

# 痢疾杆菌多糖蛋白复合物菌苗的制备 及人群免疫的初步研究

山东省淄博市防疫站  
博山区卫生防疫站  
山东省生物制品研究所  
山东铝厂职工医院

山东省卫生防疫站  
张店区卫生防疫站  
博山陶瓷厂职工医院  
解放军54813部队卫生队

细菌性痢疾(菌痢)的发病率很高,且危害严重。自从Shiga氏(1898)分离出痢疾的病原体(痢菌)以来,在菌痢的特异性免疫方法上有不少报告<sup>[1,3,4,7]</sup>,但均由于菌型多或不易免疫而停顿。六十年代Watkins、Formal和Me<sup>1</sup>等认为免疫与接种途径有关,经猴的免疫实验证明血清抗体很高,但不能抵抗经口感染痢菌的攻击,而实际上实现对抗痢菌的是肠道粪抗体。近年来,Me<sup>1</sup>等<sup>[6,11]</sup>报告福氏2<sub>a</sub>依赖链霉素(Sd)减毒活菌苗,在试验地区免疫人群,对型保护率达80%以上。国内以引进的福氏2<sub>a</sub>Sd株制备活菌苗多次现场实践,由于服用方法繁琐,效果尚有局限性;但又不能排除返祖的可能性<sup>[4]</sup>。因而使推广应用受到一定限制。Armando等<sup>[7]</sup>报告菌痢的免疫作用主要是局部抗体分泌性IgA和细胞免疫,而近来报告<sup>[7]</sup>则突出了分泌性IgA抗体的作用,因而提示菌痢的免疫尚需进行更深入的研究。鉴于肺炎和脑膜炎球菌多糖菌苗的启示,我们根据肠道致病菌的生物特性对痢菌多糖-蛋白复合物菌苗(PSPCDV)的提取和免疫方法进行了实验研究。现将菌苗的制备方法及两年来现场人群免疫的效果报告如下:

## 材料和方法

### 一、实验材料

1.菌种:选用当地流行的优势菌株福氏1<sub>a</sub>、1<sub>b</sub>、2<sub>a</sub>、2<sub>b</sub>、4:- (或志贺氏Ⅱ型)及宋内氏六个菌型。

2.培养基:肉汤培养基,普通营养琼脂培养基及SS培养基。

### 3.PSPCDV的制备:

①分别挑选六个菌型各3~5个典型菌落,接种于肉汤培养基增菌管内,置37°C 18小时,然后划线接种于普通营养琼脂培养基斜面,置37°C 18小时,用无菌肉汤或无菌生理盐水(NS)洗下斜面的菌苔,分别转种于500毫升肉汤瓶,置37°C 18小时,各取2毫升肉汤培养液倾入含有普通营养琼脂的克氏瓶内,以使肉汤菌液全部平铺于培养基的平面为宜,置37°C 18小时;

②用无菌蒸馏水分别洗下菌苔,放入灭菌的容器内,于-25°C冻结2小时后,取出融化,如此反复冻融3~4次,取裂解液涂片,以革兰氏染色镜检无完整的菌体;

③裂解液加入无水乙醇至80%(V/V1:5)混匀作10分钟待有沉淀形成后,移至离心管,以4,000转/分,离心30分钟,收集沉淀物置37°C挥发残留乙醇至干燥。上清保留过夜,再收集沉淀合并即为多糖-蛋白复合物,保存备用。

