

## 恙虫病立克次体弱毒株的毒力及免疫原性的研究

中山医学院微生物学教研组(广州)

中国人民解放军 59175 部队

本文比较了三株(“49”株、“105”株、浙三联)从自然界分离或经人工减毒处理的恙虫病立克次体弱毒株的毒力和免疫原性。从实验结果证明,三株恙虫病立克次体对小白鼠的毒力都较一般从病人分离的菌株弱。三株中以“49”株的毒力最低,它对小白鼠的  $LD_{50} < 10^{-4.00}$ ,  $LD_{50}$  与  $ID_{50}$  相差 2.5—5.5 个对数。用“49”株免疫后的小白鼠能耐受从广东、福建、云南等地分离的强毒株的攻击,保护指数大于三个对数。

不同的恙虫病立克次体株对动物及人体的毒力不同<sup>[1-3]</sup>,在实验室条件下,恙虫病立克次体可以发生毒力变异<sup>[4]</sup>,人体感染恙虫病立克次体后,除典型发病外,尚有隐性或亚临床感染,病死率差异也很大<sup>[6-10]</sup>,造成这些差异的原因之一可能与立克次体株的毒力不同有关。

不少学者通过交叉中和试验、交叉保护试验及交叉补体结合试验等方法,证明不同立克次体株之间抗原性存在不同程度的差别<sup>[3,10,12-9]</sup>。因此,制备恙虫病立克次体活疫苗之前,必须选择对人体致病力弱,免疫原性强而抗原性谱广的恙虫病立克次体株。本文报告三株毒力较弱的恙虫病立克次体的毒性及免疫原性比较结果。

### 材料及方法

#### (一) 立克次体毒株来源

弱毒株: (1) “105”株,自浙江省分离,由北京生物制品研究所提供。(2) 浙三联株,1957年自浙江省永嘉地区地里恙虫(*T. deliensis*)分离获得,最初对小白鼠的  $LD_{50} > 10^{-7.00}$ ,后经北京生物制品研究所及 59175 部队反复减毒处理,我们取得此株时,毒力已经减弱。(3) “49”株减毒株<sup>[11]</sup>。

强毒株: (1) B株,自广东省分离。(2) 昆株及孟株,自云南省分离。(3) 鼠株,自福建省分离。

#### (二) 毒力及半数感染量测定法

兔睾丸细胞 50 万/管/0.7 毫升营养液或兔肾细胞 60 万/管/0.7 毫升营养液,细胞生长成片后,以恙虫病立克次体感染,在 28—30℃ 培养 14 天,取立克次体生长丰富的管作涂片(指细胞内外滴布立克次体),用毛细吸管刮下,置冰浴中,用电动组织磨碎器充分研碎后作为原液,以肉汤进行连续 10 倍稀释 ( $10^{-1}$ — $10^{-6}$ ),分别接种于 15 克左右的小白鼠,每个稀释度接种小白鼠 5 只,每只腹腔注射 0.2 毫升,接种后观察 28 天,计算半数致死量( $LD_{50}$ ), (凡接种后 4 天内死亡者视为非特异性死亡,不计算在内),并将 28 天仍存活的动物,全部腋窝放血,分离血清,与“49”株卵黄囊膜乙醚提取的可溶性抗原作补体结合试验,凡血清抗体阳性者视为被恙虫病立克次体感染,计算半数感染量( $ID_{50}$ )。

#### (三) 保护试验

生长在组织培养中的立克次体材料,经  $10^{-2}$  或  $10^{-3}$  稀释后,用皮下接种法免疫小白鼠,每个稀释度接种小白鼠 100 只,每只注射 0.2 毫升,接种 32—48 天后,用强毒株恙虫病立克次体进行攻击,攻击量是以强毒株进行 10 倍连续稀释 ( $10^{-1}$

本文于 1978 年 1 月 26 日收到。

$10^{-4}$ ), 每个稀释度接种于弱毒株免疫后的小白鼠 5 只, 每只腹腔注射 0.2 毫升。同时以强毒株  $10^{-3}$ — $10^{-7}$  稀释, 按同法接种正常小白鼠作对照, 观察 28 天, 计算保护指数。

## 结 果

### (一) “105”株、浙三联和“49”株的毒力测定

结果见图 1。从图 1 可见“105”株、浙

三联、“49”株三株恙虫病立克次体的毒力都比较低, 而“105”株的毒力较其他两株高, 5 次测定结果  $LD_{50}$  自  $10^{-0.24}$ — $3.41$ ,  $LD_{50}$  与  $ID_{50}$  相差  $< 10^{-1.50}$ 。浙三联株毒力经三次测定结果,  $LD_{50}$  最高的一次只达  $10^{-1.44}$ , 但动物死亡不规律, 见表 1。三株中以“49”株毒力最低, 经 4 次重复测定,  $LD_{50}$  均在  $10^{-1.00}$  以下,  $LD_{50}$  与  $ID_{50}$  相差 2.5—5.5 个对数。

