微生物学报 20 (3): 316—322, 1980
Acta Microbiologica Sinica

钩端螺旋体外膜菌苗的研究

I. 菌苗的制备、性质及免疫原性

鲍行豪 李岩金 罗海波 严征辉
(浙江省卫生防疫站，杭州) (浙江医科大学，杭州)
张锦麟 陈锐纲
(上海生物制品研究所，上海)

本文报道有关钩端螺旋体外膜菌苗的研究结果。

1.通过不同孔径微孔滤膜收集盐变细胞(0.85—1.2 微米)及纯化外膜(0.45 微米)，方法简便、省时，且不需贵重仪器，为大量制备钩端螺旋体(以下简称钩体)外膜菌苗提供了新的途径。

2.黄疸出血群及波摩那群钩体外膜，在电子显微镜下的形态大多呈圆形或不规则形。其化学组成黄疸出血群外膜中含蛋白质 37.77%，碳水化合物 22.21% 及类脂质 17.77%；后者则含蛋白质 59.72%，碳水化合物 13.69%，类脂质 14.90%。除强碱 (pH12) 及高温 (100℃ 1 小时)能破坏外膜的抗原活性外，对其它酸、碱及胰酶处理均很稳定。用外膜菌苗免疫家兔产生的体液抗体滴度较普通菌苗为高，6 个月后血清中尚能保持一定水平。

3.将黄疸出血群钩体外膜菌苗分别接种于金地鼠及豚鼠，并将波摩那群外膜菌苗接种于豚鼠，用同型强毒活菌攻击。前者仅需 0.1 毫升即可 100% 保护金地鼠免于发病或死亡；如一次接种 0.2 毫升也可 100% 保护豚鼠免于死亡与肾脏排菌。对照组动物全部发病死亡，说明外膜菌苗具有良好的免疫原性。

控制钩体病发生，首先要考虑有效的免疫制剂。现用的钩体菌苗对预防钩体病已有肯定效果，但由于接种剂量大，人群不易接受。且此种灭活菌苗虽能预防发病，但不能制止免疫动物肾脏感染及钩体尿症，因此人类接触传染本病以及动物与动物间接触传播始终存在。现将在前人对钩体外膜菌苗研究的基础上，根据我国实际情况，改进钩体盐变细胞及纯化外膜的制备方法、形态观察、性质及对其免疫原性的研究结果报道如下。

材料与方法

(一) 材料

1.钩体菌株：70091 株（黄疸出血群沃尔登型浦1），109 株(波摩那群波摩那型）均为浙江省钩体菌苗生产用菌株，应用时通过豚鼠传代。

2.培养基：上海生物制品研究所制备的上海 4.1 综合培养基[1]。

3.微孔滤膜：上海第十制药厂出品，其规格有 1.2、0.85、0.65 和 0.45 微米孔径四种。

本文于 1979 年 3 月 5 日收到。

1) 4.1 综合培养基：
(1) 磷酸盐缓冲液 100 毫升
(2) 生长因子：甲液(对氨基苯甲酸、泛酸钙、谷胱甘肽、盐酸吡醛素天门冬素) 50 毫升
乙液(嘌呤、嘧啶液) 5 毫升
(3) 血红素液 20 毫升
(4) 钙镁钾液 50 毫升
(5) 4.1 液 100 毫升
(6) 氯化铵液(氯化铵、亚硫酸铁铵) 40 毫升
(7) 脂液(吐温 80、卵磷脂油脂、胆固醇) 80 毫升
(8) 蒸馏水加至 1,000 毫升

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

4.试剂：氯化钠，化学纯；十二烷基硫酸钠(SDS)，化学纯，上海牙膏厂制品，用蒸馏水配制成 0.04% 溶液备用。

5.钩体免疫炭血清和正常炭血清按参考文献[1]方法制备。

6.钩体外膜菌苗：制备黄疸出血群二批(78-1，78-3)及波摩那群一批(78-5)钩体外膜菌苗，其反向炭凝滴度分别为 1:2048、1:4096 和 1:2048。

(二) 方法

1.钩体培养物的制备：用上海 4.1 综合培养基按普通菌苗生产程序制成的钩体培养物，其菌数在 400 倍暗视野显微镜下观察为 145—155 条/视野。每批培养物制备外膜菌苗前作暗视野检查菌体形态、数量和运动情况，合格者使用。

