

一株 D 型肉毒梭菌的分离和鉴定

王荫椿 黄保国

高庆仪

(卫生部兰州生物制品研究所, 兰州) (卫生部食品卫生监督检验所, 北京)

从我国东海地区的海泥培养物中, 分离出一株厌氧性芽孢杆菌。经细菌学、毒素血清学、细菌代谢产物的气相色谱分析及 DNA 中 G + C mol% 测定, 鉴定为 D 型肉毒梭菌, 编号为 D85501。与国际参考菌株 D359 对照, D85501 菌株具有 D 型肉毒梭菌的总特性, 还有自身的特点, 是 D 型肉毒梭菌中的一新株, 是我国分离的首株 D 型肉毒梭菌。

关键词 肉毒梭菌; 交叉中和

D 型肉毒中毒主要发生在动物, 南非早就有牛的 D 型肉毒中毒 (Lanziekete) 的报道^[1]。我国除有牛、羊、水貂的 C 型肉毒中毒, 骡、马的 B 型肉毒中毒外, 尚未见 D 型肉毒中毒及 D 型肉毒梭菌分离、鉴定的报道。1983 年高庆仪^[2]在我国沿海地区海泥、砂及鱼类产毒肉毒梭菌污染情况的调查中, 发现东海地区阳性样品以 C、D 型肉毒梭菌为主, 且分布颇广, 但一直未分离出纯菌株。1984 年底, 收到送检的海泥原始培养物一份, 证实其中确有 D 型肉毒梭菌的存在, 经用多种培养基和厌氧培养方法反复分离、纯化, 得到了一株纯化的 D 型肉毒梭菌, 编号为 D85501。现将其分离、鉴定过程与与国际参考株 D359 [我国统一编号为 CMCC(B) 64451] 的有关比较结果, 报告如下。

材料和方法

基本方法参照参考文献^[3]。

(一) 培养方法

采用半固体培养基增菌。菌株分离系采用蔡司勒 (Zeissler) 血平板、卵黄琼脂平板, 以焦性没食子酸与无水碳酸钠为吸氧剂, 34—35℃ 培养 3—4 天。产毒采用酪蛋白胰酶消化液加酵母透析液培养基, 34—35℃ 培养 5—6 天。糖发酵试

验采用美国 CDC 以 CHO 为基础液的加糖 (各种糖的最终浓度为 0.6%) 培养基^[4], 34—35℃ Gaspak 罐中培养 7 天, 外加数滴 0.1% 溴甲酚紫指示剂, 根据培养液变色与否及变色程度判断发酵情况。

(二) 芽孢耐热试验

用产毒培养物的菌体沉淀物 (此时两株菌的芽孢数量均在 2/3 以上) 定量接种增菌用培养基, 煮沸不同时间, 取出冷却, 于 34—35℃ 下培养 7 天, 观察生长情况。

(三) 细菌代谢产物的气相色谱

按 CDC 厌氧菌实验方法^[5]进行。

(四) 细菌 DNA 中 G + C mol% 的测定

用苯酚氯仿混合提取法提取细菌 DNA, 以热变性温度法测定 DNA 中 G + C mol%^[6]。

结果和讨论

(一) 菌株的生物学特性

1. 产生 D 型肉毒毒素: D85501 菌株在胰酪-酵母培养基上能产生 $\geq 1,600,000$ LD₅₀/ml (小白鼠腹腔, 下同) 的毒素 (D359 株的产毒仅为 400,000 LD₅₀/ml)。该稀释毒素仅能为 D 型肉毒诊断血清特异地中

本文于 1985 年 12 月 27 日收到。

细菌代谢产物的气相色谱分析及 DNA 中 G + C 克分子含量测定由 57195 部队协助完成, 特此致谢。

和,煮沸 20 分钟完全灭活。

2. 形态特征: 在蔡司勒血琼脂平板上形成大小不等、无定形的菌落,菌落中心有多个乳头状突起(或称子菌落),边缘不规则,周围有不完全的溶血环。在卵黄琼脂平板上形成的菌落较小,周围及底部有乳浊沉淀环,菌落表面及周围有微弱的虹彩。菌体粗长,呈杆状,微弯曲,边缘光滑整齐,两端钝圆,散在;芽孢为卵圆形,位于偏端,等于或略宽于菌体,偶尔游离;具有 4—8 根鞭毛,能运动;新培养的幼龄菌体为革兰氏染色阳性(见图 1)。

