

恙蟲病立克次氏體生活力的試驗

邢祖培 黃珍華 周培安

(中南軍區衛生部衛生研究所微生物學系)

一. 緒 言

據文獻記載恙蟲病立克次氏體很脆弱。在一般的體外環境，感染的動物組織內的恙蟲病立克次氏體經過數小時即行死亡^[1]，趙樹崑氏等^[2]將廣州分離之菌株，適應於雞胚後，放置在 $28-35^{\circ}\text{C}$ 之間65小時內，30個感染雞胚中，僅有5個雞胚中之立克次氏體死亡；被感染的小白鼠脾肝，在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 之下，可保存72—96小時；而被感染之卵黃囊膜中的立克次氏體，在 $0-5^{\circ}\text{C}$ 之下，48小時後尚保存其生活力。我們爲了保存菌株的簡便與安全的目的，作了關於它們的生活力進一步的試驗。我們的方法是將恙蟲病立克次氏體感染的小白鼠脾臟，分別放在滅菌試驗管中，50%的甘油生理鹽水中，及感染的完整雞胚與卵黃囊膜等，分別放置於 -20°C ， 4°C 與 22°C ，并觀察其生活之時間。

二. 材料及方法

材料 菌株：廣州分離之恙蟲病立克次氏體菌株。

雞胚： 38°C 孵育7天之來亨雞胚。

小白鼠：體重12—14克。

方法

1. 將含有恙蟲病立克次氏體之組織，接種於小白鼠腹腔內，經8—14日小白鼠死亡，用無菌操作法解剖之。其脾或腹腔滲出液鏡檢（用Giemsa氏染色法）發現有立克次氏體者，分別將其脾臟放在滅菌空試管內與含有50%甘油生理鹽水的試管中，每管放脾臟一個，置於 -20°C 冰箱中。然後每隔7天各取出脾臟一個，置於乳鉢中以消毒手續磨碎之（保存在50%甘油鹽水中者，先以消毒肉

湯洗滌 3 次)。加入 2 毫升肉湯作成乳劑，注入 12—14 克體重之 3 隻小白鼠腹腔內（每隻約注 0.7 毫升）隔離飼養於鼠罐中。室溫保持在 15—20°C，觀察 28 天。若小白鼠在注射後 1 週至 4 週中死亡者，解剖取其腹腔液及肝、脾作塗抹鏡檢，如有典型細胞內立克次氏體者為陽性，則肯定保存材料內，立克次氏體尚未死亡，且保存其毒力。注射後 5 天內死亡者棄置之，因根據經驗 5 天內死亡的是因為雜菌污染或其他原因，而非恙蟲病立克次氏體所致。28 天不死者則停止觀察，而認其為陰性結果。

2. 將含有恙蟲病立克次氏體之材料，接種於在 38°C 孵育 7 天之雞胚卵黃囊中，然後放入 35°C 培養箱中培養 8 天，使立克次氏體發育繁殖。從培養箱中取出，按下列方法處理：

(1) 卵黃囊膜：將一部分雞胚解剖，取出其卵黃囊膜，如鏡檢含有立克次氏體者，放入無菌平皿中，每一平皿放一個卵黃囊膜，置於 -20°C 冰箱內保存，每隔 7 天，取出一個放入含玻璃珠之小瓶內，加入肉湯一管（7—9 毫升），充分振盪搖碎之。然後注射於 3 隻體重為 12—14 克小白鼠的腹腔內。每隻注射 0.8—1 毫升，觀察 28 天，其他方法同試驗 1。

(2) 整胚：將感染之完整雞胚（即不解剖）分為三組，分別放於 -20°C，4°C 及 22°C 下保存，（放入之先每組抽檢二個證明含有恙蟲病立克次氏體）。

保存在 -20°C 者每隔 6 天，在 4°C 者每隔 2 天或 3 天，在 22°C 者每天取出一個解剖，收取其卵黃囊膜作成懸液，各注射於 12—14 克體重的小白鼠 3 隻，注射量與操作方法同 1。

