

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

品研究所。

四、血球：按上海第六人民医院方法制备绵羊红细胞及甲醛固定的绵羊红细胞。

五、细胞：白纹伊蚊传代细胞C6/36 细胞株。

六、抗原：登革病毒1~4型分别感染已长成致密单层的C6/36细胞，出现典型病变后收获细胞培养物，保存于低温冰箱，作为补体结合试验、反向间接血凝试验、荧光抗体检查的抗原。

结 果

一、补体结合试验：用4个标准型登革病毒免疫小白鼠，然后用S180腹水瘤诱发腹水、腹水经3000转/分离心15分钟，上清液作免疫血清使用。然后与登革1~4型病毒及人-22株的C6/36细胞培养物作为抗原做补体结合试验（固定血清1：32为2单位，稀释抗原）结果见表1。从表1可看出，虽然登革病毒4个型之间有较明显的交叉现象，但仍可看出人-22株和登革标准病毒I型对I型病毒的免疫血清的补体结合效价相同（均为1：32），而对其它型别除D-2有1：16的滴度外皆为阴性，说明人-22株为登革病毒I型。

表1 补体结合试验结果

免疫血清	抗原滴度（1：）					正常细胞
	D*-1	D-2	D-3	D-4	人-22	
D-1	32	16	16	16	32	4
D-2	4	32	16	16	16	4
D-3	—	16	16	—	—	—
D-4	—	8	4	16	—	—
正常腹水对照	—	—	—	—	—	—

*表示登革病毒

二、间接免疫荧光技术：实验所用的抗原和抗体制备方法均同前。将被病毒感染的C6/36细胞培养物滴加在镀膜载玻片的圆孔内，每孔1滴、经固定、吹干后加入不同稀释度的免疫血清1滴，最后加入兔抗鼠标记荧光血清1滴，封片镜检。结果见表2。从表2中可以看出人-22株和标准I型病毒一样，对其标准I

型病毒的免疫血清均有较高的滴度，而对其它型别毒株的免疫血清均为阴性。与补体结合的结果是一致的。

表2 免疫荧光检查结果

抗 原	免疫血清滴度（1：）					正常腹水对照
	D-1	D-2	D-3	D-4	人-22	
D-1	>5120	20	—	—	1280	—
D-2	20	1280	80	—	—	—
D-3	—	80	1280	—	—	—
D-4	—	—	—	80	—	—
正常细胞对照	—	—	—	—	—	—

三、反向间接血凝试验：抗原用超高速冷冻离心加以浓缩。用PB液将IgG稀释成300微克/毫升。与醛化的绵羊红细胞等量混合。醛化血球被致敏后用于反向间接血凝试验。结果表明人-22病毒株对标准登革I型病毒的免疫血清，其反向间接血凝滴度比对其它型病毒的免疫血清滴度高4~16倍。试验结果证明人-22株为登革病毒I型。

讨 论

1980年我国广东广西二省沿海地区的登革热爆发流行，经多次证明为登革病毒Ⅲ型所致。我们从流行区病人血液中分离到1株登革I型病毒。这就说明1980年我国南方发生的登革热流行不仅是由登革Ⅲ型病毒所致，同时也有I型病毒。

二个型别的登革病毒同时在一个流行区发现，国内尚没见报道。Halstead认为病死率很高的登革出血热是由于病人先后两次感染了不同型别的登革病毒，因为病毒不同型别之间有抗原交叉，故在体内可形成抗原抗体复合物，促使细胞内活性物质释放并激活补体系统和凝血系统，引起一系列病理生理改变，表现为登革出血热或登革休克综合征。

两个不同型别的登革病毒在同一流行区同时发现，这对本病的流行特征，对病人的临床表现和转归的影响是值得引起重视和研究的问题，