

葡萄球菌类毒素的研究

黑龙江省应用微生物研究所免疫室

(哈尔滨)

葡萄球菌类毒素生产菌株 S155, 在血清学分型中, 属于 Oeding 分类法第 IV 型。其中含有 a、b、c、ac、e、h、i、k 八种抗原型因子, 具有产毒力高, 致病性强等特点, 本菌的外毒素中含有 α -溶血素和杀白血毒素。

S155 菌株于自制的培养基中, 在 37℃ 下, 通入 20% CO₂, 液体振荡培养 18 小时, 产毒最高。将制得的外毒素, 经福尔马林解毒后, 用氯化钠盐析法, 提纯精制而成类毒素。实验证明, 葡萄球菌类毒素, 系主要由两种抗原物质组成, 注入机体后, 体液免疫起主要作用, 同时也有细胞免疫功能。

葡萄球菌(*Staphylococcus*)系于 1879 年由 Koch 氏发现, 两年后由 Pasteur 培养成功。经过长期研究, 证明征服葡萄球菌感染的问题远没有结束。流行病学的观察结果也指出, 在化脓性感染的病原菌中, 葡萄球菌占首位。随着临床上大量使用抗菌素, 致使耐药性菌株不断增多, 从医院检出的葡萄球菌中, 有 95% 为耐药菌株^[1-4]。因此, 在防治葡萄球菌感染上, 单纯使用抗菌药物往往收不到理想的效果。

为此, 我们从提高机体的特异性和非特异性的防御作用, 应用免疫学方法, 研制成功了葡萄球菌类毒素。经千余例的临床观察, 证明本制品在控制葡萄球菌引起的感染性疾患, 如疔肿, 多发性疔肿、疖、骨髓炎等疗效显著, 有效率为 80% 以上。本文报告了葡萄球菌类毒素的提取和精制及其生物学和免疫化学性质的研究结果。

金黄色葡萄球菌 S155

菌株的生物学特征

从临床上分离的 342 株金黄色葡萄球菌, 从中选出发酵甘露醇, 血浆凝固酶阳性, 产毒力高的 S155 菌株作为生产菌种。

一、形态特征

呈单细胞, 球形或葡萄状, 直径 0.6—0.8 微米, 不运动, 无芽孢, 革兰氏阳性。

二、培养特征

在普通肉汤培养基中, 均匀混浊, 有淡黄色环, 管底有沉淀; 在普通琼脂平板上, 呈圆形菌落, 直径为 2.5—3.0 毫米, 菌落边缘整齐, 表面圆凸, 湿润光滑, 不透明, 产生蛋黄色色素; 在血液琼脂平板上, 菌落形态与颜色同普通琼脂平板, 产生明显的溶血圈。

在含 10% 氯化钠的高盐培养基上生长旺盛, 产生蛋黄色色素。

本菌为好气, 兼性厌氧, 生长温度范围 13—45℃, 最适生长温度 36—37℃, 生长的 pH 值范围 6.5—8.5, 最适生长 pH 为 7.5, 在含有 15% NaCl 培养基中能够生长。

三、生理生化特性

本菌能使石蕊牛奶凝固、产酸, 能使明

本文于 1977 年 8 月 4 日收到。

胶液化,凝固酶阳性,淀粉反应阳性,能还原硝酸盐,发酵葡萄糖、乳糖、蔗糖、甘露醇和甘油,不能使淀粉水解,不能发酵菊糖和棉子糖。

四、菌株毒力和对药物的敏感性

本菌经过培养可同时产生两种外毒素: α -溶血素(溶血效价为1:1024)和杀白血球素(效价为1:256),而且具有产毒力高的特性,在血清学分型中,属于 Oeding^[5] 分类法的第 IV 型,其中含有 ac、a、b、c、e、h、

i、k 等八种抗原因子。

本菌对链霉素、氯霉素、合霉素、红霉素、新霉素、卡那霉素、庆大霉素和强力霉素极敏感,对土霉素中度敏感,对四环素和金霉素轻度敏感,对青霉素和磺胺抗药。

葡萄球菌类毒素的制备

一、培养条件对产毒的影响^[6]

