

- 1、一种结合疫苗制剂，其特征在于，含有伤寒 Vi 多糖与蛋白载体结合物。
- 2、权利要求 1 的疫苗制剂，其中的伤寒 Vi 多糖可以是经超声波或化学方法裂解后的产物。
- 3、权利要求 1 的疫苗制剂，其中的蛋白载体可以是破伤风类毒素、白喉类毒素、人血清免疫球蛋白、B 群流行性脑脊髓膜炎球菌外膜蛋白。
- 4、权利要求 1 的疫苗制剂，其中的伤寒 Vi 多糖蛋白载体的结合是共价结合。
- 5、权利要求 1 的疫苗制剂，其中可加入氢氧化铝或磷酸铝佐剂，加入量为 0.25～1.5mg 铝佐剂/ml。
- 6、权利要求 1 的疫苗制剂，其中可以加入其他已知的可提高机体免疫的人体、植物或微生物蛋白质、多糖、磷脂或小分子化合物。
- 7、权利要求 1 的疫苗制剂，是注射剂。
- 8、权利要求 1 的疫苗制剂，每剂量含有伤寒 Vi 多糖与蛋白载体结合物 5～100 μ g/ml（按伤寒 Vi 多糖计算），铝佐剂 0.25～1.5mg/ml。
- 9、权利要求 1 的疫苗制剂，每剂量含有伤寒 Vi 多糖与蛋白载体结合物 5～100 μ g/ml（按伤寒 Vi 多糖计算）。
- 10、权利要求 1 的疫苗制剂，可与其他含铝佐剂的疫苗联合组成多价疫苗，这些疫苗包括 DTP，乙型肝炎疫苗、灭活脊髓灰质炎病毒疫苗、灭活日本脑炎病毒疫苗。

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 39/112

A61P 31/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02148876.2

[43] 公开日 2003 年 3 月 26 日

[11] 公开号 CN 1404873A

[22] 申请日 2002. 11. 22 [21] 申请号 02148876. 2

[71] 申请人 北京绿竹生物技术有限责任公司

地址 101100 北京市通州区梨园镇

[72] 发明人 蒋先敏 吴冠江

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

代理人 王 为

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 一种伤寒疫苗

[57] 摘要

本发明将伤寒 Vi 多糖共价结合到载体蛋白上形成结合疫苗，用于人及哺乳类动物的主动免疫，用于预防伤寒感染。伤寒 Vi 多糖与蛋白结合后，改变了有机体对伤寒 Vi 抗原的识别方式，使其变成了 T 细胞依赖性抗原，可用于各年龄人群的免疫，并表现出明显的加强免疫效果。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

一种伤寒疫苗

技术领域：

本发明涉及一种预防伤寒的疫苗制剂，特别是一种与蛋白载体结合的伤寒 Vi 多糖疫苗制剂。

背景技术：

伤寒是由对人有致病力的沙门氏伤寒杆菌引起的一种全身性、急性、发热性传染病。主要表现为持续性高热、腹痛、不适、头痛及小肠结肠炎症等症状。在成人和年长的儿童常出现便秘，而在幼龄儿童则常出现腹泻。在患病期间大约有 50-70% 的病人可从粪便中分离出伤寒杆菌，甚至在恢复期粪便中仍可持续排菌，大约有 2% 的伤寒病人可转为慢性携带者，排菌期可达 1 年以上。全世界每年伤寒病人超过 3300 万人，每年因伤寒而死亡的人数超过 50 万人。通过改善公共卫生条件可以降低伤寒的发病率，但是，有效的控制该病流行的最佳方式仍是预防免疫。目前伤寒是全世界范围内最主要的传染病之一，主要高发病率地区为东南亚、非洲、南美洲等经济欠发达的国家，特别是在印度尼西亚、越南、印度、尼日利亚等人口众多的发展中国家，发病率高达 478/10 万。

伤寒沙门氏杆菌是一类革兰氏阴性杆菌，细菌的表面包裹着一层多糖，即荚膜。沙门氏菌具有复杂的抗原构造，一般可分为 3 类抗原：（1）Vi 抗原或表面抗原，即荚膜多糖；（2）O 抗原或细胞壁抗原，是细胞壁的脂多糖，即内毒素；（3）H 抗原或鞭毛抗原，是一种蛋白质抗原。

