

侵袭性大肠杆菌实验性豚鼠角膜感染与免疫

杨正时 黄念君

(中国药品生物制品检定所, 北京)

用国内分离的侵袭性大肠杆菌 O124:H-菌株成功地复制了豚鼠角膜炎。观察到大肠杆菌能侵入豚鼠角膜上皮细胞, 细胞浆是它主要繁殖场所。其病程类似痢疾角膜炎。痊愈后具有病后免疫。重复感染发病率由 80% 下降到 1.1%, 排菌期缩短。免疫力可保持 3 个月以上, 在此期间血清内抗体降低到不能被一般方法所检出时, 痊愈眼仍能抗大剂量细菌的攻击。因此被认为是一种局部组织免疫, 并具有种、属的特异性。它并不能抵御史密斯志贺氏菌的感染因而发病, 但症状稍轻, 因此在建立特异性免疫过程中加强了局部非特异免疫作用。在局部组织免疫中, 除白细胞因素外, 发现了一种合体融合细胞, 我们将其称为“菊花细胞”, 并认为这是局部组织免疫中一个不可忽视的细胞学因素。

关键词 大肠杆菌; 角膜炎; 免疫

侵袭性大肠杆菌是国内常见的腹泻病原菌之一。它具有侵入肠道上皮细胞并在其中繁殖的能力, 在临床上引起类似痢疾的症状, 并已在国内多次引起较大规模的食物中毒的暴发^[1,2]。本文报告侵袭性大肠杆菌角膜炎实验性感染与免疫过程, 以及组织局部免疫在防治感染中的作用。

材料和方法

(一) 豚鼠

体重 300 g 以上, 白毛红眼, 无眼疾。

(二) 菌种

除 44844 株系实验室长期冻干保存的国外菌株外, 其余均从国内婴幼儿腹泻患者粪便中分离获得, 保存于石蜡油封的半固体培养基, 放置冰箱半年左右。试验前均经详细生化检查和血清学鉴定^[3]。菌株 E525, E526 抗原式为 O124:H-, E516 为史密斯志贺氏菌, 其余 9 株为 9 个不同血清型的其它致病性大肠杆菌。

(三) 感染方法^[4,5]

一般用灼热消毒冷却后的大头针在豚鼠角膜上轻划 5—7 次, 将 37℃ 18 小时的斜面培养物, 用生理盐水配制成 20 亿/ml 的菌悬液, 于结膜囊内

接种一白金耳(直径 2 mm)。部分豚鼠没有划痕或者感染 2 亿/ml 的菌液, 最后一次用 100 亿/ml 的菌液感染。多数豚鼠感染双眼, 部分豚鼠感染单侧。

(四) 病变观察

感染后逐日观察全身症状与体征, 按眼部病变程度记录为:

+: 明显结膜充血, 血管充盈, 角膜局部浸润混浊;

++: 显著睫状充血, 角膜血管翳形成, 角膜大部浸润混浊, 分泌物呈浆液性或脓性;

+++ : 重度混合充血, 角膜全部浸润混浊, 溃疡;

++++: 充血程度与+++一致, 角膜血管翳成红环状。

(五) 细菌学检查

初感染后三日由结膜囊取分泌物, 再感染后则逐日取材, 经增菌后作分离培养, 用玻片凝集试验定型。连续三次阴性作为停止排菌。部分豚鼠于感染后 3、8 小时采心血作血培养。

(六) 抗体测定

部分豚鼠于感染前(沈森局同志协助)及感染

本文于 1986 年 4 月 23 日收到。

后 1—4 周采心血分离血清与经加热杀死的感染菌悬液及致敏绵羊红血球作试管凝集反应, 测定效价。

(七) 细胞学检查

选发病豚鼠 5 只, 于感染后 30 分钟, 2 小时、8 小时、1—9 天、13—15 天逐日取结膜囊分泌物涂片, 用甲醇固定, 姬姆萨染色, 镜检观察。

结 果

(一) 不同血清型菌株的侵袭力

从腹泻患儿分离的 9 个 O 抗原组的致病性大肠杆菌均无侵袭力, 仅国内新分离的侵袭性大肠杆菌 O124:H- 的菌株 (E525, E526) 有侵袭力。二者的发病率相仿, 角膜划痕后每毫升含菌 20 亿, 滴眼接种发病率为 80%。同样条件下史密斯志贺氏菌能使所有感染角膜发病。划痕能促使感染。其它血清型大肠杆菌均不引起角膜炎 (表 1)。

