

用不同稀釋液干燥保存恙虫病 立克次氏体的試驗

邢祖培 黃珍華

(武昌洪山衛生防疫檢驗所)

恙虫病立克次氏体,易于死亡,不易保存^[1,2,3],是大家都熟知的。Anderson 氏^[2]报导用脫脂牛乳稀釋普氏立克次氏体可維持其生活力 24 小时左右。Bovarnick 氏研究鹽类、氨基酸、糖类、蛋白等,对立克次氏体之穩定性,發現蔗糖磷酸鹽羧氨基酸緩冲液(蔗糖 PG 液)对斑疹伤寒、恙虫病立克次氏体等最穩定。Jackson^[4]及 Smadel 二氏^[4]用此种蔗糖 PG 液及脫脂牛乳作稀釋液,以冰冻干燥方法保存恙虫病立克次氏体,獲得良好結果。以蔗糖 PG 做稀釋液干燥者保存于 5°C 下 52 周尚有毒力(对小白鼠的 LD₅₀ 由 10^{-8.4}降至 10^{-5.8});用脫脂牛乳干燥者,保存于 -20°C 之下可維持其毒力达 24 周(对小白鼠 LD₅₀ 由 10^{-8.4}降至 10^{-2.0})。作者等^[5]証明在感染鷄胚內之恙虫病立克次氏体,于 -20°C 保存六周,尚可使小白鼠致死。本文报告选用蔗糖 PG 液等五种溶液稀釋恙虫病立克次氏体鷄胚及小白鼠的感染材料,作冰冻干燥保存的試驗。

試驗及結果

1. 菌种: 以 1952 年恙虫病立克次氏体在鷄胚卵黃囊傳代至 55 代,对体重 12 克之小白鼠腹腔 0.3 毫升接种,其 LD₅₀ 为 10^{-7.5}。接种 7 天孵育之鷄胚及体重 12—14 克小白鼠腹腔各一批,鷄胚在接种后放 36°C 孵育 7 天,小白鼠在 7—9 天頻死前分別進行解剖,取卵黃囊及脾臟塗片,用姬母賽氏染色鏡檢。如立克次氏体陽性而無雜菌时,秤卵黃囊及脾臟的重量,做为試驗用的菌株。

2. 稀釋液:

(1) 羧氨基酸液 (glutamic acid)^[4],

羧氨基酸 72 毫克

蒸餾水 100 毫升

混合溶解后用 NaOH 矯正 pH 7.2, 濾紙過濾分裝,經 15 磅 15 分鐘滅菌。

(2) 蔗糖 PG 緩冲液^[4],

蔗糖 18.6375 克

麸氨基酸 0.18 克

KH_2PO_4 0.1287 克

Na_2HPO_4 0.3053 克

混合后加蒸馏水 250 毫升溶解后用 KOH 校正 pH 为 7.2, 滤纸过滤分装, 经 8 磅 30 分钟灭菌。

(3) 50% 脱脂牛乳: 脱脂牛乳加等量生理盐水分装, 经 8 磅 20 分钟灭菌。

(4) 兔血清: 取健康家兔血清 56°C 30 分钟滅活。

(5) 鸡胎尿囊液: 采取 39°C 孵育 12 天之鸡胚尿囊液。

3. 分装冷冻: 将卵黄囊与脾臟研碎, 分別用五种稀釋液各稀釋成 20% 的懸液, 按每管 1 毫升分装于直径 1.5 厘米之滅菌安瓶中, 使材料呈斜面狀放入干燥瓶, 立即冰冻于 -45°C 之小冰箱中一夜。

4. 真空干燥: 开动抽气机达真空度至 50—100 微米水銀柱之間。將冻好之菌株干燥瓶接上, 連續抽气。我們实验室的抽气裝置, 約抽兩小时后真空度可达 30 微米, 6 小时后在 15—20 微米之間, 持續 30 小时, 才能完全干燥。为了使最后水份蒸發, 我們將菌株瓶放入 37°C 水浴中再抽气 3 小时, 停止馬达, 通过硫酸瓶放入空气, 將干好之安瓶接在抽气机上, 火焰封口(此时真空度在 800—1000 微米之間)。

