

# 恙虫病立克次体毒力变异的研究

中山医学院微生物学教研组

(广州)

自沟鼠分离的“49”株恙虫病立克次体,经 30℃ 培养,于兔睾丸单层细胞中传代及加入氯化钾等综合处理,获得弱毒变异株。经多次测定对小白鼠的  $LD_{50} \leq 10^{-1.00}$ 。但转种于鸡胚或小白鼠后毒力回升。用谷酰胺、痛敌处理,或以同一方法处理其他恙虫病立克次体株,均未获得对小白鼠不致病的弱毒变异株。

制备预防恙虫病的活疫苗,必须有安全和有效的减毒株,减毒株的来源,可通过两种途径获得。即从带立克次体的人、动物或恙虫分离天然弱毒株;另一途径是在实验室条件下,通过各种方法进行减毒处理,以获得弱毒变异株。我们选择了后一种方法。本文报道以有毒力的恙虫病立克次体,通过家兔睾丸单层成纤维细胞低温培养,并用氯化钾处理,初步获得弱毒变异株的实验结果。

## 材料及方法

### (一) 菌株

1. “49”株: 1956年3月自广东沟鼠 (*Rattus norvegicus*) 分离获得,在小白鼠中传代保存。对小白鼠的  $LD_{50} \geq 10^{-8.00}$ 。

2. 恙株: 1958年5月8日自广东捕捉的太平洋背展恙虫 [*Gahrltiepia (Walchia) pacifica*] 分离获得,也于小白鼠中传代保存。

### (二) 减毒方法

以在小白鼠传代保存的“49”株或恙株恙虫病立克次体感染兔睾丸单层细胞<sup>[1]</sup>,并用下述几种方法进行减毒处理。

1. 于兔睾丸细胞培养中反复传代,并置于 28℃ 及 30℃ 低温培养,这种方法一方面作为减毒方法之一,同时又作为在培养液中加入其他药物处理的对照组。

2. 感染后的兔睾丸单层细胞培养液中分别加入下述药物:

① 加入氯化钾,最后浓度为  $10^{-3}$  及  $10^{-4}$  克分子浓度。

② 加入痛敌 ( $\delta$ -Azaguanine) (武汉红旗制药厂),最后浓度为每毫升营养液含 250 及 500 微克。

③ 加入 L-谷酰胺,最后浓度为  $25 \mu M$ 。

### (三) 鸡胚接种方法

6—8 日鸡胚,接种于卵黄囊,传代时取卵黄囊膜于冰浴中用电动组织磨碎器磨碎后,以谷酰胺蔗糖缓冲液作 1:10—1:30 稀释。

### (四) 毒力测定

测定毒力用的组织培养细胞和营养液都是定量的,细胞接种量为 50 万/0.7 毫升/管。长成片后感染恙虫病立克次体,感染量 0.2 毫升,吸附一小时后,加入营养液 0.5 毫升。在 28℃ 或 30℃ 培养 2 周,选取立克次体生长丰富、细胞内外满布立克次体的管,刮下细胞片,连同营养液一起用组织磨碎器或电动组织磨碎器在冰浴中研碎后作为原液,进行 10 倍稀释,接种于 12—16 克小白鼠,每只腹腔注射 0.2 毫升,观察 28 日,计算半数致死量 ( $LD_{50}$ )。

