

大肠杆菌 O₁₂₁ 侵袭性菌株的发现与研究

杨正时 黄念君

(中国药品生物制品检定所,北京)

张超凡 李忠辉 周爱民 邓新奇 周祖岳

(湖南省岳阳市卫生防疫站,岳阳)

本文报告从一急性腹泻患儿的脓血便中分离的具有侵袭性的大肠杆菌。该菌株发酵葡萄糖,产酸产气,不发酵乳糖, β -半乳糖苷酶试验阳性,在醋酸钠培养基上生长,赖氨酸脱羧酶阴性,无动力,能引起豚鼠角膜结膜炎,侵入上皮细胞,具有 140Md 的质粒带,经血清学试验证实其血清型为 O₁₂₁: H-,是国内外首次报道的新的侵袭性大肠杆菌血清型。

关键词 侵袭性大肠杆菌;血清型

侵袭性大肠杆菌 (EIEC) 是一类生物学特性酷似志贺氏菌,具有侵入上皮细胞功能,产生菌痢样腹泻的病原性大肠杆菌。它局限于某些少数的血清型,已报道的有 O_{28ac} (Kattawijk)、O_{112ac} (Guanabara)、O₁₂₄、O₁₃₆、O₁₄₃、O₁₄₄、O₁₅₂^[1]、O₄₂^[2]、O₂₉^[3]、O₁₆₄^[4,5]、O₁₆₇^[6-8]。1986 年 6 月 20 日,从湖南省岳阳市一发热 38.5℃ 的 6 岁腹泻女童的血性粘液便中分离到一株 Sereny 试验阳性的大肠杆菌,菌株号为 YC86-305,经鉴定其血清型为 O₁₂₁: H-,系国内外首次发现,现报道如下。

材料与方 法

(一) 菌株

具有侵袭力的 O₁₂₁ 菌株 YC86-305,由张超凡医生从湖南岳阳腹泻女童粪便中分离。标准株 O₁₂₁ (W₅₀ 株) 以及 O₁₂₁ 大肠杆菌标准株由丹麦 Ørskov 赠送。

(二) 诊断血清

侵袭性大肠杆菌诊断血清及 O₁₂₁ 分型血清由作者自制。肠道致病性大肠杆菌血清及志贺氏菌分型血清分别由成都生物制品研究所和我所提供。

(三) 菌种鉴定程序

1. 生长特性及形态学检查。

2. 生化反应: 上述二项的结果必须证明是埃希氏菌属大肠菌种,特别注意到与志贺氏菌的鉴别。

3. 血清学鉴定: 用玻片法与常见的肠道致病性、肠道侵袭性大肠杆菌诊断血清作凝集试验;以 100℃ 加热 1h 的 37℃ 培养过夜的肉汤培养物为抗原与大肠杆菌 O₁₂₁ 血清作试管凝集,在确定单价后测定效价;在初步确定为 O₁₂₁ 后,与 O₁₂₁ 标准菌株及相应血清作凝集素交互吸收试验,以证明其同一性;YC86-305 株的过夜肉汤培养物,加热 100℃ 2h 后免疫家兔制备的 O 血清与所有 O₁₂₁ 加热抗原作交叉凝集,并测定其效价,以进一步排除其它 O 抗原的可能性。

