

痢疾 T32 与伤寒 Ty21a 两价菌株的组建

陈琦媛 江丽君 孔道春 王秉瑞

(卫生部兰州生物制品研究所, 兰州)

用体内重组的方法, 将经过多次现场考核, 证明安全有效的痢疾 T32 无毒株和伤寒 Ty21a 无毒株, 用前者作给体后者作受体, 以两步法组建成一株既具痢疾福氏 2a 抗原特性又保持伤寒 Ty21a 株特性的两价菌株。经猴体免疫力试验, 在对照组全部发病的情况下, 能保护 80% 的免疫猴免于感染菌痢; 以 C₃H 系小鼠做免疫力试验, 能保护伤寒毒菌的感染。该菌株经实验室传 30 代仍保持稳定, 豚鼠角膜毒力试验无炎症反应, 以 400 亿活菌口服猴体, 对 101 人, 每人口服 157—200 亿活菌, 均未发现不良反应, 是一株有希望的菌苗候选株。

关键词 伤寒-痢疾两价菌株

细菌性腹泻, 如痢疾、伤寒迄今仍系危害人类健康的主要传染病, 是发展中国家的主要卫生问题。为控制其发生的根本性措施, 应提供强有力的免疫预防制剂。近年来, 国内外学者应用体内重组的方法选育了一些无毒活菌苗株, 得到不同的结果^[1-4]。我们采用体内重组方法, 选育具有 T32 和 Ty21a 两种细菌抗原特性和免疫原性的两价株 (简称 WTT)。对其在实验室进行了系统的鉴定, 现将结果报告如下。

材料和方法

(一) 菌株

试验用菌株列于表 1。

痢疾 T32, 具有 II 型、群 3, 4 抗原, 伤寒 Ty21a 缺乏 Vi 抗原, 而 Ty2 则具有 Vi 抗原, 所有伤寒菌株都具有 9, 12(O) 抗原及鞭毛(H)抗原。

(二) 培养基

选用适宜痢疾和伤寒 Ty21a 生长的厚金格、脑心浸液培养基。选择用基本培养基。免疫和感染试验分别用含 0.1% 半乳糖的脑心浸液和肉水蛋白胨培养基。纯化用麦康凯培养基。

(三) 选育方法

采用两步法。第一步以营养缺陷型和发酵乳糖为选择标记。第二步以发酵乳糖和链霉素

抗性 (含量 400 μg/ml) 为选择标记。给体和受体均系 37℃ 过夜培养物, 以 1:1 混合于 37℃ 2 小时培养, 取 0.1 ml 涂于琼脂平板上 (第一步杂交涂于基本培养基, 第二步杂交涂于脑心浸液培养基), 放 37℃ 培养 48 小时, 选取 (lac⁺) 菌落, 用福氏痢疾 II 型和群 3, 4 因子血清, 伤寒用 9, 12(O) 因子血清做玻片凝集试验, 将凝集菌落在麦康凯平板上划线纯化。

(四) 血清、生化、药敏、豚鼠角膜毒力试验均按常规方法进行。

(五) 溶菌试验

伤寒 Ty21a 系 gal E 突变株, 在含或不含 0.1% 半乳糖的脑心肉汤中培养时, 其生长正常。但培养基加入 0.5% 半乳糖经 37℃ 培养 3 小时, 该菌株可受培养基中半乳糖的作用, 而发生诱导溶菌。而分解半乳糖的伤寒 Ty2 对照株则不被半乳糖所裂解, 故以此鉴定 WTT 株是否仍具 gal E 的特性。

(六) 产生抗体试验

用试管定量凝集法。将 WTT (系 37℃ 过夜培养物) 比浊稀释成 2.5 亿/0.5 ml、5 亿/0.5 ml、10 亿/0.5 ml、10 亿/0.5 ml 浓度, 分 4 次对家兔静脉注射, 每次间隔 5 天, 末次免疫后 7 天颈动脉放血。抗血清用生理盐水作倍比稀释, 加入

本文于 1985 年 11 月 14 日收到。

表 1 菌株的基因型、抗原式、来源及用途
Table 1 The sources, genotype, antigenic structure and use of strains

