

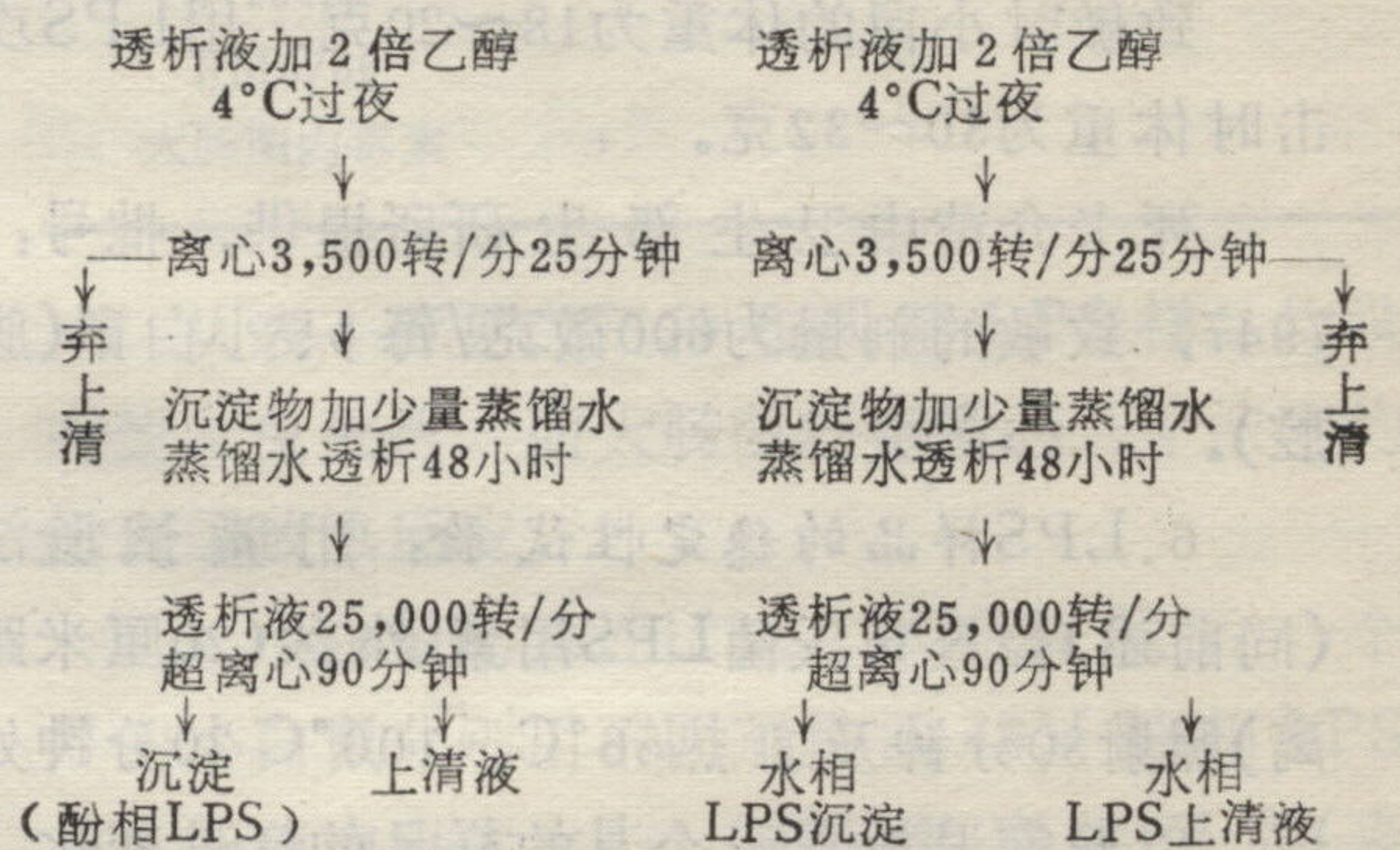
