

## ·技术交流·

恙虫病立克次体的液氮保存<sup>①</sup>杨绍基<sup>②</sup> 赵志新 黄仰苏 姚集鲁

(中山医科大学附属第三医院传染科; 广州, 510630)

**摘要** 用恙虫病立克次体感染小鼠使其产生腹水, 取腹水原液与部分提纯的恙虫病立克次体悬液加或不加二甲基亚砜、采用四级或二级降温方法作液氮保存, 并分别于保存 1、3、6 和 12 个月取出作形态观察及感染小鼠能力测定。结果证明恙虫病立克次体经液氮保存 1 年后仍具有对小鼠的感染能力。其中以腹水原液, 加二甲基亚砜, 采用二级降温法作液氮保存效果较好。采用液氮保存恙虫病立克次体具有节时省物、可靠程度高的优点, 为对恙虫病立克次体的生物特性和恙虫病的预防、诊断和治疗作深入研究奠定了基础。

**主题词** 立克次体, 恙虫热/致病力; 氮; 保存, 生物学/方法

**中图分类号** R 513.2; 376.2

据现有资料, 恙虫病流行于我国的广东、广西、福建、云南、湖南、四川、浙江、西藏、安徽、陕西、山东、江苏、海南和台湾等省<sup>[1,2]</sup>。广东省的 49 个县市已有恙虫病病例报告。广州市的恙虫病发病率近年来有上升趋势。氯霉素、四环素等治疗恙虫病有良效。患者的体温多于开始用药后 24~48 h 内降至正常水平。但是, 用青霉素类和头孢菌素类治疗本病无效。若延误诊治, 患者多于 20 d 内死亡。为了研究本病的病原体特性, 病理特点, 预防、诊断和治疗方法等, 需要保存对小鼠有致病力的恙虫病立克次体。恙虫病立克次体的抵抗力很弱, 是迄今发现对人类具致病作用的立克次体中最脆弱的一种, 有自溶倾向, 不易保存。用连续作小鼠、鸡胚或细胞接种传代法保存, 既费时耗物, 容易被其它微生物污染, 又必须及时传代, 故最好能用液氮长期保存。我们的研究表明, 恙虫病立克次体可作液氮保存。本文着重介绍这种新的保存方法。

## 1 材料与方 法

### 1.1 恙虫病立克次体

该恙虫病立克次体株是从一个恙虫病患者的血液中分离出来的。患者为男性, 26 岁, 发病前 10 d 曾多次到山旁草地坐卧, 因发热、头痛、全身酸痛与乏力 6 d 而入院。体格检查发现患者眼结膜充血,

皮疹, 淋巴结肿大, 肝、脾肿大, 并于阴囊处发现一个椭圆形、大小为 0.6 cm×0.9 cm 的焦痂。血清在本院实验室和广州市防疫站作变形杆菌 OX<sub>K</sub> 凝集反应均为 1:640 阳性。用聚合酶链反应(PCR)检测恙虫病立克次体 DNA, 结果阳性。于入院当天取血液接种于 3 只小鼠腹腔, 每只 0.5 ml。小鼠经饲养 7~9 d 后出现松毛, 行动迟缓, 进食减少和腹胀等现象。于第 8~10 d 取濒临死亡小鼠腹水涂片, 腹膜、肠系膜、肝脏、脾脏和肾脏印片, 并经 Giemsa 染色后用显微镜放大 1 000~1 600 倍观察。在上述制片中, 均可发现在一些细胞, 尤其是腹膜和肠系膜印片中的巨噬细胞内有呈团状分布的紫红色圆形或椭圆形恙虫病立克次体, 大小为 0.3~0.6 μm×0.5~1.5 μm。将小鼠腹水 0.5 ml 接种于别的小鼠腹腔, 可使其同样发病, 死亡。取其腹水涂片和组织器官印片, 作 Giemsa 染色后镜检, 可于巨噬细胞内发现同样的恙虫病立克次体。该株恙虫病立克次体的血清型有待作进一步鉴定。

### 1.2 实验动物

所用的 6~10 周龄雌性 BALB/c 小鼠由中山医科大学实验动物中心提供。

### 1.3 恙虫病立克次体的分离

取接种恙虫病立克次体的小鼠腹水 3 ml, 于 4 °C, 10 000 g 离心 10 min, 取沉淀即为腹水原液恙虫病立克次体。加入无菌双蒸馏水 8 ml, 4 °C 作