2.钩体盐变细胞及纯化外膜的制备方法：参照 Auran 方法[2]并作了改进。取生长旺盛的钩体培养物，按 8%(重量/体积)加入氯化钠，混匀，室温放置 3 小时，通过 0.85—1.2 微孔滤膜加压过滤，用原培养物 1/80 量的蒸馏水收集盐变细胞。加等量 0.04% SDS 溶液，作用 30 分钟使外膜溶解。离心(3,000 转/分)30 分钟，将上清液置透析袋中，用流动水透析 24—48 小时除去 SDS，用 0.45 微孔滤膜过滤，所得轻微乳光的滤液即为纯化外膜。加入最终浓度 0.3% 石炭酸，做无菌试验后分装安瓿或冻干保存(外膜菌苗)。

3.反向炭凝集试验：按文献[1]方法测定外膜菌苗滴度，一般滴度在 1:1024 以上为合格。

4.钩体盐变细胞及外膜的电子显微镜标本制备：用 PBS 洗涤，将浓缩 10 倍的盐变细胞及浓缩 20 倍的纯化外膜滴于火棉胶-炭支持膜的铜网上，经固定作磷钨酸及醋酸铀染色，用日本日立制作所 H-500-H 型电子显微镜观察。

5.化学成分测定：用英国 Unicam SP1800 紫外线分光光度计，按双缩脲法测定蛋白质。用 Guirgis 法测定类脂质；碳水化合物系用福州部队总医院的邻甲苯胺(O-7B)改良法测定。

6.对酸碱及热的稳定性测定：将 78-3(反向炭凝滴度 1:4096)及 78-5(反向炭凝滴度 1:2048)二批外膜菌苗用 HCl 或 NaoH 分别调 pH 至 2、4、6、8、10、和 12，室温作用 1 小时再分别用碱或酸中和。另取二种外膜菌苗分别于 100℃ 水浴加热 1 小时及胰酶(1 毫克/毫升)作用 1 小时后，用反向炭凝集试验分别[1]测定滴度，并与未经处理的外膜菌苗作比较。

7.免疫原性及抗体消长动态观察：取黄疸出血群(78-3)外膜菌苗，按总剂量 0.8 毫升(0.1、0.2 和 0.5)及 4 毫升(0.5、1.0 和 2.5)分二组给健康家兔静脉注射，共 3 次，每次间隔 5 天。末次注射后第 15 天开始作第 1 次试血，以后每月采血一次直至第 6 个月。同时用显微镜凝集试验(MAT)测定抗体滴度，并以普通菌苗 8 毫升剂量组作免疫比较。

8.保护力试验

(1) 金地鼠：取 25 天龄体重约 50 克的金地鼠，分 3 组以不同剂量的外膜菌苗作皮下接种一次，同时用盐变细胞和普通菌苗按常规法(0.5 及 1.0 毫升)作皮下接种二次比较，对照组不接种任何菌苗。接种后 14 天各组均用 1 毫升(2×10^8/毫升)同型强毒活菌作皮下攻击。观察 10 天，记录死亡数。10 天未死的则解剖观察病变情况，并取肾分别接种于切尔斯基培养基中培养。

(2) 豚鼠：取体重约 150 克的豚鼠，分 4 组以不同剂量的外膜菌苗作一次皮下接种，另 2 组用盐变细胞和普通菌苗作皮下接种二次(1.0 及 2.0 毫升)，对照组仅用盐水注射。其余各步骤同上。用波摩那群外膜菌苗免疫豚鼠，攻击后 24 小时采心血作培养，10 天后解剖观察病变情况。

结果与讨论

一、钩体外膜菌苗的制备

(一) 影响制备钩体盐变细胞的因素

1. 盐浓度

不同盐浓度对钩体盐变情况，从表 1 结果可看出，当盐浓度增高至 8% 或以上时，钩体绝大部分发生盐变，因此，确定盐变最适盐浓度为 8%。

2. 盐变时间

在暗视野显微镜下观察钩体盐变所需时间。表 3 结果表明，钩体基本发生盐变所需时间为 3 小时。不同菌群钩体盐变所

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 1 不同盐浓度对钩体盐变的关系

氯化物浓度 (%)	作用 3 小时钩体盐变情况	
	钩体活存数条/400 倍视野(%)	盐变细胞数条/400 倍视野(%)
2	10—13 (7.7)	7—9 (5.4)
4	0	74—80 (51.3)
6	0	124—130(84.7)
8	0	142—145(95.7)
10	0	141—145(95.3)