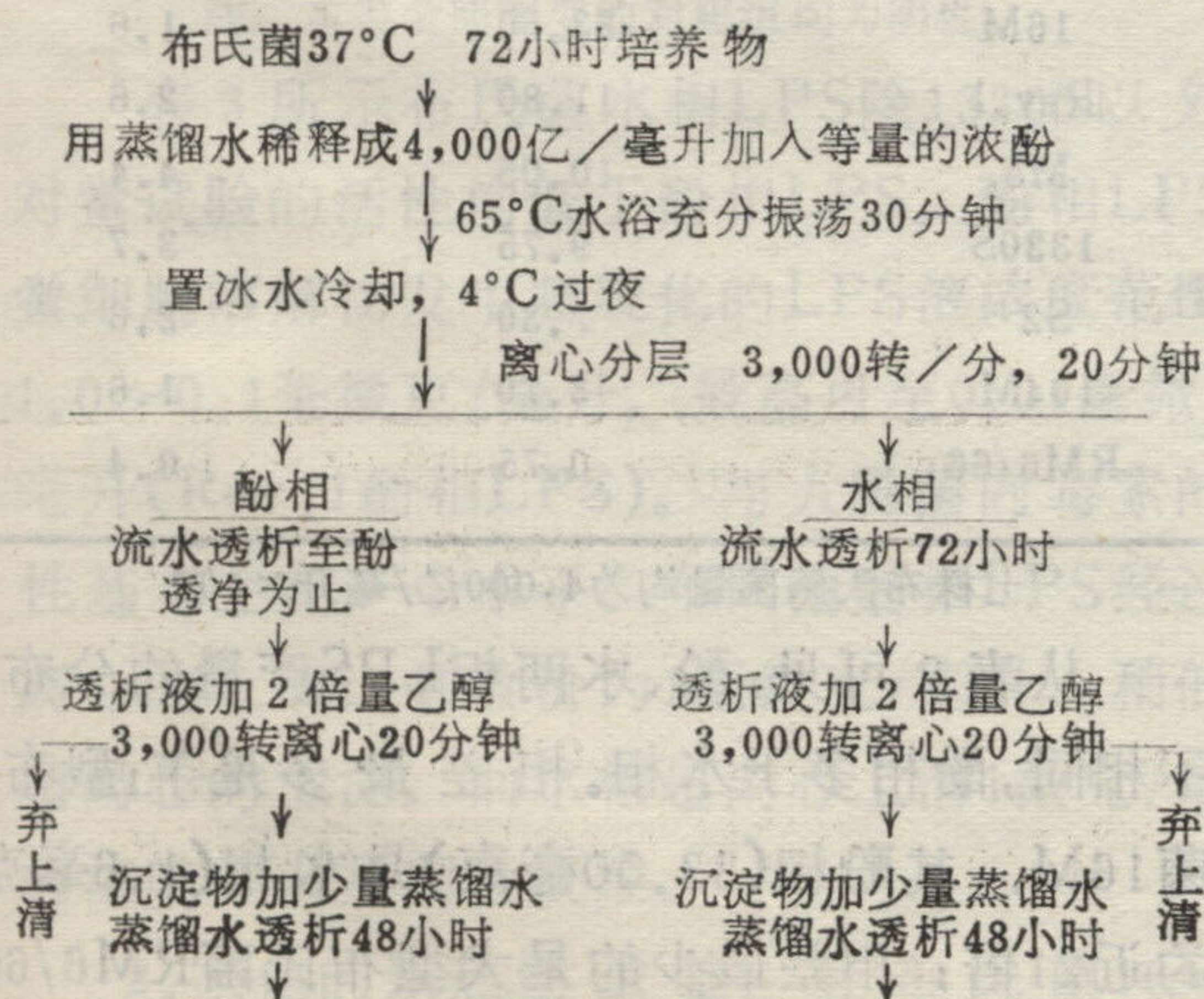
# 不同型别布氏菌内毒素含量及某些特性的初步试验观察

