

雷祚荣 编著

葡萄球菌毒素和

葡萄球菌毒素病

中国科学技术出版社

序

葡萄球菌是地球上分布最广、数量最多的细菌之一，目前已被认识的有19种，其中的金黄色葡萄球菌是人类和某些动物的病原菌，可引起化脓性感染和败血症等。金黄色葡萄球菌又可用噬菌体分为4个群23个型，其中Ⅲ、Ⅳ群金葡菌除能引起感染外，更重要的是能产生多种肠毒素，是人类经常发生的食物中毒的主要病因。此外，80年代初又发现了金葡菌产生的一种能引起中毒性休克综合征的毒素，即中毒性休克毒素，其致病率高达8%左右。由此可见，葡萄球菌毒素在人类生物性病原中所占的重要地位。

自本世纪30年代发现葡萄球菌肠毒素引起食物中毒以来，对肠毒素进行了生化、病理、生理、分子遗传学等方面的大量研究，对其所致疾病也进行了临床、流行病学、诊断、防治等方面的详细观察，积累了很丰富的资料。现已鉴别出金葡菌肠毒素有A、B、C₁、C₂、C₃、D和E五个血清型，它们对人和动物的致病性既有共性，也各具特点。中毒性休克毒素已鉴定出一种(TSST-1)，其致病的有关问题已基本阐明。

对部分毒素的基因已克隆并表达成功，DNA序列已定出，各型毒素单克隆抗体亦均有研制报道。这些都为进一步研究毒素的致病机理和防治措施创造了有利条件。

现已发现，在一般金葡菌感染中，同时伴有肠毒素或TSST-1产生就占50%以上，而在耐药性金葡菌感染中，约80%伴有毒素产生。它们在这些不同类型感染中的作用，尚有待深入研究。

葡萄球菌毒素不仅作为人和动物的常见病原有很重要的意义，而且近年来发现，它们还是非常有价值的工具药物，可以作

为淋巴细胞的促有丝分裂原，能够刺激淋巴细胞产生白介素、干扰素和肿瘤坏死因子等，其作用远较内毒素、刀豆蛋白A等为强，这对分子免疫学和抗感染及肿瘤的研究均有很重要的意义。

有关葡萄球菌毒素的研究我国起步较晚，70年代初我们实验室才开始在国内首先生产A、B、C和D型肠毒素，并由此带动了一些单位在实验室诊断、治疗等方面开展了研究，取得了一定的成绩，但总体水平还不高，和国际先进水平有较大的差距，急需全国同行协力同心，将我国葡萄球菌毒素的研究和应用水平迅速提高。为此，出版一本较系统地介绍葡萄球菌毒素及其所致疾病的基本知识和国内外研究进展的专著是十分必要的。雷祚荣副研究员是国内较早从事葡萄球菌毒素研究的学者之一，有近20年的系统实践经验，又在国际葡萄球菌毒素权威专家M. Bergdoll教授直接指导下从事过一年多的访问研究，对国际上的进展比较熟悉，收集的资料也比较丰富。她的这本书，既总结了自己的经验，也反映了葡萄球菌毒素和有关疾病的发展概貌，以及她对国内外该研究领域进展和动向的认识。此书的出版，相信对发展我国细菌毒素学的研究和应用，对葡萄球菌肠毒素食物中毒和中毒性休克综合症的防治必将起到积极的促进作用。

黄 策

1991年10月10日于北京

编 者 的 话

金葡菌肠毒素食物中毒是个世界性卫生问题，几乎所有国家都爆发这样的食物中毒。在美国和加拿大等国家，金葡菌肠毒素引起的食物中毒占整个细菌性食物中毒的50%，我国每年发生的这种食物中毒不计其数，尤其在春夏季多见。金葡菌肠毒素能够污染多种食品，例如：牛奶、酱肉、米饭、鱼类、粉皮和熟鸡等，污染的原因多是由于食品制造者带菌，食品运输和贮藏不当等。金葡菌食物中毒起病急，没有有效治疗方法，往往造成大批人群中毒，影响劳动生产力，并带来严重的卫生学问题。