菌 株 Strain	基因型 Genotype	抗原式 Antigenic structure	来源 Source	用途 Use
<i>E. coli</i> K12 W1485	F ⁺ his ⁻ ilv ⁻		复旦大学遗传所 Genetics Institute of Fudan University	给体 donor
痢疾 T32 (F2a 型), 无毒株 T32-Istrati (flexneri 2a), avirulent		痢疾 II:3,4	罗马尼亚 Cantacuzino 研究所 Cantacuzino Institute, Romania	受体 receptor
痢疾 F2a-9 (F2a 型), 毒株 F2a-9, virulent flexneri 2a		痢疾 II:3,4	甘肃省卫生防疫站 Antiepidemic Station of Gansu Province	感 染 for infection
WT32 (F2a 型), 弱毒株 WT32 (Type F2a), avirulent		痢疾 II:3,4	本实验室选育的杂交株 Our laboratory strain selected	给 体 donor
伤寒沙门氏 Ty21a, 无毒株 Ty21a, typhoid strain, avirulent	gal E	伤寒 09,12	卫生部药品生物制品检定所 National Control Institute of Drug and Biological Products, Ministry of Health	受 体 receptor
伤寒 Ty2, 毒株 Ty2, Typhoid strain, virulent		伤寒 Vi	卫生部药品生物制品检定所 National Control Institute of Drug and Biological Products, Ministry of Health	感 染 for infection
伤寒 0901, 毒株 0901, Typhoid strain, virulent		伤寒 09,12		凝集试验用 for agglutination test
伤寒噬菌体 Typhoid phage			甘肃省卫生防疫站 Antiepidemic Station of Gansu Province	鉴定 for identification
Q. B 噬菌体 Q. B Phage			中国科学院微生物研究所 Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing	检定质粒 for identification of F plasmid
伤寒 H901, 毒株 Typhoid H901, virulent		伤寒 Hd	卫生部药品生物制品检定所 National Control Institute of Drug and Biological Products, Ministry of Health	凝集试验用 for agglutination test

等量待检菌液,置 37℃ 过夜,次日判定结果。

(七) 伤寒噬菌体和 QB 噬菌体裂解试验

用噬菌体效价测定法。用伤寒噬菌体对 WTT 株进行检测,以证实是否具有伤寒杆菌的特性。用 QB 噬菌体对 WT32 株检查,是否有性菌毛。

(八) 小鼠免疫力试验

用变量免疫定量攻击法。选用 14—16 g C_H 近交系小鼠,分别以 1 亿、5 亿、10 亿 3 个剂量组皮下注射,间隔 3 天,免疫 3 次,末次免疫后 10、20 天,分别用 F2a-9 和 Ty2 毒株含 10 个 LD₅₀ 攻击,观察 3 天记录结果。

(九) 猴体免疫力试验

选用体重 4—6 kg 经常规带菌检查合格的健康恒河猴 10 只(免疫和对照组各 5 只)。用插入胃管法,空腹预服 10% 碳酸氢钠 5 ml,5 分钟后灌服菌苗,间隔 3 天,免疫 3 次,各次剂量分别为 400 亿、450 亿、600 亿活菌,末次免疫后逐日做排菌检查。末次免疫后 12 天同对照组一并用痢疾毒菌 F2a-9 攻击,剂量为 435 亿活菌。观察 10 天并做排菌检查,记录结果。

(十) 抗原稳定性试验

将 WTT 接种于脑心斜面连续传代,逐代检查其抗原性是否发生变化。

(十一) 小量人体反应观察

表 2 供试菌株的生化特性
Table 2 Biochemical properties of test strains

生化试剂 Biochemicals	<i>E. coli</i> K12 W1485	T32	WT32	Ty21a	WTT
葡萄糖 Glucose	+	+	+	+	+
乳糖 Lactose	+	-	+	-	+
麦芽糖 Maltose	+	-	+	+	-
甘露醇 Mannitol	⊕	-	+	+	+
蔗糖 Sucrose	-	-	-	-	-
卫矛醇 Galactitol	+	-	-	-	-
水杨素 Salicin	+	-	-	-	-
山梨醇 Sorbitel	+	-	-	+	-
阿刺伯糖 Arabinose	+	-	-	-	-
木糖 Xylose	+	-	-	+	-
鼠李糖 Rhamnose	+	-	-	-	-
肌醇 Inositol	-	-	-	-	-
半固体 Semisolid	+	-	-	+	±
海藻糖 Trehalose	+	-	+	+	+
半乳糖 Galactose	+	-	+	-	+
硫化氢 H ₂ S	-	-	-	-	-
棉子糖 Raffinose	-	-	-	-	-
靛基质 Indol	-	-	-	-	-

注：“+”发酵，“-”不发酵，“⊕”产酸产气。
Note: “+” fermenting, “-” not fermenting,
“⊕” acid and gas producing.