中国医学科学院流行病学微生物学研究所 王景宏

许多革兰氏阴性细菌的细胞壁中都含有复杂的糖类、类脂、蛋白及类似多肽分子的复合物，这些脂多糖蛋白复合物(LPS)称为细菌的内毒素<sup>[1]</sup>。而目前布氏菌内毒素的研究虽不同于肠道细菌，但很多问题还不清楚<sup>[2~4]</sup>。国内尚未见报导。为了探讨各型布氏菌LPS的含量与菌型、毒力的关系，我们采用了westphal热酚法<sup>[5]</sup>，加以改进后提制了七株布氏菌不同组分的内毒素。测定了样品的化学成分及比较了不同菌型布氏菌酚相及水相LPS的含量和某些生物学活性特征。初步结果如下：

## 材料和方法

一、布氏菌株及LPS的提制方法：本所布氏菌病室冻干保存的布氏菌 ①羊<sub>1</sub>型 国际参考株16M, ②羊<sub>1</sub>型兽用菌苗株Rev.1, ③羊<sub>1</sub>型国内兽用菌苗株M<sub>5</sub>, ④猪<sub>1</sub>型国际参考株1330S, ⑤猪<sub>1</sub>型国内兽用菌苗株S<sub>2</sub>, ⑥牛<sub>1</sub>型人用菌苗株M104, ⑦犬型(粗糙型)国际参考株PM6/66。将上述七个菌株分别打开, 37°C培养于肝琼脂斜面, 用第二代48小时培养物转种克氏瓶, 用72小时培养物提制LPS。工艺流程如下：



将各菌株不同组分的LPS样品, 冷冻干燥后, 用万分之一精确度的电分析天平, 分别称取其干重, 并定量分装后, 备测其化学成分及生物学活性。

二、布氏菌LPS样品的化学成分及生物学活性的测定：

1. 样品粗化学成分：①总磷量的测定：参照Subbarow法<sup>[6]</sup>；②总己糖量的测定：参照Scott法<sup>[7]</sup>；③蛋白量测定：参照Loworg法<sup>[8]</sup>，由本所生化组协作完成。

2. 红外吸收光谱：对布氏菌不同组分的LPS进行了红外光谱吸收鉴定<sup>[9]</sup>(由卫生部药品生物制品检定所协助)，同时用WHO内毒素参考品红外光谱图(卫生部药品检定所提供)及自制的大肠菌(O<sub>55</sub>B<sub>5</sub>)内毒素的红外吸收图谱进行对照。

3. 用鲎试验法检测布氏菌LPS样品的凝固活性：鲎试验均采用试管法<sup>[10]</sup>，同时用大肠菌内毒素做对照试验；所用鲎细胞溶解物均为自制的791-2。其活性可使0.1毫微克/毫升的大肠菌内毒素发生阳性反应。

4. 家兔热源质试验：按“卫生部生物制品制造检定规程”对布氏菌LPS做了家兔热源质试验；同时与大肠菌内毒素(79-1)进行了对比；由

北京生物制品研究所动物室供应做热源试验的家兔；按升温 $0.6^{\circ}\text{C}$ 者为阳性反应<sup>[11]</sup>。

5. 小白鼠的毒性试验：用死卡介苗致敏一个月的小白鼠<sup>[12,13]</sup>，腹腔注射不同剂量的布氏菌LPS(16M酚相)及大肠菌79-1内毒素，分别观察其出现的不同症状及最后结果(死亡或恢复原状)。

致敏时小鼠的体重为18~20克，用LPS攻击时体重为30~32克。

死卡介苗由卫生部生研所提供，批号：7947，致敏的剂量为600微克/每只小白鼠(腹腔)。

6. LPS样品的稳定性试验：用鲎试验法(同前述)检查布氏菌LPS用紫外线(20厘米距离)照射30分钟及加热 $56^{\circ}\text{C}$ 、 $100^{\circ}\text{C}$  30分钟处理，以及室温放置三个月的样品的活性变化。