① 广东省卫生厅科研基金资助课题; ② 第一作者, 1944 年出生, 男, 硕士, 副教授

用40 min, 其间用 Vortex 震荡器震荡3次, 每次3 min, 使细胞破裂, 静置后取上清恙虫病立克次体。于4 °C离心10 000 g, 10 min, 取沉淀即为部分提纯的恙虫病立克次体, 分别用作液氮冰冻保存之用。

#### 1.4 液氮保存

1.4.1 冻存液 在RPMI 1640培养基(Gibco BRL产品)中加入小牛血清(变形杆菌 OX<sub>k</sub> 凝集反应阴性), 使最终浓度为20%, 作为不加二甲基亚砷(DMSO, Sigma产品)的冻存液; 若于冰水浴中加入二甲基亚砷, 使最终浓度为8%, 则为含二甲基亚砷的冻存液。

1.4.2 降温冻存方法 将含有恙虫病立克次体的各种冻存液分装于无菌的冻存管中, 每管0.5 mL, 密封、标记后分别置于4 °C 1 h, -20 °C 1 h, -80 °C(液氮罐气相)1 h, 再放入-196 °C(液氮)中, 为四级降温法; 只置于-80 °C 1 h后就放入液氮中为二级降温法。

1.4.3 冻存时间 分别于液氮冻存前、冻存后1、3、6和12个月取出, 接种3只小鼠, 每只接种0.5 mL。冻存时含有二甲基亚砷者, 先用离心法除去二甲基亚砷, 再行接种, 以观察恙虫病立克次体对小鼠的感染能力。

#### 1.5 复苏后镜检

从液氮罐中取出冻存的恙虫病立克次体悬液, 于液化后即作滴片, 用倒置显微镜检查, 并作涂片、Giemsa染色, 用油镜检查。

#### 1.6 统计学处理

采用计算机统计学软件 STATA(Ver 3.0)作精确 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

### 2.1 冻存后感染力

腹水原液与部分提纯的恙虫病立克次体在含二甲基亚砷冻存液中于液氮保存3个月对小鼠感染能力的影响见表1。

表1 两种恙虫病立克次体悬液冻存结果比较

材料	感染阳性	感染阴性	合计
小鼠腹水原液	6	0	6
部分提纯	4	2	6
合计	10	2	12

$P=0.227$ , 双侧检验,  $P>0.025$ , 差别无显著意义

### 2.2 二甲基亚砷对冻存后感染力的影响

恙虫病立克次体感染小鼠腹水原液含与不含二甲基亚砷, 采用二组降温冻存法于液氮中保存3个月对小鼠感染能力的影响见表2。

表2 二甲基亚砷对恙虫病立克次体冻存的影响

材料	感染阳性	感染阴性	合计
含二甲基亚砷	5	1	6
不含二甲基亚砷	6	0	6
合计	11	1	12

$P=0.045$ , 双侧检验,  $P>0.025$ , 差别无显著意义

### 2.3 两种不同降温方法观察

含二甲基亚砷, 采用两种不同降温冻存法于液氮保存3个月后的恙虫病立克次体对小鼠感染能力的影响情况见表3。

表3 不同降温冻存法对恙虫病立克次体的影响

方法	感染阳性	感染阴性	合计
四级降温冻存	1	5	6
二级降温冻存	6	0	6
合计	7	5	12

$P=0.0075$ , 双侧检验,  $P<0.025$ , 差别有显著意义

### 2.4 于液氮保存不同时间后对感染力的影响

含二甲基亚砷的小鼠腹水原液作二级降温于液氮冻存的恙虫病立克次体分别于冻存前、冻存1、3、6和12个月对小鼠感染能力的影响无明显差异, 所接种的小鼠均被感染, 并且发病、死亡。

### 2.5 二甲基亚砷对冻存后感染细胞完整性的影响

于液氮冻存的恙虫病立克次体悬液从液氮罐取出后制片、染色检查显示, 含二甲基亚砷的冻存液中有大量完整的巨噬细胞, 内含恙虫病立克次体; 而不含二甲基亚砷的冻存液中则几乎没有完整的细胞, 但仍可见恙虫病立克次体。