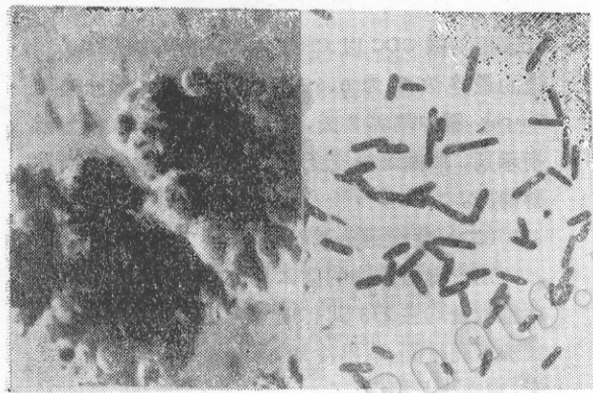


图 1 D85501 菌株的形态

Fig. 1 The morphology of strain D85501

左: 菌落(20×); 右: 菌体(1340×)

left: colony; right: cells

3. 芽孢热抵抗力: D85501 菌株的芽孢能耐 60 分钟的煮沸(兰州地区的沸点为 94℃),而参考菌株 D359 的芽孢仅能耐 30 分钟的煮沸。

4. 生化特性: 本菌和参考株均分解葡萄糖,对麦芽糖的发酵前者为弱阳性或(±),后者为阳性。而均不发酵蔗糖、山梨醇、甘油、阿拉伯糖、乳糖、木糖、水杨苷、甘露醇。但均液化明胶,消化并凝固牛奶。两者均不消化卵白,不还原硝酸盐,不产生吲哚,硫化氢试验阴性。它们都具有运动力。

肉毒梭菌的生化反应变化很大,不仅型间有差别,而且同一型的各株之间也不

完全一致,有些特性各实验室所得结果也往往不统一。尽管如此,本结果基本与 VPI 手册^[7]所列的 D 型肉毒梭菌生化特性相符。

(二) 毒素性质

1. 类毒素化: D85501 的酸沉淀精制毒素液加 0.6% 福尔马林,在 37℃ 下放置 10—12 天即能脱毒变为类毒素。用该类毒素给 2 只健康家兔反复注射,所得的免疫血清的抗毒效价平均为每毫升中和本菌毒素 800,000—900,000LD₅₀。

2. 抗原性:

(1) 毒素抗毒素中和价交叉试验: 取分离株、参考株及 C314/91 株(属 C_a 型)的毒素及抗毒素各 1 批,相互交叉进行定量中和试验,同时定量测定分离株抗毒血清 D85501(井 2) 批对 A, B, E, F 型肉毒

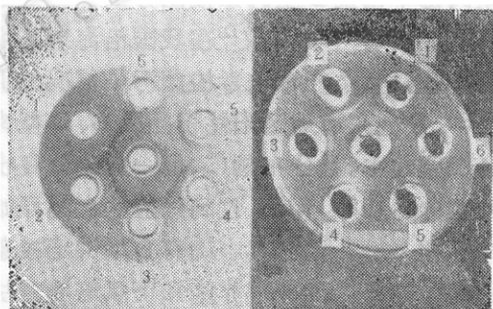


图 2 两株菌的抗毒素和类毒素间的免疫双向琼脂扩散

Fig. 2 Double-immunodiffusion between toxoid and antitoxin of two strains

左: 中央孔: D359 精制抗毒素(#6001 100IU/ml)。周围孔: 1. D359 精制类毒素原液; 3. 同上, 10 倍稀释液; 5. 同上, 100 倍稀释液; 2. D85501 精制类毒素原液; 4. 同上, 10 倍稀释液; 6. 同上, 100 倍稀释液。

右: 中央孔: D85501(井 1) 免疫血清。周围孔: 同上。

Left: central well: D359 antitoxin (#6001 100IU/ml), round well: 1. original D359 toxoid; 3. 10 × diluted D359 toxoid; 5. 100 × diluted D359 toxoid; 2. original D85501 toxoid; 4. 10 × diluted D85501 toxoid; 6. 100 × diluted D85501 toxoid.

