

上海丹麦Ⅱ(D₂)卡介苗菌株的免疫效果与反应

朱光辉 陶鸿宝 黄珍琴 邱奕励

摘要 本文介绍了上海丹麦Ⅱ(D₂)菌株保存传代适应过程,及其对小鼠免疫保护率和人体接种阳转率与接种反应的情况,并推荐PB₃₀₂PSⅠ甲₁₀种子批菌种为我国统一菌株的候选菌种。

关键词 卡介苗菌株 接种效果 热稳定

菌种是卡介苗质量的关键,常受条件影响而发生变化^[1,2]。当前世界各国使用的卡介苗菌种,均直接或间接来自Callmatte原株。由于各国传代保存方法不同,其特性呈现一定差异(见1958年Ab-58学术论文集)。目前国内生产用丹麦株、巴西株和日本株,也由于传代保存方法各异,在生物学特性和反应性上显示差别。其中北京与上海之丹麦菌株,虽同源于丹麦国立血清研究所,亦因传代方法不同而有所区别。为此我们对D₂菌株的传代保存方法进行系统探索,旨在总结D₂菌株的传代保存方法与其免疫原性及反应性的关系,结果报道如下。

一、D₂菌株传代保存方法的演变:上海D₂菌株系1948年魏锡华教授取自丹麦国立血清研究所,其传代保存方法大致归纳为四个阶段:第一阶段用原法苏通综合液连续传代保存,但数次移种后发现生长渐趋缓慢,菌膜显得粗糙。第二阶段用苏通马铃薯培养基连续传代,结果是马铃薯切面上菌苔生长旺盛,但下端液体表面之菌膜生长缓慢,约2周才能长满,且粗糙以至影响进一步扩大传代。第三阶段用甘油马铃薯培养基连续传代,其菌苔与菌膜生长均不理想。第四阶段移种于5%甘油胆汁马铃薯培养基,经38℃培养14天后,再移种于苏通马铃薯培养基培养2周,两者交替传代,则马铃薯下端苏通液表面在2周左右即长满一层薄而多皱且富于弹性的菌膜,此膜适合苏通一

代与二代的扩大,以后即以此法保存菌种。为确保菌株特性的稳定,将PB₃₀₂代菌种冻干保存。

二、D₂PB交替传代菌株的特性:

1.生物学特性:长期交替保存于胆汁马铃薯与苏通马铃薯培养基之D₂菌株,经长期观察有以下特性:培养于苏通综合液菌膜生长快、呈现薄而多皱并富于弹性,适合扩大传代。生产稳定,对热耐受力较强,骆氏鸡蛋培养基上菌落多数为非扩散型,免疫效果好,但反应性稍强。

2.国内外同类菌株免疫力比较:关于卡介苗菌种传代保存方法,不同国家乃至同一国家的不同实验室亦不一致。对于卡介苗通过胆汁培养基后能否提高毒力,意见不一。我们曾对不同传代方法的上海D₂菌株,北京D₁菌株,巴西、法国、苏联与匈牙利菌株,用小鼠腹腔免疫、静脉攻击H₃₇Rv结核菌的方法,进行免疫保护率试验(表1)。结果可见,上海D₂株与北京D₁株小鼠保护率最高,其次为法国和巴西株,苏联、匈牙利株最差,其中上海D₂株免疫0.01mg剂量,其保护率明显高于北京D₁株。

3.现场使用考核结果:为了解交替传代D₂菌种制备的菌苗在现场使用中的接种反应及免疫效果,与巴西菌株进行比较,多次和上海结

表1 各菌株不同剂量的小鼠保护率结果

剂量(mg)	上海D ₂ 株	北京D ₁ 株	巴西株	苏联株	法国株	匈牙利株	对照
1	68.70	64.50	55.80	43.30	52.70	32.20	
0.1	53.40	50.50	48.60	30.20	44.50	8.10	0
0.01	52.70	36.90	36.50	18.10	28.20	6.70	