每人口服 175—200 亿活菌，服前 5 分钟预服碳酸氢钠 2g，中和胃酸。共服 101 人，均系成人。服后 24 小时测体温，询问自觉症状，并做排便菌检查。对照组 96 人，服新鲜牛奶。

结 果

lac⁺ 的 WTT 两价菌苗株具有痢疾 F2a 型抗原的血清学特性 (II: 3,4)，伤寒

Ty21a 的血清学特性较弱，但其菌落则呈现扁平、中间稍凹陷，系典型的 Ty21a 菌落形态特征。

(一) 生化试验 (见表 2)

给体 W1485 乳糖阳性，受体 T32 阴性，杂交株 WT32 为阳性。再杂交试验，受体 Ty21a 乳糖阴性，与给体 WT32 重组后的 WTT 为阳性，表明已发生杂交重组。

给体 WT32 系链霉素敏感，受体 Ty21a 系链霉素抗性，经重组后获得的 WTT 系链霉素抗性株。

用直径 3mm 的接种环，取一环菌体 (总菌约 200 亿) 单眼浓涂于豚鼠角结膜囊内，观察 7 天无炎症反应。

(二) 溶菌试验 (表 3)

表 3 供试菌株溶菌试验结果
Table 3 Lysis test of test strains

菌 株 Strains	接种菌数 Dose in- oculated	OD _{600nm}			
		溶菌前 Before lysis	溶菌后， 0.1% 半 乳糖 After lysis 0.1% gal	0.5% 半 乳糖 0.5% gal	空白 Blank
Ty21a	1×10 ⁷		0.10	0.06	0.12
	1×10 ⁸	0.033	0.27	0.17	0.28
WTT	1×10 ⁷		0.18	0.10	0.20
	1×10 ⁸	0.035	0.23	0.14	0.22
T32	1×10 ⁷		0.15	0.15	0.18
	1×10 ⁸	0.035	0.47	0.46	0.50
Ty2	1×10 ⁷		0.14	0.14	0.15
	1×10 ⁸	0.035	0.39	0.38	0.37

表 3 说明，WTT 株与 Ty21a 株在含 0.1 % 半乳糖与不含半乳糖的空白管中，OD 值无差异，但加入 0.5 % 半乳糖后，其 OD 值相差 1 倍，此二菌株能被半乳糖裂解，而 T32 给体株和分解半乳糖的 Ty2 株对照，OD 值无明显改变，半乳糖对其不起作用。

(三) 产生抗体试验 (表 4)

WTT 同痢疾 F2a 型、群特异性血清

表 4 WTT 抗血清滴度
Table 4 Titers of WTT antiserum

抗原 Antigen	标准抗血清滴度 Titers of standard antiserum				吸收前 WTT 抗血清滴度 Titers of WTT antiserum before absorbed with	吸收后 WTT 抗血清 滴度 Titers of anti-WTT serum after absorbed with
	伤寒 Typhoid		痢疾 Dysentery			
	09,12	Hd	II 型 Type II	3,4 群 Group 3,4		
伤寒 Ty21a Typhoid Ty21a	2,560		<80	<40	640	- ^a +++ ^a
伤寒沙门氏 0901 Typhoid 0901	N. D.		N. D.	N. D.	640	N. D. N. D.
伤寒沙门氏 H901 Typhoid H901	N. D.		N. D.	N. D.	640	N. D. N. D.
痢疾 T32(F2a) Dysentery T32-Istriti (F2a)	—	—	2,560	640	10,240	+++ ^b - ^b
痢疾 F2a-1 Dysentery F2a-1	—	—	2,560	640	10,240	N. D. N. D.
杂交株 WT32 Hybrid strain WT32	—	—	2,560	640	10,240	N. D. N. D.

注: a. WTT 抗血清与 Ty21a 抗原吸收后呈阴性反应,与 T32 抗原仍呈+++阳性反应。
b. WTT 抗血清与 T32 抗原吸收后呈阴性反应,与 Ty21a 抗原仍呈+++阳性反应。
Comment: a. Anti-WTT serum absorbed with Ty21a antigen represented negative response, but still reacted positively to T32 antigen for+++.
b. Anti-WTT serum absorbed with T32 antigen represented negative response, but still reacted positively to Ty21a antigen for+++.

