

# 不同 I 相百日咳菌株抗原构造的研究\*

何秋民 陈正仁

(卫生部生物制品研究所,北京)

制造百日咳菌苗用的菌种,应与 I 相百日咳血清凝集且到达血清效价或效价之半<sup>[1]</sup>,但在我们的工作中遇到不同菌株与国际间常用的 18323 菌株所作的 I 相百日咳血清的凝集价不一致。文献上有人提出<sup>[2-4]</sup>, I 相菌的凝集力有所不同;有人认为<sup>[5,6]</sup>,凝集力及吸收能不同的菌株其抗原构造相同;但也有人证明它们的抗原构造不同<sup>[7-11]</sup>。本文对国内外不同来源、不同凝集力的 I 相百日咳菌株的抗原构造,及其它 I 相菌特性等方面进行了研究。

## 材料及方法

**菌种** PC、P5 及 P10 菌株均系在北京分离的。PCV 及 P5V 菌株系由 PC 及 P5 菌株获得的适应性菌株<sup>[12]</sup>。55155 及 5534 菌株系由上海分离的。58026 菌株系在大连分离的。58019 菌株系苏联菌株(由卫生部药品生物制品研究所得来)。18530、18380、18323 菌株来自美国中央卫生实验院。44122 菌株来自美国纽约州卫生实验所。58012 菌株来自英国李斯德研究所。久子及东滨菌株来自日本北里研究所。所用菌种均用冷冻真空干燥法保存。

**培养基** 采用羊肝浸液包姜氏培养基<sup>[13]</sup>。

**血清的制造方法** 将在羊肝浸液包姜氏培养基上 37°C 培养 44—48 小时的百日咳菌苔刮入含 0.125%福马林盐水内,做成均匀悬液,经无菌试验合格后,稀释成每毫升含菌 50 亿的菌液<sup>1)</sup>。注入家兔静脉内,每周连续注射 3 日,每日 1 次,共注射 5 周,第 1 周每次注射 0.1 毫升,以后每周增加 0.1 毫升,末次注射 14 日后采血、分离血清、加 1/5 万硝酸汞液作防腐剂。

**血清吸收方法** 将百日咳菌液用每分钟 3 千转离心沉淀 1 小时,吸去上清液,加入血清内充分摇匀后,于 37°C 放置 3 小时,每隔 30 分钟振荡 1 次,取出后于冰箱过夜,次日再离心沉淀,将上部血清移入新沉淀的菌苔管内,继续进行吸收,每次吸收后做定量凝集试验。凡血清连续吸收 3 次,血清内的剩余效价不再下降时,即认为该抗原不能再吸收该血清内的剩余抗体。

**凝集试验方法** 用两倍稀释法将血清稀释成若干稀释度,于每小管内加血清及每毫升含 25 亿的菌液各 0.5 毫升,摇匀后于 37°C 温室过夜,次日观察结果,以“+”为最终效价。

**免疫力试验方法** 用含不同浓度的菌液(每毫升 8、1.6 及 0.32 亿) 0.5 毫升,分别腹腔免疫体重 10—12 克小鼠各 16 只,14 日后用 18323 菌株进行脑内攻击(注射 100LD<sub>50</sub> 以上)。观察 14 日,用 Read 及 Muench 氏方法计算保护 50% 的最小免疫剂量 (ED<sub>50</sub>)。

