

卫生部北京生物制品研究所

生产科研资料汇编

1981—1982

目 录

1. 卡介苗生产工作总结(1974~1982).....	雷起蓉等 (1)
2. 卡介苗“种子批系”的使用.....	雷起蓉等 (3)
3. 氮气保存冻干卡介苗.....	雷起蓉等 (6)
4. 用世界卫生组织方法与常规方法对比观察41批皮内卡介苗的活菌数	刘纯谦等 (9)
5. 三批冻干卡介苗热稳定性试验.....	雷起蓉等 (12)
6. 卡介苗抗癌活性组分的提纯.....	田世昭等 (15)
7. 北京旧结素与日本旧结素豚鼠皮肤反应的比较.....	黄文萱 (20)
8. 811批旧结核菌素与两种国际参考标准品的比较.....	刘纯谦等 (22)
9. 浓缩旧结素79-1批的效价标定.....	舒 浚等 (26)
10. 罐培养新工艺厌氧棒菌苗及其效力检定方法的探讨.....	田世昭等 (29)
11. 厌氧棒菌(简称C. P.)细胞壁骨架(CWS)的分离及其检定结果	田世昭等 (30)
12. 厌氧棒状菌苗(简称CP)研制四年总结——以临床资料为主要内容	田世昭等 (33)
13. 北京部分地区肺炎菌种的分离和鉴定.....	卫生部北京生物制品研究所菌苗室 (35)
14. III型肺炎球菌液体培养及荚膜多糖提取试验的初步结果.....	张振宜等 (37)
15. 肺炎球菌诊断血清制造.....	王素兰等 (39)
16. 微孔滤膜在流脑多糖菌苗中的应用.....	陈翰彬等 (39)
17. 超速离心生产的流行性脑脊髓膜炎A群多糖菌苗的流行病学效果调查	袁承德等 (42)
18. 用微量法检测血清杀菌抗体以观察流脑多糖菌苗免疫持久性.....	董春明等 (43)
19. 纯化组分百日咳菌苗研究.....	刘德铮等 (45)
20. 影响百日咳FHA抗原HA活性的因素.....	刘德铮等 (45)
21. 在液体培养基中百日咳FHA抗原产生的规律.....	刘德铮等 (48)
22. 蔗糖密度梯度离心在纯化百日咳菌苗中的应用.....	刘德铮等 (50)
23. 百日咳菌白细胞增多因子血凝素(LP-F-HA)和丝状血凝素(FHA) 在小鼠体内的生物学效应.....	刘德铮等 (52)
24. 1979~1981年百日咳原液的质量总结.....	百日咳协作组等 (56)
25. 大罐液体深层培养与固体培养百日咳菌苗人体反应及血清学效果	北京防疫站, 北京生研所等 (59)
26. 百日咳菌苗接种小鼠足蹰浮肿试验与小鼠毒性, LPF, HSF的关系	唐巧英、刘德铮等 (62)
27. 白破三联制剂试剂研究实验室检定结果.....	百白破协作组 (64)
28. 白破稳定性试验.....	唐巧英等 (67)

29. 乙型肝炎疫苗小量研制总结..... 疫苗组 (70)
30. 中国、法国乙型肝炎疫苗人体安全性及免疫学效果观察
..... 生研所检定所黑龙江防疫站等 (77)
31. 乙型肝炎病毒adr亚型基因组的克隆和其表面抗原基团的次级克隆
..... 蔡良婉、谢彦博等 (83)
32. 固相放射免疫分析法检测HBsAg及Anti-HBs试剂的研制..... 李一飞等 (84)
33. 大量制备免疫纯度HBsAg的方法..... 王际彰等 (87)
34. 使用聚乙二醇硫酸铵初步提纯HBsAg方法比较..... 董志祥等 (92)
35. 几年来乙型肝炎表面抗原(HBsAg)诊断血清生产和试验工作总结
..... 许健音等 (94)
36. 酶联免疫吸附分析试验检测HBsAg药盒的研制..... 许健音等 (96)
37. 我国北方一些地区 δ 抗原感染的 测..... 许健音等 (100)
38. 新生儿中乙型肝炎疫苗效果观察: 抗HBs免疫应答的产生和母婴传播HBsAg
的阻断..... 北京生研所, 沈阳医大三院 (102)
39. 乙型肝炎疫苗低年龄人群随机双盲对照的效果观察
..... 北京生研所, 广西防疫站 (106)
40. 抗乙型肝炎特异性免疫核酸的制备及其对治疗HBsAg阳性慢性迁延性肝炎的
初步观察..... 第一传染病院, 北京生研所 (109)
41. 荔浦县城关居民乙型肝炎特异非特异感染指标检测..... 谢彦博等 (113)
42. 一种具有多切点的克隆化体系-Pucq质粒在乙型肝炎基因工程中的应用
..... 谢彦博等 (114)
43. 循环HBsAg-IgM复合物的测定及意义..... 中国医大附属三院, 北京生研所 (115)
44. 马抗人IgM代替IgM μ 链研制酶标检测IgM-抗HBc药盒
..... 许健音、梅雅馨等 (118)
45. 甲型肝炎病毒实验感染恒河猴的研究..... 周宁珍、李学仁等 (121)
46. 风疹减毒活疫苗的研究:
I、BRD₁₁株风疹病毒感毒的观察..... 大同、承德、广西防疫站, 北京生研所 (131)
47. BRD₁₁株风疹减毒活疫苗小量人体接种观察总结
..... 广西、承德防疫站, 唐山医学院, 北京生研所 (135)
48. BRD₁₁株和RA27/3株风疹活疫苗临床反应性和免疫原性的研究(摘要)
..... 广西防疫站, 北京生研所 (138)
49. BRD₁₁株风疹感毒活疫苗的研制..... 郝素兰等 (138)
50. BR₁株风疹病毒制备血凝素的适宜条件..... 王淑珍 (140)
51. 风疹血凝抑制试验不同试验条件的比较..... 王长太等 (142)
52. 不同风疹病毒株在动物体内的抗体反应..... 官荫乡等 (144)
53. 用单克隆抗体分析我国乙型流感病毒的抗原性..... 王桂秋等 (145)
54. 用单克隆抗体分析我国甲₃型(H₃N₂)流感病毒的抗原性..... 卢宝兰等 (147)
55. 一株用5-氟尿嘧啶诱变减毒的甲₃型(H₃N₂)流感减毒株..... 张育琴等 (151)
56. 甲型流感病毒减毒株蚀斑筛选方法的初步探讨..... 张育琴等 (152)