金葡菌也是医院和公共场所的主要病原之一。近来美国疾病控制中心报告，在引起医院获得性感染中，金葡菌占据第二位，仅次于大肠杆菌。它们造成脓毒症、创伤感染，还能入侵皮肤和粘膜的微小裂口，进入血液，在其中繁殖，引起心内膜炎、脓肿广泛转移及内毒素休克等。金葡菌是对人类最有破坏性的病原之一，其致病性的一个主要因素是能够产生多种毒素。

此外，人们还发现，金葡菌肠毒素还是一个极好的免疫调节剂和高效的细胞因子诱导剂。对这些方面的深入研究，必将促进免疫学的发展，也为疑难病症的治疗开辟一条新路。

我们在金葡菌肠毒素领域的工作，虽然不如国外开展得早和时间长，但在国内是最早进行研究的单位之一。在近20年的实践中，为了适应国内的需要，我们先后将实验室使用过的方法和技术以及积累的文献资料整理为讲义、手册等供学习班使用，也曾广泛散发到许多有关单位使用。这次在原有资料的基础上，重新编写，不仅增添了新的部分，而且也增加了这一领域目前最新的进展。

先后在我们实验室工作过和对该项工作做出贡献的有马贤

凯、姚忠诺、肖定华、韩澄沅、曲丽云、王鲁明、陈钰、严共华、姜结根、郑玉玲、刘爱云和梁克为等同志，在此向他们致谢。在本书编写过程中，还得到吴厚永、黄策教授的大力支持，宋欣明同志帮助打字，特此感谢。特别要提出的是，中华流行病学杂志编辑部张宝安主任为本书顺利出版给予热情支持，多方联系，精心指导，在此表示衷心感谢。

限于作者水平和本书编写时时间仓促，缺点错误在所难免，因此真诚地希望广大读者提出批评和建议。

雷祚荣

1991年11月24日于北京

目 录

第一篇 葡萄球菌肠毒素

1. 历史回顾

葡萄球菌毒素的发现.....	1
金葡菌各型肠毒素的发现.....	3
金葡菌肠毒素的命名问题.....	4

2. 金葡菌毒素病的特征

临床症状.....	6
临床诊断.....	7
治疗.....	8
中毒机理.....	9

3. 流行病学

发病率.....	12
微生物来源.....	13
金葡菌污染食品的途径.....	24
食物中毒的预防.....	25
肠毒素的免疫.....	27

4. 葡萄球菌的分类

种类.....	29
型别.....	31

5. 葡萄球菌的鉴定

属的鉴定.....	36
种的鉴定.....	36

型的鉴定.....	37
其他鉴定方法.....	37
葡萄球菌的形态学.....	40
致病性.....	43
 6. 影响金葡菌生长和产毒因素	
实验条件.....	45
实验培养基产毒试验.....	49
 7. 肠毒素的提纯和鉴定	
亲和层析法提纯A、B型肠毒素.....	58
等电点聚焦法提纯SEB.....	61
离子交换和羟基磷灰石层析提纯SEA.....	63
离子交换纤维素层析和葡聚糖凝胶过滤提纯SEC ₁ 和SEC ₂	65
离子交换层析凝胶过滤五步程序提纯SEC ₃	67
层析等电聚焦技术提纯金葡菌D型肠毒素.....	69
染料配位体亲和层析法提纯A型肠毒素.....	74
 8. 金葡菌肠毒素的特性	
肠毒素的物理化学性质.....	77
各型肠毒素的氨基酸序列分析.....	79
肠毒素的稳定性.....	84
肠毒素活性中心问题.....	85
金葡菌肠毒素的结构.....	87
C ₁ 型肠毒素羧基末端的生物学和免疫学性质.....	88
 9. 葡萄球菌肠毒素免疫血清制备	
制备免疫血清条件.....	95
SEA和SEB抗血清的制备.....	97
SEC ₁ 抗血清制备.....	99
抗-SEC ₂ 血清制备.....	102

