

A群脑膜炎奈瑟氏菌脂多糖抗原血清型 在我国八省一市的分布

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

胡绪敬 王士明 奚文龙 贾克丽 刘国敏

应用血凝抑制 (HAI) 试验对A群菌脂多糖 (LPS) 抗原作血清学分型, 国内外已获成功^[1~4], 但分型时需从待检菌株中提取LPS作为抑制抗原, 方法较繁, 不适于流行病学调查, 也不能定量测定各型LPS抗原在菌株中的含量。

本文用改进的LPS血凝抑制分型法, 对分离自我国八省一市的96株A群脑膜炎奈瑟氏菌 (NM) 进行LPS抗原的血清学分型, 并初步探讨3型的分布在流行病学上的意义。

材料与方法

一、脑膜炎奈瑟氏菌: 从贵州、江西、河南、江苏、湖北、湖南、青海、浙江省和上海市分离的A群菌96株, 其中病人菌株62株, 带菌者菌株34株。试验对照的B群4株, C群2株, 1916和1892群各1株, 皆为带菌者菌株。另有3株LPS分型参考菌株 (9型3843、10型7879和11型7891) 是美国Walter-Reed陆军医学研究所收藏的。所有菌株均系冻干保存, 开启菌种后进行了再鉴定, 皆属NM。

二、分型参考菌株提纯的LPS抗原是自制的^[1]。

三、三个型LPS抗原兔免疫血清的制备: 选择体重约2公斤的白家兔, 经背部多点皮内和两后足掌注射加有弗氏完全佐剂的LPS抗原1毫克, 每点0.1毫升。免疫后第4周开始, 每周静脉注射0.25毫克LPS盐水溶液1次, 共加强3次。在末次注射1周后试血, 若滴度合格

即放血, 分离血清, 灭活后置低温冰箱保存。临用时, 选择适宜的菌株吸收交叉反应的抗体。每毫升血清加湿菌200~500毫克, 混匀后, 置37℃1小时; 4℃1小时。离心吸出血清, 并重测血凝 (HA) 效价。

四、LPS型抗原包被的红血球制剂的制备: 分别精确称取各型LPS1毫克, 加0.1N NaOH2毫升, 于37℃处理2小时; 用0.25N HCl调pH到7.0左右, 置透析袋中于4℃透析2小时。用pH7.2的0.11M磷酸盐缓冲液 (PB) 稀释成25~50微克LPS/毫升。加等体积2%绵羊红血球, 置37℃水浴包被2小时, 用PB洗去剩余的LPS后, 以含有10%蔗糖和0.05%牛血清白蛋白的PB溶液将此红血球配成2%的悬液, 每支安瓿分盛0.5毫升, 冷冻干燥, 置4℃保存。试验时用PB将其稀释成0.5%。

五、NM菌粉的制备见我们的报道^[1]。菌粉的处理: 称干菌粉5毫克加0.1N NaOH1毫升, 置37℃水浴过夜。再以0.25N HCl调pH到7.0左右, 离心 (3000转/分) 30分钟, 取上清液作分型试验。

六、改进的HAI分型方法: ①将pH7.2 0.1M牛血清白蛋白 (0.05%) PB 0.025毫升滴入“U”型孔血凝反应板的各孔中。②在每行的第一孔滴入菌粉上清液0.025毫升, 用稀释棒连续倍比稀释, 每株菌稀释3行。③分别在各行每孔中滴入2~4个HA单位的抗9、10和11型LPS的免疫血清0.025毫升。④混匀孔内容物, 反应板置37℃1小时, 再滴入与LPS

免疫血清相同型的红血球 (0.5%, 0.025毫升/孔), 振荡反应板后, 置37°C 3小时, 记录HAI反应的结果。试验对照包括不加抑制抗原时HA反应; 已知LPS血清型的HAI反应; 不加抗LPS血清的阴性对照。与对照比, 若2个孔以上出现凝集强度由“井”~“卅”减弱到“0”~“十”或至多为“卅”时, 可判定为HAI反应阳性。

试验结果

一、LPS免疫血清的吸收: LPS中的O-特异侧链可以使家兔产生具有型特异的抗体, 而核心多糖和类脂A所产生的抗体无型特异性, 需选择适宜的菌株将其吸收。表1表明, 9、10和11型血清分别用相应型3843(9型), 7879(10型)和7891(11型)菌株吸收, 抗体全被吸收了。9和10型血清用7891菌株; 11型血清用7879菌株吸收, 各型血清仍保持较高的型特异抗体滴度, 交叉抗体滴度很低, 对分型试验无影响(表1)。

二、以菌粉制的上清液代替提取的LPS:

表2 A群菌粉上清液与纯化LPS抗原HAI分型比较

抑制抗原	A群脑膜炎奈瑟氏菌									
	80054	3843	79008	79014	79059	79121	79241	7879	79056	7891
提纯的LPS	9	9	10	10	10	10	10	10	11, 10	11
菌粉上清液型	9	9	10	10	10	10	10	10	11, 10	11
菌粉上清液滴度(1:)	8	16	32	64	64	32	16	32	64, 4	32