57. 人甲型流感病毒基因组电泳图谱的显示 (一) 李 港等 (152)
58. 人甲型流感病毒基因组电泳图谱的显示 (二) 李 港等 (155)
59. 流行性腮腺炎血清学方法的研究:
 - 一、微量血凝抑制试验方法的建立及应用用于临床辅助诊断..... 薛秀卿等 (158)
 - 二、中和试验及血抑试验所测流腮抗体的比较..... 薛秀卿等 (161)
60. 流腮活疫苗口服免疫效果观察..... 302医院,北京生研所 (163)
61. 不同保护剂流腮活疫苗的稳定性..... 薛秀卿等 (165)
62. 麻疹疫苗毒种污染鸡白血病病毒的检查..... 张永福等 (167)
63. 国内外五种麻疹活疫苗免疫后八年抗体消长动态..... 苏万年等 (168)
64. 脊髓灰质炎活疫苗国际参考病毒和疫苗的神经毒力试验..... 小儿麻痹组 (169)
65. 北京、西宁等地脊髓灰质炎患者病毒学及血清学调查..... 杜桂枝等 (174)
66. 不同批新生牛血清对脊髓灰质炎疫苗病毒微量滴定的影响..... 魏文杰等 (178)
67. 用Hep-2细胞微量法检测脊髓灰质炎病毒滴度及中和抗体..... 杜桂枝等 (179)
68. 流行性乙型脑炎灭活疫苗生产研究总结..... 郭祥里等 (182)
69. 流行性乙型脑炎补体结合抗原生产方法的改进..... 张美英等 (186)
70. 用微量板法进行乙型脑炎病毒滴定及中和试验..... 张美英等 (188)
71. 在同一次地鼠肾细胞培养物上反复多次收获乙型脑炎病毒悬液制备疫苗的体会

..... 庞成华等 (192)
72. 不同效力检定方法对我国及日本制备的乙型脑炎疫苗效力的比较...

..... 原明达整理 (196)
73. 用流行性乙型脑炎疫苗预防豕流产..... 丁志芬等 (198)
74. 单纯疱疹病毒分离及生物学性状观察..... 张育琴等 (200)
75. I型单纯疱疹病毒灭活疫苗对疱疹性角膜炎的近期疗效..... 张育琴等 (201)
76. 单纯疱疹病毒2型抗体对单纯疱疹病毒2型复制过程的影响

..... 医科院基医研,北京生研所 (202)
77. 单纯疱疹病毒2型与宫颈癌的相关性

..... 北京生研所,医科院基医研,肿瘤医院 (209)
78. 应用微量间接免疫荧光试验进行恙虫病立克次体的血清学分型的研究

..... 赵树萱、邵 兰等 (213)
79. 关于恙虫病立克次体活存性的观察..... 张海莲等 (217)
80. 恙虫病C₄₄减毒株活疫苗的研究 赵树萱、邵 兰等 (221)
81. 用Namalwa细胞制备人类淋巴细胞干扰素:
 - II、转瓶和发酵罐实验生产规模制备干扰素..... 丁志芬 (226)
82. 用Namalwa细胞制备人类淋巴细胞干扰素,
 - III、兰色琼脂糖层析纯化人类淋巴细胞干扰素..... 蒋盘宏等 (227)
83. 用Namalwa细胞制备人类淋巴细胞干扰素:
 - IV、降低诱导温度使Namalwa细胞干扰素超产 丁志芬 (231)
84. 吸附精制白喉类毒素成人免疫的研究..... 阚毓筠等 (232)
85. 白喉类毒素对青少年免疫的研究..... 连文远等 (237)

86. 应用ELISA法定量测定人血中白喉抗体的研究·····	阚毓筠等 (238)
87. 高纯度精制破伤风类毒素致敏绵羊红血球测定破伤风抗毒素·····	张国华等 (241)
88. 吸附精制破伤风类毒素近远期免疫效果观察·····	北京生研所等 (244)
89. 纯化精破类的两步法·····	李树珩等 (250)
90. 合成佐剂MDP的佐剂活性(摘要)·····	卢锦汉等 (252)
91. MDP在水溶液中诱发实验性变态反应性脑脊髓炎的活性·····	卢锦汉等 (252)
92. 精制破伤风抗毒素制造工艺的研究·····	陈永煌 (255)
93. 单采浆术献血员的血液学观察·····	稽幼初等 (257)
94. 用改良mason法生产Ⅷ因子中纯制剂·····	刘隽湘等 (261)
95. 浓缩中纯Ⅷ因子制剂试制小结·····	钟祖祺等 (263)
96. 兔抗人抗淋巴细胞球蛋白延长人同种异体或异种皮肤移植存活治疗再生障碍性 贫血和自身免疫病的临床效果·····	甘德坤等 (265)
97. 兔抗人ALG制造方法的改进·····	甘德坤等 (269)
98. 固定人红细胞膜和血小板用于吸收ALS中的杂抗体·····	甘德坤等 (271)
99. 玫瑰花环抑制试验及在鉴定抗淋巴细胞球蛋白的应用·····	李连臣等 (274)
100. 抗淋巴细胞血清中细胞毒抗体与血凝抗体的分布·····	方箭筠等 (277)
101. 自制淋巴细胞分层液的淋巴细胞分离效果及应用·····	李连臣等 (279)
102. 关于人血白蛋白的聚合体·····	张淑英等 (281)
103. 用亲和层析法提纯人纤维蛋白溶酶原·····	张淑英等 (285)
104. 静脉注射免疫球蛋白, 1. 溶纤维旦白酶降解免疫球蛋白·····	张淑英等 (286)
105. 静脉注射免疫球蛋白的制备与初步临床观察·····	王佩瑜等 (291)
106. 静脉注射免疫球蛋白的免疫化学性质·····	蔡素琼等 (296)
107. 人免疫球蛋白轻链的提纯与抗血清的制备·····	陈好华等 (301)
108. 癌胚抗原的精制及抗血清的制备·····	程明等 (302)
109. CEA-EIA试药盒的研制及临床应用·····	程明等 (305)
110. 兔抗人补体C ₃ 诊断血清试制小结·····	史德林等 (310)
111. 渡口市健康儿童血清C ₃ 正常范围的调查·····	史德林等 (315)
112. 脑膜炎奈瑟氏菌诊断血清稳定性试验·····	苏家媛等 (315)
113. 化学键合HCG-胶乳妊娠试剂试用小结·····	汪湘宁等 (315)
114. 检测类风湿因子用人丙种球蛋白致敏胶乳的临床使用和稳定性观察 ·····	徐淑珍等 (320)
115. IgE反向被动血凝制剂的研制及其临床应用·····	陈好华等 (321)
116. 异硫氰酸荧光素标记羊抗人IgG, 羊抗兔IgG和兔抗鼠BACB/CIgG结合物 制备·····	米竹君等 (325)
117. 关于马属动物布氏杆菌病检疫问题商榷·····	周平整理 (329)
118. 退役军马(骡)免疫方法的探讨·····	李岩 (332)
119. N:NIH小鼠在我国的饲养繁殖初探·····	于则常等 (334)
120. 用添加剂代替青饲料喂豚鼠试验观察·····	万邦礼等 (337)