4. 侵袭力与质粒检查: 以常规方法作豚鼠角膜炎试验与分泌物涂片的细胞学检查;质粒用固体培养菌苔以溶菌酶、SDS 裂解,酚-氯仿除蛋白,用常规琼脂糖电泳检查。

结 果

(一) 一般性状与生化特征

本文于 1987 年 9 月 26 日收稿。

丹麦血清研究所、国际埃希氏菌和克雷伯氏菌中心 Frits Ørskov 和 Ida Ørskov 对菌株进行检定复核,特此致谢。

表 1 YC86-305 株的生化反应

Table 1 Biochemical reaction of strains YC86-305

试验或物质 Test or substrate	反 应 Reaction	试 验 或 物 质 Test or substrate	反 应 Reaction
葡萄糖产酸 Acid from glucose	+	硝酸盐还原 Nitrate reduction	+
葡萄糖产气 Gas from glucose	+	甲基红反应 Methyl red reaction	+
甘露醇 Mannitol	+	VP	-
乳糖 Lactose	-	H ₂ S	-
蔗糖 Sucrose	-	柠檬酸盐 Citrate (Simmons)	-
水杨素 Salicin	-	醋酸钠 Acetate	+
卫茅醇 Dulcitol	-	丙二酸盐 Malonate	-
肌醇 Inositol	-	吲哚 Indol	+
福寿草醇 Adonitol	-	尿素 Urease	-
棉子糖 Raffinose	+	苯丙氨酸脱氨酶 Phenylalanine deamination	-
山梨醇 Sorbitol	+	赖氨酸脱氨酶 Lysine decarboxylase	-
阿拉伯糖 Arabinose	(+)	鸟氨酸脱氨酶 Ornithine decarboxylase	-
鼠李糖 Rhamose	+	精氨酸脱氨酶 Arginine dihydrolase	+
木糖 Xylose	+	β -半乳糖苷酶 β -Galactosidase (ONPG)	-
海藻糖 Trehalose	+	明胶液化 Gelatin liquefaction	-
麦芽糖 Maltose	+	粘液酸 Mucic acid	-
		氧化酶 Oxidase	-
		动力 Motility	-

注: +: 1—2d 内阳性 Positive in 1—2d; -: 阴性反应 Negative; (=): 2d 后阳性 Positive in more than 2d.

在麦康凯琼脂平板与 S. S. 琼脂平板上生长良好, 菌落直径约 2mm(24h), 无色, 有时可见粉色菌落, 半透明, 圆形, 稍隆起, 光滑, 湿润。革兰氏染色呈阴性, 杆状。生化反应特征是葡萄糖产酸产气, 不发酵乳糖, ONPG 反应阳性, 精氨酸双水解酶阴性, 苯丙氨酸脱氨酶和赖氨酸、鸟氨酸脱羧酶二个试验阴性。在 0.2% 琼脂半固体上, 37℃ 培养和室温放置一周后均未见动力, 是一株生化反应不活泼的大肠杆菌, 麦康凯平板上见无色菌落与微呈粉红的菌落以及从角膜炎分泌物中分离的菌株, 其生化反应是一致的(表 1)。

(二) O 抗原检定

该菌与现有的肠道致病性大肠杆菌(EPEC)及侵袭性大肠杆菌诊断血清均不发生凝集。在现有的志贺氏菌分型血清中, 仅与志贺氏 A 群 7 型有凝集反应。用标准大肠杆菌 O₁—O₁₅ 血清测定时, 与 O₁₂ 血清发生强烈的凝集。用 O₁—O₁₅ 的 O 抗原测定用该菌制备的 O 血清时发现, 除 O₁₂ 外, 尚有其它 O 抗原与该血清发生凝集, 效价在 1:40—1:320, 见表 2。

用 O₁₂ 的标准菌株(W₃₉)制备的 O 血清与 YC86-305 株 O 血清的相互交叉吸收试验证明二者的 O 抗原是一致的, 因此 YC86-305 株为 O₁₂ (表 3)。

表 2 YC86-305 株 O 抗原与大肠杆菌 O₁₋₁₅ 的关系

Table 2 O antigen relation between O antigen of strain YC86-305 and O₁₋₁₅ of *E. coli*

O 抗原 O Antigens	效 价 Titer
O ₁	1:40
O ₁₃	1:40
O ₁₆	1:40
O ₂₃	1:320
O ₂₇	1:40
O ₃₉	1:320
O ₇₃	1:160
O ₉₉	1:40
O ₁₀₇	1:80
O ₁₀₈	1:80
O ₁₂₁	1:2560
O ₁₄₄	1:80
O ₁₃₇	1:40
O ₁₆₂	1:40
O ₁₆₄	1:40
YC86-305	1:2560

(三) 侵袭力的研究

在半固体保存的二个月中曾进行二次 Sereny 试验, 并用不同菌落接种豚鼠结膜囊, 均引起典型的化脓性角膜炎(图 1), 而标准株 W₃₉ 不引起病变。在冷冻干燥后启开, 在普通营养琼脂斜面上传代二次后仍能使二只豚鼠的眼睛致病。从病眼中脓性分泌物分离到纯的乳糖阴性菌, 玻

