

# 恙虫病立克次体毒力变异的研究

汪 民

(中国人民解放军军事医学科学院微生物学流行病学研究所, 北京)

恙虫病立克次体在自然界对实验动物(主要为小白鼠)的毒力, 不同株间有很大差异<sup>[1]</sup>, 有的腹腔感染后可不发病, 有的则高度致死(LD<sub>50</sub> 10.00 以上)。但由原来毒力很强, 经实验室处理后毒力降低的有关报道, 国内外均不多。在1959—1960年曾以大量的实验室方法处理强毒的恙虫病立克次体, 希望获得减毒株以备进一步作恙虫病活疫苗株的研究。经筛选获得浙江株一株, 由其原株毒力在小白鼠腹腔感染半数致死量 LD<sub>50</sub> >7.00, 下降至2.00左右。而同样对广州株以基本相同的方法处理, 则无明显变化。

## 材料 及 方 法

### (一) 材料

1. 恙虫病立克次体: 浙江株, 浙江省卫生实验院从浙江永嘉地里恙螨分离得到。广州株, 1955年从广州崔姓病人分离得到, 1958年从协和医学院取来时已在鸡胚连续传代100余代, 毒力在小白鼠腹腔感染 LD<sub>50</sub> 为6.00左右。

2. 鸡胚: 北京家禽厂供应, 孵育6—8天的来亨鸡胚。

3. 小白鼠: 体重16—18克, 本单位动物房供应。

### (二) 方法

1. 鸡胚传代, 参照过去已报告方法<sup>[2]</sup>。

2. 实验室减毒变异处理

(1) 反复冷冻: 感染鸡胚材料轮流放冰箱或低温冰箱(—40℃)24至72小时, 反复冷冻连续传代。次数及间隔时间见图1。

(2) 在鸡胚内快速传代: 用高浓度(2—3个感染卵黄囊加2—3毫升稀释液), 大剂量(0.5—0.8毫升)接种鸡胚, 将传代时间从常规的每10—14天缩短到每2—4天传一代。

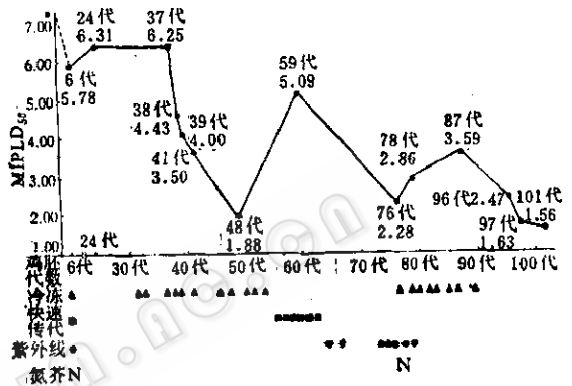


图1 浙江株恙虫病立克次体实验室处理后小白鼠毒力的变异

\* 小白鼠腹腔感染半数致死量对数(log10)的倒数

(3) 紫外线照射: 将感染卵黄囊悬液装入无菌平皿内约1—2毫米深, 在接种罩内以5瓦杀菌紫外光灯, 在距悬液40厘米处均匀照射半至5分钟。

(4) r线照射: 以装有感染卵黄囊悬液的试管, 浸入冰水, 距放射源10厘米处, 以<sup>60</sup>钴照射10,000—20,000伦琴。

(5) 氮芥: 国产注射用氧化氮芥, 用生理盐水稀释后加入感染卵黄囊悬液至最后浓度为0.2%, 作用10分钟后接种鸡胚。

3. 毒力的测定: 以感染鸡胚卵黄囊, 按重量10倍稀释(如卵黄囊膜重5克, 加45毫升稀释液为10<sup>-1</sup>), 腹腔接种小白鼠(每只0.2毫升), 观察3星期, 按Reed和Muench法计算LD<sub>50</sub><sup>[4]</sup>。感染材料立克次体的繁殖量必须达到规定的标准。

本文于1978年10月30日收到。

本文部分内容曾在1963年中国微生物学会会议上宣读<sup>[2]</sup>。

以上所用感染鸡胚卵黄囊悬液,都是经低速离心后的上清液。

## 实验结果

一、浙江株在鸡胚 37 代前为强毒(图 1),经反复冷冻、快速传代、紫外线照射等自 76 代毒力下降,至 101 代共滴定小白鼠  $LD_{50}$  6 次,其中 5 次都在 2.86 以下。自 90 代起停止减毒处理后 11 代,滴定  $LD_{50}$  3 次,基本稳定在 2.00 左右。

二、浙江株于鸡胚第 9 代时分出一株,累代均以紫外线照射。14 代时滴定  $LD_{50}$  为 4.33,17 代时为 6.14,20 代时为 6.50,与原株鸡胚 6 代时  $LD_{50}$  5.78 相比,毒力未见降低。自第 20 代起,紫外线照射与冷冻处理结合进行,至 33 代时  $LD_{50}$  为 3.65,38 代时  $LD_{50}$  为 1.27,42 代时  $LD_{50}$  为 2.70。