121. 豚鼠频密繁殖法生产三年小结..... 英子臣 (340)
122. 不用青菜饲喂豚鼠的生产试验.....豚鼠实验组 (342)
123. 离乳日龄对家兔生产力影响的探讨..... 家兔组 (346)
124. 家兔试用不同饲料配方的繁育效果观察..... 张飞鹏等 (347)
125. 补体结合试验对鸡群中白血病毒的特异性研究..... 万邦礼等 (350)
126. 罗 (Rous) 氏肉瘤病毒的病灶测定 许兆奎 (352)
127. 限制性内切酶BamHI的分离提纯 谢彦博等 (354)
128. 一种简便的Pst和Bgl_{II}内切酶的提取方法..... 顾天成等 (359)
129. 人胚肺2倍体细胞2BS株的细胞群体年龄的研究
..... 北医环研所环保室, 北京生研所 (361)
130. 人胎肺2倍体细胞培养技术..... 阎淑琴等 (362)
131. 用国产微载体培养动物细胞的初步报告..... 庞成华等 (365)
132. EAC花环试验方法的探讨及干燥制剂的制备 方箭筠等 (371)
133. 酵母浸出粉用于无菌试验用培养基的试验结果..... 培养基室检定科 (373)
134. 应用C-200 AP型氯离子测定仪检测生物制品中氯离子..... 刘焕兰、高子仪等 (375)
135. 鲎试剂用于生物制品检测:
 鲎试验与家兔热原质试验比较..... 费克芬等 (377)
136. 鲎试剂(LAL)稳定性研究..... 费克芬等 (380)
137. 采用鲎试验毛细管法 (Capillary Limulus test) 测定热原质的阶段总结
..... 倪道明等 (381)
138. 三种化学消毒剂杀菌效能比较..... 肖振亚 (384)
139. 增加心脏采血提高血清产量..... 苏家媛等 (386)
140. 珠蛋白对麻疹病毒保护作用的试验..... 兰淑芝等 (387)
141. 按装电子显微镜的经验介绍..... 刘译甫 (388)

卡介苗生产工作总结

(1974——1982)

卫生部北京生物制品研究所卡介苗组
(雷起蓉 执笔)

一、菌种：

我所生产用卡介苗菌株，1948年来源于丹麦823，由于培养条件与原株不一，而形成北京亚株的特性。自1963年底以蔗糖明胶为保护液经冷冻干燥真空封口后，作为我所卡介苗生产用的“种子批系”，包括64—2、64—11、64—26、64—42等批。由于年代较久，保存的数量有限，因此冻干了第二代种子批742、80—1、007等。在使用过程中也出现过一些问题，所以在不同年代曾换用过种子批系中的不同批号，以前以64—42为主。82年5月开始使用64—11批生产。详见“卡介苗‘种子批系’的使用”。

二、产量：

我所卡介苗生产仍以液体卡介苗为主，近年也生产部分氮气封口冻干划痕卡介苗，现将六年产量列于表1和2。

三、活菌数：

按我所生产常规，每周用同批菌膜制造的液体菌苗，只抽一批皮内的以10倍稀释法进行活菌计数，冻干菌苗则每批皆测干前、干后活菌数。自1982年3月起，按WHO规程改为每批皮内菌苗以100倍及两倍稀释法进行。又由于前几年上级下达的生产指标中，对活菌数的要求是以每毫升中1毫克计算，故自1979年开始活菌数以1毫克计算，历年活菌数见表3。

从表3见，六年活菌数年平均都在1000万以上。

四、培养基原材料——味精的问题：

表 1 1977—1982年卡介苗产量及污染率

年 份	皮 内 卡 介 苗		划 刺 卡 介 苗		污 染 率
	批 数	制 造 量 (ml)	批 数	制 造 量 (ml)	
1977	73	218900	114	265900	7.51
1978	80	229500	92	223300	0
1979	85	293500	65	140400	0
1980	75	259800	61	124800	0
1981	70	279000	55	110928	0.8
1982	72	315025	63	132544	0

表 2 近年氮气封口冻干划痕卡介苗产量及活菌数

年 份	产 量	年平均干后活菌数(万)
1977	27112支	338.5
1978	14000	271.5
1979	163606	337
1980	59336	536
1981	50000	353
1982	50000	350.3

表 3 1977—1982历年皮内卡介苗活菌数

年 份	批 数	平均活菌数(万)
1977	51	1255
1978	43	1418
1979	51	2040
1980	49	2411
1981	45	2677
1982	72	3264

注：1977—1978年为万/0.75mg，1979—1982年为万/mg。

自1974年后发现卡介苗活菌数不规律，人体接种后，结素反应有偏低现象，除在菌种方面进行选择外，对综合苏通培养基中的主要氮源——味精进行了分析研究。以往我

所使用天津味精厂出品的红玫瑰味精，含谷氨酸钠70%。经了解，其它30%成分为氯化钠（并非精制，乃市场出售的食盐）。又该厂自七十年代即已改变生产工艺，由原来的黄豆饼提取改为细菌发酵。当然两种不同工艺所生产的味精成分都是谷氨酸钠，但究竟有无差异？虽经多方请教，也未解决。为了保持原材料相对的一致，经多次试验后，采用了黄豆饼提取的清源味精，同时考虑到氯化钠对细菌生长不利，故自1978年起用含99%谷氨酸钠的清源味精进行生产。

五、六年来我所液体卡介苗在京津两地新生儿接种后三月结素复查结果见表4、5。

表 4 北京市新生儿皮内卡介苗接种后三月结素复查结果

年度	结素单位 (Tu)	结 素 反 应		
		复查人数	阳性人数	阳转率(%)
1977	5	7168	5987	83.5
1978	5	8064	6602	81.9
1979	10			90.0
1980	10			93.1
1981	10			91.5
1982	10			95.2

从表4和5看，北京市1977--1978年用5Tu结素进行新生儿三个月复查，阳转率为80%以上；天津市在80%左右。但自1979年北京市改用10Tu结素后，阳转率为90%。从提高稀释结素浓度进行种后复查，阳转率上升幅度并不大。除了从卡介苗质量、冷藏避光运转及接种技术等方面加以提高以解决接种效果外，用于考核阳转的结素本身也急待解决。首先我国结素无标准品，而我所自1974年起用732批旧结素按1:2500稀释为50Tu/ml，至1978年10月失效后，因无可用的新结素替换，而一再延期，1980年1月开始将732批旧结素改为1:2000稀释为50Tu/ml，又经一年多，至1981年5月更换811批旧结素用于生产。所以我们认为在考核卡介苗接种后阳转的问题上，结素质量也是一个应该注意的问题。

