

脑膜炎奈瑟氏菌血清学分群的研究

I. 新血清群的研究

丁绍卿 叶人邦 杨树屏 张焕春 王菱章

(北京药品生物制品检定所, 北京)

用细菌凝集吸收试验和间接血凝试验的方法, 对于我国的不与脑膜炎奈瑟氏菌 A、B、C、D 群分群诊断血清凝集的菌株进行了研究, 建立了我国 7 个新的血清群。抗原分析证实, 这些菌群是完全不同的。用代表菌株的菌号命名为 1889 群、1890 群、1892 群、319 群、1916 群、1486 群、1811 群。这些新的血清群约占从带菌者鼻咽部所分离菌株的 15% 左右。1916 群是从病人血液及带菌者鼻咽部分离检出, 其余菌群都是从带菌者鼻咽部检出。1889 群、1892 群、319 群、1916 群为常见菌群, 1890 群、1486 群、1811 群则较少见。

脑膜炎奈瑟氏菌的血清学分群, 对于流行性脑脊髓膜炎的流行病学, 临床诊断, 预防和治疗, 以及筛选制造菌苗用的菌种和观察菌苗的预防效果都有很重要的意义。

血清学分群的工作进行得比较早。1914 年 Dopter 和 Pauron 用细菌凝集吸收试验的方法把脑膜炎奈瑟氏菌分成脑膜炎球菌和副脑膜炎球菌, 副脑膜炎球菌又分为 α 、 β 、 γ 型。1915 年 Gordon 和 Murray 用同样的方法分为 I 型、II 型、III 型和 IV 型。此后还有很多学者进行了血清学分群的研究工作。1942 年以后各国习惯采用 Branham 的分群方法, 即分为 I 群、II 群、IV 群和 II₂ 群^[1]。从上述分群工作中可以看出型和群的概念含混不清, 给分类工作带来一定的困难。1950 年国际微生物学会命名委员会根据脑膜炎奈瑟氏菌的群特异性多糖体抗原, 把脑膜炎奈瑟氏菌分为 A 群、B 群、C 群和 D 群等四个血清群^[2-5]。至此分类工作得到了统一。1961 年以来国外又报告发现了一些新的血清群菌株^[6,7], 并对 B

群和 C 群进行了杀菌力分型 (Bactericidal serotyping)^[7-10]和脑膜炎球菌素(meningocin)分型^[11,12]。

脑膜炎奈瑟氏菌血清分群及分型的研究对于防治流行性脑脊髓膜炎很重要。目前英美等国家中, 主要引起流行的菌株是 C 群和 B 群^[13,14], 而 C 群中杀菌力 II 型占优势^[10]。在非洲, 中东某些国家, 以及苏联的流行菌株则是 A 群^[15,16]。新血清群 X、Y(B₀)、29E、W-135 群也常常引起发病^[7,13]。我国某些省市流行菌株亦是 A 群, 尚有 B 群、C 群、1916 群引起散发病例。流行菌株的血清群可以发生变化^[13], 值得我们重视。

尤其是在无产阶级文化大革命运动中, 遵照毛主席关于“独立自主、自力更生”的伟大教导, 开展了社会主义大协作, 在较短的时间内, 收集了全国十几个省市的脑膜炎奈瑟氏菌种二千余株。基本上摸清了我国的菌群分布。并建立了我国的 7 个新血清群。给防治工作创造了良好的条件。

本文于 1975 年 5 月 7 日收到。

材料和方法

(一) 菌种来源及鉴定

菌种分别是上海、北京、天津、山东、贵州、福建、河北、山西、辽宁等地的卫生防疫站和医院分离供给的。这些菌种中少数是从病人脑脊髓液、血液及瘀血点分离出的，大部分是从带菌者鼻咽腔分离出的。收到菌种后及时进行冷冻真空干燥保存，并按本实验室鉴定方法进行检查。菌种接种在 10% 羊血巧克力色琼脂培养基上，37℃ CO₂ 环境培育 16—18 小时。菌落为灰白色半透明的圆形隆起，光滑湿润，边缘整齐，有光泽。菌形及生长试验典型。生化反应为分解葡萄糖和麦芽糖、产酸不产气；不分解蔗糖、甘露醇、果糖、乳糖及半乳糖；少数菌株只分解葡萄糖或麦芽糖。