沙门氏菌的不同菌株都有荚膜多糖，它具有抗吞噬作用和保护细菌避免相应的抗体在补体参与下的溶菌作用。同时，荚膜可以保护细菌在血液中得以生存。特异性的抗荚膜多糖抗体与细菌结合后通过活化补体而杀死伤寒杆菌。鉴于荚膜多糖这些与细菌侵袭力和毒力有关的特性，Felix 和 Pitt 于 20 世纪 50 年代将沙门氏杆菌的荚膜多糖命名为 Vi 抗原，随后的研究发现，用粗制的 Vi 荚膜多糖抗原免疫小鼠后，小鼠可获得对伤寒沙门氏菌感染的抵抗力，可保护小鼠免受再次感染。后来研究人员用乙酸处理荚膜多糖抗原，所得到的精制抗原不能使动物产生有效的保护力。直到 20 世纪 80 年代，研究发现乙酸处理抗原可导致 Vi 多

是指对人体没有毒性，也不会引起变态反应，同时又能增强多糖的免疫原性的蛋白质如：微生物来源的蛋白质，如白喉和破伤风类毒素疫苗，经基因突变发生减毒的白喉毒素以及细菌的外膜蛋白质等，蛋白质载体也可以源于与多糖同一菌种的致病菌，另外还可以是霍乱毒素、霍乱毒素的 B 亚单位和大肠杆菌的不耐热肠毒素，它们具有佐剂的效应。另外还有绿脓杆菌的外毒素 A、P6 和一些高分子外膜蛋白质，以及不相关的蛋白质，如人血清免疫球蛋白等。

结合疫苗具有以下一些特点。(1) 能增强婴幼儿对细菌多糖的免疫反应。由于结合疫苗能激活 T 辅助性淋巴细胞和形成 T 记忆细胞，重复接种能产生记忆性免疫增强作用，使主要为 IgG 的抗细菌多糖抗原的抗体水平剧增，对婴幼儿接种后能产生较为持久的免疫保护力。(2) 细菌的多糖-蛋白质结合疫苗可成为二价疫苗。这是因为结合疫苗可同时产生针对多糖和蛋白质载体的抗体反应。(3) 能增强老年人和某些免疫功能低下或有缺陷的病人对细菌多糖抗原的免疫反应。老年人的免疫功能随年龄的增大而下降，因此对细菌多糖的免疫应答能力很差。例如肺炎是老年人的常见病，肺炎多糖和蛋白质的结合疫苗就可以增强疫苗对老年人的免疫保护力。也有报道免疫功能低下的艾滋病患者对结合疫苗产生的抗体反应要远胜于多糖疫苗。结合疫苗也可使一些缺乏对细菌多糖抗原产生免疫反应的个体产生高效价的抗多糖抗原的抗体。(4) 结合疫苗具有载体蛋白质的效应。事先或同时接种蛋白质载体会刺激 T 淋巴细胞的增殖，因而能增强结合疫苗的免疫原性。

本发明的结合疫苗可通过以下方法制备：

1. 伤寒 Vi 多糖的制备

将伤寒沙门氏杆菌接种于改良半综合液体培养基(培养基或国家药品管理局批准的其它培养基。培养基不应含有能与加入的十六烷基三甲基溴化铵形成沉淀的成分，也不能含有对人体有害或其它过敏原物质)，在培养过程中和杀菌前取样进行细菌浓度测定及纯菌试验，涂片做革兰氏染色镜检，如发现污染杂菌，应废弃。培养物于对数生产后期、静止期前期收获。一般培养 8-12 小时为宜(根据菌种接种量及所用培养基种类而异)。加入甲醛溶液杀菌，其最终浓度为 0.5-2.0%(ml/ml)。杀菌完成后，离心去菌体收集上清液，加入十六烷基三甲基溴化铵，充分混匀，形成沉淀。放置适当时间离心，收集沉淀物。用蒸馏水溶解

糖变性，从而导致多糖的免疫原性发生了改变，失去了产生保护性抗体的可能。

伤寒疫苗有注射用灭活全菌体疫苗、口服灭活全菌体疫苗、口服减毒活疫苗、Vi 多糖疫苗等。20 世纪 60-70 年代，灭活全菌体疫苗在许多国家进行了临床研究，效果不理想，已停止使用。链霉素依赖性伤寒突变株活疫苗在正常人体内繁殖能力较差，免疫后效果难尽人意，且冻干型的该种疫苗又完全丧失保护力，也停止了研究。伤寒 Ty21a 减毒活疫苗经过了大量临床实验，已被证实是目前较安全有效的伤寒疫苗之一，而且没有严重的副反应，但长期以来一些学者对 Ty21a 突变株提出以下仍然具有争议的问题：该减毒株的遗传稳定性不能确定，并推测其有毒力返祖的可能；*gaIE* 基因的突变不能完全解释该疫苗的减毒机制；有其他不明部位的基因发生了突变；冻干剂型疫苗的稳定性的不规律以及口服接种次数过多等。