## 3 讨论

恙虫病立克次体为专性细胞内寄生、抵抗力很弱的微生物。它是迄今发现对人类致病性立克次体中抵抗力最弱的一种, 有自溶倾向, 不易保存。于37 °C, 2 h后其感染小鼠的能力即明显降低。在完

整的感染鸡胚中, 4 °C 仅可保存 17 d - 20 °C 仅可保存 6 周<sup>[3]</sup>。恙虫病立克次体的长期低温保存有助于对其生物学特性、分子生物学的抗原结构, 以及对恙虫病的病理、诊断、治疗和预防等作进一步研究<sup>[4,5]</sup>。本研究结果表明, 恙虫病立克次体的液氮保存可使其保持对小鼠的感染能力达 1 年以上。

以感染小鼠的腹水原液作液氮保存优于经部分提纯后的恙虫病立克次体作液氮保存。这可能是由于用腹水原液作液氮保存时, 恙虫病立克次体始终处于一个比较稳定的细胞内环境中, 较少受外界物理和化学因素作用的结果。当冻存液中含二甲基亚砜时, 从液氮中取出的标本, 经迅速解冻, 离心后用倒置显微镜检查, 可见大量完整、胞质透明的细胞。涂片、染色后用油镜检查可见于胞质内的一端有成团、紫红色的恙虫病立克次体。细胞内的恙虫病立克次体对小鼠仍具感染能力。

不管冻存液中是否含有二甲基亚砜, 复苏后是否有完整的细胞, 对恙虫病立克次体的感染能力都无明显影响。这提示在无二甲基亚砜存在的情况下, 解冻时对细胞有裂解作用, 但对恙虫病立克次体则无明显损害作用。作液氮冻存时, 采用二级降温法优于四级降温法。这可能与恙虫病立克次体的抵抗力较弱有关, 于 4 °C 和 -20 °C 各 1 h 后可能已使

其活力明显下降。恙虫病立克次体的液氮保存有省时省物、可靠程度高的优点, 有助于对恙虫病作各方面深入的研究。本研究证明恙虫病立克次体在液氮中可保存对小鼠的感染能力达 1 年以上, 但最终可保存多长时间则需作进一步观察与研究。

## 参 考 文 献

- 1 于恩庶, 徐秉锟. 中国人兽共患病学. 福建: 科学技术出版社, 1988. 385 ~ 399
- 2 郭恒彬, 于明明, 徐毛华, 等. 江苏恙虫病立克次体阳性血清分型的研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 1993, 13(5): 316
- 3 魏 曦. 医用立克次体学. 上海: 科学技术出版社, 1984. 268 ~ 3322
- 4 Watt G, Chouriyagune C, Ruangweerayud R, et al. Scrub typhus infections poorly responsive to antibiotics in northern Thailand. Lancet, 1996. 348: 86
- 5 Kelly D J, Salata K F, Strickman D, et al. Rickettsia tsutsugamushi infection in cell culture, antibiotic susceptibility determined by flow cytometry. Am J Trop Med Hyg, 1995, 53: 602

(1997-03-03 收稿 1997-07-10 修回)

## STORING *Rickettsia tsutsugamushi* IN LIQUID NITROGEN

Yang Shaoji Huang Yangsu Yao Jilu

(Department of Infectious Diseases, Third Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510630)

A method for storing *Rickettsia tsutsugamushi* (*R. tsutsugamushi*) in liquid nitrogen was studied. Ascites produced by mice infected with *R. tsutsugamushi* and its partially purified *R. tsutsugamushi* both treated with or without adding dimethyl sulfoxide (DMSO) were kept frozen in cryovials and stored in liquid nitrogen by means of four or two-step methods to lower down the temperature stepwise to -196 °C. The frozen vials were removed out from liquid nitrogen at one, three, six and twelve months after storage, respectively. Microscopy and the test of mouse-infectability of the rickettsia were examined. Results indicated that *R. tsutsugamushi* retained their mouse-infectability in liquid nitrogen for over one year. It is apparent that the storage of the rickettsia would be better with infected mouse ascites freezing process with two-step than with partially purified preparation and with four-step freezing process. In conclusion, store of *R. tsutsugamushi* in the form of infected mouse ascites in liquid nitrogen may prove to be a simple and useful method for preservation of the rickettsia.

**Subject headings** *Rickettsia tsutsugamushi* / pathogenicity; nitrogen; preservation, biological / methods