

脑膜炎奈瑟氏菌的抗原分析及分型研究进展

丁 绍 卿

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

自从十九世纪八十年代从流行性脑脊髓膜炎患者的脑脊液中分离出脑膜炎奈瑟氏菌, 至今已近百年了。其抗原结构和分型的研究有了较大的进展, 促进了对该病的防治工作。荚膜群特异性多糖, 外膜蛋白质及脂多糖的抗原分析和分型, 以及细菌素和杀菌力分型的研究, 正在细菌检验工作中应用和深入研究。用凝胶过滤和免疫电泳等方法证实细胞壁复合物(OMC)是由蛋白质(40—50%), 荚膜群特异性多糖(4—10%), 脂多糖(10—25%)及脂类(15—30%)构成^[1]。

荚膜群特异性多糖的研究

1933年 Rake 和 Scherp 提取了A群菌的荚膜群特异性多糖。Watson 提取了C群菌的荚膜群特异性多糖。1969年 Gotschlich 分离提取了A群、B群和C群的荚膜群特异性多糖^[2-3], 并进行了化学成份及特性的研究^[4-5]。实验证明荚膜群特异性多糖有很好的抗原性和群特异性, 为以后进行分群和提纯菌苗, 以至人工合成菌苗的研究奠定了物质基础。用 Sevag 法和冷酚法提纯的荚膜群特异性多糖菌苗内, 蛋白质及核酸的含量不超过1%^[6-7]; 乙酰基含量A群应在2微克分子量/毫克以上, C群1.5微克分子量/毫克以上; A群磷含量8%以上; C群唾液酸含量按游离的N-乙酰神经氨酸计算, 其干重在80%以上。A群多糖的分子量应在100,000以上, C群在300,000以上。分子量与免疫原性有关。Kd值0.40以下的多糖抗原给人注射后, 能产生很强的杀菌抗体, 血凝抗体, IgM和IgG^[4-5,8-9]。

荚膜群特异性多糖是一种多糖聚合物。不

同群的化学结构也各不相同。A群多糖是N-乙酰-3-O-乙酰甘露糖胺磷酸盐($\alpha 1-6$); B群是N-乙酰神经氨酸($\alpha 2-8$); C群是N-乙酰, O-乙酰神经氨酸($\alpha 2-9$); X群是N-乙酰葡萄糖胺磷酸盐($\alpha 1-4$); Y群是N-乙酰神经氨酸: 葡萄糖($\alpha 2-6$); Z'群(29E)是3-脱氧-D甘露辛糖酸; W₁₃₅群是N-乙酰神经氨酸: 半乳糖。D群和Z群尚不清楚。用核磁共振方法测定了A、B、C、X、Y和W₁₃₅群多糖的结构式^[7,10-13]。例如, A群和C群结构式:

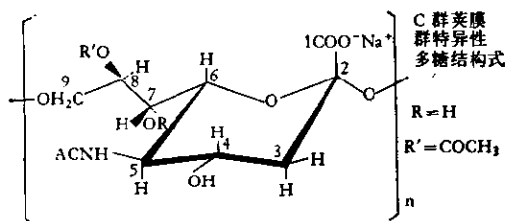
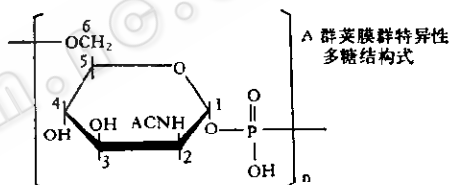


图1 A群(上)和C群荚膜群特异性多糖结构式

提纯的群特异性多糖必须保存在低温环境(-20°C)。加入乳糖作保护剂可使之稳定, 不易降解^[14]。化学结构中缺乏O-乙酰基的多糖易被神经氨酸酶降解。B群多糖含神经氨酸66.4%, 因无O-乙酰基, 故很不稳定, 甚至在病人脑脊液中和Mueller-Hinton肉水培养物中也难以检测出B群多糖抗原^[15-16]。C群多数菌株的多糖

含有O-乙酰基,称为C⁺型,少数菌株为不含O-乙酰基的C⁻型,易被降解^[7]。

1950年和1953年第五次和第六次国际微生物学会命名委员会上,根据其荚膜群特异性多糖的不同,将脑膜炎奈瑟氏菌定名为A群,B群,C群和D群等4个血清群^[17-24],结束了过去分群的混乱局面。