(二) 病程

初次感染时, 均有一定的潜伏期, 80% 以上在三天内发病, 但也有长达 7 天的。一般病后 2—3 天症状达到高峰, 持续 3—4 天, 病后一周逐渐退行, 一般经历二周。不同浓度菌液感染豚鼠的病变和病程无明显差别。在单侧眼感染时有时可见对侧眼有一过性症状, 但未能分离到细菌。症状消失后对再感染无免疫力, 也可见对侧眼有前房积脓, 然后导致角膜溃疡。

(三) 病后免疫

在初发病后 112 天期间共进行 6 次再感染 260 眼次, 仅有 3 眼次发病, 重复感染率为 1.1%, 即使再感染剂量增加 5 倍, 病后眼仍能耐受。再感染发病的病变轻, 病程短。大肠杆菌 O124 角膜炎后不能抵抗志贺氏菌的攻击 (表 2)。

(四) 排菌

在感染后 3—8 小时血培养阴性。初

表 1 不同血清型菌株的侵袭力

Table 1 Invasive ability of strains of different serotypes

菌株 No. of Strains	血清型 Serotype	菌液浓度(亿/ml) Concentration of bacterial suspension (10^8 /ml)	发病眼数/接种眼数 No. of ill ed eyes/No. of inoculated eyes
E525	O124:H-	20	32/37
E526	O124:H-	20	16/32
E525	O124:H-	20(未划痕) (non-scarified)	1/6
E526	O124:H-	2	3/6
44484	O124:H-	20	0/6
E476	O20:H32	20	0/4
E483	O25:H26	20	0/4
E507	O55:H-	20	0/4
E512	O111:H10	20	0/4
E518	O114:H14	20	0/4
E522	O119:H4	20	0/4
F527	O125:H38	20	0/4
E536	127:H6	20	0/4
E542	O128:H-	20	0/4
S516	史密斯志贺氏菌 <i>Shigella schmitzii</i>	20	14/14
S516	史密斯志贺氏菌 <i>Shigella schmitzii</i>	20(未划痕) (non-scarified)	1/2

感染后排菌时间长于病程, 平均 17.5 天, 最长达 37 天。再感染时排菌期缩短, 一般为 3 天, 5—6 周后再感染时排菌期有所延长(表 3)。在单侧眼感染时, 有时可在对侧眼分离到细菌, 不发病眼中, 一般带菌 1—2 天, 也有持续排菌的, 健康带菌眼仍保持对重复感染的敏感性。

(五) 体液抗体测定

感染后 90% 豚鼠出现血清抗体反应, 血凝抗体与细菌凝集素基本一致, 唯血凝效价较高, 但仍有二只动物始终未测出抗体(表 4)。

(六) 结膜囊涂片的细胞学变化

大肠杆菌 O124:H-豚鼠结膜囊接种后, 24 小时已见到细菌在角膜上皮细胞中生长繁殖, 上皮细胞浆中充满着大量、密集, 淡染的长短不一的杆状细菌, 第 2—3 天达到高峰(图 1), 在淋巴、单核等细胞浆

中有时也可见到细菌(图 2)。

48 小时后出现大量中性多形核白细胞, 3—4 天后有大量集中趋向, 并吞噬着细菌, 第 6—7 天吞噬相达高峰, 吞噬着细菌的多形核白细胞有时一个个围绕若淋巴——单核样细胞, 排列整齐, 聚合成一合体融合细胞, 形态特殊, 我们称它为“菊花细胞”(图 3)。

单核等吞噬性细胞的吞噬能力于 3—4 天后见到, 4—5 天明显, 6—7 天达高峰。表现为细胞的活跃, 增生, 胞浆增多, 嗜碱性增强, 吞噬着细菌及其残渣, 白细胞等, 有的见空泡形成(图 4)。

在以后的观察中(8—15 天), 继续可以见到吞噬细胞完成清除微生物的功能, 表现为吞噬细胞和吞噬能力的逐步减少, 到第 13—15 天, 细胞内外已无细菌, 单核、淋巴、中性白细胞、“菊花细胞”消失。

表 2 痊愈眼对重复感染的免疫性

Table 2 The immunity to repeated infection in recovered eyes

重复感染菌株/初感染大肠杆菌菌株 Strain on repeated infection/ Strain of <i>E. coli</i> initiate infection	感染次数 Time of infection						总计 Total
	1	2	3	4	5	6	发病眼数/接种眼数 No. of illd eyes/ No. of inoculated eyes
E525/E525	2/21	0/21	0/21	0/21	0/21	0/21	2/126
E526/E525	0/12	0/5	0/7	0/10	0/10	0/10	0/54
S516/E525		5/5	3/3				8/8
E526/E526	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/18
E525/E526	1/11	0/11	0/11	0/11	0/11	0/11	1/62
S516/E526			2/4				2/4