## 试验结果

### 一、用两株 I 相菌所作血清,分别用 5 株 I 相菌作交叉凝集试验及吸收的结果

除可看出不同 I 相菌株与不同 I 相血清的凝集力有不同外,且进一步看出不同菌株

\* 本文曾收集在本所内 1963 年生物制品集刊中。1965 年 5 月修改。

本文 1963 年 5 月 18 日收到。

1) 我国浓度 26.32 亿,等于美国浓度 100 亿。

的抗原构造以及不同 I 相血清内的抗体种类有不同,详见表 1。

表 1 两株 I 相菌所作血清被 5 株 I 相交叉吸收前后之情况

血清	凝集元		18323	PCV	久子	58019	18530
	吸收元	凝集反应结果					
18323	0	0	6400++	6400++	6400++	1600++	1600++
	18323	215	200-	200-	200-	200-	200-
	PCV	215	200-	200-	200-	200-	200-
	久子	381	200-	200+	200-	200+	200±
	久子	655	200-	200+	200-	200+	200±
	久子	1116	200-	200+	200-	200+	200±
	58019	381	1600++	1600++	1600++	200-	200-
	58019	665	1600++	1600++	1600++	200-	200-
	58019	1116	1600++	1600++	1600++	200-	200-
	18530	381	1600++	1600++	1600++	200-	200-
	18530	665	1600++	1600++	1600++	200-	200-
18530	1116	1600++	1600++	1600++	200-	200-	
58019	0	0	1600++	3200++	800++	3200++	3200++
	18323	381	200-	400+	200-	400+	400+
	18323	552	200-	200-	200-	200-	200-
	PCV	381	200-	200-	200-	200-	200-
	久子	381	400+	1600++	200-	1600+	800+
	久子	552	400+	1600++	200-	1600+	800+
	久子	1013	400+	1600++	200-	1600+	800+
	58019	381	200-	200-	200-	200-	200-
	18530	381	200+	400++	200-	400++	400+
	18530	552	200-	200+	200-	400+	400+
	18530	952	200-	200-	200-	200-	200-

\* 为吸收每毫升血清所用菌数的累积剂量。

1. 58019 及 18323 血清各用 58019、18323、18530、PCV 及久子菌液吸收后,可将这两种血清的全部或部分凝集抗体吸收掉。因此可证明这两种血清内有共同抗体 A,吸收用的 5 个菌株有能吸收共同抗体 A 的共同抗原 a。

2. 58019 及 18323 血清用久子菌液多次吸收后,虽与久子菌液不再凝集,但仍能与 PCV、58019、18530 及 18323 菌液凝集,因此,可认为这两种血清内,除有共同抗体 A 外,尚有不能被久子菌株所吸收的抗体 B。因 58019 血清被久子菌株吸收后的剩余抗体的效价较高,18323 血清的剩余抗体效价较低,故可认为 58019 血清内的抗体 B 较多,18323 血清内的抗体 B 较少;同时还可肯定久子菌株不含抗原 b,而 PCV、58019、18530 及 18323 菌株内则均有抗原 b。

3. 18323 及 PCV 菌液均能将 18323 及 58019 血清的抗体全部吸收完,而 58019 及 18530 菌液只能将 58019 血清内的抗体吸收尽,但不能将 18323 血清内的抗体全部吸收完,因此,可认为 18323 及 PCV 菌株除含有抗原 ab 外,尚会有 58019 及 18530 菌株所未

有的抗原 c。另外, 18323 血清被 58019 及 18530 菌液吸收后所得血清能与久子、18323 及 PCV 菌株相凝集, 因之可肯定久子菌也含有抗原 c。

4. PCV、58019、18530 及 18323 菌株各用 381 亿个菌即能将 58019 血清内的抗体 A 吸收完, 但吸收该血清内的抗体 B 时, 所用的剂量有不同, PCV 及 58019 菌株各只用 381 亿, 18323 及 18530 菌株则分别需要 552 亿与 952 亿, 因此可认为该 4 个菌株所含抗原 a 的吸收能或含量大致相同, 但抗原 b 的吸收能或含量则不同, 即 PCV 及 58019 菌株最强, 18323 次之, 18530 最弱。

## 二、I 相百日咳菌株所含不同抗原的耐热性

取 18530 及 P5V 的菌液各用福马林及 100°C 加热两小时进行杀菌, 分别与 18323 及 58019 血清进行吸收, 结果只有福马林杀菌的菌液能将血清内相应抗体吸收掉, 加热杀菌者则不能, 因此可进一步肯定上述之抗原 a, b 及 c 均为不耐热的 L 抗原。