表 5 天津市新生儿划痕卡介苗接种后结素复查结果

年度	结素单位(Tu)	结素反应 阳转率(%)
1978	5	89.5
1979	5	77.4*
1980	5	86.1
1981	5	87.8

* 1979年为接种后8周复查结果，其余均为12周结果。

六、关于学习WHO 规程方面：

WHO 的卡介苗制检规程，是对冻干菌苗的要求，虽然我所以生产液体卡介苗为主，但其对菌苗制造、检定的标准，仍是我们需要达到的目标。为此，我组自1980年开始较为系统的进行了学习，并在执行我国卡介苗制检规程的前提下，尽可能用于生产。

1. 卡介苗的避光问题：卡介活菌对日光非常敏感，因此WHO 规程要求在菌种、制造、分包装，保存运转、使用等全过程均需避光，过去我们对此不够重视。1980年5月将无菌室窗户全部漆黑，基本保证了卡介苗的避光。并于1982年底制作了实验室的黑布窗帘，进一步加强了避光。

2. 活菌计数：WHO 规程要求一个实验室应固定一种方法检测活菌数。我所一直沿用10倍稀释法，在与WHO 技术指南中所述的具体方法，即以该法采用的随机抽样可避免主观因素。因此82年用于生产，并按其规定表格进行记录和运算。

3. 测浓度：WHO 规程关于菌苗总菌量的计算方法，是要求一个实验室所制造的全部菌苗应坚持用一种计算方法。我所一直沿用称重法进行皮内卡介苗的生产，以及用高度法进行划痕卡介苗生产。为了测定菌苗的浑浊度，82年对生产的皮内和划痕菌苗作了浓度测定试验，取菌苗原液75mg/ml，稀释至5mg/ml，用美制35型分光光度计，650nm，红光泸板比浊测定。结果见表6。

4. 培养泸液PH：制造菌苗时，取每批

培养液测PH，结果见表7。

表 6 卡介苗的浑浊度试验结果

	浑浊度(透光率/5mg/ml)	
	皮内卡介苗	划痕卡介苗
试验次数	21 批	75 批
平均数	18.70	16.15
标准差	2.96	3.35
变异系数	15.85%	20.77%
95%可信限	12.89—24.50	9.57—22.72

表 7 培养液PH结果

	PH	
	皮内卡介苗	划痕卡介苗
试验次数	21 批	76 批
平均数	7.43	7.33
标准差	0.27	0.19
变异系数	3.6%	2.65%
95%可信限	6.91—7.95	9.95—7.72

5. 耗氧量的测定:用瓦氏呼吸计测定卡介苗的耗氧量以观察菌苗活力。此方法于六十年代初我组即已采用，但由于仪器设备的问题，一直不能用于生产。82年得到新设备后，才开始正式使用。结果见表8。

表 8 卡介苗耗氧量测定

	耗 氧 量	微毫米/75mg/1小时
	皮内卡介苗	划痕卡介苗
试验次数	39 批	48 批
平均数	249.59	249.07
标准差	44.02	42.53
变异系数	17.64%	17.08
95%可信限	163.32—335.87	165.72—332.43

结 束 语

从近六年的生产工作总结中，我们认为北京6442亚株及其种子批系生产卡介苗。生长稳定，活菌数较高，京津两地接种后结素阳转率，用5Tu复查在80%以上；用10Tu复查为90%，接种后尚未遇到过不良反应。由于液体卡介苗运输不便、效期仅42天，也是我们供应区内儿童卡介苗接种率不高的原因之一。世界卫生组织全球扩大免疫计划提出在1900年要使全世界儿童都接种卡介苗。目前国际儿童基金委员会已经提供了我组全套冻干卡介苗的机器设备，我们在总结经验的基础上，将为生产更多，质量更好的卡介苗而努力。

1983年 8 月

卡 介 菌 “种子批系” 的 使 用

雷起蓉 刘纯谦 刘明银 冯宏群 李 杰 曹秀和 明荣华

众所周知，卡介菌由牛型结核杆菌减毒而来，是遗传学上典型的“定向”变异例证之一。自1921年开始用于人体，至今已60余年。虽然从1923年就有很多学者用各种培养方法，接种动物的方法以及减低动物抵抗力等等进行试验，都未能发现卡介菌有回复致病性能的倾向。特别是从60多年的使用实践

证明，卡介菌没有出现过“返祖”现象，没有回复原有毒力，但也绝非静止不变。

自1924年巴黎巴斯德研究所设专门实验室制造供应卡介苗后，世界各国的卡介菌株均来源于此。但Frappier等⁽¹⁾认为目前卡介菌株都是从巴黎原株直接或间接分种而来，由于各国的传代方法及培养条件不一，影响

了菌株的生物学特性，在形态学上，动物保护力及人体免疫等方面皆有所变异，而形成不同的亚株。如在不同传代培养过程中不同型菌落（扩散型和非扩散型）之间比例的变化，影响菌株对动物的保护力⁽²⁾。将综合苏通培养基中的天门冬素以酶消化酪蛋白代替，反映出菌株的免疫力、变态反应，以及细菌的类脂质、蛋白质及多糖类的含量皆比原株为低⁽³⁾。R. S. Vallishayee等的试验⁽⁴⁾认为不同的卡介菌株在人体内表现不同的效能，在对11株卡介菌的比较中，布拉格株与其他株显著不同，皮肤反应及变态反应均小。A. Ladefoged等对12株卡介菌的评价⁽⁵⁾，认为巴黎、丹麦及莫斯科三株活力较强，但前二株有时在新生儿中产生局部淋巴结炎合并症。巴西株很少有人体使用资料。哥德堡株虽具明显的保护作用，但有骨髓炎发生的病例。东京株在儿童中引起较高的变态反应，但在动物中的表现则皆弱。所以学者们对此给予很大注意。如Dubos、Sula等曾指出：丹麦、日本、捷克等卡介菌株，在生长特点、菌体大小等方面都有所不同，这些对评价菌苗质量有实际意义。由于菌体大小不同，就必然影响到在同一重量下活菌数的不同，亦即免疫单位的不同。因此许多有关单位对这些亚株不断地进行研究⁽¹⁾。

为了防止卡介菌株在遗传学上的进一步变化，必须放弃连续传代的传统保存菌种的方法。因为连续传代的结果致使今天世界上没有两株卡介菌株有同一的特性⁽⁶⁾。为此，WHO生物学标准化委员会于1965年就采纳了正式的“干燥卡介苗规程”⁽⁷⁾，其中规定了使用种子批系（Seed lot system）的问题，即以冻干状态保存卡介菌种。在制造菌苗时应尽量减少培养传代次数，在任何情况下不应超过12代⁽⁴⁾。

我所生产用卡介菌株，1948年来源于丹麦823，由于培养条件与原株不一，而形成北京亚株的特性⁽⁸⁾。自1963年底以蔗糖明胶为

保护液经冷冻干燥真空封口保存一大批。检定合格后，选出64—2、64—11、64—26、64—42等批，作为我所生产用“种子批系”。即是启开安瓿后，在苏通马铃薯培养基上传代，有时通过胆汁马铃薯培养基1~2代⁽⁹⁾，以S₃制造菌苗。现将使用“种子批系”的情况汇总于后。