4.菌苗片剂制备:取六个菌型提取的多糖-蛋白复合物等量(每个菌型20毫克)混合后,以120毫克加入1号佐剂压成0.3克重的片剂即为痢疾杆菌多糖-蛋白复合物菌苗。

二、免疫原活性测定:选取免疫前间接血凝(PHA)阴性的2~2.5公斤健康家兔7只。取PSPCDV 5毫克以NS 2毫升助溶,无菌操

作做耳静脉免疫。第一、二次各 5 毫克，第三次 10 毫克。每次间隔 7 天。待末次免疫后 7 天取血分离血清，以 PHA 试验检测效价。

1、敏化红细胞的方法：称取 PSPCDV 1.5 毫克置试管内，加入无菌 NS 2 毫升溶解后，每管加入洗涤的 10% 醛化压积人 O 型红细胞（常规制备）0.4 毫升，混匀，置 37°C 水浴敏化 1 小时（期间摇动 2~3 次），取出以 10 倍量的无菌 NS 洗涤 3~4 次，最后以无菌 NS 配成 1% 的敏化红细胞悬液，置 4°C 冰箱备用。

2、PHA 试验<sup>[8]</sup>：被测血清置 56°C 水浴灭活 30 分钟并以人 O 型红细胞吸收处理。血清稀释，免前自 1:10 开始；免后自 1:50 开始。各型血清按微量法取 0.025 毫升，分别置“V”型反应板（亦可用“U”型反应板作全量法）用稀释棒做递倍稀释，最后一孔不加血清，只加 0.025 毫升 NS 做为对照，每孔加入致敏的红细胞 0.025 毫升。混匀，置 37°C，90 分钟观察并依常规判读结果。终点滴度以“++”为阳性（表 1、2）。

表 1 PSPCDV 家兔超免疫抗体效价

| 菌 株                 | 免 疫 前 (1:) |    |    | 免 疫 后 (1:) |      |      |      |      |      |      |       |
|---------------------|------------|----|----|------------|------|------|------|------|------|------|-------|
|                     | 20         | 40 | 80 | 100        | 200  | 400  | 800  | 1600 | 3200 | 6400 | 12800 |
| 福氏 1a               | ++         | +  | -  | ++++       | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++  | +++  | ++    |
| 福氏 1b               | ++         | ++ | -  | ++++       | ++++ | ++++ | ++++ | ++++ | +++  | +++  | -     |
| 福氏 2a               | ++         | +  | -  | ++++       | ++++ | ++++ | +++  | +++  | ++++ | ++   | ++    |
| 福氏 2b               | ++         | ++ | -  | ++++       | ++++ | ++++ | +++  | +++  | +++  | ++   | ++    |
| 福氏 4:-              | ++         | -  | -  | +++        | +++  | +++  | +++  | +++  | ++   | ++   | -     |
| 志贺氏 II <sup>①</sup> | ++         | -  | -  | ++++       | ++++ | ++++ | +++  | +++  | ++   | ++   | -     |
| 宋内氏                 | -          | -  | -  | +++        | +++  | ++   | ++   | ++   | -    | -    | -     |
| 多价 <sup>②</sup>     | -          | -  | -  | ++++       | +++  | +++  | +++  | ++   | ++   | ++   | -     |

注：①1980 年用过的菌型；②多价免疫血清与福氏 2b 菌凝集的结果；各型对照组均为（-）。

表 2 PSPCDV 抗原交叉凝集反应

| 血 清    | 抗 原 (1:) |       |        |        |        |       |
|--------|----------|-------|--------|--------|--------|-------|
|        | 福氏 1a    | 福氏 1b | 福氏 2a  | 福氏 2b  | 福氏 4:- | 宋内氏   |
| 福氏 1a  | 12,800   | 2,048 | 256    | 256    | 256    | 8     |
| 福氏 1b  | 2,048    | 6,400 | 128    | 128    | 32     | 16    |
| 福氏 2a  | 128      | 256   | 12,800 | 512    | 64     | 8     |
| 福氏 2b  | 512      | 512   | 512    | 12,800 | 64     | -     |
| 福氏 4:- | 64       | 32    | 16     | 16     | 6,400  | 32    |
| 宋内氏    | 128      | 64    | 32     | 64     | 64     | 1,600 |