Right: central well: D85501 antiserum, round well: ditto.

毒素的交叉中和力。方法见卫生部生物制品规程中肉毒诊断血清制检部分。结果见表 1。

表 1 3 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)
Table 1 The determination of cross neutralization titer between toxin and antitoxin of three strains (anti LD₅₀/ml antiserum)

毒素(菌株) Toxin (strain)	抗毒素(菌株及批号) Antitoxin (strain and lots)			
	D85501 (#1)	D85501 (#2)	D359 (#6001)	C314/91 (66005)
D85501	800,000	900,000	≥100,000	160—320
D359	400,000	300,000	100,000	
C314/91		640— 1,280		≈100,000

表 1 可见，分离和参考菌株的抗毒素除了能中和各自产生的毒素，还能较高地中和对方产生的毒素和稍许中和 C314/91

菌株产生的毒素，说明分离菌株属于 D 型肉毒梭菌，除产生主要的 D 型毒素外，还与 C_o 菌的毒素有部分共同抗原。分离菌株的抗毒素与 A, B, E, F 型肉毒毒素的交叉中和力均 < 10LD₅₀ (表中略)，说明分离菌株产生的毒素与 A, B, E, F 型菌的毒素无任何交叉。

(2) 双向琼脂扩散试验：分别以 D85501 的免疫血清和 D359 的抗毒素 (100IU/ml) 置中心孔，以原液和不同稀释的 D85501 和 D359 株的毒素或类毒素置相邻的周围孔进行双向琼脂扩散。结果(图 2)表明，两者有共同抗原(出现两条完全融合的沉淀线)，但又不完全相同(出现数条交叉或不融合的沉淀线)。同样分别以 D85501 免疫血清和 C314/91 抗毒素 (100IU/ml) 为中心孔，加 A, B, C, D (D85501), F 型精制类毒素原液于周围孔

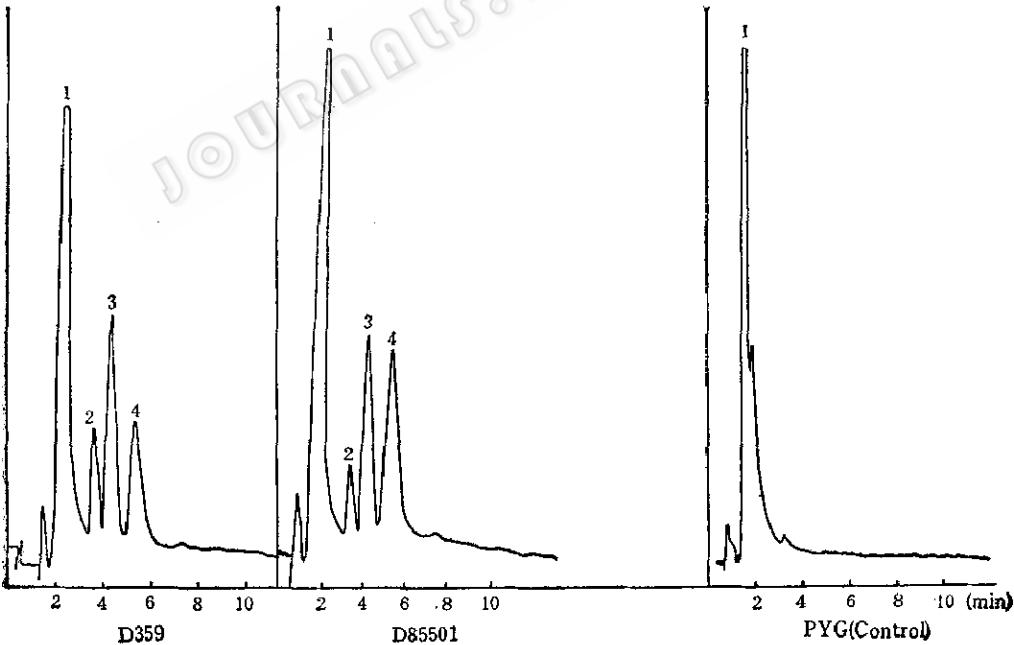


图 3 两菌株代谢产物的气相色谱分析 (VFA)
Fig. Gas chromatograph of bacterial metabolite
1. 乙醚; 2. 乙酸; 3. 丙酸; 4. 丁酸
1. Ether; 2. Acetic; 3. Propionic; 4. Butyric