表 3 不同时间重复感染后的排菌期

Table 3 Period of excreting bacteria after repeated infection in different time

重复感染间隔时间(周) Time interval for repeated infection (Weeks)	感染眼数 No. of infected eyes	平均排菌期(d) Average period forexcreting bacteria
0(初感染) (initial infection)	55	>17.5
3—4	17	8.5
5—6	32	0.4
7—9	22	3.2
11—15	53	2.0

表 4 发病豚鼠血清中血凝抗体效价测定

Table 4 Determination of hemoagglutinating antibody titer in serum of infected guinea-pigs

观察项目 Observational items	感染前 Before infection	感染后不同时间 Different time after infection					
		3天 3Days	1周 1Week	2周 2 Weeks	3周 3 Weeks	4周 4 Weeks	5周 5 Weeks
阳性数/总数 Positive number/Total	0/20	0/20	5/20	13/20	14/20	4/20	2/20
抗体效价范围 Range of antibody titer	—	—	10—20	20—160	10—80	20—80	20
几何平均效价 Average titer(G.M.T.)	—	—	3.5	50	23.5	10	2

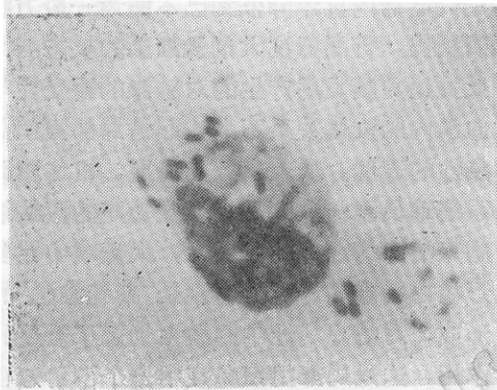


图 1 上皮细胞, 浆少, 淡染, 胞浆中见密集深染的杆状细菌(姬姆萨染色 1,500×)

Fig. 1 Epithelial cell, poor cytoplasm, light stained, concentrated rod bacteria with deep staining in cytoplasm

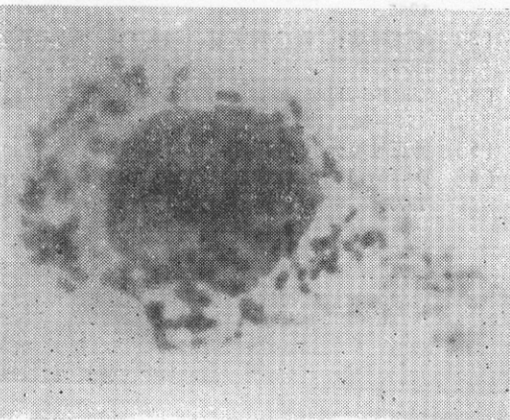


图 2 单核细胞, 胞浆丰富, 充满着密集的杆状细菌(姬姆萨染色 1,500×)

Fig. 2 Monocyte, rich cytoplasm, concentrated rod bacteria in the cytoplasm

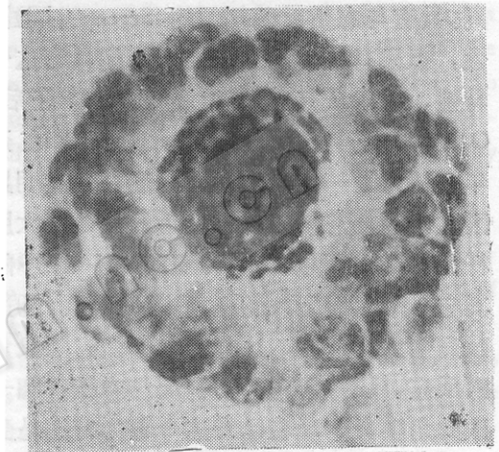


图 3 “菊花细胞”由中性多形核白血球聚合成有共同胞浆之合体(融合)细胞, 其中央布满深染长短不一的细菌(姬姆萨染色 400×)

Fig. 3 “Cell of the chrysanthemum”, the fused cell composed of polymorphonuclears possessing fused cytoplasm, fulling bacillary bacteria with deep staining and different length in the centre

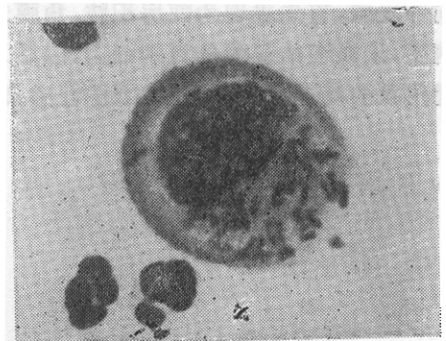


图 4 单核细胞吞噬着大量细菌(姬姆萨染色 1,000×)