由此可见,浙江株单独以紫外线照射时,不能显著降低其毒力,只有结合反复冷冻后,毒力才显著降低。

三、同上以浙江株于鸡胚第 9 代时分出一株,累代以  $\gamma$  线 10,000—20,000 伦琴照射后连续传代,第 14 代时滴定  $LD_{50}$  为 4.68,18 代时为 5.26。自第 22 代起结合冷冻处理,至 36 代时  $LD_{50}$  为 4.00,42 代时  $LD_{50}$  为 3.25,这也说明二者结合处理后毒力才有下降趋势。

四、广州株反复冷冻、快速传代及紫外线照射后,由图 2 可见对其毒力变化基本无影响。

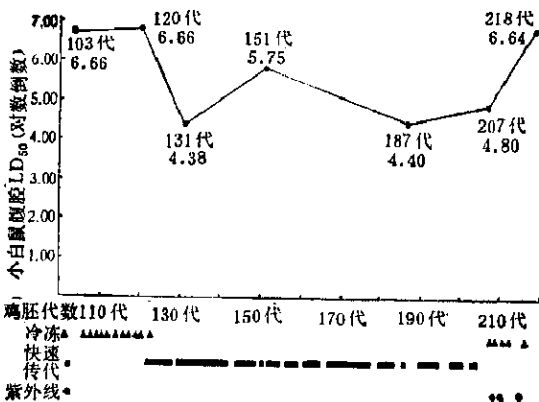


图 2 广州株冷冻、快速传代及紫外线照射

## 讨论

浙江株恙虫病立克次体自 1959—1960 年间,经单独反复冷冻处理后,从鸡胚 48 代起毒力显著降低,但 59 代以前不稳定。经快速传代、紫外线照射及氮芥处理等并结合反复冷冻,76 代以后即趋于稳定。至 1966 年夏起,继续减毒处理(冷冻及紫外线照射),毒力继续降低至  $LD_{50}$  为 1.00 左右(根据 1966 年 8 月至 12 月在卫生部生物制品研究所自鸡胚 158 代至 167 代连续滴定  $LD_{50}$  6 次结果为 0.50—1.36)。1970 年在广州中山医学院重复滴定  $LD_{50}$  连续 4 次,结果为 0.44—1.44。此后继续处理继续减毒至  $LD_{50}$  1.00 左右也是稳定的。该株毒力变异的过程,总结见图 3。根据该株原来毒力,  $LD_{50}$  高于 7.00,经实验室处理后发生变异,毒力降低达 6 个对数(100 万倍左右),看来该株似有一种特性,即对温度(特别是较低温度)比较敏感。此种变异的性质,虽不是长期稳定的,但似可遗传若干代,在此期间停止冷冻处理,立克次体可达到很高的繁殖量,并保持较低毒力。这个现象与过去国外学者所报道的情况不一致。

据我们对浙江株的观察,如图 3 所示,1958 年其感染材料连续五代放置冰箱 24 小时后传代,毒力即降低。停止冷冻处理,一律在解剖后当时即以新鲜感染材料传代,至少连续七代,降低后的毒力并不升高。以大剂量(1:3)接种小白鼠腹腔,仅有部分死亡,存活的小鼠有很强的免疫力,对异株(云南株)攻击,保护指数  $>5.33^{[3]}$ 。又如图 1 所示,鸡胚 41 代时滴定  $LD_{50}$  为 3.50,至 48 代共 8 代只经 3 次冷冻处理(41、45、47 代),48 代材料立克次体达到很高的繁殖量。在冷冻处理前,以当时解剖收获的新鲜材料滴定  $LD_{50}$  为 1.88。以上都充分说明,浙江株经冷冻处理后连续传代,表现对小白鼠毒力降低,不是由于立克次体数量上的减少,或由于冻融直接破坏了立克次体,影响其活力,而是一种可维持若干代的遗传变异。但这种变异并不稳定,经若干代后,毒力仍可回升。必须结合紫外线、氮芥等处理才能使这种遗传变异得到强化和巩固。其机理是否由于细胞质(冷冻影响)和细胞核或核酸(紫外线等影响)相互作用的结果,有待进一步研究。