注：钩体总数 150 条/400 倍视野。

需时间有差异，黄疸出血群和波摩那群盐变较易发生，而秋季群钩体盐变则需要 3 小时以上。因此，在制备不同菌群盐变细胞时，应注意掌握不同的盐变时间。

3. 不同集菌方法

将一定量的钩体培养物用酸沉淀或加 0.02% 福尔马林再用酸沉淀，集菌后，再加氯化钠，均不能使钩体发生盐变。只有将培养物直接加氯化钠，才能使钩体盐变迅速而完善，但耗盐量较集菌后再盐变多 10 倍，如何减少氯化钠用量，需作进一步研究。

表 2 钩体盐变时间的比较

作用时间(小时)	1/2	1	2	3	4	24
钩体总数条/400 倍视野	145—155 (150)	145—155 (150)	145—155 (150)	145—155 (150)	145—155 (150)	145—155 (150)
盐变细胞数条/400 倍视野	70—75 (72.5)	105—110 (107.5)	135—140 (137.5)	142—147 (144.5)	143—148 (145.5)	143—147 (145)
盐变率(%)	48.3	71.6	91.6	96.3	97.0	96.7

注：括号内为平均数。

（二）外膜菌苗制备过程中钩体形态的变化

在 70091 株和 109 株培养物中加入 8% 氯化钠，作用不同时间采样，在暗视野显微镜下观察。发现钩体首先收缩、僵曲、失去动力，此时外膜仍然完整，但脱离了柱形原生质体 (Protoplasmic cylinder)，钩体盐变成球状或呈梨形。经盐变成球状之钩体，再用蒸馏水除盐，并悬浮于蒸馏水中，不能恢复正常钩体形态，证明此种盐变过程是不可逆的。用最终浓度 0.02% SDS 处理盐变细胞，在暗视野显微镜下观察，则球状体迅速消失而出现折光性低的长螺旋柱形原生质体，这种形态上的变化是由于外膜被 SDS 溶解后，柱形原生质体和轴丝从球状体中被释放出来。

（三）外膜菌苗的制备

见方法 2。使用本法制备的外膜菌苗较国外学者介绍的高速和超速离心法简便、省时，且不需贵重设备，为制备钩体外膜菌苗提供了新的途径。

二、钩体盐变细胞及纯化外膜的形态观察、性质及免疫原性

（一）形态观察

钩体盐变细胞在电子显微镜下呈球状，部分梨形，外围一层膜状物，柱形原生质体相互折叠成团，不与外膜粘连（图版 I-1）。当加入 SDS 后制片观察，外膜被溶解，盐变细胞球状体消失，见到长螺旋柱形原生质体及部分轴丝，周围散在有许多颗粒状外膜（图版 I-2）。此外尚有少数外膜粘附于柱形原生质体上（图版 I-3）。外膜大多呈圆形或不规则形。纯化外膜在电镜下未发现细胞碎片及柱形原生质体（图版

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

I-4)。

（二）钩体纯化外膜的化学成分

用 70091 株和 109 株纯化外膜进行化学分析，结果见表 3。从表 3 可看出，黄疸出血群（78-3）和波摩那群（78-5）纯化外膜的化学组成是有差别的，但均以蛋白质含量最高。Zeigler 等将波摩那群钩体用蔗糖密度梯度区带离心，等比重 KBr 离心与 CsCl 梯度离心法分离外膜，经化学分析含蛋白质 47%，碳水化合物 27% 和类脂质 23%[4]。Palit 等用 95% 乙醇自哈佐型钩体中分离外膜，经化学测定结果，含 25% 蛋白质，44.6% 碳水化合物及 8.5% 类脂质[5,6]，二者结果不一致，可能因菌型不同有关。我们所得结果虽与 Zeigler 有相似之处，但同是波摩那群菌株三者含量有差异，可能与分析方法不同有关。

表 3　(78-3) 和 (78-5) 纯化外膜的化学成份

干重(%) / 成分	纯化外膜 (78-3)	纯化外膜 (78-5)
蛋白质	37.77	59.72
碳水化合物	22.21	13.69
类脂质	17.77	14.94

（三）纯化外膜的理化特性

黄疸出血群(78-3)与波摩那群(78-5)二种纯化外膜，以酸、碱、热及胰酶处理 1 小时后，用反向炭凝法测其滴度变化，并与未处理的作比较。结果发现纯化外膜除对 100℃ 加热和 pH12 处理 1 小时抗原活性降低外，对其它酸碱度及胰酶处理均很稳定，这对今后外膜菌苗的生产和应用提供了必要条件。