## 结 果

### 一、布氏菌LPS样品的化学成分：

1. LPS样品中蛋白、磷及己糖的测定结果见表1。

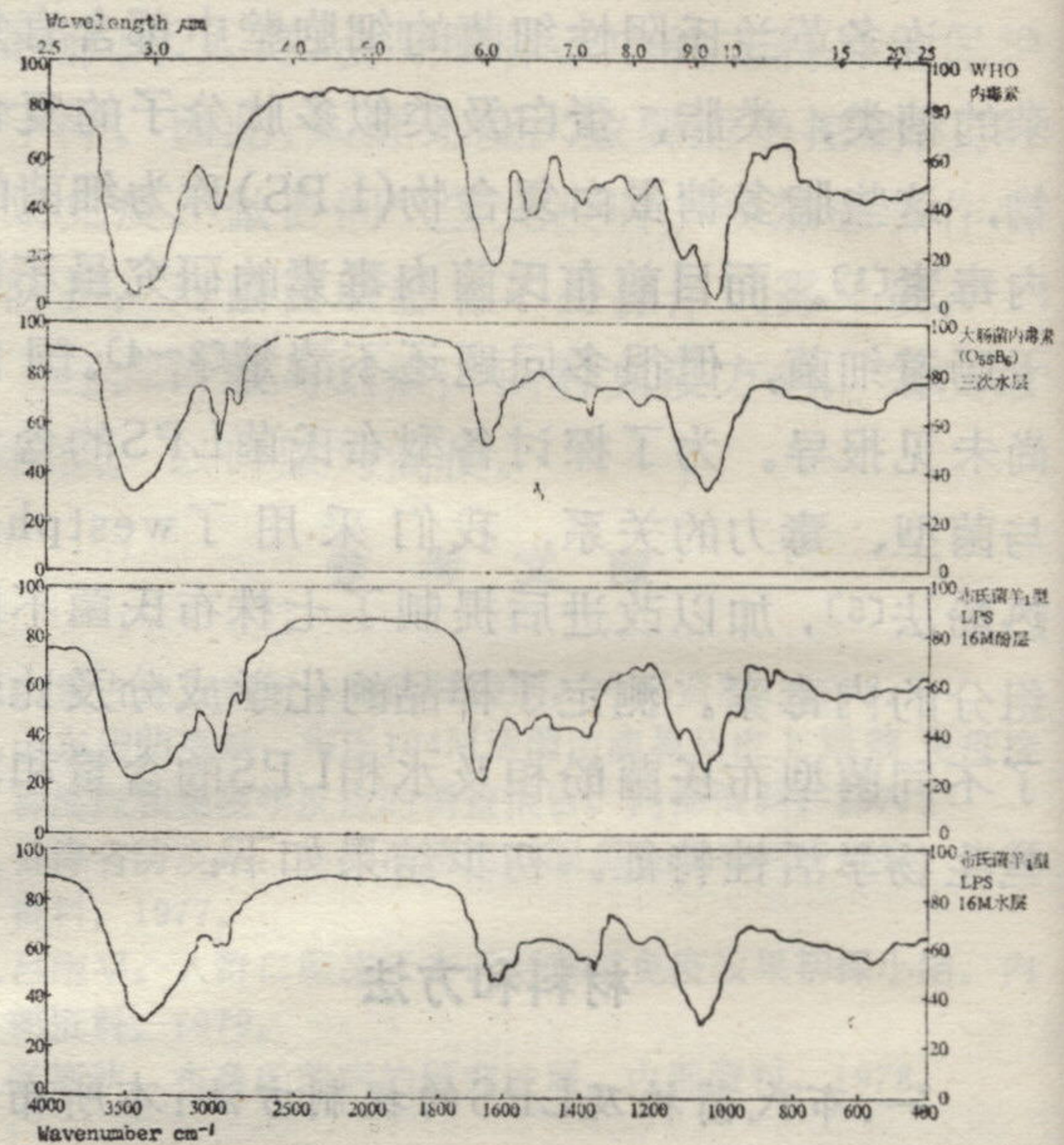
表1 布氏菌LPS样品的蛋白、磷及糖的含量(微克/100微克)

组分	LPS样品	蛋白	磷	糖
酚相	16M	23	1.6	15.6
	Rev.1	8	1.2	20.2
	M5	10	2.1	14.4
	1330S	6.5	0.8	9.6
	S2	20	2.5	18.4
	104M	11	1.6	13.6
水相	Rev.1	8	1.2	20.2
	M5	20	2.5	18.4
	1330S	15	1.6	22
	104M	3	0.8	54.6

表1表明，提制的各LPS样品无论酚相还是水相，均有一定量的蛋白、磷及糖的成分。但以糖的比重为多，次为蛋白，磷较少。

2. LPS样品的红外吸收光谱图：从红外吸收光谱图所见，WHO内毒素样品和大肠菌( $O_{55}B_5$ )热酚法三次水相提取的内毒素及布氏

菌羊<sub>1</sub>型(16M株)热酚法的酚相及水相提取物均有五个基本相同的吸收峰；其位置分别为： $3,400\text{cm}^{-1}$ 相当于-OH基团； $2,900\text{cm}^{-1}$ 相当于-CH<sub>2</sub>基团的吸收， $1,650\text{cm}^{-1}$ 相当于C=O的吸收； $1,380\text{cm}^{-1}$ 相当于-CH<sub>3</sub>的存在； $1,080\text{cm}^{-1}$ 相当于-OH的吸收峰<sup>[15]</sup>。可见被测样品均为多糖、类脂、蛋白复合物(附图)。