应用各种沉淀试验^[25-27],间接血凝试验^[21,28-31],血凝抑制试验^[8,32]及协同凝集试验(COA)^[67]进行分群研究也得到了成功。1961年Slaterus用沉淀试验(微量琼脂扩散沉淀试验)发现了X、Y、Z群等新血清群^[25-26],1968年Evans又报告了BO、29E、W₁₃₅群。BO群和Y群相同^[33],29E群和Z群相同^[34]。至今国外分为A、B、C、D、X、Y、Z、Z'(29E)和W₁₃₅群等9个血清群^[7]。Hollis等把X、Y、Z群称为E、F、G群^[27,35],这种方案尚未被广泛采用。

根据脑膜炎奈瑟氏菌的研究结果,我国除A、B、C、D群外,1974年建立了7个新血清群,定名为1889群,1890群,1892群,319群,1916群,1486群和1811群^[28]。其中1889群与国外的Y群相同;1892群与Z'群(29E)相同;319

群与W₁₃₅群相同;1916群与X群相同。1890群,1486群和1811群是我国独有的,国外未见报告。而在我国也未发现Z群菌株^[27]。各种主要分类方法的相互关系见表1。

外膜蛋白质的研究

脑膜炎奈瑟氏菌外膜蛋白质(OMP)和脂多糖结构的差别表现出了不同型菌株的特性。外膜蛋白质和脂多糖复合物^[36],可以从细菌的外膜中提取^[37]。用100℃加热和弱酸提取的外膜蛋白质具有型的特异性,且可被蛋白酶分解^[8,37-38]。用毛细管沉淀试验和免疫扩散方法证明了是一种型抗原(Serotype antigen, STA)。型抗原的提取和分析是在免疫生物化学的基础上发展起来的。1972年Frasch用盐水提取物进行沉淀试验,把B群分为11个型^[39]。用氯化锂和超速离心的方法对由100株A群菌株提取的蛋白质抗原进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析,出现三个较大的蛋白质区带。其分子量分别是35,000,39,000和45,000^[40]。采用密度梯度离心,150,000×g离心或Sephacrose 4B提取的B群和C群外膜蛋白质,可通过血凝

表 1 各种血清分群法相互关系表

报告人	Dopter	Gordon 等	Branham	国际法	Slaterus	Hollis 等	Evans 等	丁绍卿等
年 代	1909 年	1915 年	1940 年	1950 年	1961 年	1968 年	1968 年	1975 年
血	脑膜炎球菌	I、III 型	I 群	A 群	A 群	A 群	A 群	A 群
	副*脑 α、β 型	II 型	II 群	B 群	B 群	B 群	B 群	B 群
	副脑 β 型		IIα 群	C 群	C 群	C 群	C 群	C 群
	副脑 γ 型	IV 型	IV 群	D 群	D 群	D 群	D 群	D 群
清	* 副脑膜炎球菌				X 群	E 群	X 群	1916 群
					Y 群	F 群	BO 群	1889 群
					Z 群	G 群	Z 群	
							29E 群	1892 群
							W ₁₃₅ 群	319 群
								1890 群
								1486 群
群								1811 群

试验,血凝抑制试验,沉淀试验和杀菌力试验分型^[8,36-37,41-42]。B群型抗原是2—3种不同的蛋白质。1—8型分子量分别是46,000,37,000,29,000。1型中分子量为29,000的占优势,8型中分子量为37,000占优势^[37]。

A群的外膜蛋白质和群特异性多糖相同,而脂多糖不同。C群则群特异性多糖相同,外膜蛋白质不同。给人注射A群和C群特异性多糖后产生很强的杀菌抗体,且有明显的群特异性,是提纯制备群特异性多糖菌苗的依据。而B群特异性多糖只产生很微弱的杀菌抗体。多数B群抗体是直接抗外膜蛋白质的,并有明显的特异性。注射B群外膜蛋白质抗原后出现很强的杀菌抗体。B群2型菌株感染后用酶链免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELLSA)测定,产生很好的抗型抗原的抗体^[42]。因此,研究外膜蛋白质抗原及其分型,尤其在B群菌引起的疾病防治中有一定价值^[36,40-41,43-44]。