以上三種方法的結果見表 1 到表 6：

表 1 感染的小白鼠脾臟在 -20°C 下的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月 日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | | 備 考 |
|------|------|-------------|--------------|----|------|----|-----|----|---------------|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | | |
| | | | 月 日 | 結果 | 月 日 | 結果 | 月 日 | 結果 | |
| 1 | 7 | 1 18 | 2 2 | + | 2 11 | + | — | ○ | 3, 4 號材料合併接種 |
| 2 | 14 | 1 25 | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 3 | 21 | 2 1 | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 4 | 21 | | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 5 | 28 | 2 8 | — | ○ | — | ○ | — | ○ | 7 號材料因雜菌污染未接種 |
| 6 | 28 | 2 8 | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 7 | 35 | 2 15 | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 8 | 35 | | — | ○ | — | ○ | — | ○ | |
| 9 | 42 | | 2 22 | — | ○ | — | ○ | — | |

說明：+ = 接種後的小鼠死亡，解剖檢查，發現典型立克次氏體。

± = 接種後小鼠死亡，解剖檢查，發現有類似立克次氏體。

- = 小鼠在接種後 28 日內未死亡。

○ = 未作檢查或未找到立克次氏體。

表 2 感染的小白鼠脾臟保存於 50% 的甘油中在 -20°C 的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月/日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | | 備 考 |
|----------|------|-------------|--------------|----|------|----|-----|----|---------------|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | | |
| | | | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | |
| 1 | 8 | 1/20 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | |
| 2 | 15 | 1/27 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | |
| 3 | 18 | 1/30 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | |
| 4 | 23 | 2/4 | 2/18 | + | 2/24 | + | - | ○ | |
| 5 | 29 | 2/10 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | |
| 6 7 | 36 | 2/17 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | 6,7 號材料合併接種 |
| 8 9 | 43 | 2/24 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | 8,9 號材料合併接種 |
| 10 11 | 50 | 3/3 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | 10,11 號材料合併接種 |
| 12 13 | 56 | 3/9 | - | ○ | - | ○ | - | ○ | 12,13 號材料合併接種 |

說明：同表 1。

表 3 感染的卵黃囊在 -20°C 的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月/日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | |
|------|------|-------------|--------------|----|------|----|------|----|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | |
| | | | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 |
| 1 | 7 | 1/16 | 1/26 | + | 1/27 | + | 1/28 | + |
| 2 | 14 | 1/23 | 1/30 | + | 2/1 | + | 2/2 | + |
| 3 | 21 | 1/30 | 2/8 | + | 2/10 | + | 2/23 | + |
| 4 | 28 | 2/6 | 2/24 | ± | 3/11 | ○ | 3/19 | ○ |
| 5 | 35 | 2/13 | 2/21 | ± | 3/6 | ○ | 3/6 | + |
| 6 | 42 | 2/20 | 3/22 | ± | 3/25 | ○ | - | ○ |
| 7 | 49 | 2/27 | 3/29 | ○ | 3/30 | ○ | - | ○ |
| 8 | 56 | 3/6 | 3/14 | ○ | - | ○ | - | ○ |
| 9 | 63 | 3/13 | 3/29 | ○ | 4/14 | ○ | - | ○ |
| 10 | 71 | 3/21 | 4/7 | ○ | - | ○ | - | ○ |
| 11 | 78 | 3/28 | - | ○ | - | ○ | - | ○ |
| 12 | 86 | 4/5 | - | ○ | - | ○ | - | ○ |
| 13 | 93 | 4/15 | - | ○ | - | ○ | - | ○ |

說明：同表 1。

表 4 感染整胚在 -20°C 的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月/日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | |
|------|------|-------------|--------------|----|------|----|------|----|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | |
| | | | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 |
| 1 | 7 | 1/31 | 2/13 | + | 2/14 | + | 2/14 | + |
| 2 | 14 | 2/7 | 2/18 | + | 2/20 | + | 2/20 | + |
| 3 | 21 | 2/14 | 2/27 | + | 2/27 | + | 2/28 | + |
| 4 | 28 | 2/21 | 3/7 | ○ | 3/11 | ○ | 3/13 | ○ |
| 5 | 35 | 2/28 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 6 | 42 | 3/7 | 3/22 | ○ | 3/23 | + | — | ○ |
| 7 | 49 | 3/14 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 8 | 56 | 3/21 | 4/11 | ± | 4/17 | ○ | — | ○ |
| 9 | 63 | 3/28 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 10 | 70 | 4/5 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 11 | 77 | 4/12 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |

說明：同表 1。

表 5 感染整胚在 4°C 下的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月/日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | |
|------|------|-------------|--------------|----|------|----|------|----|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | |
| | | | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 |
| 1 | 2 | 1/27 | 2/2 | + | 2/14 | ± | 2/19 | + |
| 2 | 2 | 1/27 | 2/14 | + | 2/17 | ○ | — | ○ |
| 3 | 5 | 1/30 | 2/14 | + | 2/14 | ± | — | ○ |
| 4 | 5 | 1/30 | 2/20 | + | 2/14 | + | — | ○ |
| 5 | 9 | 2/3 | 2/20 | + | 2/26 | + | 2/21 | + |
| 6 | 9 | 2/3 | 2/14 | + | 2/14 | + | 2/21 | + |
| 7 | 11 | 2/5 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 8 | 11 | 2/5 | 2/21 | + | 2/22 | ○ | 2/25 | + |
| 9 | 14 | 2/8 | 2/24 | ○ | 2/28 | ○ | 2/28 | + |
| 10 | 14 | 2/8 | 2/25 | + | 2/27 | + | 2/28 | + |
| 11 | 17 | 2/11 | 3/4 | ○ | 3/6 | + | 3/6 | + |
| 12 | 17 | 2/11 | 3/12 | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 13 | 20 | 2/14 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 14 | 20 | 2/14 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 15 | 23 | 2/17 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 16 | 23 | 2/17 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 17 | 26 | 2/21 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 18 | 26 | 2/21 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |

說明：同表 1。

表 6 感染整胚在 22°C 下的生活力試驗結果

| 材料編號 | 保存日數 | 接種日期 月/日 | 小白鼠死亡日期及檢查結果 | | | | | |
|------|------|-------------|--------------|----|------|----|------|----|
| | | | 鼠 1 | | 鼠 2 | | 鼠 3 | |
| | | | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 | 月/日 | 結果 |
| 1 | 2 | 2/3 | 2/17 | ○ | 2/21 | + | 2/21 | + |
| 2 | 2 | 2/3 | 2/15 | + | 2/15 | + | 2/17 | + |
| 3 | 3 | 2/4 | 2/15 | + | 2/18 | + | 2/18 | + |
| 4 | 3 | 2/4 | 2/17 | + | 2/17 | + | 2/20 | + |
| 5 | 4 | 2/5 | 2/15 | + | 2/15 | + | 2/19 | + |
| 6 | 4 | 2/5 | 2/20 | + | 2/21 | ○ | 2/21 | + |
| 7 | 5 | 2/6 | 2/28 | ○ | 3/2 | ○ | 3/2 | + |
| 8 | 5 | 2/6 | 2/18 | + | 2/28 | ○ | 3/3 | + |
| 9 | 6 | 2/7 | 2/20 | + | — | ○ | — | ○ |
| 10 | 6 | 2/7 | 2/17 | + | 2/21 | + | — | ○ |
| 11 | 7 | 2/8 | 2/17 | + | 2/17 | + | 2/17 | + |
| 12 | 7 | 2/8 | 2/17 | + | 2/27 | + | — | ○ |
| 13 | 8 | 2/9 | 2/17 | + | 2/17 | + | 2/17 | + |
| 14 | 8 | 2/9 | 2/25 | + | 2/24 | + | — | ○ |
| 15 | 9 | 2/10 | 2/25 | + | 2/27 | + | 2/27 | + |
| 16 | 9 | 2/10 | 2/23 | + | 2/25 | + | 2/27 | + |
| 17 | 11 | 2/17 | 2/26 | + | 2/27 | + | — | ○ |
| 18 | 11 | 2/17 | 2/28 | + | 2/28 | + | — | ○ |
| 19 | 12 | 2/18 | 2/26 | + | 2/26 | + | 2/27 | + |
| 20 | 12 | 2/18 | 2/28 | + | 2/28 | + | 3/11 | + |
| 21 | 13 | 2/19 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 22 | 13 | 2/19 | 2/27 | + | 3/2 | + | — | ○ |
| 23 | 14 | 2/20 | 2/28 | + | 3/8 | + | 3/2 | ± |
| 24 | 14 | 2/20 | 3/2 | + | — | ○ | — | ○ |
| 25 | 15 | 2/21 | 3/1 | + | 3/1 | + | 3/3 | + |
| 26 | 15 | 2/21 | 3/4 | + | 3/4 | + | — | ○ |
| 27 | 16 | 2/22 | 3/4 | + | 3/4 | + | 3/4 | + |
| 28 | 16 | 2/22 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 29 | 17 | 2/23 | 3/6 | + | — | ○ | — | ○ |
| 30 | 17 | 2/23 | 3/7 | + | 3/11 | + | 3/11 | + |
| 31 | 18 | 2/24 | 3/8 | + | — | ○ | — | ○ |
| 32 | 18 | 2/24 | 2/26 | ○ | 3/4 | + | 3/8 | + |
| 33 | 19 | 2/25 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 34 | 19 | 2/25 | 3/11 | + | 3/11 | + | — | ○ |
| 35 | 20 | 2/26 | 2/27 | ○ | 3/18 | + | 3/8 | ○ |
| 36 | 20 | 2/26 | 3/12 | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 37 | 21 | 3/14 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 38 | 21 | 3/14 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 39 | 22 | 3/15 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 40 | 22 | 3/15 | 4/3 | + | 4/3 | + | — | ○ |
| 41 | 23 | 3/16 | 3/30 | + | 3/31 | + | 4/4 | ○ |
| 42 | 24 | 3/17 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 43 | 25 | 3/18 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 44 | 26 | 3/19 | — | ○ | — | ○ | — | ○ |
| 45 | 27 | 3/9 | 3/26 | + | 3/26 | + | — | ○ |
| 46 | 27 | 3/9 | 3/31 | + | — | ○ | — | ○ |
| 47 | 28 | 3/10 | 4/1 | + | 4/1 | ○ | — | ○ |