抗-SED血清制备.....	103
肠毒素各型间的交叉反应.....	104
 10. 肠毒素单克隆抗体制备	
制备肠毒素单克隆抗体的杂交瘤技术.....	110
肠毒素单克隆抗体特征和交叉反应.....	111
对肠毒素共同决定基的抗体.....	114
单克隆抗体和多克隆抗体的比较.....	116
单克隆抗体用于结构研究.....	117
结语.....	117
 11. 葡萄球菌肠毒素的检测	
生物学试验方法.....	119
葡萄球菌肠毒素的血清学试验.....	120
基因探针的研究.....	132
 12. 食品中葡萄球菌肠毒素的检测	
食品中肠毒素的提取和浓缩.....	141
检测食品中肠毒素的快速方法.....	142
 13. 金黄色葡萄球菌肠毒素分子遗传学研究	
A型肠毒素的分子遗传学研究.....	148
B型肠毒素的分子遗传学研究.....	152
C ₁ 型肠毒素的分子遗传学研究.....	155
C ₃ 型肠毒素的分子遗传学研究.....	159
D型肠毒素的分子遗传学研究.....	160
E型肠毒素的分子遗传学研究.....	163
基因探针研究.....	164
结语.....	166
 14. 葡萄球菌肠毒素的生物学活性	

肠毒素和TSST-1的免疫调节作用	169
TSST-1、SEA、SEB和SEC对兔脾细胞的结合力	173
TSST-1和肠毒素诱导白介素-1产生	175
金葡菌肠毒素和TSST-1刺激人、鼠淋巴细胞产生IL-2	177
葡萄球菌肠毒素和TSST-1刺激人淋巴细胞产生 γ -干扰素	179
TSST-1、肠毒素刺激人淋巴细胞分泌肿瘤坏死因子	179

15. 金葡菌肠毒素及其相关毒素研究的新进展

肠毒素及相关毒素的结构	184
毒素与MHC II型分子的结合	187
毒素通过V _H 刺激T细胞	189
小鼠对毒素的内源性表达	191
细菌毒素的致病性分析	193
细菌与宿主的相互关系	194

第二篇 金葡菌中毒性休克综合征和中毒性休克毒素

1. 历史问题

.....	197
-------	-----

2. 中毒性休克综合征的流行病学

流行病学调查	199
地理分布	199
暂时下降趋势	200
性别、人种和年龄	200
月经状况	201
TSS流行病学研究新进展	201
TSS的危险因子	202
中毒性休克综合征在各国的发现	205

3. TSS临床表现和诊断

.....208

4. 中毒性休克综合征的治疗

评价与监测.....209

预期疗法.....209

5. 中毒性休克综合征的病原学

噬菌体型.....215

对重金属盐和抗生素抗性.....215

溶血和蛋白分解活性.....216

对动物的致死性.....216

TSST-1和其它葡萄球菌毒素关系.....217

与TSS有关金葡菌的遗传型特征.....219

TSST-1附属基因调控.....219

金葡菌以外微生物在引起TSS的作用.....220

6. TSS病人及健康人血清抗-TSST-1抗体水平调查

急性期和恢复期TSS病人抗-TSST-1滴度.....222

不同年代和不同年龄人群血清抗体滴度.....223

病人及健康人携带产毒金葡菌及抗TSST-1抗体水平调查.....224

病人及健康人血清中含抗-肠毒素及抗TSST-1抗体滴度分析

.....227

7. 致病机理研究

金葡菌产物的致病性.....231

其他微生物产物的致病性.....232

TSS发生的各种条件.....232

月经塞与TSS发病的关系.....234

产TSST-1金葡菌在阴道内生长产毒条件分析.....235

动物模型研究.....237

8. 金葡菌的生长和TSST-1的体外合成

气体流速对金葡菌生长和产毒影响	242
分解O ₂ 对金葡菌生长和产毒影响	243
CO ₂ 对金葡菌产毒和生长的影响	244
肉汤培养基和人工月经对金葡菌生长和产毒影响的比较	245
阴道菌丛对金葡菌生长和产毒影响	246
人工月经对金葡菌生长和产毒影响	246

9. TSST-1的提纯及其物理化学和免疫学性质

提纯程序	252
TSST-1的生物化学等性质	253
“F”型肠毒素和热原性外毒素(PEC)一致性研究	258
TSST-1的生物学活性	259

10. TSST-1结构和功能分析

在体外用木瓜酶消化TSST-1	264
溴化氰处理TSST-1	266

11. TSST-1免疫血清的制备

多克隆抗血清制备	267
TSST-1单克隆抗体研究	267
TSST-1的抗原性和免疫保护问题	273

12. TSST-1的检测

双向免疫琼脂扩散	275
等电点聚焦法	276
Western blotting检测法	276
反向乳胶凝集试验(RPLA)	277
酶联免疫吸附试验(ELISA)	278
菌落免疫印迹试验	280
基因探针检测	282