（四）外膜菌苗的免疫原性

用黄疸出血群钩体外膜菌苗免疫家兔后，不同时间采血测 MAT 抗体滴度，发现均较普通菌苗（8 毫升）组为高，可见外膜菌苗仅需少量免疫，即可使免疫动物产生较高滴度的血清抗体，从而证实外膜具有良好的免疫原性(图 1)。说明外膜菌苗是可作为一种预防钩体病的免疫制剂的。

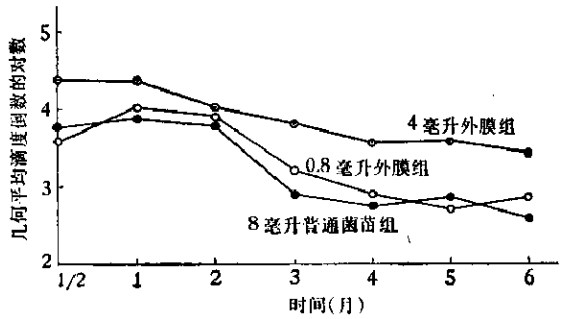

图 1　外膜菌苗与普通菌苗免疫家兔血清抗体消长动态

三、外膜菌苗对动物的保护作用

（一）70091 株外膜菌苗对金地鼠和豚鼠的保护作用

试验方法如前所述。表 4 中结果表明，70091 株外膜菌苗不论接种的剂量多少，

表 4　不同剂量 70091 株外膜菌苗对金地鼠的保护作用

菌苗及剂量（毫升）	攻击后存活数(只)	剖检病变数(只)	肾培养阳性数(只)
70091 株外膜 (0.1)	10/10	0/10	0/10
70091 株外膜 (0.2)	5/5	0/5	0/5
70091 株外膜 (0.5)	9/9	0/9	0/9
盐变细胞 (0.5+1.0)	5/5	0/5	0/5
普通菌苗 (0.5+1.0)	5/5	0/5	0/5
对　照	0/4	4/4	4/4

注：分母为试验动物数，分子为存活数，可见病变数或肾培养阳性数，下同！

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

表 5 不同剂量 70091 株外膜菌苗对豚鼠的保护作用

菌苗及剂量(毫升)	攻击后存活数(只)		剖检病变数(只)		肾培养阳性数(只)	
	78-1	78-3	78-1	78-3	78-1	78-3
外膜菌苗 (0.1)	6/8	未做	2/8	未做	2/8	未做
外膜菌苗 (0.2)	13/14	3/3	1/14	0/3	0/14	0/3
外膜菌苗 (0.5)	18/18	7/7	0/18	0/7	0/18	0/7
外膜菌苗 (1.0)	17/17	8/8	0/17	0/8	0/17	0/8
盐变细胞 (1.0+2.0)	5/5	4/4	0/5	0/4	0/5	0/4
普通菌苗 (1.0+2.0)	9/9	5/5	0/9	1/5	0/9	0/5
对 照	0/9	0/5	8/9	5/5	8/9	5/5

所有被试金地鼠均存活，对照组 4 只动物全部死亡，剖检肺部有弥漫性出血斑及肿大、充血的肾，肾培养均为阳性。

从表 5 结果可见，70091 株外膜菌苗 0.1 毫升尚不能全部保护豚鼠耐受 2 毫升活菌攻击；而二批外膜菌苗 0.2 毫升以上剂量接种一次，均能 100% 保护动物免于发病及死亡，剖检亦未发现有任何肉眼可见病变，肾培养全部阴性。对照组豚鼠全部发病死亡，剖检均可见到肺重变出血，肾脏水肿充血及皮下出血等病变。

（二）109 株外膜菌苗对豚鼠的保护作用

结果从表 6 可看出，所有经 0.2 毫升以上剂量接种的豚鼠对同型毒株攻击具有完全的保护作用。但 0.1 毫升剂量组免疫豚鼠则有 4/6 心血培养阳性，剖检有轻微病变。

表 6 不同剂量 109 株外膜菌苗对豚鼠的保护作用

菌苗及剂量(毫升)	心血培养阳性数(只)	剖检病变数(只)
109 株外膜 (0.1)	4/6	4/10
109 株外膜 (0.2)	0/10	0/10
109 株外膜 (0.5)	0/12	0/12
109 株外膜 (1.0)	0/11	0/11
普通菌苗 (1.0+2.0)	0/10	0/10
对 照	10/10	7/10