核病中心防治所协作进行现场观察。结果(表2)显示,上海D₂株接种阳转率明显高于巴西株($\chi^2=70.78, 87.9; P<0.01$), 但异常淋巴反应发生率亦明显高于巴西株($\chi^2=61.81, 27.85; P<0.01$), 而D₂菌株接种后淋巴反应发生率与活菌数密切相关($r=0.972, P<0.05$), 活菌数多, 发生率高(表3)。关于接种后异常淋巴反应的影响因素, 我们认为除与菌苗的活菌数有关外, 菌种特性、菌膜菌龄及接种技术和接种对象年龄等关

系亦极为密切。
三、种子批菌种:
1.种子批的建立: 用胆汁与苏通马铃薯每隔2周交替传代保存之菌种,经长期实践证明, 生产稳定, 免疫效果好, 唯接种后淋巴结反应发生率偏高。为降低反应, 结合建立种子批菌种对传代方法又进行了探索, 初步摸索出一条纱膜传代法, 并以此法建立了种子批(附图)。

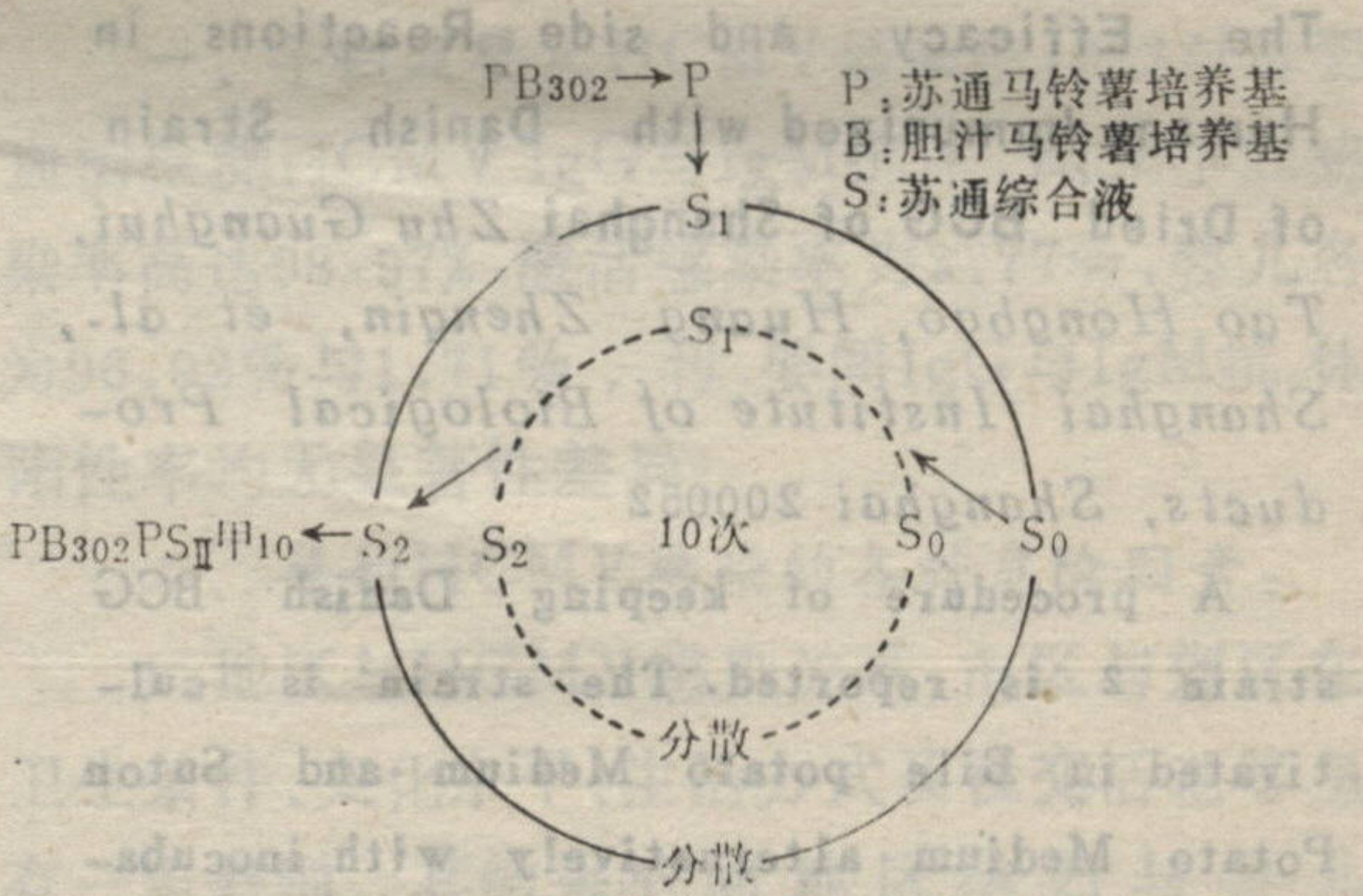
表2 上海D₂及巴西两株卡介苗新生儿皮内及皮上接种后阳转率及淋巴结反应

接种方法	菌苗浓度(mg/ml)	菌株	结素阳转率		淋巴结反应		
			复查人数	阳转率(%)	人数	肿大率(%)	化脓率(%)
皮内	0.5	巴西	366	63.10	424	1.42	0.00
		上海D ₂	348	89.90	403	17.12	0.00
皮上	75	巴西	343	54.80	424	0.24	0.00
		上海D ₂	483	84.10	548	6.90	0.18

表3 不同活菌数液体卡介苗新生儿皮内接种反应及阳转率比较结果

菌苗活菌数(万/mg)	淋巴结反应			结素阳转率		
	复查人数	肿大人数	%	复查人数	阳转人数	%
<100	899	50	5.66	848	724	84.46
101~500	977	53	5.42	924	837	90.58
501~1000	495	86	17.52	419	385	92.89
>1000	258	57	22.10	215	215	93.89

2.纱膜传代法生产卡介苗现场考核结果: 为验证经纱膜反复传代之冻干种子批菌种, 并用纱膜传代法生产之液体与冻干卡介苗的接种反应与免疫效果, 在嘉兴市结核病防治所与上



附图 PB₃₀₂PS I 甲₁₀种子批传代流程图

海结核病中心防治所的协作下进行 现场 考核 (表4、5)。结果证明, 液体苗接种后淋巴结异常反应率明显下降, 12周复查仅0.28%, 连续3年显示较高的免疫水平。冻干苗连续观察3

年未见淋巴结反应,免疫阳转率达到>95.00% 的高水平。

表4 液体卡介苗新生儿皮内接种反应及效果观察结果

接种人数	复查周期	复查人数	结 素 反 应		淋巴结反应		
			阳性人数	阳性率	硬结直径	人数	%
1950	12周	1443	1314	91.10	10.10	4	0.28
