

自生牛肉分离的一株 E 型肉毒梭菌

王荫椿 吴永义 王成怀

(兰州生物制品研究所, 兰州)

我们曾于 1966 年 4 月, 检查了一份可疑的在我国某高原地区引起食物中毒的生牛肉, 并从中分离到一株 E 型肉毒梭菌。

1. 被检的生牛肉系经过冬藏并有部分腐烂的现象, 每克约含 1,000 小白鼠致死量的 E 型肉毒毒素。

2. 从该生牛肉分离的一株厌氧性梭状芽孢杆菌, 经细菌学和毒素血清学实验, 鉴定为 E 型肉毒梭菌, 编号为 E66418。

3. 本文指出, E 型肉毒中毒及该菌的生态分布并不一定都同海洋有关。

据资料记载, E 型肉毒梭菌的第一株菌是本世纪 30 年代中期分离和定型的^[1,2]。此后, 相继在许多国家和地区分离到此菌, 表明其分布是相当广泛的。但在我国, 迄今尚未看到有关发现 E 型肉毒梭菌的报道。1966 年我们得到我国某高原地区的一份食物中毒可疑食品——生牛肉, 经过检查和分离得到一株 E 型肉毒梭菌, 编号为 E 66418。

材料与方法

一、原始材料(生牛肉)的处理

取中毒患者食剩的生牛肉之腐烂严重部分若干量, 每克加明胶缓冲液 10 毫升, 研磨、冷浸、离心沉淀。取上清液进行毒素检验, 取沉渣进行增菌培养和细菌分离。

二、培养方法

增菌采用半固体培养基(牛肉胰酶消化液与肉浸液等量混合, 加明胶 0.4%、琼脂 0.1% 及葡萄糖 0.5%, 液面盖加凡士林 0.5—1.0 厘米厚), 30℃ 或 34—35℃ 培养。

分离采用蔡司勒氏(Zeissler)血平板(1% 葡萄糖琼脂, 加脱纤维血 10—20%), 以焦性没食子酸与无水碳酸钠混合物为吸氧剂, 30℃ 培养

3—4 天。

产毒采用猪肚消化液加肉浸液培养基(含微量的生长因子, 以糊精为碳源), 30℃ 培养 5 天。

糖发酵试验采用肉汤培养基(肉浸液加胨 1%、硫乙醇酸钠 0.2% 及供试糖 1%), 以 0.1% 溴甲酚紫为指示剂, 30℃ 培养, 观察 7 天。

三、芽孢耐热试验

用产芽孢培养基(酪素胰酶水解液含胨 0.5%、硫酸镁 0.02% 及氯化锰 0.02%) 在 30℃ 下培养 48 小时, 接种增菌用培养基, 按不同时间于 80℃ 下加热, 冷却后 30℃ 培养, 观察 7 天。

四、毒素灭活试验

取毒素液在沸水中加热 20 分钟, 立即冷却, 接种于 14—16 克小白鼠腹腔内, 每只 0.5 毫升, 观察动物反应情况, 连续 4 天。

五、毒素抗毒素中和试验

小白鼠法 取毒素液与已知型单价肉毒抗毒素定量混合, 在 37℃ 下结合 45 分钟, 接种于 14—16 克小白鼠腹腔内, 每只 0.5 毫升, 观察 4 天。

豚鼠法 事先给豚鼠皮下注射已知型肉毒抗毒素, 然后以掺加毒素液的普通饲料饲喂之, 对其观察 4 天。

本文 1973 年 5 月 14 日收到。

六、毒素激活试验

基本上按达夫 (Duff) 等人^[3]的方法进行, 毒素液加胰蛋白酶 0.5%, pH 6.0 左右, 37℃ 放 30 分钟, 测定毒素活力。

七、毒素“前体” (precursor) 提取试验

参照北村 (Kitamura) 等人^[4]的方法, 以离心沉淀采集胰酶水解酪素培养基 30℃、44 小时培养的菌体, 用 pH 5.0 的 M/20 醋酸盐缓冲液洗涤 2 次, 以除净游离毒素。将洗涤菌体悬于 pH 6.0 的 M/5 磷酸盐缓冲液, 置 37℃ 2 小时, 于 4—6℃ 下冷浸过夜, 以提取菌体内的毒素“前体”。取其离心上清液, 进行毒素活力测定与激活试验。