## 三、不同来源的 I 相百日咳菌的抗原构造

用上述的 B 及 C 因子血清与不同来源的 16 株 I 相百日咳菌作凝集试验, 结果证明: 它们的不耐热抗原的构造至少有 ac...、ab... 及 abc... 三种类型, 且后者因为与 B 因子血清凝集效价的高低又可分为两类。1950 年在北京分离的 P5 及 PC 菌株含有 ac... 及 abc... 抗原, 1952 年在北京分离的 P10 菌株的 L 抗原为 a(b)c..., 由此尚可看出, 同一地区在不同或相同年代所分离的菌株的抗原构造有不同。详见表 2。

表 2 不同来源的 I 相百日咳菌的 L 抗原类型

菌株来源		我 国							
		北 京					上 海		大 连
菌株号		P5	P5V	PC	PCV	P10	5534	55155	58026
凝集情况	C 因子血清	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+
	B 因子血清	50-	50-	1600+	1600+	800+	1600+	1600+	50-
含 L 抗原的类型		ac	ac	abc	abc	a(b)*c	abc	abc	ac
菌株来源		美 国				日 本		英 国	苏 联
菌株号		18530	18380	18323	44122	久子	东滨	58012	58019
凝集情况	C 因子血清	50-	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+	1600+	50-
	B 因子血清	1600+	1600+	400+	800+	50-	200+	50-	1600+
含 L 抗原的类型		ab	abc	a(b)c	a(b)c	ac	a(b)c	ac	ab

\* (b) 系含 b 抗原较少或凝集力较弱。

## 四、不同抗原构造的 I 相百日咳菌的其他 I 相菌特性的情况

将上述 16 株 I 相百日咳菌按照生物制品及检定规程的要求进行全面检定, 除与不同类型的 I 相血清的凝集效价有不同外, 菌形、菌落、培养特性、家兔皮肤坏死试验以及对小

鼠的毒力与免疫力试验均合乎规程<sup>[1]</sup>,且无显著差别。将含不同抗原的菌株同时进行5次免疫力试验,ED<sub>50</sub>均为1.5亿左右无差别,详见表3。

表3 不同抗原构造的I相百日咳菌免疫力之比较

试验号	免疫菌液		攻击菌株		对照组 LD <sub>50</sub> 的菌数	免疫组攻击 LD <sub>50</sub> 数目	免疫组 ED <sub>50</sub> 剂量 (亿)
	菌株号	L 抗原 类 型	菌株号	L 抗原 类 型			
603	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	76	1316	1.11 1.63
605	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	382	262	1.25 1.03
6112	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	508	198	1.93 1.72
6113	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	210	476	1.12 1.47
6114	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	134	746	1.84 1.30
603,605 6112—6114	P5V 18530	ac... ab...	18323 18323	abc abc	76—508	198—1316	平均 1.45 平均 1.43

## 讨 论

Smolens 等<sup>[2]</sup>、Cohen<sup>[4]</sup>及 Kendrick<sup>[3]</sup>均发现新分离的I相百日咳菌的凝集力有所不同,虽然,Cohen及 Kendrick在当时未作I相百日咳血清与抗原构造的工作,但却明确地提出了这方面的工作应进一步研究。1951年 Standfast<sup>[5]</sup>证明了I相百日咳菌株间的凝集力及吸收能有不同,且根据两者的强弱将百日咳菌分为四类,但是他认为凝集力及吸收能不同的I相百日咳菌株间的血清学方面是一致的。1955年 Ungar<sup>[6]</sup>也认为新分离的I相百日咳菌的凝集力及吸收能有不同,但抗原构造一致。1953年春日等<sup>[4]</sup>将I相菌的抗原分为K抗原及O抗原,且K抗原又分为耐热的S抗原及不耐热的L抗原。1954年他<sup>[5]</sup>又进一步将L抗原分为a、b、c三种,但未提到不同I相百日咳菌株间的抗原构造有无不同。1953年 Anderson<sup>[7]</sup>用血清交叉方法得出K抗原有五种,用2、3、4三种K因子血清将173株新分离的百日咳菌分为五类,证明了不同I相菌株间的抗原构造有不同,且不同抗原构造的I相菌对小鼠的免疫力无差别<sup>[6]</sup>。1954年 Margni<sup>[8]</sup>证明了由英国、北美、阿根廷等不同地区得来的11株I相百日咳菌的抗原构造有不同。1957年 Eldering<sup>[9]</sup>,1959年 Preston及 Te Punga与1960年 Lacey<sup>[11]</sup>先后证实了 Anderson的工作。