脂多糖的研究

脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)是脑膜炎奈瑟氏菌外膜的主要组成部分^[4],能在人体和家兔产生免疫性。用100,000 × g离心和Sephadex G200提取进行研究。1974年Zollinger等用间接血凝试验方法分出三个不同的脂多糖型^[41],但这不是灵敏的分型方法。不同的菌株的脂多糖化学结构和生物活性不相同^[45]。

1977年Mandrell等用脂多糖抗原致敏绵羊红血球与脑膜炎奈瑟氏菌抗血清进行血凝抑制试验。对67株包括A、B、C、X、Y、Z、29E、W₁₃₅群的菌株进行分型,结果有65株菌属于8个不同的脂多糖型,只有2株A群菌株未分出脂多糖型^[46]。这是一个与杀菌力分型不同的分型方法。

脂多糖复合物具有内毒素活性,有毒性及热原性。给家兔注射0.01微克可出现热原质反应。在0.02N盐酸溶液中煮沸2分钟,脂和多糖可被水解,约含有37%的多糖和20%的可溶于氯仿的脂类。水解后的脂类不再出现内毒素的活性^[47]。

细菌素分型(bacteriocin serotyping)

细菌素(bacteriocin)是一种能抑制某些细菌生长的具有活性的蛋白质。它对细菌的作用范围很小,只对本菌或少数菌株有作用。被作用的菌株必须具有特异的受体。其作用方式和噬菌体相似,有些与T系偶数噬菌体作用方式相似。向菌体内注入噬菌体DNA,能够终止细菌的DNA,RNA的合成。它有溶源性,不能繁殖,能被蛋白酶,胰蛋白酶所破坏,而核糖核酸酶及脱氧核糖核酸酶对它无作用。能耐受100℃15分钟,而120℃15分钟被破坏^[48-49]。其大小在300 Å以下。加入丝裂霉素C(1微克/毫升)能使细菌素增多200倍,紫外线照射60—90秒钟只增多4倍^[49]。

利用细菌素进行细菌分型研究已在大肠埃希氏菌,宋内氏志贺氏菌,葡萄状球菌,芽胞杆菌等菌属中取得了成功^[50-52]。脑膜炎奈瑟氏菌的细菌素称为脑膜炎球菌素(meningocin)。1966年Kingsburg报告了脑膜炎奈瑟氏菌的一些菌株产生特异性很强的脑膜炎球菌素,用于分型得到了成功^[49]。1971年Counts用6株指示菌株把155株C群菌分成11个细菌素型,I型占135株。用14株指示菌株把108株B群菌分成32个细菌素型,I型和II型占52株,而XIII—XXXII型每型各只占1株^[53]。这种分型方法和血清学分解是完全不相同的方法。不同的血清群菌株可以是相同的细菌素型。在美国Fort Lewis地区从患者脑脊髓液分离出的28株C群菌株都是细菌素I型,而7株B群菌株则是7个不同的细菌素型。因此,这种分型在防治工作中的实际意义,尚需要进一步研究。

杀菌力分型(bactericidal serotyping)

1970年Gold等首次报告了用杀菌力反应进行脑膜炎奈瑟氏菌分类研究的结果^[59]。Gold等采用特异性抗血清和脑膜炎奈瑟氏菌相互作用,在补体存在下能杀死某些菌株,这种作用敏感性高,特异性强^[54-55]。用这种方法把从美国

新兵训练中心 1964—1970 年分离的 143 株 C 群菌分成 6 个杀菌力型。3、5、6 型只有一种杀菌力因子,而 1、2、4 型含有复合因子,可分成亚型,其中 2 型杀菌力因子最复杂。

1972 年 Frasc 等用微量杀菌力试验把 B 群分为 10 个杀菌力型。1973 年用杀菌力抑制试验定为 11 个杀菌力型^[56-57]。

B 群和 C 群菌株的杀菌力 2 型在流行时占优势。B 群和 C 群 2 型中含有复合因子的菌株是主要的流行菌株。B 群 2 型复合因子菌株中有 73% 是从患者分出,而 2 型单因子菌株则 69% 是从带菌者分离出的。B 群和 C 群 2 型菌株耐磺胺药物者较多。88 株 C 群 2 型菌株中有 83 株抗磺胺药物, B 群 2 型复合因子菌株中有 69% 是抗磺胺药物的。这一情况在流行病学和防治工作中值得重视。

