9月10日修回)