3、粪抗体测定(PHA)：同血清学方法，仅标本加入一倍无菌 NS 后，混匀 56°C 水浴 30 分钟。

4、痢菌毒菌对免疫家兔结肠的粘附<sup>[10]</sup>和 PSPCDV 对成年小白鼠的毒力试验。以 PSPCDV 40 毫克口服免疫 2~2.5 公斤的家兔，五天一次，免疫 4 次，末次免疫后 5 天，与正常家兔同时取出结肠，制成标本，依程序以 10<sup>8</sup> 个福氏 1a 毒菌做肠片粘附试验计算粘附指数。

用 16~18 克重的成年小白鼠 54 只，分为 9 组，每组 6 只，另设对照组 6 只，按剂量对数法，将 PSPCDV 以注射用水溶解，取 10.9 毫克做腹腔注射，48~72 小时后以 LD<sub>50</sub> 观察其毒力。

5、PSPCDV 组分分析：由中国科学院有机化学研究所、生物化学研究所和上海农业科学院畜牧兽医研究所帮助分析。

三、人群免疫观察方法：为了考核 PSPCDV 的免疫效果，连续两年对实验地区人群以随机配对对照，采用双盲法进行实验观察。服苗方法为饭后 2 小时口服免疫。每次 1 片，间隔 5 天，全程三次，总量 360 毫克。凡实验对象编号末位数字为奇数者服 PSPCDV；偶数者服用同型安慰剂（淀粉片）。

观察对象应无慢性菌痢史，对实验地区不加任何防疫措施，服苗人群在菌痢流行季节前免疫完毕。服苗后观察至 11 月。对发病的患者

进行细菌分离培养,按菌痢诊断标准进行诊断<sup>[3]</sup>;并逐一进行流行病学个案调查。对非全程免疫及免疫后不足半个月的不统计。

### 结 果

一、实验地区志贺氏菌属的分布频率:两个实验地区1977~1980和1981年分离的痢菌,福氏菌分别为81.55%和75.49%(表3)。

以两个地区的福氏痢疾杆菌分型鉴定结果

表3 痢疾志贺氏菌属分布频率

| 地 区             | 分离菌株 | 志贺氏菌属(%) |        |       |      |      |
|-----------------|------|----------|--------|-------|------|------|
|                 |      | 福氏       | 志贺氏II型 | 鲍氏    | 宋内氏  | 未定型  |
| 博陶<br>(1977-80) | 607  | 81.55    | 9.88   | 2.80  | 5.44 | 0.33 |
| 山铝(1981)        | 102  | 75.49    | 1.96   | 12.75 | 9.80 | —    |
| 合 计             | 709  | 80.68    | 8.75   | 4.23  | 6.06 | 0.28 |

分析,以1a、1b、2a、2b和4:-为优势菌,各为87.67%及94.81%(表4)。

表4 福氏痢疾杆菌分型

|                  | 各 菌 型 (%) |       |       |       |      |      |      |      |       |      |      |      |
|------------------|-----------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-------|------|------|------|
|                  | 1a        | 1b    | 2a    | 2b    | 3a   | 3b   | 3c   | 4a   | 4:-   | 6    | X变种  | Y变种  |
| 博 陶<br>(1977-80) | 11.11     | 35.15 | 24.85 | 9.59  | 4.24 | 0.40 | 0.60 | 1.01 | 6.67  | 2.63 | 1.82 | 2.02 |
| 山铝(1981)         | 24.68     | 28.57 | 18.18 | 12.99 | —    | —    | —    | —    | 10.39 | —    | 1.29 | 3.90 |
| 合 计              | 12.94     | 24.27 | 23.95 | 9.97  | 3.67 | 0.35 | 0.52 | 0.87 | 7.17  | 2.27 | 1.75 | 2.27 |

### 二、流行病学效果:

1、保护率:两地1980年及1981年共观察4,057人,其中免疫组2,030人,发病14人(7月4例,8月7例,9月1例,10月1例),发病率为0.69%;对照组2,027人,发病112人(7月36例,8月47例,9月22例,10月7例),发病率为5.53%,保护率为87.53%( $df=1 \chi^2=78.82 P<0.001$ )(表5)。