(一) 适宜培养基的选择

我们选用六种培养基和一种自制培养基,分别接种 S155,于一定时间测定毒素效价,结果见表 1。

表 1 七种培养基产毒的比较

培养基种类	毒 素 稀 释 倍 数									
	原液	2	4	8	16	32	64	128	256	512
葡萄糖肉汤	++++	++++	++++	+++	+	-	-	-	-	-
Burnet 培养基	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	-	-	-
牛肉玉米浆	++++	++++	++++	++++	+++	-	-	-	-	-
脑心肌浸液	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-	-
脑心肌甘露醇	++++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
溶链“0”生产培养基	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	-
自制培养基*	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	-

注 “++++”完全溶血;“+++”大部溶血;“++”50% 溶血;“+”部分溶血;“-”不溶血(下同)。

* 葡萄糖 2 克, NaCl 5 克, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3 克, K_2HPO_4 2.5 克, 牛肉浸液或胎盘浸液 700 毫升, 胰酶胎盘消化浸液或胰酶牛肉消化浸液 300 毫升, 活性炭 2 克, pH 7.5。

表 2 培养温度对产毒效价的影响

温 度 (°C)	毒 素 稀 释 倍 数									
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
28	++++	++++	++++	++++	++++	++++	-	-	-	-
37	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	-	-

从表 1 看出,自制培养基产毒效价最高,因此即采用该培养基进行试验,其中胰酶胎盘消化液浓度为 30%,蛋白胨(北京产) 1.8%,蛋白胨胨(育出产) 0.2%。

(二) 培养温度

进行了 28°C 和 37°C 条件下产毒试验,结果以 37°C 培养,产毒效价较高(见表 2)。为 1:512。

(三) 培养时间

在 37°C 摇床上振荡(180 次/分)培养 9、12、

14、16、18、19 小时进行产毒比较试验,以 14—19 小时产毒效价较高(见表 3)。为 1:128。

(四) 通气量

在培养过程中,空气中 CO_2 的含量对产毒效价有一定影响^[6]。以不同量的 CO_2 和空气混合通入,结果以通气量为 20% CO_2 和 80% 空气之比,产毒效价最高(见表 4)。为 1:2048。

表 3 不同培养时间对产毒效价的影响

时 间 (小时)	毒 素 稀 释 倍 数								
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
9	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—
12	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—
14	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
16	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
18	++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	—	—
19	++++	++++	++++	++++	++++	……	+	—	—

表 4 摇床内 CO₂ 含量对产毒效价的影响

通 入 CO ₂ (%)	毒 素 稀 释 倍 数										
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048
5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	—	—
10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+
20	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
30	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	—

表 5 pH 值对产毒效价的影响

pH	毒 素 稀 释 倍 数									
	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024
5.0	++++	++++	++++	++++	++++	++	+	—	—	—
5.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—
6.0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	—	—
6.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—
7.0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
7.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
8.0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
8.5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
9.0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++	—

(五) pH 值

从表 5 看出 pH 为 7.0—8.5 范围内,毒素效价都较高,可达 1:1024。

二 类毒素的提取和精制

(一) 几种提取精制方法的比较

分别选用细谷、宫田法^[7]、硫酸铵分级沉淀法、氯化钠盐析法进行了比较,结果以后两种方

法精制效价较高,可达 1:1024,为减少硫酸铵法操作复杂,采用了氯化钠盐析法。

(二) 氯化钠盐析法的最适 pH

采用不同 pH 值对类毒素的提取精制做了比较,氯化钠浓度为 15% 结果以 pH 为 3.0 时,效果较好(见表 6),为 1:1024。

表 6 pH 值对提取毒素效价的影响

pH	毒 素 溶 液 效 价						
	64	128	256	512	1024	2048	4096
2.5	++++	++++	+++	+	—	—	—
3.0	++++	++++	++++	++++	+++	+	—
3.5	++++	+++	+	—	—	—	—