1. 自1964年使用北京亚株“种子批系”后，生产稳定，未出现过异常现象。1965年为考核我所种子批菌株的稳定性，进行了64—42菌种与原菌种（天门冬素58—61）的对比试验，对豚鼠免疫力及人群接种后结素阳转率方面，两者之间无明显差异。但接种后的淋巴结反应天门冬素58—61株高达5.4%，较北京亚株高出9倍。

2. 1970年生产中，发现菌苗活菌数不稳定，出现500万以下的批数较多约20%。曾在菌种、培养基的原材料等方面寻找原因进行试验，发现可能与当时所用种子批系的64—2菌种在苏通马铃薯培养基上连续传入4~5年有关。因此1973年重新启开原株58—61和64—42，及连续在苏通马铃薯培养基上传代25年和8年的7号和64—2菌种进行全面检定⁽⁸⁾。现仅就小白鼠免疫力试验来看（表1）。对照组与各免疫组之间的死亡率在统计学上有显著性差异，说明各组菌苗都有免疫力。其中58—61与7号、64—2相比有非常显著的差异（ $P < 0.01$ ）。58—61优于7号及64—2号，由此可见，免疫力减弱的原因，可能与长期在培养基上连续传代有关。因此1973年

表 1 小白鼠免疫力试验结果(1973年)

组别	小白鼠 总数(支)	开始死亡 时间(天)	对照组死亡90%时(47天)		t 50
			死亡数	死亡率(%)	
7号	26	4	16	61.5	44
64—2	27	7	13	48.1	45
64—42	30	20	12	40.0	52
58—61	25	15	6	24.0	>56
对照	29	4	26	89.6	20

以种子批系中的64—42作为生产菌种使用，并订为每年启开种子批进行生产。发现活菌数恢复正常，未出现低于500万者。当时新生儿皮内接种12周结素阳转率均在90%以上。

3. 在1973经验交流会后，1974年为考核“种子批”64—42的使用情况，又与国际菌种丹麦1331、日本172及原株58—61进行三批对比试验。结果见表2、3、4。从4个菌种的生长发育来看，64—42最好，也最稳定，不但产量高，活菌数也高。表4的免疫力试验可见，64—42与丹麦1331、原株58—61相比。经统计学处理无显著差异，说明64—42仍保持其原有的免疫原性。

表 2 不同菌株的产量比较

菌 号	半 干 重 (克/500ml 苏通)		
	12天	14天	16天
北京64—42	14.50	20.81	17.27
58—61	9.95	5.00	6.53
丹麦 1331	6.46	5.83	3.36
日本 172	5.74	4.44	2.19

注：（1）产量以每500ml综苏所产S₃菌膜，经过滤、压干、称重为半干重。
（2）12天产量为三批结果平均数，每批两瓶S₃，14和16天为两批结果平均数，每批两瓶S₃。

表 3 不同菌株的活菌数对比

菌 号	第一批	第二批	第三批	平均
北京64—42	2770万	3340万	1940万	2683
58—61	1210	1080	—	863
丹麦1331	270	440	220	310
日本 172	—	2480	1700	2090

4. 由于64—42保存的数量较少，于1974年2月将新启开的64—42P₃S₃进行第二代种子批冻干保存，批号为742。并用于生产至1982年初。每年启开2～3次，以不超过在马铃薯培养基上传代12次为限度，此时期的生产在活菌数方面较稳定，小白鼠免疫力试验（表5）说明仍较好。遗憾的是自1976年

表 4 不同菌株三批小白鼠免疫力试验(1974)

组 别	第 一 批		第 二 批		第 三 批	
	小白鼠 (只)	t ₅₀ (天)	小白鼠 (只)	t ₅₀ (天)	小白鼠 (只)	t ₅₀ (天)
北京64—42	29	51	24	47	24	46
58—61	28	48	23	37	22	45
丹麦 1331	28	48	24	52	22	44
日本 172	30	19	25	24	22	18
对 照	30	15	24	15	20	16

表 5 小白鼠免疫力试验(1975年)

免疫时间	批号	小白鼠数(支)	死亡率(%)	t ₅₀ (天)
1975	3801	21	76.2	45.07
3.27	3590	23	95.7	40.50
	对照	23	100.0	12.84
1975	3848	22	59.1	43
12.18	3841	25	72.0	43
	对照	23	100.0	15

注：批号系指用742种子批生产的菌苗批号。

起至今，历时7年，年年均因攻毒问题而致免疫力试验失败。因此缺乏必要的资料来说明种子批的免疫效果。

根据北京市结核病防治所反映自1974年后新生儿接种后12周结素复查阳转率达不到90%，在改用10Tu结素后可达90%以上。另外一些使用部门也反映接种卡介苗后结素反应较弱的情况，当然，影响结素阳转的因素不少，但就制造菌苗的部门来说，我们首先考虑的是菌种的问题，由于742种子批的真空封口保存状态不佳，可能影响质量。因此，从1982年5月，取种子批系64—11投入生产，至于使用效果有待以后总结。

在长期使用“种子批系”的过程中，我们的体会是：

1. 卡介菌北京亚株64种子批系，虽来源于丹麦823，但由于从1960年起改变了培养基中的氮源，而形成的特性是生长稳定、产量和活菌数高，淋巴结反应小，没有合并症，能保持较好的免疫力、至今未见使用部门有关接种后异常反应的报告。这与Mande⁽¹⁰⁾及

Dahlstrom⁽¹¹⁾的报导不同,他们在北欧及斯堪的那维亚国家的调查中,发现接种卡介苗后化脓性淋巴结炎仍很普遍,骨髓炎的发生率达1:5000。丹麦卡介苗接种后,仍有1%的淋巴结肿大化脓,可能与菌种有关,所以我们认为确立北京亚株64种子批系进行生产是适宜的。

2. 为了将卡介苗的变异控制在一定的范围内,应在适当的时机确定“种子批”,以达到既能保持原有免疫持久性,又能获得较高的阳转率及较小的接种反应。并在生产过程中定期启开种子批菌种使其传代保存不超过12代,以保持相对的稳定性。

3. 按照WHO规程要求,种子批菌种启开后传代,不应超过12代。对于代数的计算,我们是以在马铃薯培养基上传代的次数为限,而未计算苏通的代数。因此,相对地说,是增加了传代的次数,应在今后注意改进。

4. 为保证种子批传代的限制,若以苏通传苏通的方法进行生产,不但可减少传代次数,还可免去马铃薯的影响因素。值得考

虑。

5. 免疫力试验在考核菌种的免疫效能上是一重要手段,遗憾的是近七年来屡次试验均因毒株问题而告失败。

参 考 文 献

1. Frappier et al; Immunization in Tbc, Fogarty international center proceedings No.14, P. 157.
2. Osborn T. W.; Tubercle 57(1976) 181—195.
3. Galliova' Jindriska; International Symposium on BCG Vaccine, 1970, Vol 17, P. 117—124.
4. Vallishayee R. S. et al; Bull WHO 51(5): 489, 1974.
5. Ladefoged A. et al; Bull WHO 53(4): 435, 1976.
6. Guld J.; International Symposium on BCG Vaccine, 1970. Vol 17. P. 143—146.
7. Requirements for dried BCG Vaccine; WHO Techn. Rep, Ser., 1966, 329, 25.
8. 卫生部生物制品研究所卡介苗组: 卡介苗北京64—42亚株的特性(摘要), 全国结核病学术会议大会宣读稿, 1979.
9. 卫生部生物制品研究所卡介苗组: 三个生产菌株的对比研究, 1965年卡介苗经验交流会。
10. Mande R.; Journal of Biological Standardization 1977, 5, P. 155—158.
11. Dahlstrom G.; Journal of Biological Standardization 1977, 5, P. 147—148.