表 3 YC86-305 株与 W₃₉ (O₁₂₁) 株的 O 抗原关系

Table 3 O antigen relation between YC86-305 strain and W₃₉ (O₁₂₁) strain

菌 株 Strains	抗 原 制 备 Antigen preparation	抗血清效价 Titer of antiserum			
		吸 收 前 Before absorption		吸 收 后 After absorption	
		W ₃₉ YC86-305		W ₃₉ /305	W ₃₉ /W ₃₉ 305/W ₃₉ 305/305
W ₃₉	100℃, 1h	5120	2560	0	0 0 0
YC86-305	100℃, 1h	5120	2560	0	0 0 0

注: O 血清/吸收菌; 0: 效价 < 1:40。

O Serum/Absorption culture; 0: Titer < 1:40。



图1 YC86-305 株引起豚鼠角膜结膜炎(右侧), 左侧为对照

Fig. 1 Keratoconjunctivitis in guinea pigs caused by YC86-305 strain (right), Control (left)

片血清学凝集试验证明是 O₁₂₁, 分泌物涂片中除见有各种吞噬细菌的白血球外, 尚在脱落的角膜上皮细胞中见到侵入的细菌, 聚集成堆状呈繁殖生长状态(图2)。

(四) 质粒

将固体琼脂平板上生长的菌苔, 用溶菌酶、SDS 及酚除去蛋白, 提取质粒。用琼脂糖电泳检查质粒。在麦康凯琼脂平板上呈粉色(图3, 第一行)和无色(图3, 第二行)菌落以及在发病的结膜囊分泌物中分离的 YC86-305 株(图3, 第三行), 均有一与志贺氏菌 51118 (图3, 第七行) 及 EIEC O_{28ac}: H- 86-246 株(图3, 第四行), EIEC O₂₉: H- 85-210 株(图3, 第六行)相仿的 140Md 质粒带(图3)。



图2 在角膜上皮细胞内的细菌

Fig. 2 Bacteria in epithelial cells of cornea

讨 论

自本世纪六十年代初开始发现血清型 O₁₂₄ 大肠杆菌能引起豚鼠角膜炎后, 相继发现了一群血清学上无关而均引起上皮细胞侵入性的血清型, 为了与原有传统的肠道致病性大肠杆菌相区别, 而称为志贺氏菌样大肠杆菌, 现在也称为侵袭性大肠杆菌。最近报告的侵袭性大肠杆菌是圣保罗

大肠杆菌, 这是一个新的 O 抗原群, 世界卫生组织埃希氏菌中心标记为 O₁₆₇。因此迄今已报告的侵袭性大肠杆菌计有 O_{28ac}, O₂₉, O₄₂, O_{112ac}, O₁₂₄, O₁₃₆, O₁₄₃, O₁₄₄, O₁₅₂, O₁₆₄, O₁₆₇ 等 11 个 O 抗原。

侵袭性大肠杆菌的生物学特性酷似志贺氏菌。本文报告的 YC86-305 株不发酵乳糖, 赖氨酸脱羧酶阴性, 没有动力, 引起角膜炎, 有 140Md 大质粒等特性与志贺氏

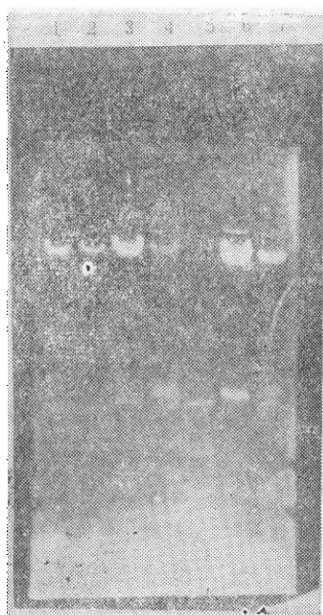


图3 YC86-305 株的质粒

Fig. 3 Plasmids of strain YC86-305

1. YC86-305 株粉色菌落 (Sereny 试验阳性)。
2. YC86-305 株无色菌落 (Sereny 试验阳性)。
3. 从角膜分泌物分离的同一血清型菌株。
4. 86-246 株 EIEC (Sereny 试验阳性)。
5. 85-246 株, 大肠杆菌 (Sereny 试验阴性)。
6. 85-210 株, EIEC O₂₈:H- (Sereny 试验阳性)。
7. 志贺氏菌 51118 (Sereny 试验阳性)。