(三) 葡萄球菌类毒素的制备

将斜面培养好的种子, 接入装培养液的摇瓶中, 37℃ 摇床通 20% CO₂ 培养 18 小时后, 得到葡萄球菌外毒素。除菌滤过, 取上清调 pH 为 8.0, 加 0.4% 甲醛溶液, 放 37℃ 温箱中, 解毒至完全不溶血为止。将解毒好的液体加入 15% 氯化钠, 充分溶解后, 调 pH 为 3.0, 静止片刻, 离心, 沉淀用少许蒸馏水洗一次, 离心后其沉淀溶

于 pH 8.0 磷酸盐缓冲液中, 再离心后去掉杂质, 上清加防腐剂即得类毒素原液。

葡萄球菌类毒素抗原分析

葡萄球菌类毒素是一种蛋白质, 具有免疫原性^[9]。用琼脂扩散和免疫电泳进行抗原分析, 结果见图 1—3。



图 1 葡萄球菌类毒素免疫电泳

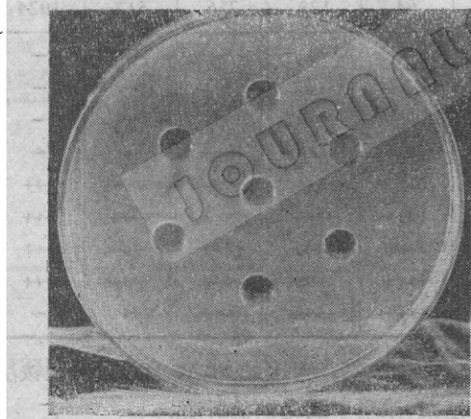


图 2 葡萄球菌类毒素琼脂扩散(平皿法)

葡萄球菌类毒素免疫电泳出现二条沉淀带, 一条较粗, 一条较细。

图 2 的中间孔为抗毒血清, 周围六孔为类毒素抗原不同稀释度, 明显看出二条沉淀线。

图 3 试管下段为抗毒素与等量的 2% 琼脂溶液、上段为抗原原液, 中段为 1% 琼脂生理盐水溶液, 明显看出二条沉淀带。

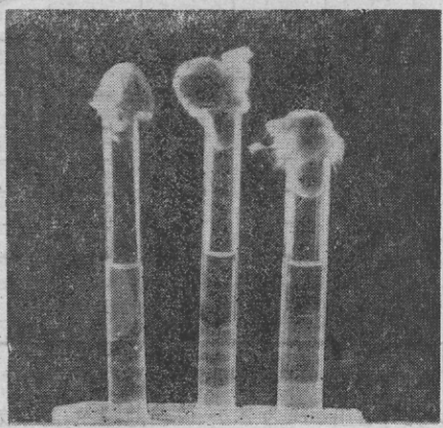


图 3 葡萄球菌类毒素琼脂扩散(试管法)

从上述免疫血清沉淀反应中, 明显看出有两条沉淀线, 说明葡萄球菌类毒素主要由两种蛋白抗原组成, 其一是类 α -溶血素, 另一条为类杀白血球素。

免疫力试验

(一) 豚鼠免疫力试验

选体重 250—300 克的健康豚鼠 4 只,

免疫前心脏采血,分离血清,然后每只豚鼠肌肉注射葡萄球菌类毒素3.0毫升,每天注射一次,共三次,于末次注射后一周采血。以中和试验测定免疫前后的血清抗毒素效价,结果看出葡萄球菌类毒素具有明显的免疫效果,可使豚鼠血清中抗毒素增高,免疫后比免疫前抗毒素几何平均滴度由 1:2 增高到 1:64,增长 32 倍。

(二) 家兔免疫力试验

取 2.5—3.0 公斤家兔,试验方法同豚鼠免疫力试验,结果见表 7。

表 7 免疫前后家兔血清抗毒素效价

家 兔 号	抗毒素效价(单位/毫升)	
	免 疫 前	免 疫 后
1	2	32
2	2	64
3	2	64
4	8	64
5	16	64
6	8	128
几何平均滴度	4.5	64
平均增长倍数	14	