氮 气 保 存 冻 干 卡 介 苗

雷起蓉 李 杰 刘明银 曹秀和 冯宏群 明荣华 刘纯谦 陈正仁

由于液体卡介苗有效期短,不易深入边远地区,1950年陈正仁等⁽¹⁾曾试制冻干卡介苗,皮内注射阳转率达99%,惟因注射部位溃疡较大,未能推广。自1956年起,我们经多次试验,制成冻干皮内和划痕菌苗,真空封口保存,干后活菌数均在100万以上,冷藏保存1—3年质量也较稳定⁽²⁾。在京津两地试用结果⁽³⁾:冻干划痕卡介苗阳转率达90%以上,皮内菌苗为89%,经观察两千多名被接种者,证实安全可靠,并投入生产,有效期暂定为一年。

但是七十年代初,由于缺乏真空安瓿,加之手工操作进行真空封口,工艺复杂,费人费时。鉴于世界卫生组织冻干卡介苗规程⁽⁴⁾容许使用氮气保存菌苗,故自1972年开始进行了氮气保存冻干卡介苗的研究。通过试验证明,冻干划痕卡介苗的效果与液体划痕菌苗是一致的,效期可达一年,仅以77—82年的生产为例,产量逐年增高,现为5万支左右,年平均干后活菌数在272—536万/mg之间。但冻干皮内卡介苗的干后活菌数不稳定,结果往往不够理想,虽经多方面反复试

验，亦不能达到预期要求。因而近几年来未生产冻干皮内卡介苗，现将氮气保存冻干划痕卡介苗试验总结于后。

试 验 结 果

一、活菌计数：采用直接稀释法，即将冻干制品稀释成1mg/ml 卡介菌液，依次作10倍稀释至 10^{-6} 。干前取 10^{-5} 、 10^{-6} ，干后取 10^{-4} 、 10^{-5} ，分别接种骆氏鸡蛋培养基，每支种0.1ml，经37℃培育六周后计数。现将13批结果综合于表1。

表 1 氮气保存划痕卡介苗冷藏
(2~8℃)不同时期活菌数

批号	活 菌 数 万/mg						
	干前	干后	活存率	3月	6月	9月	一年
7414-1	3630	752	20.7%			395	153
7414-2	3150	795	25	458	690	319	382
7417-1	2300	280	12			261	246
7423-1	1670	402	24			367	148
7423-2	660	189	29	786		572	219
7424	3020	858	28	789		410	328
762	3130	475	15	522	464		345
765	3075	526	17	589	690		689
767	2860	423	15	373	235		489
9批平均	2610.56	522.22	20%	601.83	522	387.33	333.22

从表1看：9批氮气保存划痕卡介苗干后平均活菌数为522.22万/ml，符合我国冻干卡介苗制检规程上100万/ml 以上为合格的规定。干后活存率为20%。冷藏保存一年后平均活菌数为333.22mg/ml，为干前活卡数的13%干后的63.81%。

二、动物试验：

1. 小白鼠免疫力试验：采用12~14克小白鼠，经腹腔注射氮气保存冻干划痕卡介苗0.5mg/0.5ml进行免疫，每批25支，同时设液体划痕卡介苗及空白对照组各25支。免疫后一月请北京结核病研究所攻击毒菌，观察半数动物死亡时间 (t_{50})。

从表2、表3 结果可见，氮气保存冻干划痕卡介苗干后和经冷藏 (2~8℃) 2、3、6 及12月后，其免疫力与液体划痕卡介苗(制

表 2 氮气保存冻干划痕卡介苗冷藏(2~8℃)
三月后小白鼠免疫力试验

组 别	小白鼠总数 (只)	小白鼠死亡数 (只)	死亡率 (%)	t_{50} (天)
7420-2	24	23	95.8	32.66
7423-2	24	19	79.0	49
7424	24	18	75.0	40
7422	24	22	91.7	39.32
3950液体对照	23	22	95.7	41.15
空白对照	23	23	100.0	12.84

表 3 氮气保存划痕卡介苗762批冷藏(2~8℃)
保存不同时间小白鼠免疫力试验

组 别	保 存 时 间	小白鼠 总 数 (只)	小白鼠 死亡数 (只)	死亡率 (%)	t_{50} (天)
762	干后立即	24	11	45.83	>35
3705液体对照	立即	25	16	64.00	49
空白对照	—	23	23	100.00	14
762	2月	24	15	62.50	42
3718液体对照	立即	25	20	80.00	35
空白对照	—	24	24	100.00	13
762	3月	22	1	4.58	>33
空白对照	—	25	15	60.00	19
762	6月	23	13	56.52	48
3755-5液体对照	立即	23	14	60.85	46
空白对照	—	22	22	100.00	17
762	12月	23	7	30.4	>53
3803液体对照	立即	24	12	50.0	49
空白对照	—	24	21	87.5	14.9

造后立即免疫) 相一致，与空白对照比较， t_{50} 显示出较好的免疫力。

2. 安全试验：按制检规程要求所进行的豚鼠安全试验合格，说明氮气保存安全可靠。

三、人群效果观察：按卡介苗划痕常规在天津进行了氮气封口冻干菌苗的新生儿及学龄儿童 (7~10岁) 接种观察。又将冷藏保存一年的冻干菌苗在鹤壁进行学龄儿童 (7~10岁) 的接种。学龄儿童均系初种对象，并在接种前用5单位结素选择阴性者接种，接种后3个月仍用5单位结素复查阳转。

1. 天津市结果：见表4。

天津的观察结果是令人满意的，新生儿及学龄儿童接种后的结素阳转率与新鲜液体

划痕卡介苗结果是一致的。

2. 鹤壁市结果：见表5。

表 4 天津市新生儿及学龄儿童接种氮气保存冻干划痕卡介苗后结素复查结果

接种对象	菌苗批号	12周结素复查		一年结素复查	
		人数	阳转率	人数	阳转率
新生儿	7420-2	379	86.10		
学 龄 儿 童	7420-2	807	88.6	615	82.2
	液体对照	181	90.6	253	77.8
	762	617	83.9*		