在检查的 2320 株菌种中，约有 15% 的菌种不与 A、B、C、D 群分群诊断血清凝集。被称为“不能分群”菌株。从“不能分群”菌株中选出 132 株分别去免疫家兔制备抗血清，进行群代表株的筛选。

(二) 抗血清的制备

将初步筛选出的“不能分群”菌株接种在 10% 羊血巧克力色琼脂培养基上，37℃ CO₂ 环境培育 16—18 小时，菌苔刮入生理盐水中，制成 50 亿/毫升的菌悬液，然后加入 0.5% 福尔马林杀菌即为免疫原。检定合格后，进行家兔耳静脉免疫注射，每周免疫两次，每次间隔 2—3 天，共免疫 8 次。剂量为 10 亿，10 亿，20 亿，30 亿，40 亿，50 亿，75 亿，100 亿。末次免疫后 7 天采用颈动脉放血，分离血清，除去类属凝集素。一般滴度可达到 1:160—1:640。

(三) 细菌凝集吸收试验

菌株在 N₂ 固体培养基(含葡萄糖、玉米淀粉及无机盐)上生长 16—18 小时。菌苔刮入生理盐水中，制成 100 毫克/毫升的菌悬液。用 1% 福尔马林杀菌。吸收前将菌悬液用生理盐水洗 1—2 次。吸收试验根据凝集试验结果每毫升原血清加入适量的吸收菌，充分摇匀，置 37℃ 水浴箱内 3 小时，随时振摇，然后于 4000 转/分离心沉淀 30 分钟。检查吸收后的抗血清凝集反应强度及效价的变化。一次吸收不完全时，可重复吸收，直至抗血清不再和吸收菌抗原出现凝集反应时为止。吸收

后的抗血清用玻片凝集试验和试管定量凝集试验进行检定。

(四) 间接血凝试验

抗原的制备是用冻融方法破碎菌体。在 -40—-45℃ 冷冻后，于 37℃ 孵育室内融化。共反复冻融 3—4 次，镜检菌体完全破碎。然后加入 5 倍量无水乙醇沉淀，4000 转/分离心沉淀 30 分钟，收集沉淀物，加入生理盐水提取多糖体抗原。用提取之多糖体抗原致敏经用生理盐水洗 3—4 次之绵羊红血球。用微量法进行间接血凝试验。

结 果

一、群代表株的初步筛选

将菌落菌形，生长特性及生化反应典型的脑膜炎奈瑟氏菌株进行血清学分群。共筛选出 132 株不与脑膜炎奈瑟氏菌(A、B、C、D 群)标准分群血清凝集的(不能分群)菌株，免疫家兔制备抗血清进行抗原分析。第一批用 71 免疫株。用玻片凝集试验进行代表株的初步筛选。选出 3 个代表株(表 1)。

表 1 第一批“不能分群”代表株交叉玻片凝集试验结果

抗血清 抗 原	1889	1890	1892
1889	+++	-	-
1890	-	+++	-
1892	-	-	+++

表 1 是抗血清用生理盐水稀释 5 倍后玻片凝集试验结果。证明 3 个代表株的抗血清都和本菌呈现玻片强凝集反应，而各株间无交叉凝集反应。

第二批共选出 61 株，不与 A、B、C、D 群分群诊断血清凝集，也不与 1889 株、1890 株、1892 株的抗血清凝集。这些菌株免疫家兔制备抗血清后，用玻片凝集试验筛选出 4 个代表株，即 319、1916、1486、1811 株(表 2)。

表 2 第二批“不能分群”代表株交叉玻片凝集试验结果

抗血清 抗 原	319	1916	1486	1811
319	+++	-	-	-
1916	-	+++	-	-
1486	±	±	+++	-
1811	-	-	-	+++

表 2 结果说明, 319, 1916, 1486, 1811 株制备的抗血清都与本菌呈现玻片强凝集反应(抗血清已用生理盐水稀释 5 倍)。各株间无明显的交叉凝集反应, 证明是完全