我们的工作证实了春日<sup>[5]</sup>提出的L抗原可再分为三种,且进一步得出不同I相菌株间的L抗原不同;抗原构造相同I相百日咳菌株因所含抗原量的数量不同;以致在凝集力与吸收能方面有不同结果。这也可能是 Standfast及 Ungar<sup>[6]</sup>发现了I相菌株间凝集力与吸收能有不同,而未能证明它们之间抗原构造不同的原因。Anderson<sup>[7]</sup>先用3株I相菌与三种血清交叉吸收,得到了四种K抗原,再用另外3株菌与另外三种血清进行吸收,又得到了第五种K抗原。我们仅用两种血清与五株菌交叉吸收,得到三种L抗原;如

果用更多的不同抗原构造的 I 相菌作血清,进行交叉吸收,很可能得到更多的不同种的 L 抗原或 S 抗原。至于我们所获得不同种的 L 抗原是否与春日的三种 L 抗原及 Anderson<sup>[6]</sup> 的 K 抗原相同,因缺乏对照材料,不能断言。

由于缺少其他毒力较强适于脑内攻击用的菌株,我们只用 18323 菌株攻击了免疫小鼠,未能用抗原构造不同的百日咳菌株进行交叉攻击,这也可能是 Anderson 和我们未能发现不同抗原构造的 I 相菌对小鼠的免疫力有差别的原因。1963 年 Preston 及 Evans<sup>[7]</sup> 用含有不同抗体的百日咳血清被动免疫小鼠后,用不同抗原构造的菌株进行交叉攻击,发现二者有一定的交叉免疫力,但不如对相应菌株免疫的好。1963 年 Preston<sup>[8]</sup> 于不同地区及同一地区分离出抗原不同的百日咳菌株。且在 3 例接受预防接种及 11 例未接受预防接种的百日咳患者分离出的菌株中,发现有当地多数菌苗中未包括的抗原 3。因此,作者认为如果百日咳菌苗内不包括当地流行菌株含有的抗原,是不会有较好的免疫效果的。进一步进行不同抗原构造的 I 相百日咳菌株间的交叉免疫力的研究,广泛了解使用菌苗地区的百日咳菌株的抗原构造,是有助于提高百日咳菌苗质量的重要课题。在这些情况未弄清以前,选择含抗原种类较广的菌株来生产菌苗是比较妥善的。

我们证明 I 相百日咳菌株的凝集力的不同是与本身及血清所含抗原及抗体的种类有关。理想的检定菌种用的血清应含有广泛的抗体,在这个问题未解决以前,我们认为能到达 I 相百日咳血清效价与否,不是一个正确衡量 I 相百日咳菌的标准。特别是判定某一株百日咳菌是否适于作菌苗的菌种,应从 I 相菌的全部特性来考虑;特别是免疫力试验。

Anderson<sup>[7]</sup> 提出了同一患者在两次分离的菌株以及同一传染源的不同患者所分离出的菌株间,抗原构造相同,如上述情况能被证实,则可利用菌株间抗原构造的异同,从事传染线索的调查,有助于百日咳流行病学的工作。

## 摘 要

一、不同 I 相百日咳菌株与不同 I 相百日咳血清的凝集力有所不同,且具有不同凝集力的 I 相菌的抗原构造亦不同,惟抗原相同的 I 相菌的凝集力与吸收能也有不同者。