从表中看出,葡萄球菌类毒素具有很好的免疫原性,可使家兔产生明显的相应抗体,免疫后抗毒素几何平均滴度由 1:4.5 升高到 1:64,增长 14 倍。

(三) 不同免疫剂量与抗毒素产生及其维持时间的关系

选 2.5 公斤的健康家兔 18 只,分为 6 组,第一、二、三组,每天注射一次,连续三次,第四、五、六组,同样连续注射三次后,间隔 7 日再连续注射三次,即分为二程注射。注射剂量为(1)组每次注射量 2 个单位,(2)组每次注射量为 5 个单位,(3)组每次注射量为 10 个单位,(4)组两程注射,每次剂量皆为 20 个单位,(5)组第一程每次注射剂量为 30 单位,第二程每次剂量为 10 个单位,(6)组两程的每次注射剂量皆为 30 个单位。每次免疫后间隔 5 天采血,于 83 天内共采血 16 次,同时进行抗毒素测定。测定方法分别用中和试验和间接血凝试验法(采用双醛化绵羊血球吸附抗原,常规法进行测定)。试验结果见图 4 和图 5。

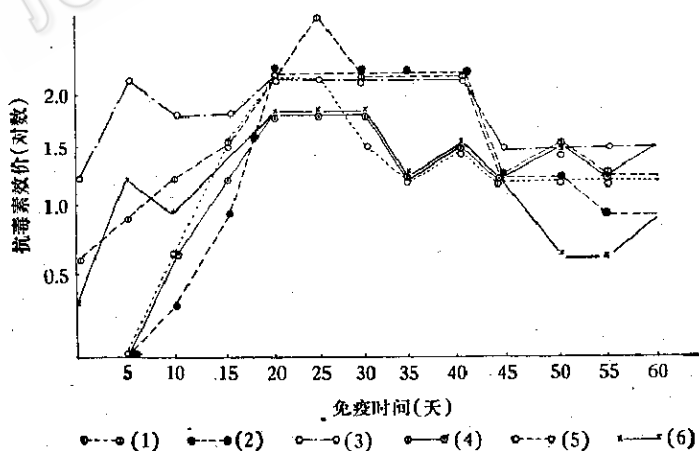


图 4 抗毒素消长曲线(中和试验法)

图 4 和 5 表明:动物免疫一周,抗体就开始上升,两周达到高峰,然后开始下降,个别动物抗体可维持 2 个月以上。大

部分动物仍高于免疫前的水平。间接血凝抗体上升较高,中和抗体上升较慢,最高为 1:256。

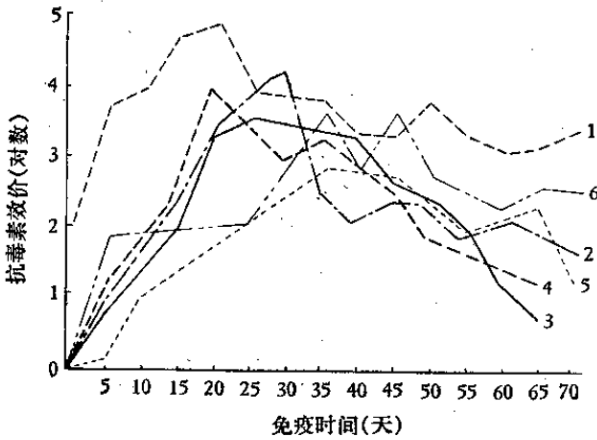


图5 抗毒素消长曲线(间接血凝法)