纯化 Vi 多糖疫苗是经使用溴化-16-烷基-3-甲基铵处理的伤寒 Vi 多糖，具有较好的免疫原性，目前法国巴斯德-梅里厄研究所、比利时史克-必成及中国、印度的疫苗生产企业均已投入生产。在成人及 2 岁以上的儿童中，伤寒 Vi 多糖疫苗通常是经肌肉注射或皮下深部注射免疫，一次注射后 90% 以上的 2 岁以上的被免疫者可产生 Vi 多糖抗体，血清抗体的保护性水平可维持 2-3 年，再次免疫时没有回忆反应，血清抗体水平与初次免疫相似。伤寒 Vi 多糖疫苗于 1989-1997 年间共接种了 2200 万人，其中仅 6 人发生伤寒感染，而且有 2 人血培养结果阴性，另外 2 人则是 3 年前接种的疫苗，因此，确切判定为伤寒 Vi 多糖疫苗免疫失败的只有 2 人。因此可以认为伤寒 Vi 多糖疫苗是目前所使用的最为安全有效的伤寒疫苗。伤寒 Vi 多糖疫苗与其他的多糖疫苗一样，为 T 淋巴细胞非依赖性抗原，不能用于 2 岁以内儿童的免疫，再次免疫接种时不会产生免疫记忆反应。

发明内容：

为了保护 2 岁以内的儿童免受伤寒的侵扰，制造一种可用于 2 岁以内儿童的伤寒疫苗是需要的。本发明提供了一种这样的疫苗，本发明将 Vi 多糖与蛋白载体共价结合制成结合疫苗，使之成为 T 细胞依赖性抗原，动物实验表明，Vi 多糖-蛋白结合疫苗可使受试动物产生高效价的中和抗体，再次加强免疫时，动物可产生较强的回忆反应。

本发明所述 Vi 多糖是指具有免疫原性的沙门氏杆菌的荚膜多糖，蛋白载体

沉淀，并加入适量 1mol/L 氯化钠（或 2mol/L 氯化钙）溶液，摇动或搅拌 1 小时，使多糖与十六烷基三甲基溴化铵解离，加入乙醇至最终浓度为 25%（ml/ml）。冷库静置 1-3 小时或过夜，离心去沉淀，收集澄清的上清液。于上述上清液中加入冷却乙醇至最终浓度为 80%（ml/ml），充分振摇，使多糖沉淀，离心收集沉淀，然后用无水乙醇及丙酮各洗 2 次以上，干燥，即为多糖粗制品，保存于 -20℃ 以下，待进行一步提取。

多糖精制：将粗制品溶解于 1/10 饱和中性醋酸钠溶液中，使其浓度达 5-20mg/ml，按 1:2 容量用冷酚（100 克结晶酚溶于 40ml 1/10 饱和醋酸钠溶液）提取 3-5 次，超速离心（35000RPM，10℃、5 小时）去除内毒素，收集上清液，并用 0.1mol/L 氯化钙溶液或其它适宜溶液透析。再加入乙醇至最终浓度为 75%-80%（V/V）。离心收集沉淀物，用无水乙醇及丙酮各洗 2 次以上，干燥后用无热原质蒸馏水溶解，经除菌过滤后，取样进行无菌试验、血清学试验及各项生化测定。提取过程应在 15℃ 以下进行。提纯多糖应保存在 -20℃ 以下，待下一步与蛋白偶联。若所提纯多糖中的蛋白质、核酸含量（不超过 1%）及其它指标若达不到要求时，可再制一次。

精制的伤寒 Vi 多糖可用超声波处理，使高分子量 Vi 多糖变为分子量较小的多糖。

2. 载体蛋白的活化：

向载体蛋白溶液中加入己二酰二肼(ADH)，充分混合，然后再加入碳二亚胺(EDAC)，维持反应体系的 pH 在 5.6 ± 0.2 的范围内 1 小时，反应物经透析后，浓缩，置 2-8℃ 保存。