不同的血清群。
132 株“不能分群”菌株经过免疫家兔制备抗血清后, 进行玻片凝集试验。上述试验有的菌株反复重试几次, 初步筛选出 7 个群代表株, 即 1889, 1890, 1892, 319, 1916, 1486, 1811 株。

二、抗原分析建立新的血清群

把初步筛选出的 7 个群代表株和 A、B、C、D 群菌株用玻片凝集试验和试管定量凝集试验进行类属抗原关系的测定。然后用细菌凝集吸收试验作进一步的抗原分析。

表 3 A、B、C、D 群和 7 个“不能分群”菌株交叉玻片凝集试验

抗血清 抗 原	A	B	C	D	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
A	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
D*	-	-	-	++	+	+	+	+	+	+	+
1889	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-	-
1890	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-
1892	-	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-
319	-	-	-	-	±	-	-	+++	-	-	-
1916	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	-	-
1486	-	-	-	-	-	-	-	±	±	+++	-
1811	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++

* D 群菌株比较粗糙, 与正常家兔血清有弱凝集反应, 在生理盐水中还有微弱的凝集。A、B、C 群抗血清用 D 群抗原吸收过后, 不再出现交叉凝集反应, 其余 7 个“不能分群”菌株的抗血清未经 D 群抗原吸收。

从表 3 结果看出, A、B、C、D 群和 7 个“不能分群”菌株交叉玻片凝集试验相互间没有类属凝集反应或只有微弱的交叉反应。
A、B、C、D 群和 7 个“不能分群”菌株进行了交叉定量凝集试验, 从结果(表 4)说明, 这些菌株大都不含有共同抗原, 而是各自独立不同的抗原组成。A 群和 1890 群含有较多的共同抗原。
用细菌凝集吸收试验方法对这些菌株间的抗原关系进行了研究。A、B、C、D 群

和 1889, 1890, 1892, 319, 1916, 1486, 1811 株的每一种抗血清分别用除去本菌抗原以外的 10 种抗原交叉吸收。
表 5 结果表明, 吸收后的抗血清不再和其他菌株的抗原出现玻片交叉凝集反应, 而对本菌抗原的凝集反应没有影响, 仍是强凝集反应。
表 6 说明, 每一种抗血清不用本菌抗原吸收, 而用其余 10 种抗原吸收, 吸收后与本菌抗原凝集滴度没有变化。只有 A 群和 1890 株交叉吸收后, 凝集滴度降低较大

表4 A、B、C、D 群和7个“不能分群”菌株交叉定量凝集滴度

抗血清 抗 原	A	B	C	D	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
A	640	—*	—	—	—	160	—	—	—	—	—
B	—	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C	—	—	160	—	—	—	—	—	—	—	—
D	—	—	—	320	—	—	—	—	—	40	40
1889	—	—	—	—	320	—	—	—	40	—	—
1890	160	—	—	—	—	320	—	80	—	—	—
1892	—	—	40	—	—	—	320	—	—	—	—
319	40	—	—	—	—	40	—	320	—	—	—
1916	—	—	—	—	—	—	—	—	320	—	—
1486	—	—	40	—	80	—	—	—	80	160	—
1811	—	—	—	—	—	—	—	—	—	40	320

* 凝集滴度在 1:40 以下者为(—)

表5 11种抗血清交叉吸收后玻片凝集试验结果

抗血清 抗 原	A	B	C	D	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
A	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C	—	—	+++	—	—	—	—	—	—	—	—
D	—	—	—	++	—	—	—	—	—	—	—
1889	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—	—
1890	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—	—
1892	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—	—
319	—	—	—	—	—	—	—	+++	—	—	—
1916	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—	—
1486	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++	—
1811	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++

表6 11种抗血清交叉吸收后试管定量凝集滴度

抗血清 吸收后	A	B	C	D	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
A	160	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
B	—	80	—	—	—	—	—	—	—	—	—
C	—	—	320	—	—	—	—	—	—	—	—
D	—	—	—	320	—	—	—	—	—	—	—
1889	—	—	—	—	80	—	—	—	—	—	—
1890	—	—	—	—	—	80	—	—	—	—	—
1892	—	—	—	—	—	—	320	—	—	—	—
319	—	—	—	—	—	—	—	640	—	—	—
1916	—	—	—	—	—	—	—	—	160	—	—
1486	—	—	—	—	—	—	—	—	—	80	—
1811	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	160
未 吸 收	1280	160	320	320	160	640	320	640	160	160	160