說明：同表 1。

四. 總 結

根據上述的 110 份恙蟲病立克次氏體的感染材料，保存在不同環境下的試驗結果，初步證明了恙蟲病立克次氏體的生活力並不如一般相信的那樣脆弱。因為：

1. 恙蟲病立克次氏體感染的小鼠脾臟，保存在 -20°C 冷凍狀態下，可以保存一星期；同樣材料若在 50% 甘油生理鹽水中冷凍至 3 星期，尚能保存其毒力。

2. 鷄胚卵黃囊膜中的恙蟲病立克次氏體，在 -20°C 冷凍保存 5 星期，尚能殺死小白鼠。完整鷄胚內的恙蟲病立克次氏體，在室溫 22°C 下，可以保存 28 日；在 4°C 下可以保存 17 日；在 -20°C 冷凍狀態下保存至 6 星期，尚有殺死小白鼠的能力。

上述試驗中的陰性結果，雖然因為我們沒有作傳代試驗，不能斷言其中不含有生活的恙蟲病立克次氏體。但可以說明，其毒力不足以使小白鼠致死。

參 考 文 獻

- [1] Thomas M. Rivers: viral and rickettsial infection of man, 1948, 1st ed. 520-521.
 [2] 趙樹荃等: 微生物學報, 1953 1 (1):42-55.

A STUDY ON THE PRESERVATION OF RICKETTSIA TSU-TSUGAMUSHI UNDER VARIOUS CIRCUMSTANCES

SHING TSU-PEI, HUANG CHEN-HUA and CHOW PEI-AN

Ministry of Health, Central-South Military Area

The viability and pathogenicity of the *Rickettsia tsutsugamuchi*, isolated in Canton in 1952 by Dr. Chao, S. H. etc., were observed when preserved in differential materials and kept under differential conditions.

The *Rickettsia* remained viable and pathogenic to white mice, when preserved in infected whole embryonated hen's eggs under 22°C for 28 days; under 4°C for 17 days and under -20°C for 6 weeks. Those in the infected Yolk sacs under -20°C for 5 weeks. And those in the infected spleens of white mice, stored in the sterilized test tubes under -20°C lasted for 1 week and in the same materials but stored in 50% glycerol, kept under -20°C for 3 weeks.