表5 PSPCDV免疫效果

| 年 度  | 免 疫 组 |     |      | 对 照 组 |     |      |       |
|------|-------|-----|------|-------|-----|------|-------|
|      | 人数    | 发病数 | 发病率% | 人数    | 发病数 | 发病率% | 保护率%  |
| 1980 | 653   | 2   | 0.31 | 658   | 15  | 2.28 | 86.40 |
| 1981 | 1,377 | 12  | 0.87 | 1,369 | 97  | 7.08 | 87.72 |
| 总 计  | 2,030 | 14  | 0.69 | 2,027 | 112 | 5.53 | 87.52 |

两组相比 1980,  $df=1, \chi^2=9.97, P<0.01, U_{95}=87.52 \pm 4.42$   
1981,  $df=1, \chi^2=69.54, P<0.001$ 。

全部菌痢患者均进行细菌分离培养,结果只在对照组分离出10株(福氏1b1株,1a1株2a1株,2b1株,X和Y变种各1株,鲍氏和宋内氏各2株)。

1981年免疫组慢痢38例(2.76%),对照组39例(2.85%)( $df=1 \chi^2=0.02 P>0.05$ )。免疫组的慢痢分离出细菌4株(福氏1a、1b、4:-和鲍氏1型),在因素控制上无差异。

2、追踪两年的流行病学效果:至1981年11月访问1980年免疫的博陶辅助车间免疫组95人,发病2人(2.1%);对照组93人,发病10人(10.75%),第二年的保护率为80.47%( $df=1 \chi^2=5.88 P<0.01$ )。

三、粪抗体的检测:PHA检测32份标本,按双份标本处理方法,全程免疫后5天,粪抗体滴度未见有意义的上升反而略低,而在半月后,则显示各型对应的粪抗体滴度水平呈明显的升高,GMT自1:14.0504~1:22.6280,  $\Sigma \bar{X}GMT$ 免前滴度为1:7.0934,全程免疫后5天为1:4.8067,20天为1:16.8626,滴度整数20天较5天几乎为4倍上升(表6)。

四、PSPCDV的化学分析:各型多糖-蛋白复合物每毫克含多糖为4.55~9.95%;粗蛋白为65.04~67.42%;总氨基酸(毫微克分子)为174.103~219.977,一般均含有17种氨基酸,含磷为1.13~1.46%,钙为0.35~0.72%。

表6 PSPCDV免疫32例粪抗体测定

| 抗原型别  | GMT (1:) |        |         |
|-------|----------|--------|---------|
|       | 免前       | 全程免疫后  |         |
|       |          | 5天     | 20天     |
| 福氏1a  | 6.7273   | 5.5358 | 15.3222 |
| 福氏1b  | 6.5332   | 4.6551 | 16.7328 |
| 福氏2a  | 7.4968   | 4.0877 | 14.9936 |
| 福氏2b  | 7.1790   | 4.7570 | 17.4486 |
| 福氏4:- | 6.0368   | 4.2687 | 14.0504 |
| 宋内氏   | 8.5373   | 5.5357 | 22.6280 |
| ΣX    | 7.0934   | 4.8067 | 16.8626 |