表 1 浙三联株对小白鼠的毒力测定

试验日期	立克次体株	接种途径	接种剂量 (毫升)	稀 释 度							$\lg LD_{50}$	
				$10^{-0}$	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$		
1970.1.14	浙三联	腹腔注射	0.2	—	0/5	1/4	1/4	0/5	0/5	0/5	0/5	< -1
1970.1.30	浙三联	腹腔注射	0.2	0/5	0/5	2/3	3/2	2/3	0/5	0/5	0/5	0.49
1970.2.5	浙三联	腹腔注射	0.2	2/3	1/4	1/4	1/4	3/2	2/3	0/5	0/5	1.44
1970.2.13	浙三联	腹腔注射	0.2	1/2	0/5	0/5	2/3	0/5	1/4	0/5	0/5	0.44

注: 表 1 中, 分子代表观察期间小白鼠死亡数, 分母代表小白鼠生存数。

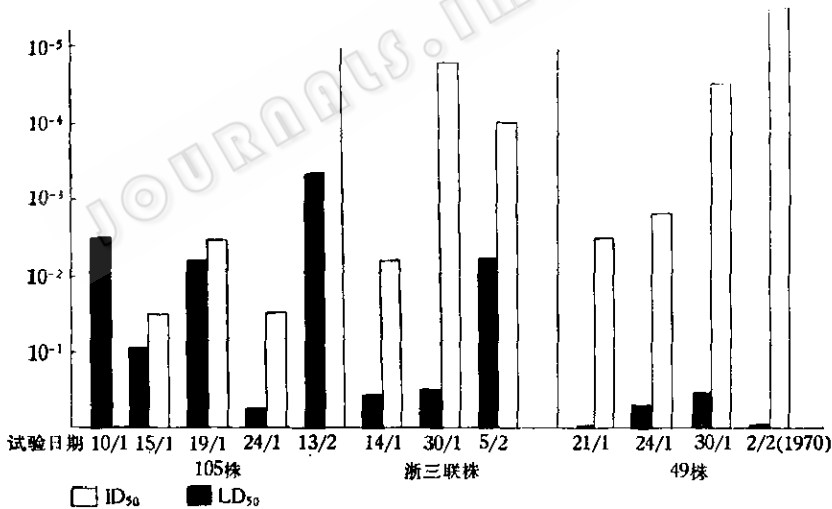


图 1 105、浙三联、49 株恙虫病立克次体对小白鼠毒力的比较

### (二) 对强毒株攻击的保护试验

以“105”株、浙三联、“49”株三株弱毒株免疫小白鼠后, 以云南、福建、广东等地分离的强毒株进行攻击, 每株都进行 4—6 批的重复试验, 但结果有一定波动, 现将每株各选一较典型的实验结果列于表 2。

从表 2 可见, “105”株除对鼠 5 株攻击的保护作用较差外, 对自广东、云南分离的 B 株、昆株、孟株的攻击, 保护作用还是较好的。浙三联及“49”株免疫后对各强毒株的攻击, 保护作用都比较好。但浙三联株在免疫过程中, 动物发病及死亡较常见,

表2 弱毒株恙虫病立克次体免疫后  
耐受强毒株攻击的保护试验

免疫株	攻击株	lgLD <sub>50</sub>		保护指数 (对数)
		免疫组	对照组	
“105”	B	2.68	6.63	3.95
	昆	≥4.00	≥7.00	
	孟 鼠	3.75* 4.00	6.75 5.88	3.00 1.88
浙三联	B	≤2.00	7.38	≥5.38
	昆	≤4.00	7.00	≥3.00
	孟 鼠	2.00 ≤2.00	4.50 6.36	2.50 ≥4.36
“49”	B	≤2.00	7.38	≥5.38
	昆	≤2.00	7.00	≥5.00
	孟 鼠	≤3.00 ≤2.00	5.38 6.36	≥2.38 ≥4.36