(3—4 倍)。

细菌凝集吸收试验的结果证明，在我国脑膜炎奈瑟氏菌除 A 群、B 群、C 群外（没有发现 D 群），尚有 1889, 1890, 1892, 319, 1916, 1486, 1811 等 7 个新的独立的菌群。把这些菌群定名为新的血清群。

三、间接血凝试验结果

对于 A, C, 1889, 1890, 1892, 319, 1916, 1486, 1811 群进行了间接血凝试验（B 群和 D 群多糖体抗原没有提取成功）。多糖体致敏绵羊红血球的能力见表 7。

表 7 多糖体抗原致敏红血球能力的测定结果

各群抗原稀释度	各 群 抗 血 清 的 间 接 血 凝 滴 度								
	A	C	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
1:10	2048	1024	256	512	512	512	1024	32	128
1:20	2048	2048	256	512	1024		1024		256
1:50	4096	2048	256	1024	1024		1024		256
1:100	4096	4096	512	1024	1024	512	2048	32	512
1:200	8192	4096	512	1024	1024	1024	2048	64	1024
1:400	8192	4096	512	2048	2048	1024	4096	128	1024
1:800	8192	4096	64	2048	2048	256	4096	128	1024
1:1600	8192	4096	2	64	32	<2		256	
1:3200	32	16	<2	<2	<2	<2		256	
1:6400	<2	<2	<2	<2	<2	<2		512	
1:12800						<2		512	
1:25600						<2		<2	

表 7 结果表明，各群多糖体抗原致敏绵羊红血球的能力较好。一个抗原致敏单位分别是：A 群 1:1600, C 群 1:1600, 1889 群 1:400, 1890 群 1:800, 1892 群 1:800,

319 群 1:400, 1916 群 1:800, 1486 群 1:12800, 1811 群 1:800。

间接血凝试验中应用 2 个抗原致敏单位。

表 8 9 个血清群间接血凝试验交叉滴度

抗 原 \ 抗血清	A	C	1889	1890	1892	319	1916	1486	1811
A	4096	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
C	<2	4096	<2	<2	<2	<2	<2	<2	<2
1889	<2	<2	512	<2	<2	<2	<2	<2	<2
1890	<2	<2	<2	2048	<2	<2	<2	<2	<2
1892	<2	<2	<2	<2	2048	<2	<2	<2	<2
319	<2	<2	8	<2	<2	1024	<2	<2	<2
1916	<2	<2	<2	<2	<2	<2	>4096	<2	<2
1486	<2	<2	<2	<2	<2	<2	4	512	<2
1811	<2	<2	<2	<2	<2	<2	2	16	512

从表 8 结果看出，间接血凝试验比细菌凝集试验灵敏度高。9 个血清群间接血凝滴度都较高，在 1:512—1:4096 以上。

而各群血清间无交叉凝集或凝集滴度在 1:16 以下。证明了这些血清群都含有不同的间接血凝抗原成分。

用间接血凝试验方法得出的结果。更进一步证实了这些血清菌株的抗原成分互不相同,是属于不同的血清群。

讨 论

自从1950年国际微生物学会命名委员会将脑膜炎奈瑟氏菌命名为A群、B群、C群和D群以后,1961年Slaterus用微量沉淀琼脂扩散试验的方法发现了新的血清群,暂定名为X群、Y群和Z群^[6,17,18]。1968年Evans又报告了B₀群、29E群、W-135群等新血清群,B₀群与Y群相同^[7]。这些新血清群用血凝抑制试验得到了证实^[19]。新血清菌株目前尚未有统一的正式命名。但在一些国家中已经习惯应用上述暂定名称。有人试图把新血清群排在A、B、C、D之后,统一命名为E、F、G等^[9],尚未完成。