5. 立克次氏体的生活力試驗法: 將干燥好的菌株放入 -20°C 冰箱中保存, 每 15 天取出一支用 pH 7.4 肉水 1 毫升稀釋。經腹腔接种 12—14 克体重的小白鼠兩只, 死亡后立即解剖鏡檢, 查出立克次氏体者为陽性。如小白鼠在 21 天仍不死則仍行解剖用脾臟傳代, 至第三代如仍不死, 即为菌株已失掉活动力。保存至 180 天后則每隔 30 天試驗一次, 方法同前。此外并將蔗糖 PG 緩冲液的卵黄囊干燥种在 100 天与 300 天时滴定一次 LD_{50} 。

我們采用了上述五种稀釋液, 以真空冰冻干燥法保存恙虫病立克次氏体, 試驗結果总结于表 1。

从表 1 中可以看出用蔗糖 PG 液稀釋之感染卵黄囊及小白鼠脾臟懸液, 經冰冻干燥后保存在 -20°C 已观察 360 天尙可使小白鼠死亡。是否可以保存更久, 尙在連續观察中。而用麸氨基酸, 50% 脱脂牛乳或鸡胚尿囊液稀釋者, 經冰冻干燥后, 僅能保存感染卵黄囊对小白鼠的致死力 30 天或 15 天, 而用同样方法所保存的感染小白鼠脾臟內之立克次氏体 15 天内即已失去其生活力。以正常家兔血清作稀釋液經干燥保存之感染卵黄囊材料在 45 天内, 感染小白鼠脾臟在 30 天内, 可使小白鼠發病致死。

表 1 恙虫病立克次氏体用不同稀釋液干燥后的穩定性

稀 釋 液	立克次氏体來源	卵 黃 囊 膜	小 白 鼠 脾 臟
	立克次氏体活存天数		
麸氨酸液		30 天	—
50%的牛乳		15 天	—
尿囊液		15 天	—
正常兔血清		45 天	30 天
蔗糖 PG 緩冲液		360 天	360 天

注：表中天数表示到該日期尚能感染小白鼠并導致死亡，“—”表示在干燥保存 15 天后，已無感染力。

干燥菌株对小白鼠之致死率：感染卵黃囊材料，在被干燥前一代，对小白鼠的 LD_{50} 为 10—7.5，用蔗糖 PG 液稀釋干燥保存（ -20°C ）100 天时的 LD_{50} 为 10—5.5，300 天时的 LD_{50} 为 10—6。

总 結

1. 用蔗糖 PG 緩冲液、麸氨酸液、50% 牛乳、健康家兔血清及健康雞胚尿囊液五种稀釋液分別稀釋恙虫病立克次氏体感染材料，做冰冻真空干燥保存，以蔗糖 PG 緩冲液結果最好，在 -20°C ，保存 360 天，能使小白鼠感染至死，此点与文献中所得結果大致相符。

2. 被干燥之感染卵黃囊材料，保存其感染力之日期远較同样条件下干燥之小白鼠脾臟材料为長。作者等^[5]1954 年試驗报告中，在 -20°C 保存雞胚卵黃囊感染材料立克次氏体可至 6 周对小白鼠尚有致死能力，而小白鼠脾臟僅保存至 3 周，卵黃囊組織可能有保护立克次氏体穩定性的作用，此点尚需繼續研究。

参 考 文 献

- [1] Rivers, M., Viral and Rickettsial infections of man, p. 520-521, 1948.
- [2] Anderson, C. R. *J. Bact.* 47: 519-522, 1944.
- [3] Bovarnick, M. R. et al, *J. Bact.* 59: 509-522, 1950.
- [4] Jackson, E. B. and Smadel, J. E. *J. Hyg.* 53: 326-333, 1951.
- [5] 邢祖培、黃珍華、周培安：微生物学报 2(2): 50—60 頁，1954.

PRESERVATION OF *R. TSUTSUGAMUSHI* BY LYOPHILIZATION WITH DIFFERENT DILUENTS

HSING TSU-PEI AND HUANG CHEN-HUA

The present report is concerned with the infectivity of lyophilized *R. tsutsugamushi* in different suspending menstrua. The results obtained by the authors indicate that the sucrose-PG buffer medium is definitely superior to those others employed, and the organisms so preserved are still virulent for white mice after a storage at 20°C for a year. This agrees with the results obtained by Jackson and Smadel employing the same procedure. When the *R. tsutsugamushi* contained in the sacs of fertilized eggs were dried by lyophilization, they appeared definitely more stable than those contained in the mouse spleens and dried by the same procedures. The reasons for this difference are briefly discussed in this paper.