

用。

四、该研究所的领导和专家对我们都十分热情、友好：所长S.C.Pal博士和副所长B.C.Deb博士亲自接送、介绍全所和有关情况、安排日程。各研究室的专家也都认真介绍他们的工作。流行病学研究室的专家不顾烈日酷暑，冒着大雨带我们去现场考察。我们提出一些索取资料和标本、材料的要求，他们都一一答应解决。他们赠送的标本有：弯曲菌的鸡蛋培养基、轮状病毒SA-11标准株，阿米巴原虫的纯培养物。我们还提出索取他们新分离的10株古典型和埃尔

托型霍乱弧菌，他们经请示世界卫生组织新德里办事处后已如数寄来。

五、建议：

①最好在北京、上海等地建立腹泻病研究中心，以利加强腹泻病的研究和对外联系。

②腹泻病研究要更注重结合实际，特别是防治措施考核的研究。

③ORS简便、有效，应注意宣传、生产、推广。

④继续加强对外学术交流，以启发和促进我们的腹泻病研究和控制工作。

波摩那型钩端螺旋体猪用活菌苗菌株保存的研究

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所 张荣珍 李昭华* 王宝旺

猪是钩端螺旋体（钩体）病的主要传染源之一。为了消除猪带菌，近年来我们开展了猪用活菌苗的研究。工作中碰到的一个难题是菌种保存问题。过去或现在国内多采用液体或半固体培养基定期传代的方法，该法即费人力、物力、又费时间。更重要的是长期频繁传代，一旦导致菌株抗原性改变，工作就会前功尽弃。因此，我们学习并改进了上海生物制品研究所的经验，从1978年5月开始将波摩那型钩体弱毒菌株及实验用的强毒攻击株分别作了冻干保存，并定期开封检查，对复苏的菌株进行了动物保护力试验和毒株毒力测定，获得了较好的结果，现报告如下。

材料和方法

一、钩端螺旋体菌株：

弱毒菌株：L₁₈、7005、7009和丹。

强毒菌株：公15

二、保护剂及其制备：用于钩端螺旋体冻干保存的保护剂种类很多，我们使用的是成分较少的一种：蛋白胨9克，蔗糖7.5克及磷酸盐缓冲液150毫升（pH 7.2~7.4）。

将蛋白胨和蔗糖放入缓冲液中加热溶解，用滤纸过滤，然后用6号除菌漏斗过滤，用0.1N NaOH调节pH至7.2，放4℃冰箱保存备用。

三、钩端螺旋体菌液的制备及冻干方法：将待冻干保存的菌种接种于含8%兔血清的Korthof培养基中，28℃~30℃孵育5~7天，暗视野检查无杂菌，生

长丰盛（100条以上/400×），4000转/分离心30分钟，然后与保护剂等量混合，每只菌种管注入0.2毫升。与此同时作无菌试验和钩端螺旋体生长试验，即将保护剂与浓缩菌液的混合物分别注入普通肉汤、Korthof培养基及接种琼脂斜面。菌种管口堵上无菌棉花，置-60℃左右酒精加固体CO₂中速冻2分钟，然后迅速放入冻干机内，立即抽真空，真空度达50微米以下，继续抽干过夜，次日封口，冻干的菌种放4℃冰箱保存。用该种保护剂共进行了4次冻干，不同时间开封检查。

四、开封、复苏及生物学特性的检查：开封的菌种管将其颈部在火焰上烤热，滴加无菌生理盐水使之炸裂，迅速将炸裂的菌种管插入无菌的纱布块内压破，滴加少量的Korthof培养基待溶解后吸出，加入培养基内，放28℃~30℃孵育，每周用暗视野显微镜检查一次，一般观察4周。

将生长的培养物传代，增菌。进行动物保护力试验，首次腹腔内注射0.5毫升，间隔5天，再注射1毫升，第二次注射后14天以强毒株攻击，观察发病情况，存活的动物于14天处死，取双侧肾培养。强毒株公15测毒的方法是将该株7天培养物1毫升腹腔内注射地鼠，注射后观察发病、死亡或肾带菌情况。

结 果

一、不同时间开封冻干菌株复苏情况（表1）：

• 现调卫生部药品生物制品检定所

表1 5株波摩那型钩体冻干后不同
时间开封存活情况

冻干后 时 间	存 活 管 数*				
	L ₁₈	7005	7009	丹3	公15
1个月后	8	6	6	7	8
6个月后	8	6	6	7	8
1年半后	7	5	6	7	7
6年后	6	6	4	6	7

*各株试验管数每次均为8管。

二、生物学特性检查结果：弱毒菌株L₁₈选为代表株（因为此株曾在金地鼠和仔猪中作了大量的试验），强毒株公15。共作2次检查，一次是冻干后1个月；另一次是冻干保存6年后进行的。结果如表2。

表2 波摩那型钩体L₁₈株冻干前后保护力比较

时 间	试 验 组		对 照 组	
	试验数	存活数	试验数	存活数
冻干前	10	10	10	0
冻干后1个月	5	5	5	0
冻干后6年	8	8	8	0

试验组存活的地鼠，在第二次免疫后14天杀死，取肾培养结果均无钩体生长。

毒株公15冻干前后毒力没有改变，仍能造成动物的死亡。

讨 论

冷冻干燥是细菌菌种常规的保存方法。但钩体不易用冻干的方法保存，虽然有人曾作过尝试，但都没有成功。目前国外多用液氮保存，但一般实验室并不具备这样的条件。我们采用上海生物制品研究所使用的71-8号保护剂，在此基础上将保护剂的pH作了调整，从试验的结果看复苏率大大提高。这种保护剂效果好，配方简单，容易掌握。因此，这种方法将给猪用钩体活菌苗的实际应用提供前提，有可能制备成冻干的菌苗。

从冻干的四批菌种复苏情况看，随着冻干的保存时间的延长，复苏率有所下降。不同菌株对冷冻的耐受力也不相同，似乎毒力较强的菌株耐受力较强（如毒株公15），毒力弱的菌株耐受力也不相同（如7005和7009），总的复苏率是较低的。冻干保存的波摩那型钩体究竟还能保存多长时间，仍在观察中。

从广东登革热病人血清中分离出 I 型登革病毒

中国预防医学中心流行病学微生物学研究所

李福琛 胡半农 杨凤蓉 宋俊棋 唐家权 邹长华 高 宏

1980年广东省海南岛等地发生登革热爆发流行。我们在流行区采集病人发病早期的血液和病家周围100米范围内蚊虫进行病毒分离，结果在病人血清中分离到一株I型登革病毒。此标本系采自海南临高县东英公社居留大队第一生产队一患者。该患者于1980年8月30日因头痛、高热等症状去公社医院就诊，确诊为登革热，次日采其静脉血、分离血清保存于液氮中带回实验室、接种小白鼠乳鼠（1~3日龄），传二代后转种C6/36传代细胞，经传11代病变稳定，血清学多种方法鉴定为登革病毒I型。现将分离鉴定结果报

告如下。

材料和方法

一、毒株：标准毒株登革病毒I型（Haw allan株）；II型（New-Guinea株）；III型（H-87株）；IV型（H241株）；新分离毒株（暂命名为人-22株）。

二、免疫血清：按Rull法制备的登革病毒1~4型小白鼠免疫腹水及其IgG。

三、兔抗鼠荧光素标记的IgG：购于北京生物制