(四) 吸附类毒素的免疫力试验

吸附剂为每毫升3.7毫克的氢氧化铝。免疫健康家兔3只,三天一次,共十次,每次剂量为3.0毫升。用中和试验测定抗体,结果见图6。

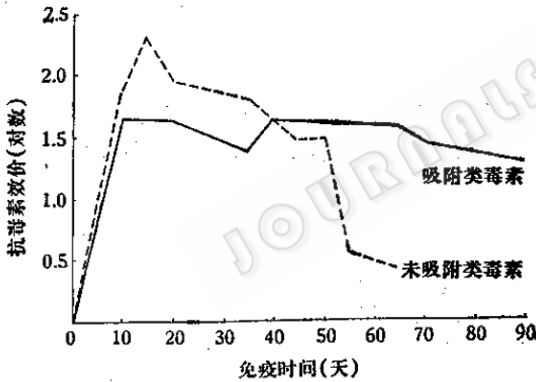


图6 加吸附剂与不加吸附剂的葡萄球菌类毒素免疫家兔后抗毒素消长曲线

从图6看出,加吸附剂与未加吸附剂的葡萄球菌类毒素免疫家兔,均可使其产生抗体,于免疫后两周左右,抗体达最高,然后开始下降,但加吸附剂的下降较慢、维持时间也较长,95天后抗体几何平均滴度为12.59,未加吸附剂的抗体下降较快,维持时间也较短,50天时抗体几何平均滴度为12.59。

(五) 细胞免疫的初步观察

仅就巨噬细胞移行抑制试验,结果如

下图。

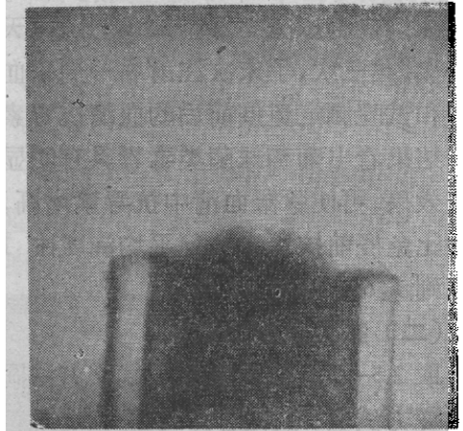


图7 免疫豚鼠细胞加抗原培养



图8 免疫豚鼠细胞不加抗原培养



图9 对照豚鼠细胞加抗原培养

上图表明,免疫豚鼠细胞加入葡萄球菌类毒素培养后,巨噬细胞的移动受到明显的抑制。



图 10 对照豚鼠细胞不加抗原培养

表 8 各组巨噬细胞移行面积重量(克)

免疫豚鼠 细胞加抗 原 培 养	免疫豚鼠 细胞不加 抗原培养	对照豚鼠 细胞加抗 原 培 养	对照豚鼠 细胞不加 抗原培养
0.1723	0.6873	0.7965	2.1048

巨噬细胞移行百分率 =

$$\frac{0.1723}{0.6873} \times 100\% = 25.1\% \text{ 或 } 0.251$$

从表 8 结果看出, 巨噬细胞移行百分率小于 0.6, 可以认为存在着细胞免疫作用。

此外, 我们进行了八百余例的临床疗效观察, 有效率达 80% 以上, 同时进行了小人群气雾治疗, 效果也较好。

讨 论

1. 从不同临床病人分离的 342 株金黄色葡萄球菌中, 经过筛选, 找到了制备葡萄球菌类毒素的优异菌株——金黄色葡萄球菌 S155。本菌具有对青霉素和磺胺药物耐药和产毒力高的特点, α -溶血毒素效价可达 1:2048。血清学分类上, 属于 Oeding 分类法的 IV 型, 含有 a、b、c、ac、e、h、i、k 八种抗原型因子。

2. 在葡萄球菌类毒素的提取和精制过程中, 发现不同培养条件对产毒的影响较

大。其中以培养基较为明显, 采用 30% 胰酶胎盘消化液, 1.8% 蛋白胨(北京产)加 0.2% 蛋白胨(青岛产)做产毒培养基时, 产毒效价最高, 为 1:2048。为减少制备过程中混入的异性蛋白对机体产生的变态反应, 我们采用了改良的人胎盘组织制成浸液和胰酶消化液作为产毒培养基, 效果最好。其次, 空气中 CO_2 的含量对产毒也有一定的影响, 以 20% 为适宜。在提取和精制方法上, 氯化钠盐析法最好。