3. 伤寒 Vi 多糖-蛋白结合物的制备：

将伤寒 Vi 多糖与活化的载体蛋白等量(w/w)混合，加入碳二亚胺(EDAC)，维持反应体系的 pH 在 5.6 ± 0.2 的范围内，2 小时后将反应物装入透析袋，用 0.2mol/L NaCl 溶液 2-8℃ 透析。将透析后的结合物用 Sephacral S-1000 或 S-400HR 层析柱纯化，以 206nm/280nm 监测器监测流洗液的吸光值的改变，收集 V_0 附近的洗脱峰，即为纯化的结合物原液。以 0.22 μ m 的滤膜除菌过滤后保存在 2-8℃。

Vi 多糖-蛋白结合物原液用 pH 6.5~7.5 的 PBS 稀释，调整每毫升疫苗溶液

中含伤寒 Vi 多糖量在 10-100 μg 之间。疫苗液中可以加入防腐剂，如 0.01% 硫柳汞，疫苗液中可以加入铝佐剂如：氢氧化铝佐剂或磷酸铝佐剂（1mg/ml）。

将以上疫苗溶液制成注射用的疫苗制剂即可应用于人预防伤寒。

本发明的结合疫苗，其中的伤寒 Vi 多糖可以是经超声波或化学方法裂解后的产物。

本发明的结合疫苗，其中的伤寒 Vi 多糖蛋白载体的结合是共价结合。

本发明的结合疫苗，其中可加入氢氧化铝或磷酸铝佐剂，加入量为 0.25~1.5mg 铝佐剂/ml。

本发明的结合疫苗，其中可以加入其他已知的可提高机体免疫的人体、植物或微生物蛋白质、多糖、磷脂或小分子化合物。

本发明的结合疫苗，是注射剂。

本发明的结合疫苗，每剂含有伤寒 Vi 多糖与蛋白载体结合物 5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （按伤寒 Vi 多糖计算），铝佐剂 0.25~1.5mg/ml。

本发明的结合疫苗，每剂含有伤寒 Vi 多糖与蛋白载体结合物 5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ （按伤寒 Vi 多糖计算）。

以上所述每剂是指每一疫苗制剂，如每一注射针剂，或每支注射剂，或每次使用量的注射用药剂。

本发明的结合疫苗，可与其他含铝佐剂的疫苗联合组成多价疫苗，这些疫苗包括 DTP，乙型肝炎疫苗、灭活脊髓灰质炎病毒疫苗、灭活日本脑炎病毒疫苗。

本发明的伤寒 Vi 多糖-蛋白结合疫苗的使用方法为肌肉注射。本发明的结合疫苗特别适合于 2 岁以内儿童应用，也可用于 2 岁以上儿童或成年人，老年人。

具体实施方式：

以下通过实施例进一步说明本发明

实施例 1

伤寒 Vi 多糖-破伤风类毒素结合疫苗的制备方法之一

破伤风类毒素原料符合《吸附破伤风疫苗制造与检定规程—中国生物制品规程》2000 年版的要求。纯度不低于 1700Lf/mg 蛋白质，蛋白含量为 4mg/ml。

破伤风类毒素的活化：向 50ml 破伤风类毒素（蛋白含量为 200mg）溶液中加入 700mg 己二酰二肼（ADH），充分混合，然后再加入 1000mg 碳二亚胺（EDAC），维

在 5.0 ± 0.2 的范围内, 3 小时后将反应移到 $2-8^{\circ}\text{C}$ 环境中, 继续搅拌 24 小时, 之后产物装入透析袋内, 用 0.2mol/L NaCl 溶液于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 透析 24 小时以上, 或用分子量为 300KD、500KD 的超滤膜超滤除去小分子物质。

将透析或超滤后的结合物用 $5.0 \times 100\text{ cm}$ 的 Sephacryl S-400HR 或 Sepharose CL-4B 层析柱纯化, 以 206nm/280nm 监测器监测流洗液的吸光值的改变, 收集 V_0 附近的洗脱峰, 即为纯化的结合物原液。用 $0.22\mu\text{m}$ 除菌滤膜过滤后保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

用 pH $6.5-7.5$ 的 PBS 稀释至 $10-100\mu\text{g/ml}$, 以 0.01% 硫柳汞为防腐剂 (也可不加), 按 0.5ml 、 1.0ml /支分装后即 为 伤 寒 Vi 多 糖-白 喉 风 类 毒 素 结 合 疫 苗。稀 释 后 的 疫 苗 液 中 可 加 入 铝 佐 剂 ($0.5-1.2\text{mg/ml}$)。