Southern 杂交试验	285
---------------------	-----

13. TSST-1 分子遗传学研究

生物型同 TSST-1 表达关系	289
TSS-1 的遗传学成分	290
TSST-1 基因由一变异遗传性成分编码	291
TSST-1 基因核苷酸序列分析	295
TSST-1 表达调控	295

14. TSST-1 研究的回顾及展望

人类存在的 TSST-1 抗体的研究	297
人和动物来源株产 TSST-1 的分析	297
人奶和牛奶中存在 TSST-1 抗体可能性	298
TSST-1 和 TSS 预防的某些研究设想	299
今后工作中需要解决的问题	300

第一篇 葡萄球菌肠毒素

1. 历史回顾

葡萄球菌毒素的发现

葡萄球菌所产生的多种胞外蛋白质，大多数对人和动物组织有害。胞外蛋白质包括各种酶类，如脂酶、脱氧核糖核酸酶、蛋白酶和凝固酶。另一组为毒素，它们是 α 、 β 、 γ 、 δ -溶血素、溶白细胞素、表皮松解素、肠毒素（A、B、Cs、D、E和TSST-1）及化脓性毒素等。

早在19世纪初就发现葡萄球菌除菌滤液有致死性、坏死性和溶血性等，但是经过了30年，才明确知道存在几种不同形式的毒素（表1.1）。较早弄清的是 α -溶血素，其溶解兔红血球的能力极强：能溶解羊红血球的称做 β -溶血素，该命名沿用至今。随后 γ -溶血素和 δ -溶血素相继发现。本世纪初才发现表皮松解素。

30年代由于葡萄球菌毒素方面报告的混乱和相互矛盾，以致这方面的工作没有受到重视。直至在澳大利亚邦达伯格发生一起21名儿童在白喉免疫过程中12人死亡的悲剧事件，查明是白喉菌苗污染了葡萄球菌所产生的毒素所致，此后才对葡萄球菌可产生强毒力外毒素的问题不再发生疑问，相信葡萄球菌可引起毒素病。也设想和白喉一样可用免疫保护。用 α -溶血素进行了被动免疫和类毒素主动免疫疗效的观察，结果只能对实验动物的致死性攻击保护几天。由于40年代抗生素使用的巨大成功，使得对这方面工作的兴趣大大下降。

50年代末这一工作的开展，主要由葡萄球菌对青霉素的抗性

及医院脓毒症继发问题而引起。不同实验室对不同种类毒素进行了提纯和理化性质的研究。这一时期的研究主要是采用生物化学技术,对毒素的生物学意义了解不多。到70年代中,毒素的物理化学和生物学性质都得到重视,并进行了多方面的研究,积累了丰富的资料。

表1.1

葡萄球菌各种毒素的发现者及年代

毒素种类	发现者和年代
α -溶血素	Burnet(1930)
肠毒素	Dack(1930)
溶白细胞素	Panton 等(1932)
β -溶血素	Glenny 等(1935)
γ -溶血素	Smith 等(1958)
δ -溶血素	Williams 等(1947)
表皮松解素	Ka Prall 等(1971)
TSST-1	Bergdoll 等(1981)

金黄色葡萄球菌(简称金葡菌)食物中毒的最早观察没有记录,但1930年就有这种病的记载。金葡菌与食物中毒的关系是Vaugnan等1884年首次说明的。Barber(1914)是金葡菌食物中毒与其产生的毒性物质确切关系的第一个研究者,他发现喝不冷藏的牛奶生病是由于牛奶中金葡菌生长产生的毒性物质所致。这个极好发现被忽视,以致把这类食物中毒归结到其他病原体。例如,第一次世界大战期间德军有2000名士兵由金葡菌引起的食物中毒被认为是变形杆菌引起的。

Dack(1929)对两个圣诞蛋糕的经典工作,发现金葡菌在食物中的中毒作用。一起引起11人中毒的两个三层奶油夹心蛋糕,由蛋糕里分离出的金葡菌产生的毒性物质也同样使志愿者发病,其症状同食蛋糕者,这就是金葡菌食物中毒研究的真正开始。从1930~1948年,很多人各自从不同角度研究Dack等人的工作。特