3. 琼脂扩散试验和免疫电泳结果证明, 葡萄球菌类毒素可产生两条沉淀线, 呈均匀带状分布, 说明本抗原是由主要的两种蛋白质组成, 一条为类溶血素(以国际标准 α -抗毒素血清作了对比试验), 另一条为类杀白血球素(本菌株含杀白血球素)。

4. 通过抗体中和试验方法和间接血凝法, 测得的抗毒素消长曲线结果表明, 两者是一致的。

5. 巨噬细胞移行抑制试验结果表明, 葡萄球菌类毒素有刺激机体产生细胞免疫的功能。这种细胞免疫是以相应抗原激发网状内皮系统的单核细胞或巨噬细胞增生, 产生非特异性的细胞吞噬杀灭作用。从 800 余例葡萄球菌感染患者临床疗效来看, 效果显著。特别是对抗菌素具有耐药性的葡萄球菌感染的病人效果更好。

本研究证明, 葡萄球菌类毒素具有提高机体体液免疫和细胞免疫的功能, 是一种很好的抗葡萄球菌感染的制品。

参 考 资 料

- [1] Vourekha, A.: *J. Gen. Microbiol.*, 6: 352—360, 1952.
- [2] Abraham, E. P.: *Nature*, 158: 818—821, 1946.
- [3] Medermott, W.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 65: 58—66, 1956.
- [4] Reimann, H. A.: *Postgrad. Med.*, J51, 599: 600—610, 1975.

- [5] Oeding, P.: *Actapath. Microbiol. Scand.*, 41: 310, 1957.
- [6] Bernheimer, A. W.: *J. Gen. Microbiol.*, 30: 455, 1963.
- [7] 细谷省吾: 各科領域に於ける化膿性疾患の細

菌叢と免疫療法, 176—180, 1941.

- [8] 野沢昭: 日本細菌学雑誌, 26 (3), 79—90, 1971.
- [9] 村田良介ウ: タンパク毒素, 上, 講談社, 348—367, 1972.

STUDIES ON THE STAPHYLOCOCCAL TOXOID

Department of Immunology, Heilungkiang Institute of Applied Microbiology

(Harbin, Heilungkiang)

Staphylococcal toxoid producing strain S155, belongs to the serological group IV of Oeding. It has 8 different antigenic factors: a, b, c, ac, e, h, i and k. It is a highly virulent (1:2048) and pathogenic strain. The exotoxins produced by this bacterial strain are α -hemolysin and leucocidin.

When S155 is grown in cultural medium devised by ourself, at 37°C, aerated with 20% CO₂, on shaker for 18 hrs producing the most virulent culture. Exotoxins thus obtained was detoxified with formaldehyde, dialyzed with NaCl to obtain purified toxoid.

Staphylococcal toxoid is a protein. Through agar-diffusion and immunoelectrophoretic tests, 2 precipitin lines are visible, indicating that staphylococcal toxoid is composed of 2 different substances. Immunological tests indicate staphylococcal toxoid being a very good immunogenic substance. Immunized rabbit

produced highest antibody titer two weeks after. Neutralization assay for antibody titer is 1:256. Indirect hemagglutination test showed that the antibody titer has been raised to 100 thousand-fold higher than the original titer. Antibody level was maintained at this level for 2 months. Antitoxin antibody produced from toxoid possessing the potent to neutralize exotoxin.

Macrophage movement inhibition test showed staphylococcal toxoid possessing a cell involved immuno-function. Therefore, this antigen produces both body fluid immuno-function and stimulation of the host to develop a cellular immuno-function, thus protecting the tissue cells from toxic damage. More than 800 clinical observations were made, over 80% of them producing good results. And it seemed that it is in close relevance to the mechanism of this antigen function.