表7 PSPCDV生物化学组分分析

| 提取物     | 志贺氏菌属       |           |           |           |         |             | PSPCDV  |
|---------|-------------|-----------|-----------|-----------|---------|-------------|---------|
|         | 1a          | 1b        | 2a        | 2b        | 4:-     | 宋内          |         |
| 含糖量(%)  | 7.39        | 8.48      | 9.95      | 9.65      | 8.15    | 4.55        |         |
| 葡萄糖     | 十*          | 十*        | 十*        | 十*        | 十*      | 十*          | 卅       |
| 半乳糖     | 卅           | 卅         | 卅         | 卅         | 卅       | 卅           | 卅       |
| 鼠李糖     | —           | 卅         | 卅         | 卅         | —       | —           | 卅       |
| 木糖      | —           | 卅         | 十         | 卅         | 卅       | —           | 卅       |
| 粗蛋白(%)  | 65.04       | 66.55     | 66.38     | 67.03     | 67.35   | 67.42       | 未作      |
| 脂(%)    | —           | —         | —         | —         | —       | —           | "       |
| 氮(%)    | 10.61-10.59 | 9.73-9.95 | 8.61-9.49 | 9.34-9.49 | 未作      | 12.82-12.59 | "       |
| 磷(%)    | 1.46        | 1.23      | 1.37      | 1.13      | 1.26    | 1.26        | "       |
| 钙(%)    | 0.72        | 0.54      | 0.58      | 0.44      | 0.44    | 0.35        | "       |
| 氮(nm)   | 18.748      | 17.388    | 19.987    | 18.857    | 19.747  | 20.450      | 22.920  |
| 氨基酸(nm) | 190.735     | 174.103   | 219.977   | 190.053   | 192.793 | 208.661     | 207.337 |

● 6型混合气相色谱法。

### 讨 论

菌痢的肠道内特异性免疫的研究,是当前菌痢预防工作的一项重要课题。从目前国内外的资料来看,对于病原学和免疫方法的研究进展较快。但亚单位菌苗多是在实验室阶段[4,9]。各学者从不同角度试图解决菌痢预防用的特异性菌苗。本文选用当地优势菌株,采用化学的方法制备了痢菌多糖-蛋白复合物菌苗,做了动物毒力试验和人群口服肠道免疫的效果观察,初步认为该菌苗不仅口服简便,无不良反应,且具有良好的免疫原性。通过实验动物的观察,血清抗体效价水平显著地升高,口服免疫的家兔毒菌粘附指数明显的减低,尤其是在

无脂类。本PSPCDV的多糖以己糖(葡萄糖、半乳糖)为主,其次为戊糖(鼠李糖、木糖)(表7)。

五、毒菌粘附及菌苗的毒力测定:免疫的家兔以福氏1a毒菌粘附指数为0.0012%,正常家兔为0.0087%。小白鼠的毒力试验LD<sub>50</sub>为100毫克/公斤。

六、人群服苗的反应:服苗后观察12小时,所有饭后2小时口服者,无不良反应;而空腹服时,于服后2小时内有少数人出现恶心、呕吐。个别人在当日仅有轻微腹泻。

服苗人群中做了粪抗体的测定。文献记述,局部粪抗体的效价在1:16~1:32时,即可对抗痢菌的感染。本文菌苗口服免疫人群后特异性粪抗体有显著的差异,GMT达1:14~1:22,从而提示菌苗具有良好的免疫效果。

PSPCDV为一种半抗原与蛋白等载体相结合的且具有良好的免疫原性的菌苗,化学组分分析指出,其O-重复单位(O-repeat unit)或称O-特异性侧键,以葡萄糖、半乳糖为主,尚有戊糖(鼠李糖、木糖),含量在8%以上,粗蛋白65.04~67.47%,氮为8.51~12.82%,且有17种氨基酸,磷为1.13~1.46%,钙为0.35~0.72%。文献记述[6],化学基团的空间排列,数目是决定抗原特异性的重要因素,蛋

白质抗原的各种多肽决定簇(结合的化学基团)其末端氨基酸排列不同,表现出不同的种属特异性。本菌苗的化学组分表明,其氨基酸的分布,数量和O-特异性侧链大致是相近的,从而支持本菌苗具有交叉免疫的理论根据。从本菌苗免疫原性测定的交叉凝集的结果可以证实。