三、以菌粉的上清液进行LPS HAI分型的可重复性: 为了证实方法简化后, 分型结果的可重复性, 我们将80054、3843、79008、7879、79056和7891等6株A群菌在同样条件下培养3次, 制成三批菌粉, 重复测定了它们的血清型。

表3证明, 这种分型方法的可重复性是令人满意的。上述6株菌各自的LPS血清型以及HAI的滴度, 几次试验的结果均可比(表3)。

四、A群NM LPS血清型的分布: 应用上述改进的HAI方法对我国8省一市的96株A群NM进行了LPS血清学分型。流脑病人和

表1 A群NM LPS免疫血清的吸收

免疫血清 LPS型	吸收血清 的菌株号	滴度 倒数		
		9	10	11
9	吸收前	512	16	256
	3843	< 4	< 4	< 4
10	7891	128	< 4	16
	吸收前	128	512	512
	7879	< 4	< 4	< 4
	7891	8	128	8
11	吸收前	32	128	2,048
	7891	< 4	< 4	< 4
	7879	< 4	< 4	256

*LPS血清型编号与Zollinger提出的相同。

若从被检菌株中提取LPS进行HAI分型, 试验非常繁琐, 不适于流行病学调查。我们已将方法简化, 省去了用酚水提取LPS的步骤。把待检菌株制成菌粉, 用碱液浸泡, 离心取上清作为抑制抗原, 抑制LPS型抗原包被的红血球同型特异的LPS免疫血清之间的HA反应。由表2可见, 以各菌株的菌粉上清液与其纯化LPS作为抑制抗原进行LPS分型, 所得到的血清型是一致的(表2)。

表3 A群NM菌粉上清液的LPS用HAI分型的可重复性

A群菌	各型HAI 滴度 倒数(三次)								
	9			10			11		
80054	8	8	8	—	—	—	—	—	—
3843*	16	16	16	—	—	—	—	—	—
79008	—	—	—	32	32	32	—	—	—
7879*	—	—	—	16	32	16	—	—	—
79056	—	—	—	2	4	4	64	64	64
7891*	—	—	—	—	—	—	32	32	16

*分别为9、10、11型参考菌株

带菌者的A群NM LPS血清型的分布列入表4。

表4 流脑病人和带菌者的A群NM LPS血清型比较

菌株	试验株数	L ₉		L ₁₀		L ₁₁		未定型	
		株数	%	株数	%	株数	%	株数	%
病人	62			52	83.9	5	8.1	5	8.1
带菌者	34	5	14.7	28	82.4			1	2.9
合计	96	5	5.2	80	83.3	5	5.2	6	6.3

*L₉为LPS₉型, 余类推。

由表4可见, 在所试的96株A群菌中, 有90株(93.7%)可以分成L₉~L₁₁型。其中以L₁₀型最多见(83.3%), 在病人和带菌者中的分布很相近。L₁₁型只出现在病人菌株中, L₉型仅出现在带菌者菌株中。尚有6株菌不属于L₉~L₁₁型, 待进一步定型。

作为分型对照的8株其它群NM菌中, B群、C群和1892群菌各1株属L₉型, 其余5株皆不属L₉~L₁₁型。

A群NM LPS血清型在我国八省一市中的分布见表5。

表5 8省1市A群脑膜奈瑟氏菌的LPS血清型

省(市)	试验株数	血清型的分布			
		L ₉	L ₁₀	L ₁₁	未定型
青海	13		12		1
江西	25		21	3	1
贵州	21	5	12	1	3
湖北	8		7	1	
上海	4		3		1
河南	9		9		
江苏	7		7		
浙江	7		7		
湖南	2		2		

表5表明, 在八省一市中均可发现L₁₀型菌。L₉型菌只见于贵州省, L₁₁型菌出现在贵州、江西和湖北省。在贵州、江西、青海和上海等省市还有少数A群菌尚待进一步分型。只从贵州省查出了三个LPS血清型, 其它省市查出了2个或1个血清型。

A群菌LPS血清型在不同年代中的分布见表6。

由表6可见, 除于1963以前A群菌较少,

表6 不同年代的A群菌LPS血清型

分离年代	试验株数	血清型的分布			
		L ₉	L ₁₀	L ₁₁	未定型
1956	2			1	1
1963	5	5			
1973	2		2		
1974	10		8		2
1976	1		1		
1978	5		4		1
1979	54		51	2	1
1980	17		14	2	1

未发现L₁₀型外, 自1973年至1980年均以L₁₀型为最多见。

五、三个LPS血清型之间以及病人与带菌者菌株之间型LPS抗原HAI滴度的比较: 我们比较贵州、江西、青海、湖北、河南和浙江等省在1974、1979和1980年所分离的L₁₀型病人和带菌者菌株时, 发现病人菌株LPS抗原HAI的几何平均滴度(GMT)为1:33.8, 同型带菌者菌株的GMT为1:20.5, 前者比后者高($t=2.1$, $P<0.05$)。在三个LPS型中, L₉型的GMT(1:5.3)明显的低于L₁₀(1:25.3)和L₁₁(1:55.7)型。

讨 论

应用我们改进的HAI试验方法对96株A群菌进行LPS血清学分型, 获得了较高的分型率(93.7%)。此结果同Griffiss和Zollinger等人应用固相放射免疫(SPRI)抑制法进行分型的报道相似^[2-6], 可是HAI的分型方法不仅可重复性较好, 而且比SPRI抑制法简单, 操作安全, 不需要特殊设备, 便于推广。分型方法简化后, 被检菌株可不必提纯LPS, 因此更适于流行病学调查, 此外, 还可以测定各型LPS的HAI滴度。这也许能更好地比较各型菌与流脑发病的关系, 因为病人菌株LPS HAI的GMT比带菌者菌株高。初步试验证明我国A群NM的LPS抗原至少可以分成3个血清型。其中L₁₀和L₁₁型菌均可能致病, 但L₁₁型远不如L₁₀型多见。目前尚未从病人菌株中查出L₉型。

LPS血清型在地区和时间上的分布,也是以L₁₀型占优势,在流行地区内从病人和与病人密切接触者中均可以分离到此型菌。由此可见,A群NM LPS血清学分型不仅在细菌分类学上有意义,它还可能与流脑的流行有关。本试验初步表明,我国流脑的发生与流行主要与A群NM的L₁₀型有关。

Zollinger和Mandrell曾发现少数A群菌LPS为L₁~L₈型[7~8]。本报道中尚有6株A群NM的LPS未定型,它们是L₁~L₈型,还是存在着新的LPS血清型,尚待进一步试验证实。

摘 要

本文报道应用改进的HAI试验方法调查A群NM LPS抗原的血清型。此分型方法简单,可重复性亦好,并且可以测定各型LPS抗原的HAI滴度。以此方法检查我国八省一市所分离的96株A群NM,其中90株(93.7%)可以分成三个血清型(L₉、L₁₀和L₁₁),以L₁₀型最多见,占80株(83.3%),在我国流行分布较广。本试验初步分析,自1973年以后,我国流脑的流行主要与A群NM L₁₀型有关。

ABSTRACT

This paper reports the results of a revised tech-

nique of hemagglutination inhibition (HAI) test used in investigating lipopolysaccharide (LPS) serotypes of *N. meningitidis* group A. The technique of serotyping was simple and the experimental results were reproducible and the HAI titers of various LPS antigens could be determined. Ninety-six strains of meningococci group A isolated from eight provinces and one municipality in China were examined with our revised HAI test. Among them, 90 strains (93.7%) were divided into three serotypes (L₉, L₁₀, and L₁₁). L₁₀ accounted for 83.3% of all the strains studied and was found widely prevalent in China. The results of this preliminary study showed that LPS type 10 of *N. Meningitidis* group A had been associated with epidemic cerebrospinal meningitis prevalent since 1973 in China.

参 考 文 献

1. 胡绪敬等: 应用血凝抑制试验对A群脑膜炎双球菌脂多糖抗原进行血清学分型, 内部资料, 1983。
2. Zollinger WD et al: *Inf Immun*, 28(2): 451, 1980.
3. Poolman JT et al: *FEMS Microbiology Letters*, 13(4): 339, 1982.
4. Griffiss JM: *J Med Microbiol*, 15: 327, 1982.
5. Демина АА: *ЖМЭИ*, 1: 11, 1980.
6. Dininno VL et al: *J Clin Microbiol*, 15(3): 379, 1982.
7. Zollinger WD: *Inf Immun*, 18(2): 424, 1977.
8. Mandrell RE et al: *Inf Immun*, 16(2): 471, 1977.

(本文承刘秉阳教授、胡真主任审阅, 特此致谢)

淄博市流行性出血热疫源地鼠类带毒情况调查

山东省淄博市卫生防疫站

为了探索淄博市流行性出血热(简称出血热)疫源情况,于1983年4~5月选取发病最早、地理景观有代表性的临淄区边河公社和周村区南阎公社的野外和室内,以夹夜法(诱饵为生花生米)共布夹2,496夹夜,捕鼠188只,平均鼠密度为7.53%。两地野外优势种均为黑线姬鼠,分别为58.93%和43.48%。室内褐家鼠为优势种,分别为70.91%和53.43%。

将鼠全数剖取肺组织,送山东省防疫站检验,以

出血热病人特异抗体,用间接免疫荧光法检查鼠肺内出血热病毒抗原,共检鼠肺159份,其中黑线姬鼠39份、褐家鼠61份、小家鼠30份、背纹仓鼠17份、大仓鼠11份。结果只从褐家鼠中检出12只阳性,阳性率为19.67%。

初步证实,本地区为以褐家鼠为宿主的轻型流行性出血热的疫源地。

(夏 猛 整理)