* 因地震影响，复查时间推迟至接种后半年完成。

表 5 鹤壁市学龄儿童接种冷藏一年的氮气保存冻干划痕卡介苗的结素复查结果

接种时间	菌苗批号	冷藏(2~8℃)时间	结素复查结果		
			人数	阳性人数	阳转率
1977年 3月	762	一年	241	200	82.98
	765	一年	217	202	92.09
	3802液体对照	三周	156	147	94.8

从表5结果可见，762、765两批氮气保存冻干划痕卡介苗冷藏一年后，在鹤壁市进行学龄儿童接种，三月后结素复查阳转率达82%以上，新鲜液体菌苗阳转也达到94.8%，与天津市的结果相等。

讨 论

氮气保存冻干卡介苗，是将卡介苗经冷冻干燥后，在安瓶内充以纯氮，以代替将安瓶内空气抽尽后熔封保持真空状态的作法，同样能使卡介苗的新陈代谢维持在最低水平或静止状态，并能保持其生命力。从工艺过程上看，充氮不需用真空安瓶，普通安瓶则可。在安瓶封口技术上，氮气封口可在一般安瓶罐封机上进行，比手工操作真空封口效率提高10倍以上。但是氮气纯度不易解决，

而更不易掌握安瓶内充氮量，只能抽样测安瓶内残余空气的办法来检测，不如真空封口能用真空检测器作每支安瓶的测试。我们的氮气保存冻干卡介苗在热稳定性试验方面尚未完全过关。冻干皮内菌苗，干后活菌数达不到要求，这都与氮气保存有关。目前所获得的干后活存率很低，平均只有20%，而最低为12%，最高也不超过29%，这是值得研究的问题。卡介苗接种有赖于活菌数，若接种的菌数过少，则达不到应有的作用。虽说规程规定干后活菌数毫克达100万即合格，但这是最低要求，所以应设法提高干后的活存率，可考虑选择活存率高的菌株来制备冻干卡介苗，同时可再对保护剂进行多种配方，还可从冷干过程进行改进。总之应设法提高干后的活菌数以保证质量。

小 结

对氮气保存冻干划痕卡介苗的试验表明，干后活菌数符合法规要求，均在100万以上。小白鼠免疫力试验t₅₀与对照组有非常显著的差异，而与液体菌苗组的结果相符。人群效果也表明新生儿及学龄儿童种后12周及1年的结素复查均得到满意结果。

从近年大批量生产来看，干后活菌数较高，使用安全可靠。在未具备真空封口条件之前，使用氮气保存冻干划痕卡介苗是可行的。

参 考 文 献

1. 陈正仁等：中华医学杂志，中文版，36：563，1950。
2. 卫生部生物制品研究所：冻干卡介苗的制造，1959。
3. 卫生部生物制品研究所：冻干卡介苗的使用，1959。
4. Requirements for dried BCG vaccine, WHO tech. Rep. Ser, 1966, 329, 25。

用世界卫生组织方法与常规方法对比观察41批皮内卡介苗的活菌数

刘纯谦 刘长明 曹秀和 郝欣欣

卡介苗是经钢珠研磨加稀释苏通制成的活菌苗,含有一定数量的有活力的细菌,过去大家称这些有活力细菌的数目为活菌数。自1967年世界卫生组织发表了卡介苗试管内试验技术指南①②以后,多数人改称它为“培养颗粒”。本文沿用我国习惯,仍用“活菌数”一词。菌苗依靠这些活的细菌使机体产生免疫力。因此,活菌数的多少是衡量卡介苗质量指标之一,正确地真实地反映制品的活菌数是非常重要的。

影响活菌数的因素很多,如:菌株、菌龄③、研磨时间及速度④、活菌计数的方法和计数用的培养基④等等。尽管涉及的因素很多,所得的活菌数差异很大,但只要每个实验室固定用一个方法,仍然可以得到有规律的结果,且具有统计学的重复性。

本文仅就学习世界卫生组织1977年卡介苗试管内试验技术指南上的活菌计数方法⑤(以下简称世界卫生组织方法)以后,利用世界卫生组织方法与我所常规法在1980~1981年对41批皮内卡介苗进行了活菌数的对比。在这次对比中,我们只采用了世界卫生组织方法中的稀释,接种及统计三个步骤,所得结果表明两个方法在统计学上无显著的差异。接着1982年选择了世界卫生组织方法作为我们的操作方法,并且比前一年更有系统地从对鸡蛋培养基及菌苗的随机抽样、密码编号开始到最后脱密码为止的全部程序。现将所得结果总结如下:

一、材料和方法:

1. 材料:皮内卡介苗、骆氏鸡蛋培养基,稀释苏通。
2. 方法:常规法:为我组常规使用的方法,以0.75 mg/ml的菌液为第一管(10^{-1}),连续10倍稀释至第6管和第7管(10^{-6} 、 10^{-7})。取 10^{-6} 、 10^{-7} 两个稀释度分别接种骆氏鸡蛋培养基5支,每支0.1 ml。

世界卫生组织法:按世界卫生组织规程上规定的活菌计数方法,1980~1981年用0.75 mg/ml,1982年用1 mg/ml的菌苗。开始连续作两个100倍稀释,即 10^{-2} 、 10^{-4} ,随后以 10^{-4} 作倍倍稀释,即 $2\times$ 、 $4\times$ 、 $8\times$ 、 $16\times$ 、 $32\times$,根据经验取三个稀释度(4:2:1),前两个稀释度各接种5支鸡蛋斜面,后一稀释度接种10支鸡蛋斜面,每支接种0.1 ml。

世界卫生组织法中的一个主要特点是随机抽样及密码编号,第一步:将鸡蛋斜面按自然顺序进行编号,每管一号;第二步:若有数批菌苗需同时测定,则随机将数批菌苗标以密码;第三步:将全部待测菌苗的不同稀释度统一随机分配已编号的鸡蛋斜面;第四步:按世界卫生组织规定的稀释方法进行稀释及接种;第五步:将接种完的鸡蛋斜面又恢复接种前的顺序号码,每20支一筐,放37℃培养;第六步:培养四周后取出斜面计数,填入顺序编号的表格内;第七步:将鸡蛋斜面脱密码,填入每批菌苗的活菌计数表格内;第八步:按规定的公式计算。在计算时,每个实验室按自己的情况规定每支鸡蛋

斜面上的适合菌落数。

3. 计算:常规法: 根据两个稀释度接种鸡蛋斜面后, 经37℃四周培养后所生长的菌落数, 取其平均值, 再乘以稀释倍数, 即为该批制品所含的活菌数。

世界卫生组织法: 根据世界卫生组织规程上规定的活菌数计算公式计算。其公式如下:

(1) $2W \geq \bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \rightarrow \frac{d_1}{V} \times \frac{1}{2}$