\* 该组用 10<sup>-3</sup> 免疫,其余均用 10<sup>-2</sup> 免疫。

故部分用以接受异株攻击的动物,是发病后恢复的动物。

## 讨 论

过去有学者<sup>[20]</sup>曾证明毒力强的恙虫病立克次体株(如 Karp 株), LD<sub>50</sub> 与 ID<sub>50</sub> 较接近,只相差 0.5 个对数,而毒力较弱的立克次体株则相差较大。本文报道的结果,以“105”株的毒力较其他两株大, LD<sub>50</sub> 与 ID<sub>50</sub> 也较接近。浙三联株的毒力虽然较“105”株低,但接种动物后,死亡不够规律,经过几批重复试验,这种情况都较其他株常见,因此很难用技术操作(如测定毒力时,原液未充分研碎,致使立克次体在稀释时分布不够均匀)或动物个体差异来解释。我们考虑是否在浙三联株中,有强毒的个体混杂在内,当立克次体浓度高时,弱毒株占优势,能干扰强毒株的致病作用;稀释后,强毒株与弱毒株的数量都减少,但强毒株只需少量已能致病,因此时弱毒株已不

足以完全干扰强毒株,故致动物死亡。是否因此表现死亡不规律?在斑疹伤寒及斑点热立克次体也有类似的观察<sup>[21-23]</sup>。若如此,则浙三联株尚不适于作活疫苗株。

根据毒力及保护试验的结果,“49”株的毒力较“105”株及浙三联株低,免疫原性也较好,对国内各地分离的部分菌株均具交叉免疫,有希望作为制备活疫苗的减毒株。

## 参 考 文 献

- [1] Smadel, J. E. et al.: *Am. J. Hyg.*, 53:317, 1951.
- [2] Koeneki, S.: *T. D. B.*, 55:143, 1958.
- [3] Bengtson, I. A.: *Pub. Health. Rep.*, 60:1483, 1945.
- [4] Le. Gac, P. et al.: *Bull. Soc. Path. Exot.*, 49:338, 1956.
- [5] 中山医学院微生物学教研组: *微生物学报*, 18(3):259, 1978年。
- [6] Smadel, J. E. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 1:87, 1952.
- [7] 穴户亮: *日本传染病学会雜誌*, 35:585, 1961.
- [8] 穴户亮: *日本传染病学会雜誌*, 36:231, 1962.
- [9] 穴户亮: *日本传染病学会雜誌*, 35:621, 1961.
- [10] Kitaoka, M. et al.: *T. D. B.*, 61:30, 1964.
- [11] Plake, F. G. et al.: *Am. J. Hyg.*, 41:243, 1945.
- [12] Smadel, J. E. et al.: *P.S.E.B.M.*, 62:138, 1946.
- [13] 梅谷照世: *冈山医学会雜誌*, 70:277, 1958.
- [14] 高桥秀: *冈山医学会雜誌*, 70:163, 1958.
- [15] 村上荣: *日本细菌学雜誌*, 12:538, 1957.
- [16] Byron, L. Bennett, et al.: *J. Imm.*, 62:453, 1949.
- [17] Rights, F. L. et al.: *J. Exp. Med.*, 87:339, 1948.
- [18] Klisberg, B. L. et al.: *J. Hyg. Epid. Microbiol. & Imm.*, 12:18, 1968.
- [19] Bell, E. J.: *P.S.E.B.M.*, 62:134, 1946.
- [20] Elizabeth, B. Jeckson & Smadel J. E.: *Am. J. Hyg.*, 53:326, 1951.
- [21] Balayeva, N. M.: *T. D. B.*, 68:440, 1970.
- [22] Winston, H. Price: *P.S.E.B.M.*, 82:180, 1953.
- [23] 于恩庶、黄育默: *中华寄生虫传染病杂志*, 2:100, 1958.
- [24] 于恩庶等: *微生物学报*, 7:189, 1959.

## THE VIRULENCE AND IMMUNOGENICITY OF ATTENUATED STRAINS OF *R. TSUTSUGAMUSHI*

Department of Microbiology, Chungshan Medical College (Guangzhou),  
The Chinese People's Liberation Army No. 59175

To obtain a poly-spectra antigenic attenuated strain is the prerequisite in the preparation of *R. tsutsugamushi* vaccine. The virulence of the attenuated strains, including "49", "Je-san-lian" and "105" were lower than those strains generally isolated from patient's blood. In comparison with two other attenuated strains, we found that the virulence of "49" strain was the lowest. In mice

experiment, the LD<sub>50</sub> was generally lower than 10<sup>-1.0</sup>. The difference of LD<sub>50</sub> and ID<sub>50</sub> was 2.5—5.5 logs. The mice, vaccinated with "49" strain, after a lapse of about one month were challenged by other virulent strains (separately isolated from Guangdong, Fujian and Yunnan Province), the immunity index was more than 3.0 logs.