949	1年	846	765	90.40	9.90	0	0.00
418	2年	313	294	93.90	10.40	0	0.00
118	3年	87	80	92.00	11.50	0	0.00

表5 冻干卡介苗皮内接种人体反应及阳转结果

年份	平均活菌数(万/mg)	观察人数	淋巴结反应		结素阳转率	
			人数	%	阳性数	%
1987	518	519	0	0.00	512	98.84
1988	493	493	0	0.00	471	95.53
1989	462	183	0	0.00	183	100.00

四、小结：上海D₂PB₃₀₂PSI甲₁₀种子批菌种，是经适当方式诱导质量稳定的菌株，制成冻干菌苗热稳定性好，大规模人群接种具有免疫原性好，接种反应低的特点。因此，我们认为可推广使用。

The Efficacy and side Reactions in Humans Immunized with Danish Strain of Dried BCG of Shanghai Zhu Guanghui, Tao Hongbao, Huang Zhenqin, et al., Shanghai Institute of Biological Products, Shanghai 200052

A procedure of keeping Danish BCG strain 2 is reported. The strain is cultivated in Bile potato Medium and Sutton Potato Medium alternatively with inocuba-

tion periods of two weeks. Lyophilized vaccine produced by using seeds derived from this strain gives better immunogenicity and lower side reaction to new-born babies and has better thermostability in compare with vaccines derived from strains of Beijing, Brazil, CCCP, France of Hungary

Key words BCG strain Efficacy of immunization Thermostability

参 考 文 献

- 1 Sawada T, et al. International Symposium on BCG. Vaccine, 1971, 17: 109.
- 2 Sekhnis VM, et al. J Biol Standar 1977, 5: 85.

(收稿: 1993-07-02)