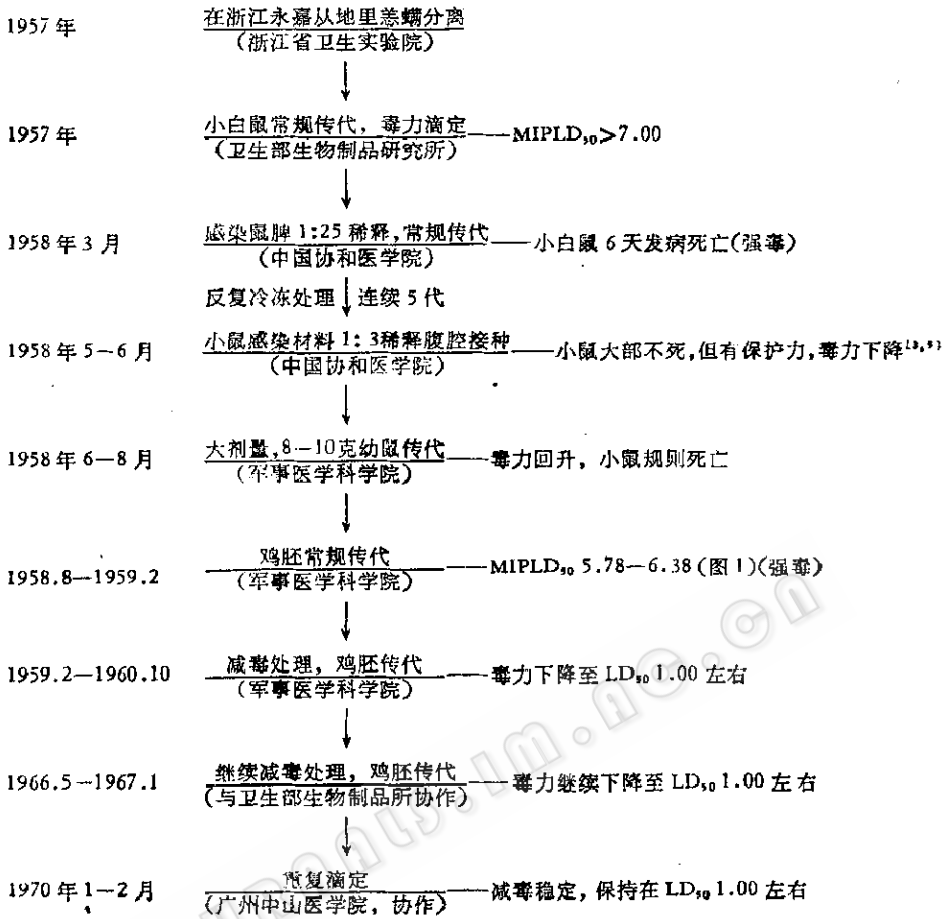


图 3 浙江株恙虫病立克次体毒力变异历史

表 1 浙“三联”减毒株小白鼠腹腔感染后死亡情况

试验日期	试 验 地 点	稀 释 度									LD <sub>50</sub> (log 10)
		10 <sup>-0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	
1960.5.10	军事医学科学院		5/1	3/3	2/4	3/3	1/5	1/5			2.86
1960.12.28	军事医学科学院		3/2	1/4	0/5	1/4	0/5	0/5			1.63
1966.5.19	卫生部生物制品研究所		0/5	0/5	2/3	0/5	1/4	0/5	0/5	0/5	0.80
1966.12.29	卫生部生物制品研究所		0/5	0/5	0/5	0/5	1/4	0/5	0/5	0/5	0.67
1970.1.30	广州中山医学院	0/5	0/5	2/3	3/2	2/3	0/5	0/5			0.49
1970.2.13	广州中山医学院	1/2	0/5	0/5	2/3	0/5	1/4	0/5			0.44

注: 分子代表观察期间小白鼠死亡数, 分母代表小白鼠生存数。

该株经减毒处理后,以不同稀释度接种小白鼠腹腔,根据死亡数及存活数计算  $LD_{50}$  终点,虽然表现毒力较未经处理前显著降低,但从不同稀释度感染动物死亡情况看并不规律(见表 1),可能仍有少数未经变异的强毒颗粒混杂其间,或有一定的回复突变(当然也存在死活立克次体干扰问题,但关键仍在于剩余的少数强毒颗粒的原因)。立克次体悬液稀释度为  $10^{-8}$  时,接种小白鼠后,仅极少数发生不规则死亡现象。根据以上情况早在 1960 年秋,即对该减毒株进行了终末稀释法(limiting dilution)和单细胞分离(当时对恙虫病立克次体还不能在细胞培养上产生空斑),尽可能加以纯化,并继续减毒处理。该株减毒后的抗原性较好,国内异株之间也有较长时期的交叉保

护力<sup>[1,2]</sup>。减毒后在鸡胚及小白鼠长期连续传代(1962—1964 年在小白鼠连续 66 代中滴定  $LD_{50}$  10 次,在 0.78—2.62 之间)也很稳定。通过各种细胞培养(兔肾、兔辜、鸡纤、地鼠肾等)没有毒力回升现象。如能使毒力继续降低并加以纯化,则可用于制备活疫苗。

### 参 考 文 献

- [1] Robinson, D. M. et al.: *J. Inf. Dis.*, 134: 193, 1976.
- [2] 汪民等:《中国微生物学会 1963 年学术会议论文摘要》,第 115—116 页,1963 年。
- [3] 汪民: 人民保健, 1(9):789, 1959.
- [4] Reed, L. J. and H. Muench: *Am. J. Hyg.*, 27: 493, 1938.
- [5] 汪民: 军事医学杂志, 2(4): 291, 1959.