

# 布氏菌内毒素的类脂A抗血清制备

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所 杨莲芬 程尧章 姜顺求

布氏菌内毒素(或称脂多糖)和其他革兰氏阴性菌的内毒素一样,是细菌细胞壁外膜结构的主要构成成分<sup>[1]</sup>。内毒素是脂多糖-蛋白质-类脂(或称磷脂)的复合物<sup>[1~3]</sup>。类脂A是内毒素构成成分之一,某些研究者特别强调类脂A的生物学作用,认为在内毒素复合物中类脂A具有热原性和毒性作用<sup>[3]</sup>。我们为了检测布氏菌感染和患病机体内的毒性物质,用家兔制备了抗类脂A血清。现将试验方法介绍如下。

## 材料和方法

### 一、菌株与试剂:

1. 菌株: 羊种16M菌和牛种104M菌48小时培养物。

### 2. 试剂:

①乙酸: 分析纯,北京化工厂出品,批号790807。

②鲎细胞溶解物: 批号810831,由流研所诊断室提供。

③辣根过氧化物酶标记的葡萄球菌甲蛋白,由流研所诊断室提供。

### 二、布氏菌内毒素类脂A抗血清的制备方法:

1. 布氏菌株16M内毒素的提取及生物学活性的测定: 用热酚水法提取16M菌的内毒素<sup>[1,4]</sup>。以鲎试验测定提取物的凝胶活性<sup>[5]</sup>,按常规法测定对小鼠的半数致死量(LD<sub>50</sub>)<sup>[6,7]</sup>以及提取物的化学成分。

2. 16M菌内毒素类脂A的提取<sup>[8]</sup>: 首先将16M菌内毒素酚相提取物进行高速离心(35000转/分)2小时,这样可得三层物质,将其中层胶状物冻干。然后称取一定量的干粉按0.5%

比例加入1%的乙酸,此混合物在100℃水浴中水解2小时后,以6000转/分离心1小时,去上清,沉淀物用无菌蒸馏水洗两次,真空干燥,即得游离的类脂A。

用同法制备104M菌的酸水解产物。

3. 利用家兔制备抗类脂A血清<sup>[8]</sup>:

### ①免疫方法:

a. 类脂A与104M菌酸水解产物以1:2混合,按后者1.5毫克用无菌蒸馏水1毫升稀释,再加入等量的不完全佐剂,并研磨制成乳化液,以此1毫升于背部皮下多点注入。

b. 类脂A 0.5毫克/毫升与等量不完全佐剂混合,以此1毫升乳化液按a法注入。

c. 类脂A 0.5毫克从耳静脉注入。

对照组: 104M菌酸水解产物以2毫克/毫升稀释,按a法皮下注入。104M菌10亿/毫升死菌液,用1毫升从耳静脉注入。

### ②加强注射:

a和b组注射后30天, c组注射后10和20天各以原法加强注射1或2次。

③各组自第一次注射后间隔一定时间(约5~6天)从耳静脉采血,分离血清。用酶联免疫吸附试验(ELISA)、试管凝集试验(SA.T)和半胱氨酸凝集试验(CYT)测定抗体效价

④放血时间: 各组于末次加强注射后15~20天放血。

⑤抗类脂A血清的吸收<sup>[9]</sup>: 试验组和对照组血清用16M菌按1:3(1份菌加3份血清)混匀,然后置37℃温箱中3小时作用后,以4000转/分离心30分钟,其上清液即为吸收后的抗类脂A血清。

## 结 果

一、16M菌内毒素的生物学活性：利用小鼠测定16M菌内毒素的毒性表明，酚相制品的毒性(LD<sub>50</sub>为0.1~0.7毫克)明显高于水相制品(LD<sub>50</sub>为2.0~2.65毫克)，而且前者反应明显重于后者。

用蜚试验检查内毒素的凝胶活性，酚相制品的活性终点(0.1~0.01毫微克/毫升)比水相制品的终点(1~10毫微克/毫升)低。类脂A的活性终点为10毫微克/毫升。

内毒素的化学成分测定，酚相制品含糖量(16微克/100微克)比蛋白量(9.6微克/100微克)高。而水相则相反，蛋白量达43.7微克/100微克，糖含量甚微。而类脂A主要为磷脂。

### 二、抗类脂A血清效价的测定及其动态观

察：结果(表1)表明，三种免疫方法即类脂A+布氏菌酸水解产物+不完全佐剂和类脂A+不完全佐剂皮下注射；类脂A直接静注都能使家兔产生抗类脂A抗体。用ELISA试验测定其效价，一般在第一次注射后7~15天即能查到低滴度的抗体(1:20~1:160)，以后逐渐上升。于加强注射后7~21天滴度为最高(1:2560~1:5120)，平均持续10天后开始下降。

用SAT, CFT检查抗类脂A血清，抗血清与布氏菌颗粒性抗原也能产生凝集，滴度一般在1:20~1:320之间。个别可达1:640。表明用类脂A免疫的家兔，既能产生抗类脂A的抗体，也能产生抗布氏菌细胞的抗体。

三、抗类脂A血清经布氏菌细胞吸收后抗体效价的变化：从表2可以看出，抗类脂A血清经吸收后，用ELISA试验检查其效价无变

表 1 用ELISA试验检查抗类脂A血清的结果①

血清号	注射制剂	注入途径	采血时间(第一次注射后天数)										
			7	12~15	19~21	26~31	33~37	41~42	51~53	58~62	66~68	73~75	79
III3	类脂A + 佐剂②	皮下	—	80	160	640	1280 (2)	2560 (7)	2560 (16)	640 (23)	640 (31)	640 (38)	
IV2	类脂A + 佐剂	皮下	40	160	640	640	640	1280 (9)	2560 (21)	2560 (30)	1280 (36)	640 (43)	
III5	类脂A	静脉	—	40	320	640	1280 (8)	2560 (13)	640 (22)	640 (39)	640 (47)	320 (54)	
IV5	类脂A	静脉	0	160	320	1280 (3)	1280 (10)	5120 (18)	5120 (30)	2560 (35)			
IV1	类脂A + 菌 + 佐剂	皮下	20	80	320	640	640	1280 (9)	5120 (21)	10240 (30)	20480 (36)	10240 (43)	5120 (47)