附图 各种内毒素样品红外吸收光谱图

### 二、布氏菌内毒素的含量与型别的关系：

用热酚法提制的各型布氏菌酚、水两相的LPS产量见表2。

表2 七株布氏菌两相的LPS产量

菌 株	LPS产量(毫克)	
	酚相	水相
16M	33.50	1.6
Rev.1	11.80	2.6
M5	10.05	4.4
1330S	9.75	3.7
S2	7.30	2.6
104M	3.70	1.6
RM6/66	0.75	0.4

七株布氏菌菌量均为4,000亿/毫升 $\times 100$

从表2可见，酚、水两相LPS产量的分布极不相同，酚相多于水相。相差最多是羊<sub>1</sub>型布氏菌16M，其酚相(33.50毫克)是水相(1.6毫克)的近21倍；相差最少的是犬型布氏菌RM6/66。

而且明显看出酚相中羊<sub>1</sub>型菌LPS最多,猪型菌次之,牛型菌为第三,犬型菌(粗糙型)为最低;又看出羊型菌中16M最高,其次是Rev.1, M<sub>5</sub>最少;而猪型菌中1330S多于菌苗株S<sub>2</sub>。

### 三、布氏菌LPS样品的某些生物学活性试验:

1.用鲎试验法检测各种LPS的活性,结果见表3。

表3 各种布氏菌LPS样品的鲎试验结果

组 分	样 品	LPS浓度(毫微克/毫升)					
		100	10	1	0.1	0.01	0.001
酚 相	16M	#	#	++	+	—	—
	Rev.1	#	#	#	#	++	—
	M <sub>5</sub>	#	#	++	—	—	—
	1330S	#	#	#	++	—	—
	S <sub>2</sub>	#	#	++	—	—	—
	104M	#	#	+	—	—	—
水 相	16M	#	+	—	—	—	—
	Rev.1	##	—	—	—	—	—
	M <sub>5</sub>	#	—	—	—	—	—
	1330S	#	#	#	#	++	—
	S <sub>2</sub>	#	##	—	—	—	—
	104M	#	+	—	—	—	—
酚 上 清	16M	#	#	#	—	—	—
	104M	#	#	##	—	—	—
	犬	#	#	++	#	—	—
水 上 清	16M	—	—	—	—	—	—
	104M	—	—	—	—	—	—
	大肠菌内毒素	#	#	#	++	—	—

注:本表全部菌型的对照组均为阴性。

表3所示布氏菌水相LPS除1330S以外,对鲎试验的活性均低于酚相LPS。酚相LPS使鲎细胞溶解物发生凝胶化的LPS液浓度范围在1.0~0.1毫微克/毫升,最高可至0.01毫微克/毫升(Rev.1酚相LPS)。与大肠菌内毒素的活性基本上在一个水平。布氏菌酚相LPS经过超离心的上清,其效价为1毫微克/毫升,稍低于超离心的沉淀。而水相超离心上清1微克/毫升的浓度亦未见阳性反应。

2.家兔的致热性试验:对布氏菌16M、

104M、RM6/66酚相LPS及大肠菌内毒素所做的家兔法致热试验,结果见表4。

表4 几种LPS的家兔致热性试验结果

样 品	LPS浓度(毫微克/公斤体重)		
	100	10	5
16M	—	—	—
104M	—	—	—
RM6/66	—	—	—
大肠菌内毒素	+	+	+

从表4可见,三种布氏菌LPS样品均没有使家兔致热,而大肠菌内毒素的三个浓度均出现了致热反应。

3.小白鼠的毒性试验:BCG致敏后一个月的小白鼠分别用不同剂量的16M酚相LPS及大肠菌内毒素攻击,观察其毒性反应(表5)。

表5 BCG致敏一个月的小白鼠对LPS的毒性反应

组 别	剂 量 (毫克)	症状反应			结 果
		松毛	弓腰	便稀	
布氏菌16M	1.8	+	+	—	恢复
酚相LPS	2.4	+	+	—	"
	3.0	+	+	—	"
大肠菌内毒素	0.1	+	+	+	死亡
	0.2	+	+	+	"
	0.3	+	+	+	"

从表5看出三种剂量的布氏菌16M酚相LPS可使致敏的小白鼠出现无腹泻性的松毛、弓腰等症状,但几天后均恢复健康;而大肠菌内毒素0.1毫克/只即可使小白鼠发生各种症状,24小时内致死。

### 讨 论

一、本试验初步表明,用热酚法提制的各型(七株)布氏菌LPS主要存在于酚相中,而水相的含量较低。相差最多的是布氏菌16M,其酚相(33.5毫克)是水相(1.6毫克)的20.93倍。与国外所报导的布氏菌LPS主要在于酚相,而