## 结 果

### (一) 谷酰胺对恙虫病立克次体毒力的影响

结果见图 1。“49”株在兔睾丸细胞中培养,并分别置于 28℃ 和 30℃ 温度条件

本文于 1977 年 11 月 23 日收到。

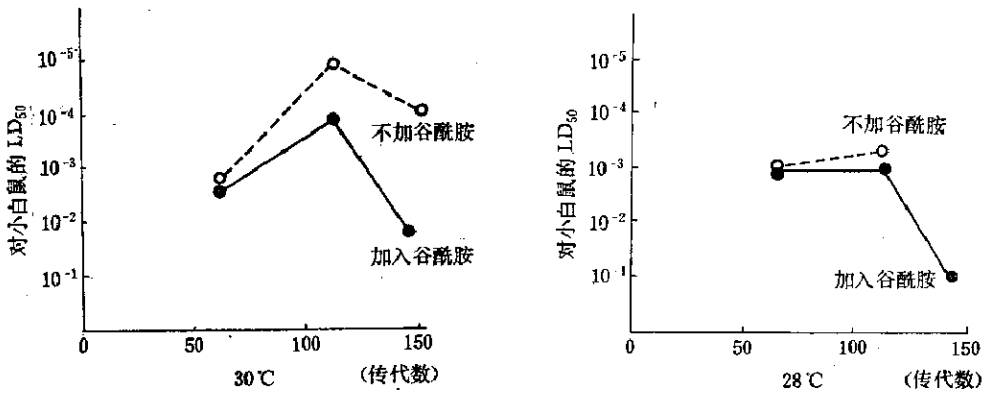


图1 谷酰胺对“49”株恙虫病立克次体毒性的影响

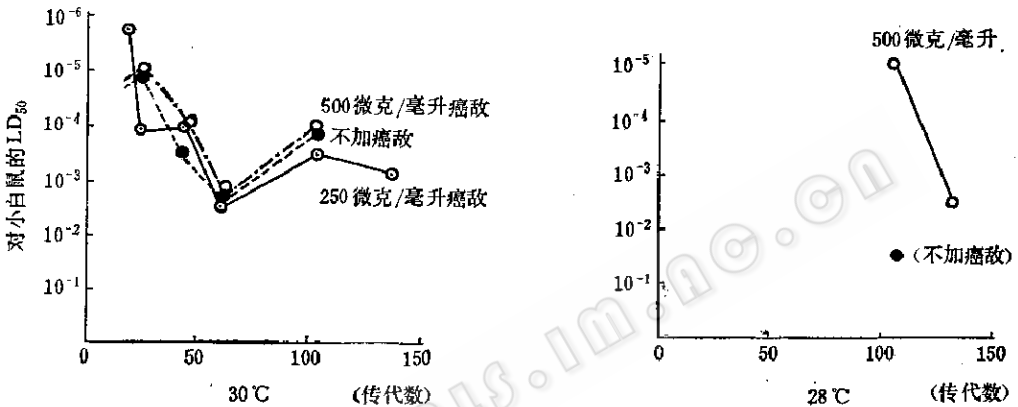


图2 癌敌对“49”株恙虫病立克次体毒性的影响

下,如在营养液中加入谷酰胺,可见“49”株对小白鼠的毒力有下降趋势,不加入谷酰胺的组,则立克次体的毒力没有下降。

### (二) 癌敌对“49”株恙虫病立克次体毒力的影响

结果见图2,不加入癌敌组的结果与不加入谷酰胺组的结果基本相似,经过103次传代,毒力下降不明显。若于传代时,营养液中加入癌敌,也无助于明显降低恙虫病立克次体的毒力。

### (三) 氰化钾对恙虫病立克次体毒力的影响

在本组实验中,除了“49”株外,还同时用恙株进行比较,结果见图3,4。本组实验与前两组有些不同,“49”株虽然在相同的条件下传代(指不加入氰化钾组),但对小白鼠的毒力呈进行性下降,特别是培养

于30°C并加入氰化钾的条件下,毒力下降更明显,传至112代时,稀释度为10<sup>-1.00</sup>已不致动物死亡。从112至128代间共进行6次毒力测定;对小白鼠的半数致死量除一次为10<sup>-1.35</sup>外,其余均在10<sup>-1.00</sup>以下,以后并在连续4年的实验观察中,毒力始终稳定于对小白鼠的LD<sub>50</sub><10<sup>-1.00</sup>。从第143代起部分“49”株于传代时营养液中不加入氰化钾,这样再经28次传代,毒力也没有回升。

在28°C培养的“49”株,加入氰化钾后,毒力降低没有30°C明显。

恙株的培养条件与“49”株同,但经过约150次传代,仍保留相当毒力。

### (四) 改变宿主系统后,“49”弱毒株的复毒试验

1. 以适应于兔辜丸单层细胞的“49”弱

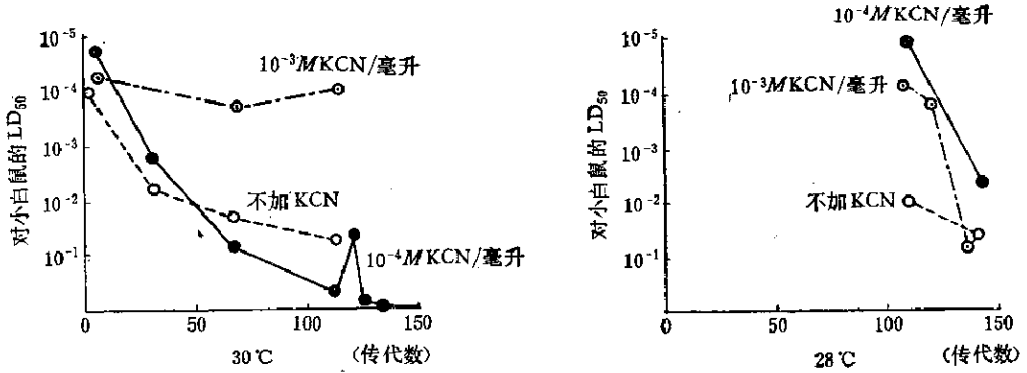


图3 氰化钾对“49”株恙虫病立克次体毒性的影响

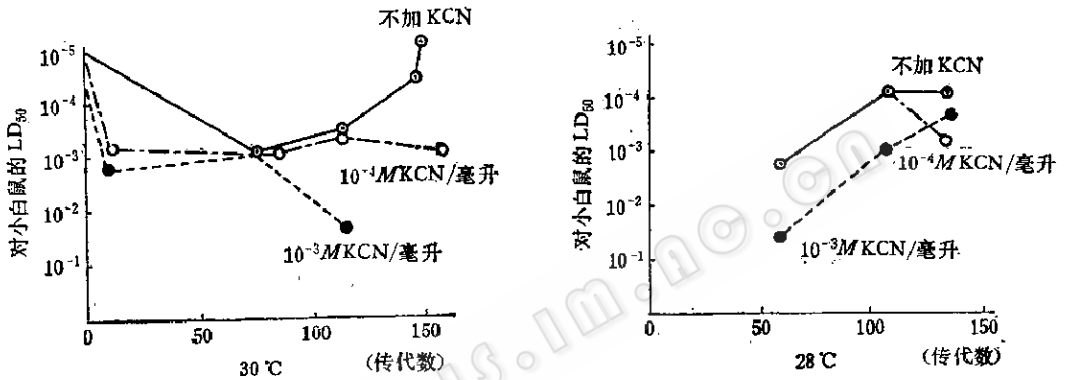


图4 氰化钾对恙株恙虫病立克次体毒性的影响

毒变异株恙虫病立克次体，转种于鸡胚卵黄囊后，很易适应，一般在第一代已找到立克次体。“49”株在鸡胚卵黄囊中传代后，对小白鼠的毒力变化见表1。

表1 在鸡胚卵黄囊中传代后的“49”株对小白鼠的毒力改变

菌株	在鸡胚中传代次数*	测定毒力日期	LD <sub>50</sub>
“49”	3	1971.1.21	≤10 <sup>-1.00</sup>
	5	1971.1.31	≤10 <sup>-1.00</sup>
	7	1971.10.18	≤10 <sup>-1.83</sup>
	11	1972.2.1	10 <sup>-1.63</sup>
	18	1971.9.20	≥10 <sup>-5.00</sup>
	18	1971.9.28	≥10 <sup>-5.00</sup>

\* 表中传代次数是各批实验抽样检查的结果，并非同一批实验连续不同传代次数的比较。

从表1中可见“49”株于鸡胚中传代后，对小白鼠的毒力很快回升，传至第7代已对小白鼠致病，18代时毒力已回复至较

高水平。

2. 以适应于兔睾丸单层细胞的弱毒变异株143代，用原液0.7毫升注射于小白鼠腹腔，第一代不发病，宣传一代；第二代小白鼠发病，取腹腔液涂片，立克次体阳性，取鼠脾进行滴定，LD<sub>50</sub> = 10<sup>-5.00</sup>。可见弱毒“49”株在小白鼠中传代，迅速恢复毒力。

3. 以在鸡胚卵黄囊中传代毒力已经回升的“49”弱毒株，再在兔睾丸细胞中传代后的毒力改变情况：以鸡胚18代毒力LD<sub>50</sub> ≥10<sup>-5.00</sup>的“49”弱毒株转种于兔睾丸单层细胞，经11次传代后，不管营养液是否加入氰化钾，毒力又下降至10<sup>-1.50</sup>左右。

## 讨 论

恙虫病立克次体的致病性与其细胞内

寄生性及毒性物质<sup>[2]</sup>有关。我们选择影响核酸(癌敌)<sup>[3-5]</sup>、蛋白合成(氯霉素)和影响细胞呼吸(氰化钾)<sup>[6]</sup>等类药物,加速立克次体毒力的变异。在氯霉素的实验中,我们用含氯霉素 1.00 微克/毫升营养液,可能由于浓度过大,经传代一段时间后,立克次体肿胀变形,因此没有继续进行。

我们在营养液中加入氰化钾,获得了一株对人毒力减弱的“49”弱毒变异株,但毒力的下降是否由于氰化钾的作用? 氰化钾在其中起什么作用和如何起作用? 则仍不清楚。有学者证明<sup>[7-9]</sup>立克次体的毒性与其呼吸活性,氧化谷酰胺盐的能力平行,氰化钾是否通过抑制立克次体的呼吸促使其毒力变异? 尚待进一步研究。用减毒后的“49”株接种鸡胚,经几次传代后,毒力逐

渐恢复,若转种于小白鼠,则毒力恢复更快,复毒的原因,也有待进一步研究。

### 参 考 文 献

- [1] 冯慧敏等: 微生物学报, 9: 280, 1963.
- [2] Smadel, J. E., et al.: *PSEBM.*, 62: 138, 1946.
- [3] Smith, J. D. & Matthews, R. E. F.: *Biochem. J.*, 66: 323, 1957.
- [4] Mandel, H. George: *J. Biol. Chem.*, 225: 137, 1959.
- [5] Chantrenne, H. & Devreaxs.: *Nature*, 21: 1737, 1958.
- [6] Donald Greiff, et al.: *J. Exp. Med.*, 82: 193, 1945.
- [7] Charles L. Wissman, et al.: *J. Imm.*, 67: 123, 1951.
- [8] John C. Snyder, et al.: *J. Bact.*, 67: 724, 1954.
- [9] Marianna, R. Bovarnick, et al.: *J. Bact.*, 59: 509, 1950.

## STUDIES ON THE VIRULENCE-VARIATION OF *RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI*

Department of Microbiology, Chungshan Medical College  
(Guangzhou)

The strain of “49” *R. tsutsugamushi*, after isolated from *Rat. novagicus*, was cultured and passed in rabbit testis fibroblast monolayer tissue culture for more than one hundred generations at 30°C when  $10^{-4}M$  KCN in the final concentration was added to the medium. Finally an attenuated strain was obtained. The LD<sub>50</sub> for mice of this strain

by repeated tests was lower than  $10^{-1.00}$  log. If the host was changed to chicken yolk sac or mice, the virulence of attenuated “49” strain would rapidly restored. The use of other chemicals such as glutamine or 8-azaguanine instead of KCN, or of other strain instead of “49” strain was not successful in attenuation of the *rickettsia*.