(2) $\bar{x}_1 + \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \geq 2W \geq \bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \rightarrow \frac{d_2}{V}$

(3) $\bar{x}_2 + 2\bar{x}_3 \geq 2W \geq 2W_3 \rightarrow \frac{d_2}{V} \cdot \frac{W \cdot \bar{x}_2}{2W + \bar{x}_2 - 2\bar{x}_3}$

(4) $2\bar{x}_3 \geq 2W \rightarrow \frac{d_3}{V} \cdot \bar{x}_3$

符号解释:

- W 合适菌落数/每支培养基。我们规定每支培养基接种量 (0.1ml) 为20。
 - d 稀释度。 $\bar{x}_1$ 系 d_1 的平均数。
 - $\bar{x}_2$ 系 d_2 的平均数, $\bar{x}_3$ 系 d_3 的平均数。
- 二、结果:

表 1 两种方法对41批卡介苗活菌数测定的比较 (1980~1981)

	世界卫生组织法	常 规 法
活菌数范围	13.12-66.56×10 ⁶	10.2-61.7×10 ⁶
平均数 ($\bar{x}$)	33.92×10 ⁶	29.22×10 ⁶
标准差 (S)	14.12	12.68
差异系数 (C.V)	41.63%	43.41%
标准误	2.21	1.98
	p > 0.05	

从表 1 看来, 用常规法所作41批菌苗的平均活菌数的范围是10.2-61.7×10⁶, 平均为29.22×10⁶, 而世界卫生组织方法的范围是13.12~66.56×10⁶, 平均为33.92×10⁶,

经统计学计算, 两个方法无差异。

表 2 两种计数方法所测活菌数的分布情况 (1980~1981)

	世界卫生组织法	常 规 法
1000万以下	0	0
1001~2000万	9	13
2001~3000万	7	19
3001~4000万	12	7
4001~5000万	8	10
5001~6000万	2	0
6001~7000万	3	1

从表 2 看来, 两种方法所得活菌数的结果, 分布频率相似, 按我国制检规程要求, 400万/0.75mg以下为不合格, 此次对比中没有因方法的不同而出现400万以下者, 另按我所行政指标规定, 1500万/0.75mg算高标准。此次对比中, 世界卫生组织法高标准占40/41=97.6%, 常规法占37/41=90.2%, 两者也相似。

另外, 我们将1980~1981年按世界卫生组织方法操作但无密码编号的41批制品与1982年完全按世界卫生组织方法即有密码编号的41批制品进行活菌计数对比, 见表 3。

表 3 有、无密码编号所测活菌数的比较

方 法	未编密码(1980~1981)	编密码(1982)
菌苗浓度	0.75mg/ml	0.75mg/ml
批数	41	41
平均活菌数	33.92×10 ⁶	31.91×10 ⁶
标准差	14.12	11.76
差异系数	41.63%	36.85%
标准误	2.21	1.84

1982年测定活菌数时是以1mg/ml为基础, 为了比较, 将结果折算成0.75mg/ml所含的活菌数。

从表 3 看来, 将菌苗和鸡蛋培养基编以密码与否, 所得结果极为相似, 统计学表明没有明显差异。

此外, 在计算公式中, 对每支鸡蛋斜面上最适菌落数的提出, 匈牙利⑥及我们实验室规定为20, 丹麦国立血清研究所规定为40,

这个数字的规定对结果的计算有无影响？我们将1980～1981年所作41批菌苗分别以40及20为最适菌落数进行计算,所得结果见表4：

表 4 不同最适菌落数对41批活菌数的影响

最适菌落数(个)	40	20
平均活菌数	31.19×10^6	33.92×10^6
标准差	12.58	14.12
差异系数	40.33%	41.63%
标准误	1.96	2.21

从表4看来，不论最适菌落数定为20还是40，计算所得结果无显著差异。

三、讨 论

一个实验室生产的活菌苗必须具有相当稳定的活菌数，但因环境条件的影响，活菌数也会波动。如我所卡介苗组成立三十余年来，五十年代菌苗活菌数，每0.75 mg含有 $5.4 \sim 8.4 \times 10^6$,而61年以后的20年，其中14年的活菌数在 $10 \sim 20 \times 10^6$,六年的活菌数在 $20.1 \sim 30.0 \times 10^6$,这可能与菌种培养基成分的改变有关。关于活菌数是活菌苗质量优劣的一个指标，但以多少为适合尚有待研究。

在活菌计数操作方法方面，为了考核我们常规法的准确性，在五十年代曾对九批冻干卡介苗采用苏联沉淀比浊法和我所常规法进行了对比，对比结果，常规法每毫克菌苗含有活菌数 3.8×10^6 ，而沉淀比浊法含有 3.1×10^6 ，两者无显著差异。当时也用苏联格氏鸡蛋培养基与我所骆氏鸡蛋培养基对比，对比结果骆氏鸡培为 3.8×10^6 ，而格氏培养基为 3.5×10^6 ，两者也无显著差异。自那次以后，我们仍采用我所常规法。

这次系第二次用不同方法对同批卡介苗进行了较长期的活菌数对比。所得结果证明不论世界卫生组织方法或常规法在活菌数上

无显著差异。

至于我所常规法已经执行了三十余年，在前后几十年中，菌苗的活菌数由几批人经手操作，所得活菌数的绝对数不同，这主要是菌株特性的改变，而在统计学处理时，所得标准差五十年代为17，差异系数为46%，而八十年代，标准差为±12，差异系数为43%，与挪威卡介苗实验室曾对90批生产菌苗活菌数的统计结果，标准差为50.5，差异系数为54.8%相比⑦，我所常规法还是比较稳定的，不因人员的更换而产生更大的波动，这种常规法还是可行的。目前鉴于国际交流，还有要申请世界卫生组织生物制品合格证书，一般都提倡按世界卫生组织生物制品制检规程操作，因此我们进行了学习，并且初步体会如下，常规法具有方法简单，节省材料、计算容易的优点。世界卫生组织方法操作繁复，用于科研工作或负责检定等方面，确有其科学性。

四、小 结

世界卫生组织法及常规法对比测定41批皮内卡介苗所得结果，常规法每0.75 mg含活菌数 29.22×10^6 ，世界卫生组织法含 33.92×10^6 ，两者无显著差异。

参 考 文 献

- 1. WHO/TB/Technical Guide/67.6
- 2. WHO Technical Report Series 329:25,1966.
- 3. 卫生部生物制品研究所卡介苗组,冻干卡介苗的制造,全国卡介苗经验交流会资料, 1965.
- 4. 刘纯谦,在丹麦国立血清研究所卡介苗室工作总结. 1981.
- 5. WHO/TB/Technical Guide/77.9
- 6. Lugosi L. et al:International Symposium on BCG, 17: 233,1970
- 7. Krohn EF et al:Laboratory Control of BCG Vaccine. p47, 1952.