八、毒性活力测定

用 pH 6.5—6.8 的 0.2% 明胶磷酸盐缓冲液稀释毒素, 每一稀释度腹腔注射 14—16 克小白鼠 2 只, 各 0.5 毫升, 观察 4 天, 判定结果。

实验结果

一、对生牛肉的初步检查结果

取生牛肉浸液的上清液 8 毫升饲喂健康豚鼠, 经 24 小时后动物呈现典型的肉毒中毒麻痹症状, 即瘫软、蜂腰、腹式呼吸, 30 小时死于呼吸麻痹。用 E 型肉毒抗毒素给予被动免疫的豚鼠得到完全保护。

分别用 A、B、C、D、E 五个型的肉毒抗毒素所作的小白鼠中和试验结果表明, 生牛肉浸液中所含的毒素只能被 E 型抗毒素中和。

浸液的毒性活力为每毫升 1,000 小白鼠致死量, 但经煮沸 20 分钟完全灭活。

用生牛肉浸液离心沉渣进行产毒培养试验, 结果指出, 培养液中含有只能为 E 型肉毒抗毒素中和的毒素, 其毒性活力为每毫升 10,000—16,000 小白鼠致死量, 煮沸 20 分钟即灭活。

据此, 经过反复分离培养, 获得了一株疑为 E 型肉毒梭菌, 编号为 E 66418。

二、菌株 (E66418) 的生物学特性

(一) 产生 E 型肉毒毒素 本菌在猪

肚消化液培养基中所产毒素能被已知的 E 型肉毒抗毒素完全特异中和, 煮沸 20 分钟灭活, 毒性活力可达每毫升 8,000—20,000 小白鼠致死量。

(二) 形态特征 本菌在蔡司勒氏 (Zeissler) 血琼脂平板上形成大小不一的乳白色叶状菌落, 表面隆起, 边缘不规则, 其周围有完全溶血现象。在半固体培养基与液体培养基中生长良好, 产气较多, 菌体易于沉聚。菌体为粗长杆状, 稍微弯曲, 两端半圆。芽孢为卵圆形, 宽于菌体, 偏端。常呈短链, 具多形态性。新鲜菌体革兰氏染色为阳性。

(三) 芽孢抗性 本菌在产芽孢培养基上所形成的芽孢, 经 80℃ 加热 60 分钟左右仍可培养生长。

(四) 生理生化特性 本菌分解葡萄糖、麦芽糖、山梨糖醇、甘油、糊精、甘露糖, 不分解果糖、半乳糖、水杨苷, 侧金盏糖醇分解不明显。不消化卵白, 不液化明胶。

三、毒素性质

(一) 类毒素化 E 66418 株的除菌毒素液, 加入福尔马林 0.4%, 在 37℃ 下放置 10 天即能脱毒, 变为类毒素。用此类毒素给 2 组各 2 只健康家兔反复注射, 所得 2 批免疫血清的抗毒效价分别为每毫升中和本菌毒素 13,000 及 14,500 小白鼠致死量。

(二) 抗原性 取我们实验室保存的 E 型肉毒梭菌 No. 153 株 (此株系苏联于 1936 年自亚速海鱼所分离) 的毒素及抗毒素各 1 批, 与 E 66418 株的毒素 1 批及抗毒素 2 批, 相互交叉地进行了定量中和试验。结果指出, 两菌株的抗毒素均能中和异株的一定量毒素, 但其中和价比同株毒素低。

(三) 胰蛋白酶激活 本菌株在培养基中自然产生的毒素经胰蛋白酶作用后, 其毒性活力可增强 4.5—5.0 倍。由洗涤菌

两菌株的毒素抗毒素中和价交叉测定结果
(每毫升血清中和毒素的小白鼠致死量数)