在我国已采用A、B、C、D群的国际分类法。并证实流行菌株为A群、带菌菌株B群占80%左右。本文将我国存在的不与A、B、C、D群分群诊断血清凝集的菌株,根据其抗原特异性,分成为7个新血清群。这些新血清菌株中是否有型的差别,还是群和型是相同的,有待今后研究。

在新血清群的研究工作中,没有国外的新群参考菌种和诊断血清。国际上对新血清群尚无统一命名。对于我国建立的7个新血清群,暂定名为1889群、1890群、1892群、319群、1916群、1486群和1811群。名称的来源是菌株的收到登记号。

新血清群的建立是符合我国实际需要的。在实践中证实从带菌者鼻咽腔分离出的菌株约为新血清群,并发现1916群引起的流行性脑脊髓膜炎病例。新血清群中

1889群、1892群、319群和1916群较为常见。由于新血清群的建立,无论从病人脑脊髓液,血液及瘀血点分离出的菌株,还是从带菌者鼻咽部分离出的菌株基本上都可以分出血清群来。

参 考 资 料

- [1] Branham, S. E.: *J. Bact.*, 66: 487—491, 1953.
- [2] Branham, S. E.: *Bact. Rev.*, 17: 175—188, 1953.
- [3] Branham, S. E.: *Inter. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8: 1—15, 1958.
- [4] Branham, S. E.: *Inter. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8: 181—183, 1958.
- [5] Edwards, E. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 876—879, 1967.
- [6] Slaterus, K. W.: *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 27: 305—315, 1961.
- [7] Evans, J. R.: *Amer. J. Epidemiol.*, 87: 643—646, 1968.
- [8] Frasch, C. E. et al.: *Infect. Immun.*, 5: 98—102, 1972.
- [9] Frasch, C. E. et al.: *J. Infect. Dis.*, 127: 149—154, 1973.
- [10] Gold, R. et al.: *J. Infect. Dis.*, 124: 593—597, 1971.
- [11] Kingsbury, D. T.: *J. Bact.*, 91: 1696—1699, 1966.
- [12] Counts, G. W. et al.: *J. Infect. Dis.*, 124: 26—32, 1971.
- [13] Artenstein, M. S. et al.: *Bull. W. H. O.*, 45: 275—278, 1971.
- [14] Abbott, J. D. et al.: *J. Clin. Path.*, 25: 528—530, 1972.
- [15] Kent, D. C.: *Milit. Med.*, 135: 674—677, 1970.
- [16] Лещинская, Е. В.: *Ж. М. Э. Н.*: 7: 37—42, 1973.
- [17] Slaterus, K. W.: *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, 29: 265—271, 1963.
- [18] Hollis, D. G. et al.: *J. Bact.*, 95: 1—4, 1968.
- [19] Cohen, R. L. et al.: *App. Microbiol.*, 23: 289—292, 1972.

STUDIES ON THE SEROLOGICAL GROUPING OF *NEISSERIA MENINGITIDIS*

I. INVESTIGATIONS ON NEW SERO-GROUPS

DING SHAOQING, YE RENBANG, YANG SHUPING, ZHANG HUANCHUN, WANG LINGZHANG
(The Beijing Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing)

By employing bacterial agglutination-absorption and indirect hemagglutination tests, the authors have carried out some studies concerning certain meningococcus strains, isolated in China, which are nonagglutinable with the diagnostic grouping sera A,B,C,D of *Neisseria meningitidis*.

Through an analysis of serological specificity, it has been tentatively proposed that the strains of *N. meningitidis* so far isolated from this country can be divided into 7 new serotypes, which have been clearly proved to be antigenically different from the classical groups A,B,C,D and from one another.

With regard to the problem of nomenclature for these new serogroups, it is

suggested to use the numbers of the representative strains for the respective serological groups, i.e. groups 1889, 1890, 1892, 319, 1916, 1484, 1811.

Up to the present, most of the new group strains have been isolated from nasopharyngeal carriers, amounting to about 15%. Among these, strains of groups 1892, 319 and 1916 were more frequently found. Furthermore, the strains of the last group have also been recovered from specimens of patients suffering from cerebrospinal meningitis. With the introduction of these new groupings, it is possible to classify the vast majority of meningococcus strains now isolated in China.