肠道菌存在于水相的结论是相似的<sup>[3~5]</sup>。

二、酚相中，羊型菌的LPS含量最高，第二是猪型菌，第三为牛型菌，最少的是犬型（粗糙型）。羊型菌中以国际标准羊<sub>1</sub>型菌株16M的LPS为最多（表2），其次是羊<sub>1</sub>型兽用菌苗株Rev.1，最少为国内羊<sub>1</sub>型兽用菌苗株M<sub>5</sub>。猪型菌中标准猪<sub>1</sub>型1330S多于兽用菌苗株S<sub>2</sub>。人用牛<sub>1</sub>型菌苗株104M的LPS含量均少于上述菌株；犬型RM6/66的含量最少。七株布氏菌LPS含量的排列顺序由多至少是16M、Rev.1、M<sub>5</sub>、1330S、S<sub>2</sub>、104M、RM6/66。说明羊型菌对人的毒力最强，其次是猪型，第三是牛型，最后是粗糙型的排列基本相一致（1330S例外）。因此，似乎看出LPS含量与菌型及毒力有一定关系。这是值得深入研究的课题；从而也提示我们，在选育布氏菌苗及制备人用各种布氏菌生物制品中，应考虑到内毒素的含量问题。

三、本试验结果说明布氏菌LPS对鲎细胞溶解物是敏感的。而布氏菌LPS对家兔没有出现致热反应，对于小白鼠的毒性亦是最低的。不同于肠道菌内毒素。这与Renoux<sup>[5]</sup>、Joues<sup>[3]</sup>、Dohald<sup>[4]</sup>所报导的结果相似。

用鲎试验法与各型布氏菌的酚相LPS的凝

固活性在1.0~0.1毫微克/毫升范围内（表3），与大肠菌内毒素的活性相近。而布氏菌水相的鲎试验活性是很低的（1330S水相LPS除外）。更说明大部分布氏菌LPS的含量及活性均在酚相中为高。猪型布氏菌1330S水相LPS对鲎试验活性突出高于其它，其原因还不能确定，但看到其水相比酚相中磷含量多一倍，而其它菌的LPS磷含量相差则不明显，是否由此所致，尚待研究。

本文系初步试验，仅供参考。

### 参 考 文 献

1. 谢彦博：免疫学问题，第11—34页，吉林医大，1963。
2. Joues LM et al: International Symposium on Brucellosis, p. 62-67, 1976.
3. kreutzer DL et al: Infect Immunity, 23(3): 811, 1979.
4. Renoux G et al: J Infect Dis, 127: 139, 1973.
5. Westphal O et al: Z Naturforsch, 76: 148, 1952.
6. Fiske CH et al: J Biol Chem, 66: 375, 1925.
7. Scott TA et al: Anal Chem, 26: 875, 1954.
8. Lowrg OH et al: J Biol Chem, 193: 265, 1951.
9. 凌大奎：药检工作通讯，9(2): 99, 1979.
10. 王景宏等：流行病学杂志，1(3): 180, 1980.
11. 卫生部颁发：《生物制品制造检定规程》，1958.
12. Barlow JL: Bacterial Endotoxins, P 448, Rutgers Univ Press, 1964.
13. Shingawa M et al: Infect Immunity, 5: 12, 1972.

## 注射人用狂犬病疫苗引起神经系统并发症调查

广东省东莞县防疫站 李海军

1980年6月东莞县发生狂犬病流行。疫情发生后，县防疫站对被狂犬咬伤以及有感染危险的4,563人分别注射地鼠肾组织培养的人用狂犬病疫苗（1,853人）和Semple氏人用狂犬病疫苗（2,710人）。结果表明，前一种疫苗无异常反应，而后一种疫苗注射后有13例（0.48%）发生神经系统异常反应，其中死亡3人（23.1%）。其反应发生在20岁以上年龄组比较高；最短发生于注射后第5天，最长为全程注射后

15天；9例在注射疫苗的期间内发生，4例发生于全程注射结束后；以针次计，最短为注射后第5针，最长为21针；出现异常反应的13例所用疫苗分别来自广东、兰州、武汉三个生物制品研究所，反应率分别为0.46%（8/1756）、0.54%（3/553）、0.50%（2/401）。13例异常反应中，脑脊髓炎型1例，背脊髓炎型7例，脑膜脑炎型3例，周围神经炎型2例。