总之,研究脑膜炎奈瑟氏菌的抗原结构及分群分型,在防治流行性脑脊髓膜炎的工作中具有重要的意义。细菌性脑膜炎是严重危害人民身体健康的疾病,其病原菌以脑膜炎奈瑟氏菌最为常见,且病死率比较高^[58]。临床实验诊断,除用细菌检验技术外,尚可采用乳胶凝集试验,间接血凝试验,对流免疫电泳,酶标记技术及放射免疫等方法,测定患者脑脊髓液及血液中的抗原,抗体以及 IgM 的含量进行实验诊断,分群诊断及鉴别诊断。这种实验诊断对流行病学也很有价值。

病原学诊断证实世界各国的流行菌群不相同。我国以 A 群为主, B 群、C 群、1916 群和 319 群只引起散发病例的发生^[27-28]。美国英国及欧洲其他一些国家和以色列等地近些年来是 B 群和 C 群流行。苏联,中东和非洲一些国家则以 A 群流行为主^[60-62]。

由于 A 群、B 群、C 群和 Y 群抗磺胺药物菌株的出现,研究菌苗预防甚为重要。目前我国除采用吸附菌体菌苗预防外,并开展了提纯菌苗的研究。国外 A 群和 C 群提纯多糖菌苗已在实验研究的基础上,开始大量生产,并向工业化生产前进。提纯的 A 群和 C 群单价及二价菌苗已进行了大面积的大量人群接种,收到了一定的

预防效果^[63-65]。现正在研究 B 群菌苗,多价提纯菌苗,以及脑膜炎奈瑟氏菌苗与流感嗜血杆菌 b 型菌苗的多联菌苗。另外还对大肠埃希氏菌同脑膜炎奈瑟氏菌的类属抗原进行研究^[42, 66]。脑膜炎奈瑟氏菌的抗原分析和分型研究,必将促进防治流行性脑脊髓膜炎的工作。

参 考 文 献

- [1] Zellinger, W. D. et al.: *Infect. Immunol.*, 6: 835—851, 1972.
- [2] Getschlich, E. C. et al.: *J. Exp. Med.*, 129: 1367—1384, 1969.
- [3] Getschlich, E. C. et al.: *ibid*, 129: 1349—1365, 1969.
- [4] Liu, T. Y. et al.: *J. Biol. Chem.*, 246: 2849—2858, 1971.
- [5] Getschlich, E. C., et al.: *ibid*, 246: 4703—4712, 1971.
- [6] Wang, K. H. et al.: *J. Biol. Stand.*, 5: 197—215, 1977.
- [7] W. H. O. *Technical Report*, Series 588, p. 1—4, 1976.
- [8] Frasc, C. E. et al.: *Infect. Immunol.*, 6: 674—681, 1972.
- [9] Wyle, F. A. et al.: *J. Infect. Dis.*, 126: 514—522, 1972.
- [10] Jennings, H. J. et al.: *ibid.*, 136: s78—s83, 1977.
- [11] Bundle, D. R. et al.: *J. Biol. Chem.*, 249: 2275—2281, 1974.
- [12] Bhattacharjee, A. K. et al.: *ibid*, 250: 1926—1932, 1975.
- [13] Bhattacharjee, A. K. et al.: *Can. J. Biochem.*, 54: 1—8, 1976.
- [14] Tiesjema, R. H. et al.: *Bull. W. H. O.*, 55: 43—48, 1977.
- [15] Hammond, B. W. et al.: *J. Immunol.*, 101: 808, 1968.
- [16] Severin, W. P. J.: *J. Clin. Pathol.*, 25: 1079—1082, 1972.
- [17] Reyn, A.: Part 10: Gram-Negative Cocci and Coccobacilli, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (ed. by Buchanan, R. E. & N. E. Bibbons), The Williams & Wilkins Co Baltimore, 1974, pp. 427—432.
- [18] Branham, S. E.: *Inter. Bull. Bact. Nomencl. Taxon.*, 8: 1—15, 1958.
- [19] Branham, S. E.: *ibid*, 8: 181—183, 1958.
- [20] Branham, S. E. et al.: *J. Bacteriol.*, 66: 487—491, 1953.
- [21] Edwards, E. A. et al.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 126: 876—879, 1967.
- [22] Branham, S. E.: *Bacteriol. Rev.*, 17: 175—188, 1953.
- [23] Scherp, H. W.: *Ann. Rev. Microbiol.*, 9: 319—334, 1953.