上述试验结果表明外膜菌苗对金地鼠和豚鼠的免疫原性较强，对接种动物有良好的保护作用。

此外，外膜菌苗对动物的接种剂量仅为普通菌苗的 1/15，而且只要作一次接种就能产生较强的免疫力，这对菌苗的生产和人群免疫接种都是比较有利的。

（三）钩体不同组份的生物学活性

为了解钩体各组份的生物学活性，特将除菌上清液、盐变细胞、外膜菌苗及柱形原生质体的同浓度悬液分别作反向炭凝集试验、免疫动物后体液抗体测定以及对豚鼠的保护试验，并与普通菌苗作比较。结果从表 7 可以看出，钩体不同组份的生物学活性是有明显差别的。以外膜菌苗活性最好，它不仅在制品中有最高的反向炭凝滴度，给家兔免疫后可呈现最高滴度的显微镜凝集抗体，而且当用同型毒菌攻击豚鼠时，可 100% 地保护动物免于发病和死亡，同时也不出现肾脏感染。其它组份生物学活性均较低，对动物保护作用也较小，因此在制备菌苗时，应注意除去这些组份，以提高菌苗效力。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

表 7　钩体不同组份的生物学活性 (70091, 78-1)

组　份	反向凝集滴度	三个家兔免疫后血清 MAT 几何平均滴度	豚鼠免疫后攻击剖检病变(只)	肾培养阳性数(只)
盐变细胞上清液	1:64	503.6	3/8	2/8
外膜菌苗 (78-1)	1:2048	64,560	0/10	0/10
盐变细胞	1:512	16,130	0/8	0/8
柱形原生质体	1:128	800	2/6	1/6
普通菌苗	1:256	16,130	0/5	0/5

参考文献

[1] 鲍行豪：微生物学报，**14**:112—119,1974。

[2] Auran, N. E. et al.: *Infect. Immunol.* **5**: 968—975, 1972.

[3] 鲍行豪等：微生物学报，**17**:154—157,1977。

[4] Zeigler, J. A. et al.: *Canad. J. Microbiol.*, **21**: 1102—1105, 1975.

[5] Palit, A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **82**: 223—228, 1974.

[6] Palit, A. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **100**: 249—254, 1977.

本文承上海复旦大学生物系电镜室及浙江医科大学电镜室制片及拍摄电镜标本。又承浙江医科大学第一附属医院中心检验室、浙江省中医院中心实验室及杭州市第一人民医院检验科协助测定外膜的化学成份，特此一并致谢。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

STUDY ON THE OUTER ENVELOPE VACCINES OF *LEPTOSPIRA*

I. THE PREPARATION, PROPERTIES AND IMMUNOGENICITY OF THE OUTER ENVELOPE VACCINE OF *LEPTOSPIRA*

Bao Xing-hao Li Yan-jin

(Sanitary and Anti-epidemic Station of Zhejiang, Hangzhou)

Luo Hai-bo Yan Zheng-hui

(Zhejiang Medical University, Hangzhou)

Zhang Jin-lin Chen Rui-gang

(Shanghai Institute of Vaccine and Serum, Shanghai).

This paper reports the study of outer envelope vaccines of *Leptospira*. The salt-altered cell (SAC) and the outer envelope of *L. icterohaemorrhagiae* and *L. pomona* were filtered through the milipore filters (SAC, 0.85—1.2 μm and 0.45 μm). This modified method is found to be simple and more rapid, since no special equipment is required and it is a new way to prepare the outer envelope vaccine of *Leptospira* in large quantities.

The shape of the outer envelope of *Leptospira* under electron microscope was found to be round or irregular. Their chemical composition varies with different groups: that of *L. icterohaemorrhagiae* contains, by weight, 37.77% protein, 22.21% carbohydrate and 17.77% lipid; that of *L. pomona* consists of 59.72% protein, 13.69% carbohydrate and 14.90% lipid, by weight. The outer envelope was susceptible to pH 12 heat, which gave the suggestion that some of the protective antigen may be heat-labile. The antibody level of the rabbit immunized with the outer envelope vaccines was higher than that of the commercial vaccines and it could be maintained for at least 6 months.

An experimental leptospiral outer envelope vaccines (icterohaemorrhagiae and pomona group) was evaluated for its protective efficacy in hamsters and or guinea-pigs by the development of clinical diseases or renal shedding of *Leptospira* after challenge. In hamsters dose as small as 0.1 ml protected 100% of the animals against challenge with *L. icterohaemorrhagiae;* while 100% of the control hamsters died after challenge. A dose of 0.2 ml protected 100% of the vaccinated guinea-pigs from clinical diseases and renal shedding, while the control guinea-pigs all died. It was considered that the outer envelope vaccine prossesses significant protection potency.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn