

# 流感嗜血杆菌免疫血清的试制

吴丽华 周 第 杨秀琴 胡可月

**摘要** 国内获得的58534、87007、儿<sub>1</sub>三株b型菌通过革兰氏染色、X、V因子生长试验、与葡萄球菌共生所呈现的卫星现象以及与b型血清所产生的特异性凝集，证实此三株菌均为流感嗜血杆菌b型菌。

对58534、87007、儿<sub>1</sub>、HK179(丹麦)、GB3291(美国)等5株b型菌的抗原性进行了比较，以58534抗原性最好，免后滴度可达1:5120，对除HK179外的其他菌的血清滴度亦等于或高于它们本菌的滴度，用58534抗原免疫后血清的稳定性亦好，放置半年以后其滴度基本上无变化。

采用死菌抗原(b~f型)及新鲜死菌加佐剂方法免疫(a型)健康家兔，获得较高抗体水平，连续免疫三批血清，其抗体滴度基本上一致，表明该方法是稳定、可靠的。

**关键词** 流感嗜血杆菌 抗血清

国外许多国家均有流感嗜血杆菌(Hi)免疫血清制剂，目前还有一些试剂盒出售，如英国Wellcome公司出售的Wellcogen，美国Wampale公司的Bactogen，瑞典Pharmacia的Phadebact<sup>[1]</sup>。应用这些试剂盒可以在几分钟内检测出标本中的脑膜炎双球菌、肺炎双球菌及流感嗜血杆菌的抗原。为了解Hi在我国的流行情况，我们试制了Hi免疫血清，现将结果报道如下。

## 材料和方法

一、培养基：以自制的心脑浸液为基础液，含有1%蛋白胨、0.5%NaCl、0.2%葡萄糖、0.25%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、氯化血红素3mg/100ml、辅酶1 1mg/100ml、pH7.6~7.8。

### 二、菌种：

1.来源：HK 645a型、HK179b型、HK 658c型、HK644 d型、HK6 41e型、HK646f型，均为丹麦血清研究所赠送，GB3291b型由美国CDC赠送，58534b型从中国药品生物制品检定所购买，87007b型为首都儿科研究所赠送(从病人分离出)，儿<sub>1</sub>b型由北京儿童医院赠送，系1989年从病人脑脊液中分离，共10个菌株。

2.菌种鉴定：对国内获得的三株b型菌按WHO为亚太地区印发的“急性呼吸道传染病实验室细菌检验手册”<sup>[2]</sup>方法进行。

三、免疫动物：健康家兔，体重2kg左右。

### 四、抗原制备：

1.陈旧菌体抗原制备：菌种接种于心脑浸液大管斜面，经纯菌试验合格，镜检为G<sup>-</sup>小杆菌，培养16~18小时的等三代菌苔刮入0.5%福尔马林生理盐水内，放4℃、48小时，经无菌试验合格，放冰箱备用。

2.新鲜菌体抗原制备：将第三代菌培养18小时左右后刮入0.5%福尔马林生理盐水中，放37℃、1小时即可使用。

五、佐剂制备：将抗原、羊毛脂、石蜡按3:2:3及2:3:5两种不同比例配制，两者所含菌浓度相同。

### 六、免疫途径和方法：

1.陈旧菌体抗原免疫：除HK 645a型以外，所有b~f五个血清型均用此抗原免疫，抗原剂量15亿、30亿、60亿/0.5 ml×4，共6次耳静脉注射，每次间隔4~5天，于末次注射后

本文作者单位：卫生部北京生物制品研究所 100024 北京市



6~8天采血测抗体。并用58534抗原观察不同次数(5、6、7次)免疫后的抗体水平。

2.对HK645a型抗原的免疫方法进行了比较,观察了加与不加佐剂、两种不同配方的佐剂、新鲜与陈旧抗原免后所产生抗体水平的差别。所有加佐剂免疫的家兔第一次均接受5亿/0.5ml肌注,间隔10天,第二次为10亿/0.5ml,10天后改为耳静脉注射,以后步骤同上。不加佐剂抗原亦同b~f方法。

七、吸收菌的制备及吸收方法:按我所规程进行。

## 结 果

### 一、国内获得的三株b型菌的鉴定:

1.菌落特征:三株b型菌生长于自制的心脑浸液培养基上的特征相同,均为灰白色、湿润、半透明菌落,直径约1~2mm,有融合现象。

2.涂片检查均为G<sup>-</sup>小杆菌,有成对排列现象,偶尔可见多形性,在菌体周围可见明显的荚膜圈,用Hiss法染色可见清晰的淡紫色荚膜,菌体呈淡蓝色,58534菌更加明显。

3.X、V因子生长试验:该菌在营养琼脂上不生长,在放置含有X、V因子纸片(Taxo产品,曹玉朴大夫赠)之间则有本菌生长,三株b型菌均生长良好。

4.卫星现象:羊血琼脂平皿接种Hi,再点种葡萄球菌,则在葡萄球菌周围可见到本菌生长丰盛,呈卫星现象,三株b型菌结果相似。

5.血清学检查:三株b型菌均与b型血清产生凝集(该血清为丹麦血清研究所生产)。结果表明,国内获得的58534、87007、儿<sub>1</sub>三株均系Hi b型菌株。

二、不同免疫次数抗体滴度的比较:免疫5、6、7次之间其抗体水平在1:2560~5120,无显著性差异。

三、不同免疫方法的比较:抗体水平测定的结果表明,①加入佐剂比不加佐剂免疫效果

好,同是新死菌,加入佐剂后其抗体滴度可到1:1280,而不加的只有1:320~1:640。②同是老死菌,加两种不同佐剂配方,抗体滴度为1:320左右,无显著性差异。③新鲜制备抗原比陈旧抗原免疫效果好,前者滴度可达1:320,而后者只有1:40。

### 四、五个不同b型菌株抗原性比较:见表1。

表1 五个不同Hi b型菌株抗原性比较

血清号	抗 原 号					Difco Hi b型血清
	58534	87007	儿1	HK179	GB3291	
58534	5120	1280	1280	320	640	160
87007	640	1280	640	320	320	160
儿1	640	640	640	320	160	80
HK179	320	320	640	1280	640	40
GB3291	1280	640	320	640	640	80

注:表内数字为血清抗体滴度的倒数

表1结果表明,58534抗原不仅对本菌血清的滴度高,而且对除HK179外的其他三个b型血清滴度均等于或高于本菌的滴度,与美国Difco b型血清的滴度也达到1:160,58534菌的抗原性似较其他四个菌株为好。

根据实验结果,采用3:2:3佐剂配方加新死菌方法免疫HK645 a型,b型抗原选用58534,连续免疫三批家兔,每个抗原三只家兔,结果见表2、3。

表2 三批抗原免后滴度及吸收后滴度

细菌种型	免后血清滴度(倒数)			吸收后血清滴度(倒数)		
	第一批	第二批	第三批	第一批	第二批	第三批
HK645 a	1280	1280	1280	80	80	160
58534 b	5120	5120	5120	560	320	320
HK658 c	2560	2560	2560	640	640	640
HK644 d	320	320	320	20	80	80
HK641 e	1280	1280	640	80	80	40
HK646 f	640	640	640	40	40	320

从表2免后效价看,三批血清滴度基本一致,以b型最高,可达1:5120,d最低,只有1:320。吸收后滴度则大大下降,一般降



表3 Hi不同血清型之间交叉反应

抗 原	血 清 型					
	a	b	c	d	e	f
HK645 a	卅	卅	+	+	卅	-
58534 b	卅	卅	卅	卅	卅	卅
HK658 c	+	卅	卅	+	±	-
HK644 d	+	+	-	卅	-	±
HK641 e	卅	+	-	+	卅	卅
HK646 f	-	-	-	+	+	卅

4管，三批血清中除d、f型外，其他滴度也相同或相似。

表3的交叉反应情况表明，六个血清型之间的交叉反应较强，尤以b、c之间，其试管凝集试验滴度可达1:1280。

稳定性测定表明放置半年或半年以上其滴度下降一管左右。

### 讨 论

1. 国内获得的三株b型菌鉴定结果表明，均属流感嗜血杆菌，与b型血清产生凝集。此结果也初步揭示国内也有由Hi b引起的疾病存在。

2. 在流感嗜血杆菌中由于b型的致病力最强，b型血清质量好坏直接关系到诊断结果，我们在对5株b型抗原性比较中发现58534菌对本菌的血清滴度达1:5120，而对其他四个b型菌的滴度除HK179外，均等于或高于它们本菌的滴度，在5个菌株中与美国Difco b型血清的滴度也是最高的，达1:160，抗原性明显优于其他菌株，其稳定性亦好。

3. 应用佐剂加新鲜抗原免疫家兔，可大大提高HK645a型的免疫原性，使其血清滴度大幅度升高（从1:40升到1:1280），从而解决了a型免疫原性差的问题。

4. 连续制备三批血清，其结果基本一致，说明本方法基本上是稳定和可靠的。

A Preliminary Report on the Preparation of Antisera against *Haemophilus influenzae* Wu Lihua, et al., National Vaccine and Serum Institute, Beijing 100024

The antigenicity of 5 strains of serotype b *Haemophilus influenzae* was compared. Strain 58534 showed a higher titer than the rest four.

Three lots of antisera were made by immunizing rabbits with 6 strains of *Haemophilus influenzae*. The results indicated that the antibody titer against strain 58534 also showed a higher level, and the titer only dropped by one dilution after stored in cool place for half a year. We considered that *Haemophilus influenzae* serotype b strain 58534 is a good strain for the preparation of antiserum against *Haemophilus influenzae*.

Key words *Hemophilus influenzae* Antiserum

### 参 考 文 献

- 1 吴丽华. 关于流感嗜血杆菌及其菌苗的研究. 微生物学免疫学进展, 1990, 3: 79.
- 2 Acute respiratory infections laboratory Manual of bact. procedures WHO Western Pacific Education in Action Series, 1986. 31~38.

(收稿: 1992-08-26)

## 《1991年中国疾病监测年报》征订启事

1991年中国疾病监测年报公开发售。该年报汇总了全国疾病监测系统1千万人口的出生、死亡(分死因), 以及35种传染病的发病与死亡资料。资料详尽, 有代表性。对不同年龄段、不同地区的发病和死亡特征作了探讨。该资料可为公共卫生科研人员进一步分析研究提供素材, 为各级卫生决策人员制定卫生策略提供依据。本书计44万字, 定价每本25.00元。订购者请与陈爱平联系(联系地址: 北京市雅宝路3号, 流研所疾病监测组, 邮政编码100020, 电话5128189), 还可购买1990年中国疾病监测年报, 32万字, 每本20.00元。