进行双相琼脂扩散,除 C、D 间相互有一条完全融合的沉淀线(即有共同抗原)和多条不融合或交叉的沉淀线(即主要抗原不同)外,与其他类毒素或毒素均无沉淀线(即无共同抗原),照片略。

以上两试验结果符合 D 型肉毒梭菌能产生 C₁、D 型毒素,且以 D 型为主;C₂ 肉毒梭菌能产生 C₁、C₂、D 型毒素,且以 C₁ 型为主的理论^[8,9]。

(三) 细菌代谢产物的气相色谱分析

以 PYG 培养基为空白对照,测定两菌株 PYG 培养物中的细菌代谢产物。结果表明,分离菌株 D85501 和参考菌株 D359 培养物(标准对照)中挥发性有机酸的气相色谱图(图 3)基本相似,即均含乙酸、丙酸、丁酸,而菌株 D85501 的丁酸含量稍大于菌株 D359 的。但两者培养物中均未测到非挥发性有机酸。既符合 D 型肉毒梭菌代谢产物总的规律,两者相互间又有微小差异。

(四) 细菌 DNA 中 G+C 克分子含量的测定

分离菌株 D85501 DNA 中 G+C 克分子含量为 24.8%, T_m(热变性温度)为 79.5℃,基本符合或接近肉毒梭菌 G+C

mol% (26—28%) 的标准^[7]。

(五) 结论

以上结果说明 D85501 是一株与国际参考株基本相同,但又有不同形态、生化特性和不同毒素抗原组分的 D 型肉毒梭菌,是迄今我国自己分离的首株 D 型肉毒梭菌。

参 考 文 献

- [1] Sakaguchi, G.: *Pharmac. Ther.*, **19**: 165, 1983.
- [2] 高庆仪等: *中华预防医学杂志*, **18**(3): 129, 1984.
- [3] 王荫椿等: *微生物学报*, **13**(2): 107, 1973.
- [4] Dowell, V. R. et al.: *Media for Isolation, Characterization and Identification of Obligately Anaerobic Bacteria*. U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center of Disease Control, 1978.
- [5] Dowell, V. R. et al.: *Laboratory Method in Anaerobic Bacteriology*. CDC Laboratory Manual. U. S. Department of Health, Education and Welfare, Public Health Service, Center of Disease Control, 1974.
- [6] 林万明(黄翠芬主编): *《医学细菌分子生物学进展》*, 科学出版社, 北京, 第 209—217 页, 1984.
- [7] Holdeman, L. V. et al.: *Anaerobe Laboratory Manual*. V. P. I. Anaerobe Laboratory. Virginia Polytechnic Institute and State University, 1977.
- [8] Sugiyama, H.: *Microbiological Review*, **44**(3): 419, 1980.
- [9] Simposon, L. L.: *Pharmacological Reviews*, **33**(3): 155, 1981.

THE ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYPE D STRAIN

Wang Yinchun Huang Baoguo

(Lanzhou Institute of Biological Products, Lanzhou)

Gao Qingyi

(Food Hygiene Control and Inspection Institute, Ministry of Public Health, Beijing)

A strain of *Clostridium botulinum* was isolated from a culture of sea-mud in China East Sea.

The strain D85501 was identified as *Clostridium botulinum* type D on the basis of its bacteriological, serological, toxicological characteristics, gas chromatography analysis of bacterial metabolite and DNA G+C mol% determination.

Comparing with an international reference strain D359, D85501 strain possesses high ability to produce toxin and spores. Its spore are more resistant against boiling than D359 one. The toxin produced by these two strains can only be neutralized by type D typing antiserum when they were diluted. They share

some common antigen as well as C314/91 (Ca) strain's but not entirely identical. Therefore, there are partially cross-neutralization among them, but none of common antigen with type A, B, E, F botulinum toxin was shown.

Gas chromatography analysis of bacterial metabolite and DNA G+C mol% determination of D85501 strain are also in accordance with the main key for identification of type D botulinum.

Key words

Clostridium botulinum; Cross-neutralization