表 5 伤寒 Ty21a, WTT 株小鼠免疫力试验结果
Table 5 Results of protection test in mice

免疫菌株 Strains for immunization	免疫剂量 Dose for immunization	感染菌株 Strains for infection	感染剂量 Infective dose	攻击后 3 天死亡数/总数 Three days after challenge death/total	保护力 Protection rate (%)
Ty21a	5.0×10 ⁸	F2a-9 Ty2	1.5×10 ⁹ 2.25×10 ⁷	13/15 2/15	13 87
WTT	1.0×10 ⁸ 5.0×10 ⁸ 10.0×10 ⁸	F2a-9	1.5×10 ⁹	0/10 0/10 0/10	100 100 100
	1.0×10 ⁸ 5.0×10 ⁸ 10.0×10 ⁸	Ty2	2.25×10 ⁷	3/7 2/7 1/7	57 71 86
阳性对照 Positive Control		F2a-9 Ty2	1.5×10 ⁹ 2.25×10 ⁷	10/10 10/10	0 0
阴性对照 Negative Control		7% 胃膜素 7% Mucin 0.5ml		0/5	0

发生高度凝集,对伤寒 09,12 抗原也发生凝集,可见 WTT 株既具有痢疾 F2a 型、群抗原,又具有伤寒 09,12 抗原。

(四) 伤寒噬菌体裂解试验

用伤寒噬菌体检测伤寒 Ty21a、Ty2 毒株和 WTT 株,结果 Ty21a 和 Ty2 株出现大量透明噬菌斑,WTT 株亦有大小不等的透明噬菌斑,痢疾 T32 无噬菌斑,

WTT 株具有伤寒沙门氏菌的特性。QB 噬菌体检查 W1485、WT32 株,均有噬菌斑,具有性菌毛。

(五) 小鼠免疫力试验 (表 5)

Ty21a 能保护同型毒菌 Ty2 10 个 LD₅₀ 的攻击,保护率为 87%,但不能保护痢疾毒株 F2a-9 的攻击。WTT 株不同免疫剂量组均能保护同型毒菌 F2a-9 10 个 LD₅₀ 的攻击,保护率为 100%。对伤寒 Ty2 的保护率分别为 57%、71% 和 86%,说明 1 亿、5 亿、10 亿免疫剂量组均有不同程度的保护。

(六) 猴体免疫力试验 (表 6)

由表 6 结果看出, WTT 能保护同型毒株 F2a-9 的攻击,保护率为 80%,5 只对照组猴体全部发病(其中 2 只死亡)。免疫组 5 只猴,经 400 亿、450 亿和 600 亿活

菌 3 次服苗后,未见不良反应。并逐日进行排苗菌检查,一般达到 5、6 天,其中有 2 只猴达 8 天。

WTT 株经 30 代脑心浸液平板上检查,结果仍具有痢疾和伤寒的特征,该菌株是较稳定的。

(七) 人体反应观察

未发现不良反应,排苗菌时间 3—4 日,表 7。

表 6 WTT 株猴体免疫力试验结果
Table 6 Results of protection test in monkey

组别 Group	猴数 No. of monkey	免疫剂量 Dose for immunization	感染剂量 Dose for infection	发病数 No. of diseased monkey	保护力 Protection rate(%)
免疫组 Immunized	5	活菌 viables 1450×10 ⁸	500	1	80
对照组 Control	5		500	5	

表 7 WTT 菌苗株人体副反应观察结果
Table 7 The results of side reactions of the WTT strain in man

组别 Group	体温 Temperature (>37℃)	头痛 Head-ache	头昏 Giddi-ness	腹鸣 Bubble sound in abdomen	腹胀 Abdominal distension	恶心 Nausea	腹痛 Abdo-minalgia	腹泻 Diarrhea	荨麻疹 Hives	总计 Total
免疫组 Immunized	0/101	2/101	1/101	1/101	1/101	1/101	0/101	0/101	0/101	6/101
对照组 Control	0/96	0/96	2/96	0/96	1/96	0/96	1/96	0/96	1/96	5/96

注: 对照组服新鲜牛奶。
Comment: Oral feeding fresh milk for control group.