1. Pink colony (Sereny test positive) of strain YC86-305.
2. Colourless colony (Sereny test positive) of strain YC86-305.
3. Strain of the same serotype isolated from secretion of keratitis.
4. Strain 86-246, EIEC O_{28ac}: H- (Sereny test positive).
5. Strain 85-546, *E. coli* (Sereny test negative).
6. Strain 85-210, EIEC O₂₈: H- (Sereny test positive).
7. *Shigella* 51118 (Sereny test positive).

菌相似。但该菌株的生化特性与志贺氏菌有别: 它发酵多种常见的糖类; 葡萄糖产酸产气; 醋酸钠培养基上生长; ONPG 阳性

反应。因此是一株生化反应欠活泼的大肠埃希氏菌。在 O₁₋₁₆₄ 大肠杆菌免疫血清中仅与 O₁₂₁ 达到该菌效价, 凝集素交互吸引证明与 O₁₂₁ 一致, 因此其抗原式应为 O₁₂₁: H-。在我们的试验菌株中虽没有包含 EIEC O₁₆₇, 但已知 O₁₆₇ 与鲍氏志贺氏菌 3 型 O 抗原相同^[6], 我们未发现该菌与鲍氏 3 型血清发生凝集, 因而排除了 O₁₆₇ 的可能性, 本菌与志贺氏 A 群 7 型凝集, 与文献报告一致^[9], 因而更证明了 O₁₂₁ 的可靠性。鉴于本菌引起严重的豚鼠角膜结膜炎; 侵入到上皮细胞内, 存在着与志贺氏菌以及其它侵袭性大肠杆菌相一致的大质粒, 因此是属于侵袭性大肠杆菌。鉴于目前国内文献中尚未报道, 因此本文的报告的大肠杆菌 O₁₂₁: H-血清型为一株新血清型的侵袭性大肠杆菌。本菌株经丹麦血清研究所、国际埃希氏菌和克雷伯氏菌中心 Frits Ørskov 和 Ida Ørskov 教授进一步检定核为具有侵袭力的大肠杆菌 O₁₂₁: H-菌株。

参考文献

- [1] Ørskov, I. et al.: *Bacteriol. Rev.*, 41: 667—710, 1977.
- [2] Voros, S. et al.: *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.*, 11: 125—129, 1964.
- [3] Toledo, M. R. F. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 9: 288—289, 1979.
- [4] Manolov, D. G.: *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 29: 1979—1982, 1958.
- [5] Rowe, B. R. et al.: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 27: 15—18, 1977.
- [6] Toledo, M. R. F. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 11: 422—423, 1980.
- [7] Gross, R. J. et al.: *ibid.*, 17: 521—523, 1983.
- [8] Ørskov, I. et al.: *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. B*, 92: 189—193, 1984.
- [9] Edward, P. R. et al.: *Identification of Enterobacteriaceae*, 3rd ed. Burgess Publishing Co., 1972.

THE DISCOVERY AND STUDY ON INVASIVE STRAIN OF *ESCHERICHIA COLI* O₁₂₁

Yang Zhengshi Huang Nianjun

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

Zhang Chaofan Li Zhonghui Zhou Aiming

Deng Xingqi Zhou Zuyue

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Yueyang, Yueyang)

A strain of Enteroinvasive *Escherichia coli* was isolated from the stool with blood and mucus of a child suffering from acute diarrhea. The strain shows the following characteristics: rapid fermentation of glucose (with gas), no fermentation of lactose, β -galactosidase reaction positive, growth in acetate media, lysine decarboxylase negative, non-motility causing keratoconjunctivitis in guinea

pigs and invading into epithelial cells, with a plasmid of 140 Md, Serotype is O₁₂₁:H- which is a new serotype of Enteroinvasive *Escherichia coli*.

Key words

Enteroinvasive *Escherichia coli*; Serotype