抗毒素 (菌株及批号)	E 66418 (3603)	E 66418 (3605)	No. 153 (64— 10—2)
毒素 (菌株)			
E 66418	13,000	14,500	11,000
No. 153	1,650	1,000	25,000

注: 将毒素稀释至每毫升含 1,000 小白鼠致死量, 取 1 毫升与不同稀释度的血清 1 毫升及缓冲液 3 毫升混合, 37℃ 结合 45 分钟, 腹腔注射 14—16 克小白鼠 0.5 毫升, 观察 4 天, 判定结果, 计算中和价。

体提取的毒素“前体”溶液仍具有毒性, 其活力约等于培养母液的 1/15, 但经胰蛋白酶作用后可增强 250 倍, 而且仍能被 E 型肉毒抗毒素中和, 经煮沸 15 分钟灭活。

讨 论

根据几方面的实验结果, 主要是毒素血清学试验, 确定所分离的 E66418 株为 E 型肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum* type E)。

肉毒梭菌的每一新型的发现, 其主要根据都是毒素血清学反应。以毒素抗毒素中和反应试验进行肉毒梭菌的鉴别定型, 可算是一种简便易行的可靠方法。分离株 E66418 的毒素培养液、由洗涤菌体提取的毒素“前体”溶液, 以及它们的胰蛋白酶激活液, 都能特异地被已知的 E 型肉毒抗毒素所中和, 据此将该株鉴定为 E 型肉毒梭菌是没有什么困难的。我们在毒素抗毒素中和价交叉测定试验中发现, 不论分离株

E66418 或参考株 No. 153 的抗毒素, 中和同株的毒素量(指毒性活力)都远比中和异株的为多。此现象可以认为是毒素抗毒素的亲合力在菌株之间的差异。事实上, 这种差异在同一菌株不同批的毒素或抗毒素之间也是常有的, 因而并不妨碍判断 E66418 与 No. 153 二菌株的毒素抗原性是共同的。

许多报道和资料一致指出, 世界各地发生的 E 型肉毒中毒的特点是, 第一, 引起中毒的媒介食品都是海产物, 主要是鱼类, 也有鲸鱼、海豹之类的海洋哺乳动物; 其次, E 型肉毒中毒基本上都是发生在北半球 40 度左右和以北的沿海地区^[5]。另一方面, 许多实验室分别进行的生态分布调查的结果也指出, 从海产物或海砂海泥中分离 E 型肉毒梭菌的阳性率是相当高的。于是, 就自然而然地把 E 型肉毒中毒同海洋联系起来, 提出了“海洋论”。而本文报道的 E66418 株是从同海洋没有任何地理关系的高原地区的生牛肉中分离出来的, 这同迄今的有关论点都是不同的。

参 考 资 料

- [1] Gunninson J. B. et al.: *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **35**:278, 1936.
- [2] Hazen E. L.: *Science*, **87**: 413, 1938.
- [3] Duff F. T. et al.: *J. Bact.*, **72**: 455, 1956.
- [4] Kitamura M. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, **163**: 207, 1968.
- [5] Dolman C. E. et al.: *J. Infect. Dis.*, **109**: 107, 1961.

A STRAIN OF *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYPE E ISOLATED FROM RAW BEEF

WANG YIN-CHUN, WU YONG-YI AND WANG CHENG-HUAI

(Lanchow Serum & Vaccine Institute)

A strain of *Clostridium botulinum* was isolated from some raw beef which had been suspected as the source of an outbreak of human food poisoning on April, 1966, in a plateau area of China.

This strain (E66418) was identified as *Cl. botulinum* type E in accordance with its bacteriological, serological and toxinic characteristics.

Each gram of the suspected raw beef, which was partially decomposed with a foul odor, contained about 1,000 lethal

doses for mice of type E botulinal toxin confirmed by neutralization test with known antitoxin.

From the epidemiological and ecological points of view, it appears that the incidence of type E botulism and the distribution of the type E organisms may not necessarily always follow the established idea of close association with marine nature such as fish or marine mammals.