讨 论

本试验采用体内重组的方法,对组建既表达痢疾杆菌又表达伤寒杆菌特征的两价无毒活菌苗株进行了尝试。试验用 Ty21a 和 T32 株系经过比较严格的科学试验及多次现场效果考核的菌苗株,证明了它们的安全性、稳定性和免疫原性,且有选择标记。本试验分两步将痢疾杆菌的特性转移至伤寒杆菌。第一步采用具有 F 因子的大肠菌 W1485 同受体 T32 杂交,

以 lac⁺ 为选择标记,从而使后者成为具有 F 因子表达大肠菌特性的转接体 WT32 株。第二步以 WT32 株转接体与 Ty21a 再次重组,获得了既表达痢疾又表达伤寒 Ty21a 固有特性的 WTT 双价株。通过实验室鉴定表明,该株明显地呈现亲本菌株抗原特征,尽管其玻片凝集试验弱,但血清抗体结果证明,该株可刺激家兔机体产生明显的抗痢疾和抗伤寒抗体,而且能被特异的伤寒噬菌体裂解。不仅具有伤寒 Ty21a 特有的菌落形态及遗传特性,而且

动物试验证实,该株免疫猴体显示了抗痢疾毒株攻击的抵抗力;小鼠免疫力试验结果表明对伤寒杆菌感染的免疫力。因此,它是一株具有双重细菌特性的两价菌苗株。以 lac^+ 做选择标记获得具有福氏痢疾杆菌型群抗原的杂交株屡有报告^[4,5],这是一个相对来说比较简便的方法,但出现既有型抗原又有群抗原的频率较低。

应该指出,伤寒系人类特有的感染,除了某些灵长类(黑猩猩外),伤寒杆菌并不能使任何实验动物建立真正的感染。目前各国多以小鼠法做伤寒菌苗的免疫力试验,但这种方法是靠不住的。因此,本试验以小鼠免疫力试验所得结果只能作为参考。其次, Ty21a 系一不含 Vi 抗原的无毒株,这也是值得考虑的一个问题。就 Vi 抗原的免疫原性问题,人们作过许多研究,

尚未获得统一的结论。但没有 Vi 抗原终究是一缺点。

经研究表明利用 Ty21a gal E 突变株作受体,采用体内重组技术将不同菌株抗原转移至该受体内,组建广谱无毒活菌苗株,系一选育无毒株的可行途径。

鉴于本试验是对 WTT 株所进行的实验室检定结果,因而尚需对该株进行流行病学效果观察,以便进一步作出评价。

参 考 文 献

- [1] 王秉瑞等:微生物学通报,7(2): 65—68,1980.
- [2] Levine, M. M. et al.: *J. Inf. Dis.*, 136(4): 577—582, 1977.
- [3] Meitert, J. et al.: *Arch. Roum. Path. Exp. Microbiol.*, 32(1): 35, 1973.
- [4] Germanier, R. et al.: *J. Inf. Dis.*, 131(5): 553—558, 1975.
- [5] 阎世德等:中华微生物学和免疫学杂志,3(5): 324, 1983.

CONSTRUCTION OF TYPHOID-DYSENTERY BIVALENT STRAIN WITH TYPHOID Ty21a AND DYSENTERY T32-ISTRATI STRAINS

Chen Qiyuan Jiang Lijun Kong Daochun Wang Bingrui

(Lanzhou Institute of Biological Products, Ministry of Public Health, Lanzhou)

The bacillus dysentery is a wide spread enteric disease in China. Although there are obvious decrease in morbidity in recent years after improvements of hygiene conditions, it is still a serious problem to control it. We have tried to develop a dysentery vaccine for the prevention of this infectious disease for years. The efforts to select a candidate live bivalent vaccine strain is one of our aims.

The construction of typhoid-dysentery bivalent strain was achieved by recombination in vivo using the avirulent strain typhoid Ty21a which was selected and used as vaccine strain by Germanier in Awitzerland and the dysentery T32-Istrati strain used in Romania. The hybrid strain confers with the serological properties both of its parent strains in that it can stimulate the antibodies formation specific to *Salmonella typhoid* and *Shigella flex-*

neri 2a strains with high titer. It offers 80% protection in Rhesus monkey from infection when immunized 3 times using a total doses about 1450×10^8 viables and challenged with virulent strain of flexneri 2a 15 days after the last dose. Its also gives a protection to the infective dose of virulent typhoid strain (Ty2) when tested with C₃H mice. It keeps stability after 30 passage on agar slants and the Sereny test is negative. The safety of this strain had been tested with 101 people through oral route using $157-200 \times 10^8$ viables and no ill condition occurred. We consider it would be a hopeful candidate vaccine strain.

Key word

Typhoid-dysentery bivalent strain