实施例 4

伤寒 Vi 多糖-人 IgG 结合疫苗的制备方法

将 200mg 伤寒 Vi 多糖 (4mg/ml , 50ml) 与 200mg 人血清免疫球蛋白 (IgG 10mg/ml , 20ml) 混合, 调 pH 至 5.5 , 加入 1400mg 碳二亚胺 (EDAC), 以 0.1M HCl 调节反应体系的 pH 在 5.5 ± 0.5 的范围内, 3 小时后将反应物移入 $2-8^{\circ}\text{C}$, 继续搅拌 24 小时, 之后装入透析袋内, 用 0.2mol/L NaCl 溶液于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 透析 24 小时以上, 或用分子量为 300KD、500KD 的超滤膜超滤除去小分子物质。

将透析或超滤后的结合物用 $5.0 \times 100\text{ cm}$ 的 Sephacryl S-400HR 或 Sepharose CL-4B 层析柱纯化, 以 206nm/280nm 监测器监测流洗液的吸光值的改变, 收集 V_0 附近的洗脱峰即为纯化的结合物原液。用 $0.22\mu\text{m}$ 除菌滤膜过滤后保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

用 pH $6.5-7.5$ 的 PBS 稀释至 $10-100\mu\text{g/ml}$, 以 0.01% 硫柳汞为防腐剂 (也可不加)。按 0.5ml 、 1.0ml /支分装后即 为 伤 寒 Vi 多 糖 结 合 疫 苗。疫 苗 液 中 可 加 入 铝 佐 剂, 铝 佐 剂 的 加 入 量 为 $0.5-1.2\text{mg/ml}$ 。

实施例 5

动物实验

SPF 级雌性 BALB/c 小鼠, 体重 $16-18\text{克}$ 。于 0、14、21 天皮下注射下列各组配方的疫苗 0.5ml 。分别于第 2 次免疫后 7 天、第 3 次免疫后 7 天时采集鼠血液标本, 分离血清后冻存于 -20°C , 直到测定。

持反应体系的 pH 在 5.6 ± 0.2 的范围内 1 小时，反应物经透析后，用截留分子量为 100KD 的滤膜超滤浓缩至 6 mg/ml 蛋白浓度以上，置 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存。

伤寒 Vi 多糖-蛋白结合物的制备：将 150mg 伤寒 Vi 多糖与活化的破伤风类毒素等量(w/w)混合，调 pH 至 5.6，加入 1000mg 碳二亚胺 (EDAC)，维持反应体系的 pH 在 5.6 ± 0.2 的范围内，2 小时后将反应物装入透析袋，用 0.2mol/L NaCl 溶液 $2-8^{\circ}\text{C}$ 透析或用分子量为 300KD、500KD 的超滤膜超滤除去小分子物质。

将透析后的结合物用 2.6×100 cm 的 Sephacral S-1000 或 S-400HR 层析柱纯化，以 206nm/280nm 监测器监测流洗液的吸光值的改变，收集 V_0 附近的洗脱峰即为纯化的结合物原液。保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

将多批 Vi 多糖-蛋白结合物原液合并，然后加入 pH 6.5~7.5 的 PBS 稀释，以 0.01% 硫柳汞为防腐剂，每毫升疫苗溶液含伤寒 Vi 多糖量在 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。按 0.5ml、1.0ml/支分装后即为伤寒 Vi 多糖-破伤风类毒素结合疫苗，疫苗液中可加入铝佐剂 0.5~1.2mg/ml。

实施例 2

伤寒 Vi 多糖-破伤风类毒素结合疫苗的制备方法之二

将 200mg 伤寒 Vi 多糖(50ml)与 200mg 破伤风类毒素 (4mg/ml, 50ml) 混合，调 pH 至 5.6，加入 1000mg 碳二亚胺 (EDAC)，维持反应体系的 pH 在 5.6 ± 0.2 的范围内，2 小时后将反应入 $2-8^{\circ}\text{C}$ ，继续搅拌 24 小时，之后将结合物装入透析袋内，用 0.2mol/L NaCl 溶液于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 透析 48 小时。