别是1948年前后,美国食品和药物实验室的Casman和食品研究所的Surgalla及Bergdoll开始了对这一课题的多方面研究。

金葡萄各型肠毒素的发现

1. A型原型株196E(ATCC) 1940年美国食品药品署(FDA)从一份14人中毒的火腿里分离出的196变异株;100号株1932年由一次中毒蛋糕中分离出;还有产毒高的13N—2909人工变异株。1966年化学提纯。
2. B型原型株243(TACC) 系1954年从一名患“急性非特异性腹泻”儿童分离出, S—6株从整块冻大虾中分离出。1965年提纯。
3. C型原型株137(ATCC 19095) 产C1型肠毒素,系1933年从芝加哥大学医院一名腿脓肿患者伤口中分出;361(Casman 239)产C2型肠毒素,1962年从英国一次熟鸡中毒中分出;FR1913产C3型肠毒素,由英国公共卫生实验室Gilbert分离出。Bergdoll实验室在1984年提纯和鉴定。
4. D型原型株494(ATCC 23235) 由1964年华盛顿150名小学生中毒的火鸡色拉里分出;315株系1963年一家六口中毒熟火鸡中分离;293株1962年英国航空站食堂乘客中毒火鸡中分出。1967年鉴定,1978年提纯。
5. E型原型株FR1326, 1960年芝加哥卫生局由一次食物中毒中分出。1971年鉴定,1972年提纯。
6. F型株FR1184, 1981年从中毒性休克综合征病人分离,产类似肠毒素蛋白质,与已知肠毒素血清型不同,最初试验它能引起猴呕吐,因此定名为F型毒素。后来发现F型毒素致病临床症状和肠毒素不同。1984年在美国威斯康辛大学召开的金葡萄中毒性休克综合征(TSS)专题讨论会上,将F型肠毒素正式定名叫中毒性休克毒素1(TSST-1),称TSST-1的意思是推断可能会发现TSST-1的类似物。

金葡萄肠毒素的命名问题

Surgalla和Bergdoll等(1953~1960)观察到金葡萄菌不只一个血清型。起初将产肠毒素的根据其来源分为两种:一为肠炎源性,另一为食物中毒菌株。Casman(1960)建议将肠炎源性菌株(S—6)所产肠毒素用字母“E”代表;食物中毒分离株用“F”表示。后来发现肠源性菌株S—6既产生“E”也产“F”型毒素。Fujiwara(1961)在对5株食物中毒分离菌的试验中发现,它们产“E”和“F”两型毒素,因此无法区别它们是肠炎源性或食物中毒株。1962年在美国堪萨斯城召开的美国62届微生物学年会上,与会者中有21人对金葡萄肠毒素的命名问题产生浓厚兴趣,自动集合在一起,讨论并确定了肠毒素的命名原则和系统。如果用 α 、 β 、 γ ...等命名,这就很容易与其他细菌毒素相混淆,因而使用英文字母顺序大写分别代表不同型肠毒素;已称做“F”和“E”型的毒素正式定名为A及B型,陆续新发现的毒素分别命名为C、D和E型等,依次类推;亚型则在字母右下角标上阿拉伯数字例如C₁、C₂和C₃等。

主要参考文献

1. Freer JH, *et al.* 1983. *Pharmac Ther.* 19:55
2. Montie TC, *et al.* 1970. *Microbial Toxins Vol II*, Bacterial Protein Toxins. 189. Academic Press, New York
3. Bergdoll MS. 1983. Enterotoxins. In *Staphylococci and Staphylococcal Infections Vol I*. Easmon, C and Adlam, C. (Eds). Academic Press
4. Bernheimer AW. 1974. *Biochem Biophys Acta.* 344:27
5. Coleman G, *et al.* 1975. *J Theor Biol.* 52:143
6. Jeljaszewicz J, *et al.* 1976. *Staphylococci and Staphylococcal Disease.* 517 Suppl. 5. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

-
7. Cohen JO. 1972. *Staphylococci*. 250. Wiley, New York
 8. Kapral FA. 1974. *Staphylococcus aureus*: Some host-parasite interactions. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 236:267
 9. Falmagne P, *et al.* 1986. *Bacterial Protein Toxins*. 141. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart