

## 冻干对恙虫病立克次体抗原性的影响

中山医学院微生物学教研组

(广州)

以含恙虫病立克次体的鸡胚卵黄囊膜材料冻干后,立克次体对小白鼠的  $ID_{50}$  平均下降 1.93 个对数,但若以鸡胚细胞培养材料进行冻干,则冻干后恙虫病立克次体的抗原性明显遭到破坏,对小白鼠的  $ID_{50}$  平均下降 2.73 个对数。冻干后的卵黄囊膜材料经 4℃ 冰箱保存六个月至一年,对小白鼠的  $ID_{50}$ , 一般再下降一个对数左右。

恙虫病立克次体比较脆弱,很易受各种理化因素的影响而失去活性,因此保存比较困难。为了适应制备疫苗的需要,我们比较了冻干前后恙虫病立克次体的抗原性变动情况,并比较了各种保护剂的效果。

### 材料及方法

#### (一) 立克次体株来源

1. 恙虫病立克次体“49”弱毒株<sup>[1]</sup>。
2. “41”株及“44”株: 均为福建省卫生防疫站自福建省分离,本实验室于 1969 年 12 月自北京生物制品研究所取得,原已适应于地鼠肾细胞,本实验室改用兔肾、兔睾丸细胞及鸡胚传代。

#### (二) 冻干材料

1. 鸡胚卵黄囊膜材料: 以“49”、“41”、“44”株接种鸡胚卵黄囊,收获时先将卵黄囊膜涂片,选取每油镜视野超过 50 个立克次体的卵黄囊膜为冻干材料,每个卵黄囊膜加 5 毫升保护剂稀释,于冰浴中用电动组织磨碎器研碎后作为原液,分装于安瓿中,每安瓿 0.5 毫升,除取出一部分进行小白鼠的  $ID_{50}$  及  $LD_{50}$  滴定外,立即置 -40℃ 低温冰箱中冰冻。

2. 感染鸡胚细胞材料: 9—11 日龄鸡胚皮肤肌肉纤维母细胞 100 万/0.7 毫升营养液/管,营养液用含 0.5% 水解乳蛋白和 0.5% 小牛血清的 Hank's 液,以碳酸氢钠调节至 pH 7.2,细胞长成片后,感染恙虫病立克次体,营养液改用: (1)

10—20% 鸡胚浸液、0.5% 水解乳蛋白,以 Hank's 液补足至 100 毫升;或(2) 0.5% 水解乳蛋白、5% 小牛血清、800 微克% 半胱氨酸,以 Hank's 液补足至 100 毫升。30℃ 培养 2 周,涂片选取立克次体富集的(即细胞内外都满布立克次体),弃去营养液,用谷酰胺蔗糖缓冲液洗一次后,换以保护剂 0.7 毫升/管,用毛细吸管把细胞片刮下,在冰浴中用电动组织磨碎器磨碎后作为原液,分装安瓿(0.5 毫升/安瓿),取出一部分进行  $LD_{50}$  及  $ID_{50}$  滴定,其余立即置 -40℃ 中冰冻。

#### (三) 保护剂

1. 谷酰胺蔗糖缓冲液<sup>[2]</sup> (以下简称谷蔗)。
2. 20% 鸡胚浸液谷蔗。
3. 0.6—1.2% 明胶谷蔗。
4. 20% 红细胞水解液谷蔗(红细胞水解液是北京生物制品所产品)。
5. 3:7 卵黄谷蔗: 3 份 9—11 日龄的正常鸡胚卵黄液加 3 份谷蔗。

#### (四) 冻干前后小白鼠的 $LD_{50}$ 及 $ID_{50}$ 滴定

冻干前直接以原材料用肉汤培养基稀释为  $10^{-1}$ — $10^{-5}$ , 注射于 14—16 克小白鼠,每个稀释度注射小白鼠 5 只,每只腹腔注射 0.2 毫升,观察 28 日,计算半数致死量,不死的动物腋窝放血,分离血清,测定补体结合抗体,计算半数感染量。冻干后每安瓿加 0.5 毫升肉汤培养基稀释,作为原液,如上述进行  $LD_{50}$  及  $ID_{50}$  滴定。

本文于 1977 年 11 月 23 日收到。

**(五) 冻干条件**

冻干前含立克次体的安瓿先置 -40℃ 中冰冻 1—3 天, 然后进行真空干燥, 干燥时间 15 小时左右, 冻干过程中不加温, 干后抽样检查, 残余水份 <1%。

**结 果**

**(一) 鸡胚卵黄囊膜材料冻干前后立克次体毒力及抗原性的比较**

共进行 9 批 16 份标本测定, 结果见表 1 及图 1。

由于大部分试验使用的是弱毒株 49, 41 号及 44 号两株的毒力也较弱, 冻干前对小白鼠的 LD<sub>50</sub> 已达 ≤10<sup>-1.00</sup> 或稍低, 故未能比较冻干后 LD<sub>50</sub> 的下降的程度。冻干前后对小白鼠的 ID<sub>50</sub> 平均下降不超过 2 个对数 (1.93)。

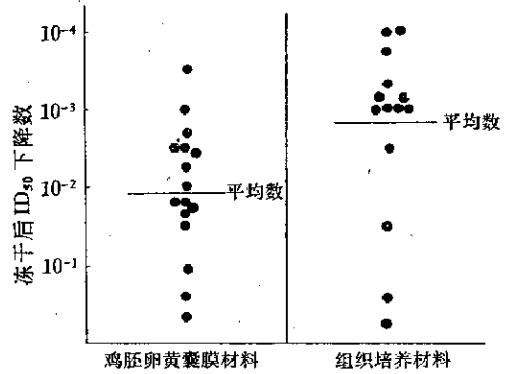


图 1 冻干对恙虫病立克次体抗原性的影响  
注: 每一点代表一批实验的结果

**(二) 同一冻干条件不同保护剂对立克次体抗原性的比较**

共进行 4 批试验, 结果见表 2。

**(三) 冻干对感染鸡胚细胞中的恙虫病立克次体抗原性的影响**

共测定 11 批 14 份标本, 结果见表 3 及

表 1 鸡胚卵黄囊膜材料冻干前后恙虫病立克次体毒力及抗原性的比较

实验批号	立克次体株号	LD <sub>50</sub> (lg)		ID <sub>50</sub> (lg)		冻干前后 ID <sub>50</sub> 对比 (lg)
		冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	
7	49	≤1.00	≤1.00	≥4.00	≤1.00	≥3.00
10	49	≤1.00	≤1.00	4.55	2.75	1.80
	49	≤1.00	≤1.00	4.00	2.50	1.50
15	41	2.69	≤1.00	4.00	1.29	2.71
18	49	≤1.00	≤1.00	4.75	2.50	2.25
	49	≤1.00	≤1.00	4.70	3.00	1.70
	49	≤1.00	≤1.00	4.70	2.18	2.52
	49	≤1.00	≤1.00	4.00	2.00	2.00
	49	≤1.00	≤1.00	2.22	2.50	
	49	≤1.00	≤1.00	4.17	1.75	2.42
23	49	≤1.00	≤1.00	5.00	3.23	1.77
33	44	1.22	≤1.00	4.60	≥4.00	≤0.60
43	49	≤1.00	≤1.00	4.64	3.00	1.64
44	49	≤1.00	≤1.00	4.00	1.50	2.50
	49	≤1.00	≤1.00	3.75	2.78	0.97
46	49	≤1.00	≤1.00	≥5.00	1.50	≥3.50

表 2 保护剂对冻干鸡胚卵黄囊膜中恙虫病立克次体抗原性的影响

实验批号	立克次体株	保护剂	LD <sub>50</sub> (lg)		ID <sub>50</sub> (lg)		冻干前后 ID <sub>50</sub> 对比 (lg)
			冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	
10	49	20%红细胞水解液谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.55	2.75	1.80
		谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.00	2.50	1.50
	41	20%红细胞水解液谷蔗	≤1.00	≤1.00	≥5.00	3.75	≥1.25
		谷蔗	1.82	1.44	≥5.00	2.75	≥2.25
15	41	20%红细胞水解液谷蔗	1.79	≤1.00	3.42	≤1.00	≥2.42
		谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.00	1.29	2.71
18	49	谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.75	2.50	2.25
		20%红细胞水解液谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.70	3.00	1.70
	49	谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.70	2.18	2.52
		20%鸡胚浸液谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.00	2.00	2.00
	49	谷蔗	≤1.00	≤1.00	2.22	2.50	
		0.6% 明胶谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.17	1.75	2.42
35	44	谷蔗	≤1.00	≤1.00	≥5.00	4.00	≥1.00
		1%明胶谷蔗	1.40	≤1.00	≥5.00	3.00	≥2.00

表 3 冻干对鸡胚细胞中对恙虫病立克次体的影响

实验批号	立克次体株号	保护剂	LD <sub>50</sub> (lg)		ID <sub>50</sub> (lg)		冻干前后 ID <sub>50</sub> 对比 (lg)
			冻干前	冻干后	冻干前	冻干后	
6	49	3:7卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	≥4.00	≤1.00	≥3.00
	49	3:7卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	≥4.00	≤1.00	≥3.00
8	41	3:7卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	3.50	1.00	2.50
9	41	20%红细胞水解液谷蔗	≤1.00	≤1.00	2.60	1.00	1.60
10	44	1.2%明胶谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.33	≤1.00	≥3.33
13	44	1.2%明胶谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.17	≤1.00	≥3.17
17	44	20%卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	2.57	2.00	0.57
19	41	1%明胶谷蔗	1.30	≤1.00	5.00	≤1.00	≥4.00
	44	20%卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.00	≤1.00	≥3.00
22	49	1%明胶谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.75	≤1.00	≥3.75
24	49	3:7卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	≥5.00	2.00	≥3.00
	49	1%明胶谷蔗	≤1.00	≤1.00	5.00	2.00	3.00
34	44	20%卵黄液谷蔗	≤1.00	≤1.00	4.25	≥4.00	≤6.25
38	49	1:1卵黄液谷蔗	3.31	≤1.00	≥5.00	≤1.00	≥4.00

图 1。冻干后  $ID_{50}$  平均下降 2.73 个对数, 在冻干过程中立克次体的破坏较卵黄囊膜大。

#### (四) 4℃保存对冻干后的恙虫病立克次体的影响

共进行 10 批试验, 结果见图 2。冻干后放置 4℃ 冰箱中保存, 大部分标本经 5 个月至一年,  $ID_{50}$  平均下降一个对数左右 (0.99)。

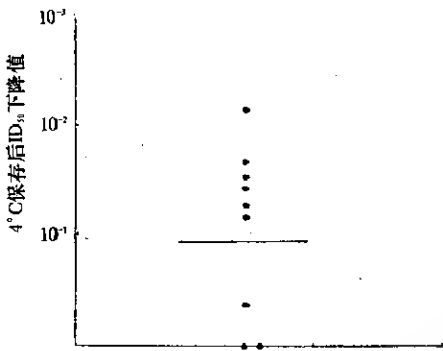


图 2 4℃保存对冻干恙虫病立克次体抗原性的影响  
每一点代表一次实验结果

## 讨 论

本实验使用的是弱毒株, 若单纯为了研究冻干对恙虫病立克次体毒性的影响是不理想的。因为冻干前对小白鼠的  $LD_{50}$  已经很低, 因此无法看到冻干后立克次体毒力下降的程度, 但由于我们进行这些实验的目的是为了解决恙虫病立克次体减毒活疫苗的保存问题, 因此选用弱毒株, 更符合实际应用时的条件。

根据上述实验结果, 在冻干过程中, 鸡

胚卵黄囊膜对保存恙虫病立克次体的抗原性较鸡胚细胞培养材料好。这是否由于制备冻干材料过程中, 卵黄囊膜常带有部分卵黄液, 对恙虫病立克次体有保护作用? 因此冻干组织培养材料时, 我们在部分实验中加入 20—30% 正常鸡胚卵黄液作为保护剂, 也似乎效果较好。冻干后  $ID_{50}$  下降  $\leq 1.00$  个对数的两份标本中, 都是加入卵黄液作为保护剂的。但有些实验, 保护剂中虽然也加入了卵黄液, 冻干后  $ID_{50}$  仍下降  $\geq 3.00$  个对数, 因此, 我们还没有解决如何更有效地保护组织培养中的恙虫病立克次体, 使在冻干过程中减少损失。

在实验 2 中, 我们比较了各种保护剂对冻干卵黄囊膜材料的保护效果, 初步印象似乎加或不加入红细胞水解液、明胶或鸡胚浸液等影响不太大。为了简化手续, 同时也考虑到制疫苗时尽量减少附加的抗原性物质, 因此, 以后的实验观察, 我们都只用谷蔗作为保护剂。冻干后置 4℃ 冰箱中保存半年至一年, 虽然一般对小白鼠的  $ID_{50}$  滴度下降一个对数左右, 但总的趋势还是下降。因此冻干作为实验室毒种的保存方法还是不够理想, 但作为生产疫苗时便于疫苗的运输和保存, 还是有一定的实用意义。

## 参 考 文 献

- [1] 中山医学院微生物学教研组: 微生物学报, 18 (3): 259—262, 1978.
- [2] Mariana, R. Bovarnick et al.: *L. Baet.*, 59: 509, 1950.

## THE INFLUENCE OF LYOPHILIZATION ON THE ANTIGENCY OF *RICKETTSIA* *TSUTSUGAMUSHI*

Department of Microbiology, Chungshan Medical College  
(Guangzhou)

The virulence of *Rickettsia tsutsugamushi* grown in yolk sac and in chick embryo tissue cultures was compared. It was found that whereas the latter showed a marked decrease in virulence for white mice, a lowering of log ID<sub>50</sub> in 2.73, the

former only lost 1.93. When the lyophilized yolk sac materials were stored in refrigerator at 4°C for six months to one year, a further drop in log ID<sub>50</sub> of 1 was observed.