将透析后的结合物用 2.6×100 cm 的 Sephacryl S-1000 或 S-400HR 层析柱纯化，以 206nm/280nm 监测器监测流洗液的吸光值的改变，收集 V_0 附近的洗脱峰即为纯化的结合物原液。用 0.22 μm 除菌滤膜过滤后保存在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 。

用 pH 6.5~7.5 的 PBS 稀释至 10-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，以 0.01% 硫柳汞为防腐剂（也可不加），按 0.5ml、1.0ml/支分装后即为伤寒 Vi 多糖-破伤风类毒素结合疫苗。疫苗液中可加入铝佐剂，铝佐剂的加入量为 0.5-1.2mg/ml。

实施例 3

伤寒 Vi 多糖-白喉类毒素结合疫苗的制备方法

将 200mg 伤寒 Vi 多糖(50ml)与 200mg 白喉类毒素 (5mg/ml, 40ml) 混合，调 pH 至 5.0，加入 1800mg 碳二亚胺 (EDAC)，用 0.1M HCl 调整反应体系的 pH

各组实验动物疫苗配方及动物只数：

Vi 组：伤寒 Vi 多糖疫苗，5 μ g/ml，10 只 BALB/c 小鼠。

Vi-TT 组：伤寒 Vi 多糖-TT 结合疫苗，含伤寒 Vi 多糖 5 μ g/ml，15 只 BALB/c 小鼠。

Vi-TT-Al(OH)₃ 组：伤寒 Vi 多糖-TT 结合疫苗，含伤寒 Vi 多糖 5 μ g/ml，含氢氧化铝佐剂 0.5mg/ml(按铝离子计算)，15 只 BALB/c 小鼠。

NS 组：生理盐水对照组，10 只 BALB/c 小鼠。

Al 组：氢氧化铝佐剂对照组，含氢氧化铝佐剂 0.5mg/ml(按铝离子计算)，10 只 BALB/c 小鼠。

将伤寒 Vi 多糖用 0.02mol/L PBS(pH7.2) 稀释为 5 μ g/ml，包被 96 孔酶标板，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C 放置 2 小时，4 $^{\circ}$ C 放置过夜。次日用 1% 牛血清白蛋白封闭酶标板，200 μ l/ml，室温下封闭 1 小时，用 PBS-Tween 20(0.2%) 洗液洗板 3 遍，净化工作台内吹干，用铝泊袋真空封口后 4 $^{\circ}$ C 放置。

以酶联免疫方法测定免疫小鼠血清抗 Vi 多糖抗体的滴度。NS 组、Al 组小鼠血清血清进行 25 倍稀释，37 $^{\circ}$ C 反应 1 小时，洗涤 3 次后加入羊抗鼠-HRP，反应 1 小时后洗涤 3 次，加入底物液避光显色 15 分钟，以 2mol/L 硫酸终止反应，测定 A450/650 值，以其平均值的 2.1 倍作为 Cut off 值。其它各组的血清效价测定方法同上，但血清的稀释度不同，Vi 组小鼠血清自 25 倍开始稀释，倍比稀释至 1600 倍，其它各组小鼠血清自 100 倍开始稀释，倍比稀释至 12800 倍。以 A450/650 值大于或等于 Cut off 值的最高血清稀释度为效价。各组免疫动物血清的实验结果见表 1。

表 1：不同配方伤寒疫苗免疫小鼠 2、3 次后 1 周的血清抗体几何平均滴度

组别	动物只数	第 2 次免疫后 1 周		第 3 次免疫后 1 周	
		GMT	SD	GMT	SD
Vi	10	200	2.08	230	1.55
Vi-TT	15	2316	2.75	4422	2.28
Vi-TT+Al(OH) ₃	15	5572	2.59	4222	2.08

从上述实验结果可以看出，单纯用伤寒 Vi 多糖疫苗免疫小鼠 2、3 次后，抗

体滴度的差别无显著性 ($P>0.05$); Vi-TT、Vi-TT+Al(OH)₃组与 Vi 组相比, 第 2 次、第 3 次免疫后的抗体几何平均滴度(GMT)明显高于 Vi 组 ($p<0.01$); 第 2 次免疫后, Vi-TT+Al(OH)₃组的 GMT 显著高于 Vi-TT 组 ($p<0.05$); 第 3 次免疫后, Vi-TT+Al(OH)₃组与 Vi-TT 组的 GMT 无显著性差异; Vi-TT、Vi-TT+Al(OH)₃组第 3 次、第 2 次免疫后的抗体几何平均滴度无显著性差异 ($p>0.05$)。