对接受免疫的人群以随机配对对照,分为免疫组与对照组,并采用双盲法进行实验观察,其保护率为87.52%,而国外<sup>[11]</sup>南斯拉夫1965~1966年对儿童观察服苗(Sd)的2,082人,发病109例(5.35%),其中同型病人4例。对照组2,821人,发病111例(3.93%),其中同型46例,对型保护率为91%,但未能降低发病率。国内同类的Sd株减毒活菌苗,综合报导其各型保护率最高为39.1%,有的仅17.98%。

本菌苗经两年重复实验获得的预防效果是一致的,95%的可信限为83.10~91.94%。根据肠道的特点,从免疫的持久性来设想,适当增加免疫次数或许可能收到较好的免疫效果。一般认为接触抗原次数多,有助于肠道粘膜局部淋巴组织表面的M细胞摄取抗原,激活产生IgA的浆细胞(包括其记忆细胞)<sup>[4,5]</sup>,从本菌苗免疫家兔后毒菌结肠粘附试验的结果推论,肠道粘膜集合淋巴结与抗原接触后,增强了免疫应答,肠道为痢菌感染时,原发与继发应答的特征合为一种过程。分泌型IgA抗体通过直接地作用于细菌使其制动,凝集或阻止细菌粘附于肠粘膜上;而延长其保护力,可能是依靠迅速活化粘膜IgA系统中的免疫记忆细胞的作用<sup>[4,5]</sup>。本文粪抗体水平免前GMT为1:7,个别最高的达1:256,因此,人群尽管暴露于痢菌污染的因素,却不可能均发病,说明正常人群中是有抵抗痢菌能力的。这种能力可能来自亚临床感染,尤其是菌痢患者90%具有粪抗体<sup>[6]</sup>,从流行病学上分析一年以后再感染者很少,这些都为本菌苗口服免疫提供了理论依据<sup>[6]</sup>。

本文两年的流行病学效果观察是有意义的,我们认为痢菌的有效化抗原的方向,可以引伸到其他肠道致病菌菌苗的研究,它将比从事于活菌苗的研究前途更为广阔。

## 摘 要

本研究为选用当地志贺氏菌属的优势菌型(福氏1a、1b、2a、2b、4:-和宋内氏)六个菌株,用物理和化学的方法提取的一种多糖-蛋白复合物菌苗。以1号佐剂制成菌苗片(每型20毫克。生物化学分析以己糖(葡萄糖和半乳糖为主),尚有戊糖(鼠李糖、木糖)等,含17种氨基酸。免疫原活性测定证实免疫原性良好并有明显地型间交叉效价。口服免疫三次,每次1片,间隔五天,总量360毫克,免疫后20天粪抗体效价较免前上升2~4倍。经两年两地人群重复实验,以随机配对对照,双盲法观察,免疫组2,030人,发病14人(0.69%),对照组2,027人,发病112人(5.53%),保护率为87.5%。且无副反应。

(本研究承谢少文、郭可大、陈正仁、林飞卿、张振宜、魏承毓、仲崇祐、荆永志、王洁民、李在连、崔正言、王家英、檀树棻、李遂初等专家教授及傅周卿、吕炳俊、惠柏林等主管技师、讲师给以指导和帮助,特此致谢)

## 参 考 文 献

- 1.郭可大等译:秦氏细菌学,538~550,中华医学会出版,1951。
- 2.林飞卿等:免疫学与血清学,37~52,上海科技出版社,1959。
- 3.耿贯一等:流行病学(中),95~100,人卫,1980。
- 4.Bull WHO, 57(5):719, 1979。
- 5.刘汉明:国外医学,流行病学传染病学分册,(4):145, 1979。
- 6.上海第二医学院:医用微生物学,86~87, 187~191,人卫,1979。
- 7.Armando C et al: J Infect Dis, 129(4):439,1974。
- 8.Young VM et al: Am J Pub Hlth,50:1866,1960。
- 9.Subbtina Yu L et al: Abstract Hygiene,55(5):467, 1980。
- 10.Bhattacharjee JW et al: Bull WHO,57(1):123, 1979。
- 11.陈正仁:北京医学,(2):105, 1980。