二、I 相菌的 L 抗原至少有 a、b、c 三种,a 抗原是 I 相菌共同的抗原。b 及 c 抗原在不同 I 相菌株内有不同。用 B 及 C 因子血清可将我国、苏联、美国、英国、日本不同来源的 16 株 I 相百日咳菌分为含有 L 抗原 ac···、ab···、abc···三大类。

三、不同抗原构造的 I 相菌株间同其他 I 相菌的特性一致。用同一菌株(18323)进行攻击时,对小鼠的免疫力无差别。

四、对文献上认为凝集力不同的 I 相菌的抗原构造是否一致;用 I 相血清来判定 I 相菌的可靠性;菌株间不同的特异抗原在免疫方面的作用与制造百日咳菌苗用的菌种的抗原构造的问题;以及不同及相同抗原构造的 I 相菌株在流行病学方面的意义等方面进行了讨论。

## 参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部生物制品委员会: 生物制品制造及检定规程, 43页, 1959年。
- [2] Smolens, J., McLaren, C. S., McAller, D. S. and Flavell, E. H.: *J. Immunol.*, **57**:361, 1947.
- [3] Kenderick, P. L., Updyke, E. L. and Eldering, G.: *Amer. J. Public. Health*, **39**:179, 1949.
- [4] Cohen, S. M.: *Rep. N. Y. St. Dep. Health*, **48**, 1949.  
(摘自: Anderson, E. K.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **33**:202, 1953.)
- [5] Standfast, A. F. B.: *J. Gen. Microbiol.*, **5**:531, 1951.
- [6] Ungar, J., Muggleton, P. W. and Stevens, W. K.: *J. Hyg.*, **52**:475, 1954.
- [7] Anderson, E. K.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **33**:202, 1953.
- [8] Margni, R.: *Bull. Hyg.*, **31**:580, 1956.
- [9] Eldering, G., Hornbeck, C. and Baker, J.: *J. Bact.*, **74**:133, 1957.
- [10] Preston, N. W. and Te Punga, W. A.: *J. Path. Bact.*, **78**:209, 1959.
- [11] Lacey, B. W.: *J. Hyg.*, **58**:57, 1960.
- [12] 陈正仁、何秋民: 微生物学报, **5**:411, 1957。
- [13] 何秋民、陈正仁: 微生物学报, **5**:75, 1957。
- [14] 春日忠善等: 日本细菌学杂志, **8**:841, 1953。
- [15] 春日忠善等: 日本小儿科学会杂志, **58**:718, 1954。
- [16] Anderson, E. K.: *Acta. Path. Microbiol. Scand.*, **32**:125, 1953.
- [17] Preston, N. W. and Evans, P.: *Nature*, **197**:508, 1963.
- [18] Preston, N. W.: *Brit. med. J.*, **2**:724, 1963.

## ANTIGENIC COMPOSITION OF DIFFERENT STRAINS OF PHASE I HEMOPHILUS PERTUSSIS

HO CHIU-MIN AND CHEN CHEN-JEN

(National Vaccine and Serum Institute, Peking)

Two rabbit sera, prepared from strains of phase I *Hpertussis* 18323 and 58019, were absorbed separately with various concentrations of 5 strains of phase I organisms. Agglutination tests were tested respectively with these organisms. Very interesting phenomena were noticed: (1) various strains of phases I *Hpertussis* showed differences in agglutinability with these two sera. By means of antigenic analysis, the L antigen within these organisms could be classified into at least three groups according to our experiments: *ab*, *ac*, and *abc*. Furthermore by using the nonspecific sera B and C, sixteen strains all of phase I obtained in this country and from USSR, USA, England and Japan were also examined and could be grouped according to their antigenic structure. (2) Although there were antigenic differences between different strains of phase I *Hpertussis*, the other characteristics were found to be the same, particularly, the immunogenicity was found to maintain the same level as was shown in mouse protection tests.

We fully agree with Standfast that agglutinability varied considerably from strain to strain and, therefore, the expression "agglutinates to titre" could not be considered as a criterion of phase I organism. It is suggested that various strains with different antigenic composition should be used in preparing prophylactic vaccines.