- [24] Jyssum, K.: *J. Immunol.*, **76**: 433—440, 1956.
- [25] Slaterus, K. W.: *Antonie Van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.*, **27**: 305—315, 1961.
- [26] Slaterus, K. W.: *ibid.*, **29**: 265—271, 1963.
- [27] 丁绍卿等: 微生物学报, **18**: 336—346, 1978.
- [28] 丁绍卿等: 微生物学报, **15**: 341—347, 1975.
- [29] Huntley, B. et al.: *Amer. J. Epidemiol.*, **86**: 124—148, 1967.
- [30] Jyssum, K.: *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **42**: 216—227, 1958.
- [31] Eickhoff, T. C.: *J. Infect. Dis.*, **123**: 519—526, 1971.
- [32] Cohen, R. L. et al.: *App. Microbiol.*, **23**: 289—292, 1972.
- [33] Evans, J. R. et al.: *Amer. J. Epidemiol.*, **87**: 643—646, 1968.
- [34] Fallon, R. J.: *J. Med. Microbiol.*, **9**: 239—242, 1976.
- [35] Hollis, D. G. et al.: *J. Bacteriol.*, **95**: 1—4, 1968.
- [36] Frasch, C. E. et al.: *J. Exp. Med.*, **140**: 87—104, 1974.
- [37] Frasch, C. E. et al.: *J. Bacteriol.*, **127**: 973—981, 1976.
- [38] Munford, R. S. et al.: *Lancet*, **2**: 177, 1974.
- [39] Frasch, C. E. et al.: *Infect. Immunol.*, **6**: 127—133, 1972.
- [40] Sippel, J. E. et al.: *ibid.*, **16**: 623—627, 1977.
- [41] Zollinger, W. D. et al.: *ibid.*, **10**: 975—978, 1974.
- [42] Frasch, C. E.: *J. Infect. Dis.*, **136**: s84—s90, 1977.
- [43] Hill, J. C. et al.: *Infect. Immunol.*, **10**: 605—615, 1974.
- [44] Frasch, C. E. et al.: *J. Exp. Med.*, **144**: 319—329, 1976.
- [45] Dovic, C. E. et al.: *ibid.*, **140**: 159—171, 1974.
- [46] Mondrell, R. E. et al.: *Infect. Immunol.*, **16**: 471—479, 1977.
- [47] Кувакина, В. Т.: *Ж. М. Э. Н.*, **7**: 32—37, 1973.
- [48] Reeves, P.: *Bacteriol. Rev.*, **29**: 25—45, 1965.
- [49] Kingsbury, D. T.: *J. Bacteriol.*, **91**: 1696—1699, 1966.
- [50] Vosti, K. L.: *ibid.*, **96**: 1947—1952, 1968.
- [51] Morris, G. K. et al.: *App. Microbiol.*, **27**: 312—316, 1974.
- [52] Caepherson, J. N. et al.: *J. Med. Microbiol.*, **2**: 161—165, 1969.
- [53] Counts, G. W. et al.: *J. Infect. Dis.*, **124**: 26—32, 1971.
- [54] Gold, R. et al.: *ibid.*, **124**: 593—597.
- [55] Kesper, D. L. et al.: *J. Infect. Dis.*, **127**: 378—387, 1973.
- [56] Frasch, C. E. et al.: *ibid.*, **127**: 149—154, 1973.
- [57] Frasch, C. E. et al.: *Infect. Immunol.*, **5**: 98—102, 1972.
- [58] Finland, M. et al.: *Amer. J. Med. Sciences*, **274**: 4—12, 1977.
- [59] Gold, R. et al.: *Infect. Immunol.*, **1**: 479—484, 1970.
- [60] Kent, D. C.: *Milit. Med.*, **135**: 674—677, 1970.
- [61] Лещинская, Е. В.: *Ж. М. Э. Н.*, **7**: 37—42, 1973.
- [62] Burian, V. et al.: *Bull. W. H. O.*, **51**: 495—500, 1974.
- [63] Lepow, M. L. et al.: *Pediatrics*, **60**: 673—680, 1977.
- [64] Peltola, H. et al.: *N. Eng. J. Med.*, **297**: 686—691, 1977.
- [65] Gold, R. et al.: *J. Clin. Invest.*, **56**: 1536—1547, 1975.
- [66] Makela, P. H. et al.: *J. Infect. Dis.*, **136**: s43—s50, 1977.
- [67] Zimmerman, S. E. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **7**: 470—473, 1978.