Fig. 4 Monocyte phagocytizing a large number of bacteria

讨 论

引起急性腹泻的病原性大肠杆菌,按其发病机理至少可以分为肠道致病性大肠杆菌,产毒性大肠杆菌和具有上皮侵袭能力的侵袭性大肠杆菌^[6]。在早期文献中,由于对大肠杆菌的致病性还未充分认识,曾将 O124:H-列入与婴幼儿流行性腹泻有关的致病性大肠杆菌中。虽然当时也已发现 O124:H-与其它致病性大肠杆菌不同,具有与志贺氏菌相似的 Sereny 试验阳性,但只有在发现更多的血清型具有这一特性,并确认其侵袭性的致病特征后, O124:H-与其相似的一群大肠杆菌在近年才认为是一类与致病性大肠杆菌有明显区别,而与志贺氏菌相接近的侵袭性大肠杆菌。本文试验中的除 O124:H-以外的其它 9 个血清型大肠杆菌均为典型的肠道致病性大肠杆菌,这些菌株不引起豚鼠角膜反应,只有 O124:H-引起与志贺氏菌一致的角膜炎,现在已知这一毒力特征是受 100—140 Md 的大分子量质粒所控制的。本文用角膜炎分泌物细胞涂片的方法证明侵入上皮细胞中的细菌主要在胞浆中增殖。

本文报告在 10 只单侧眼接种感染的豚鼠中有二只豚鼠对侧眼发生病变,由内向外发展,首先表现为前房积液,角膜未见病变,未能在结膜囊分离到细菌,以后才出现角膜溃疡,因此很可能为眼源性感染。我

们也在单侧眼感染试验中发现一未接种眼发病,病变消失酷似感染,但消退迅速,结膜囊始终未分离到细菌,痊愈后对重感染无免疫力,因此该眼发病似有过敏因素参与。

大肠杆菌角膜炎痊愈后具有病后免疫,表现为重感染时发病率大大降低,个别发病动物的潜伏期延长,病程短,病变轻,排菌期缩短,细菌在感染后 3—8 小时内即被清除,免疫期至少保持三个月以上,在此期间血清内抗体降低到已不能为一般方法所检出,仍能抵抗大剂量细菌的攻击。因此推论角膜炎后产生的对感染的耐受性与血清内的抗体关系不大,而是局部组织免疫性的表现。随着感染的发展,机体防御系统动员了一系列具有吞噬功能的活性细胞来清除病灶中的微生物,大量嗜中性多形核白细胞的出现,特别是“菊花细胞”的形成,对清除病灶中的微生物起了重要的作用,这是局部组织免疫中一个不可忽视的细胞学因素。

参 考 文 献

- [1] 杨正时等: 北京医学, 8(5): 257—259, 1986。
- [2] 张绪团等: 微生物学通报, 12(6): 266—267, 1985。
- [3] 杨正时等: 微生物学报, 19(2): 187—197, 1979。
- [4] Lin Fei-ching et al.: *Chinese Med. J.*, 83: 454—462, 1964。
- [5] 杨正时等: 中华医学杂志, 3: 155—157, 1980。
- [6] Ørskov, I. et al.: *Bact. Rev.*, 41: 667—710, 1977。

EXPERIMENTAL INFECTION AND IMMUNITY OF ENTEROINVASIVE *ESCHERICHIA COLI* IN CORNER OF GUINEA PIGS

Yang Zhengshi Huang Nianjun

(National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

The keratitis in guinea pigs is experimentally produced successfully by inoculation with strains of *E. coli* O124:H-. It was observed that *E. coli* can invade epithelial cells of corneae, in which cytoplasm is the main place for multiplication. Its course of disease resembles keratitis elicited by dysentery bacilli, producing acquired immunity after recovery. After repeated infections, the morbidity of experimental animal dropped from 80% to 1.1%. Period for excreting bacteria was also much shorter. Acquired immunity maintain for a period of more than three months. During this period, when antibody titre in serum dropped to undetectable level by common methods, the recovered eyes could still withstand a challenge with a large dose of the some organisms. Therefore a local tissue immunity possessing

species specificity is considered to have occurred. Yet the recovered eyes could not resist an infection with *Shigella schmitzii* and the animal came down with mild symptoms. So during the setting up of the process of specific immunity, local non-specific immunity might also be strengthened.

In local tissue immunity, besides containing specific agglutinins and white cells factor in the secretion of eyes, we found a sort of fused cells called by us "the cells of the chrysanthemum". The author considered that this is a cellular factor, its importance can not be ignored in local tissue immunity.

Key words

Escherichia coli; Keratitis; Immunity