注：①表中数据为所测效价的倒数；括号内数字为末次加强注射后天数；“—”为未做。②不完全佐剂；

表 2 抗类脂A血清用布氏菌细胞吸收后血清效价的变化①

血清号	注射制剂	注射途径	ELISA试验		SAT		CYT	
			吸收前	吸收后	吸收前	吸收后	吸收前	吸收后
III1	类脂A + 佐剂②	皮下	2560	2560	320	<5	80	<5
III4	类脂A + 佐剂	皮下	320	320	30	<5	20	<5
IV5	类脂A	静脉	2560	2560	160	<5	20	<5
II1	类脂A + 菌③ + 佐剂	皮下	2560	2560	80	<5	80	5
II2	类脂A + 菌 + 佐剂	皮下	1280	1280	320	20	160	20
IV4	菌 + 佐剂	皮下	20480	2560	10240	40	3200	40
IV6	死菌④	静脉	2560	160	320	10	320	10

注：①表中数据为所测效价的倒数；②不完全佐剂；③104M酸水解产物；④104M菌死菌液。

化,用SAT和CFT检查则效价明显下降,而对  
照组血清经吸收后,用上述三种试验检查,其  
效价均较吸收前有明显下降。表明用ELISA试  
验尚能鉴别抗类脂A及抗布氏菌细胞的抗体。

### 摘 要

应用精制后的16M菌内毒素酚相制品经乙酸水解  
制备了类脂A。经类脂A与布氏菌酸水解产物、不完  
全佐剂以及类脂A与不完全佐剂皮下注射和类脂A直  
接静脉注射三种方法免疫家兔制备了抗类脂A血清。  
其中静脉注射法较好。

以酶联免疫吸附试验、试管凝集试验和半胱氨酸  
凝集试验检查了免疫血清的效价。抗类脂A血清经用  
布氏菌细胞吸收后,用ELISA试验检查抗体效价不  
变,而SAT和CYT所测效价明显下降。表明用类脂  
A免疫家兔不仅产生了抗类脂A的抗体,也产生了抗  
布氏菌细胞的抗体。

### ABSTRACT

An acetic acid hydrolytic preparation of bruce-

lla lipid A was obtained from Br. melitensis  
16M endotoxin. The lipid A extract could be ma-  
de use of in preparing antisera by way of intrav-  
enous immunization or subcutaneous injection cor-  
porated with incomplete Freund's adjuvant in ra-  
bbits. When such antisera were absorbed by bruc-  
ella cells, we found no drop in titre by means of  
ELISA test against lipid A antigen. This means  
the lipid A preparation contains very little cell  
surface antigen.

### 参 考 文 献

1. 阎泰东译:微生物学免疫学译刊,兰州生物制品研究所出  
版,第13页,1980。
2. 李良寿等译:免疫学基础,人卫,第22页,1962。
3. 谢少文主编:免疫学问题,吉林医科大学出版,第11页,  
第19页,1963。
4. Renoux G: J Infect Dis, 127(2): 139, 1973.
5. Berman DT: 国际布氏菌病讨论会会议录, 62-67,  
1976.
6. Lois M et al: Infect Immun, 13(4-6): 1639, 1976.
7. Baker J et al: J Bact, 90(4-6): 895, 1965.
8. Galanos C et al: Eur J Biochem, 24(1): 116, 1971.
9. Gones LM et al: Infect Immun, 31(1): 214, 1981.

## 渔民血吸虫病潜在污染指数调查

安徽贵池县血防站

钟读敏 王多先

为摸清本县湖沼地区血吸虫病流行因素,1981年  
夏,我们调查了秋浦河流动渔民血吸虫病感染情况,  
并用虫卵定量计数结果,推算潜在污染指数及其流行  
病学意义。

1. 感染率:收集73人新鲜粪便,发现血吸虫卵阳  
性者52人,感染率为71.23%。其中男性阳性率为  
75.61% (31/41),女性为65.63% (21/32),无  
明显差异。20~30岁青壮年感染率最高,达83.78%;  
年龄最小5岁,10岁以下儿童为66.67%;40岁以上  
因下水机会少,感染率下降,但仍在50%以上。

2. 克粪便虫卵数(EPG):52例病人虫卵计  
数,EPG最少10只,最多4,030只。其中10~100只  
22人,占42.3%;110~400只19人占36.5%;410~  
800只5人占9.6%;>800只6人占11.5% (>2000  
只3人)。400只以上重感染者11例,占病人总数

21.5%,包括19岁以下青少年8例,30岁组1人,  
61岁者1人,EPG几何均数为149.25只,以10岁以  
下为最高。

3. 一天排卵数(EPD):52例患者按EPG对数  
分组,计算虫卵总和,再乘以每天排粪量(按平均  
250克计),求出每天排卵总数达66,110,000只。其  
中1000只以上5人(9.61%),但排卵数占病人总数  
21.47%,为100只以内轻感染者22例总和的一倍以  
上。

4. 潜在感染指数(IPC):按湖南省寄研所拟定  
的潜在污染指数公式计算,总污染指数为11087.46,  
以20岁组最高,IPC达4617.21。

以上结果提示,今后必须加强对渔民的粪管和查  
治。