

在廣州發現的恙蟲熱立克次體的研究

趙樹萱 趙春芳 許兆奎 吳啓文 楊淑英

(中央生物製品研究所)

緒 論

廣州市的恙蟲熱 (Tsutsugamushi Fever, Scrub typhus) 自從1946—1948年開始為醫學工作者所注意。彭淑景, 謝敏貞^[1]根據數百例的血清檢查, 發現對於 OXK 有 19—44% 陽性率, 並將臨床上疑似恙蟲熱患者的血液接種於小白鼠腹腔有 2 例發見有類似恙蟲熱立克次體的小體。施復晉^[2]及朱師晦等^[3]也相繼報告了恙蟲熱患者的臨床症狀和在廣州流行的情況。1950年7月作者之一奉派到廣州調查恙蟲熱的病原學及流行病學時, 曾與彭淑景梁柏齡二氏合作, 從事恙蟲熱立克次體 (*Rickettsia tsutsugamushi*) 的分離培養, 並檢查廣州市恙蟲熱的傳染媒介及病原保藏宿主的問題。初步的結果: (1) 將恙蟲熱病人血液分別接種小白鼠腹腔及雞胎卵黃囊有 10 例以上證明了恙蟲熱立克次體並傳達至三、四代。(2) 由鼠類耳殼內發現恙蟲的一種 (*Neoschongastia* Sp.), 繼由梁柏齡、張念堯^[4]發現東南亞熱帶地區最主要的恙蟲熱的傳染媒介地恙蟲 (*Trombicula deliensis*)。當時限於試驗動物的缺乏, 未能繼續工作下去, 而已經得到的小白鼠和雞胎培養材料又因工作上經驗不足, 旅途中冷藏不當, 以致損失了大部, 使這項工作沒有得到系統的結論。

今年六月初作者等又奉派赴廣州市參加恙蟲熱防治及研究工作; 總的工作報告尚在整理中, 本文主要討論廣州市發現的恙蟲熱立克次體的一般生物學特性和動物試驗。

分 離 培 養

依恙蟲熱的細菌學診斷方法^[5]進行恙蟲熱立克次體的分離培養試驗, 茲將試驗結果分述如下: ——

1. 病人材料

(1) 血液：以無菌操作法採取病人初期的靜脈血液 5—10 毫升注入已滅菌的盛有玻璃珠的 50 毫升玻塞廣口瓶中，充分搖盪，成為脫纖維血液。分別接種於小白鼠腹腔及雞胎卵黃囊內。每次試驗用小白鼠三隻，每隻腹腔注射 0.5—1.0 毫升，觀察四週。受感染的小白鼠多在接種 6 日後發病，9—18 日死亡，在瀕死前或死亡不久時解剖，常發現腹壁淋巴腺充血腫脹及 0.5—2.0 毫升的粘稠狀的腹腔滲出液，用 Giemsa 氏染色法，鏡檢可見大單核細胞及淋巴細胞增多，特別是在大單核細胞原漿內含有大量的堆集在細胞核周圍的典型的立克次體（圖 1）。脾臟腫大至一、二倍不等，呈現充血現象。以此項脾臟或腹腔滲出液接種另外的健康小白鼠或豚鼠，仍能引起恙蟲熱典型的症狀，同時將此項材料接種於一般人工培養基上，則無細菌生長。

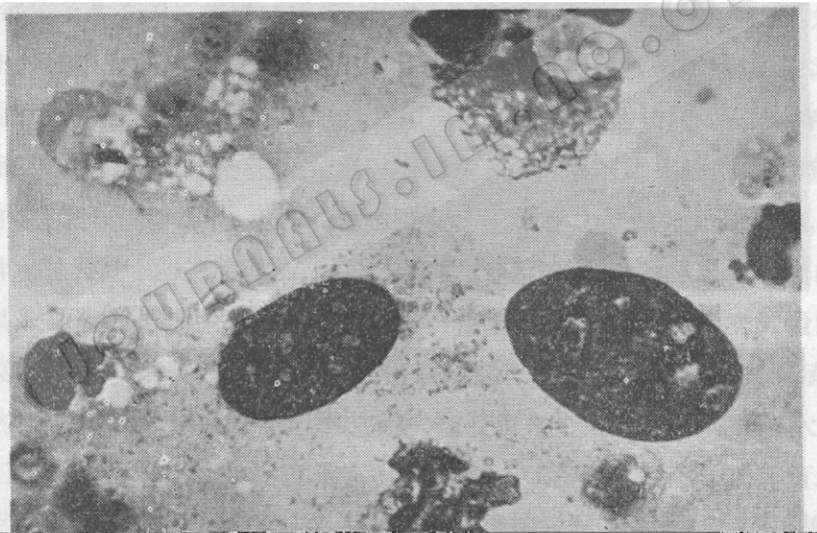


表1 病人材料分離試驗結果

試 驗	份 數	陽 性 結 果		陰 性 結 果	
		份 數	百分率	份 數	百分率
小白鼠	62	28	46.1%	34	54.9%
雞 胎	37	18	48.7%	19	51.3%

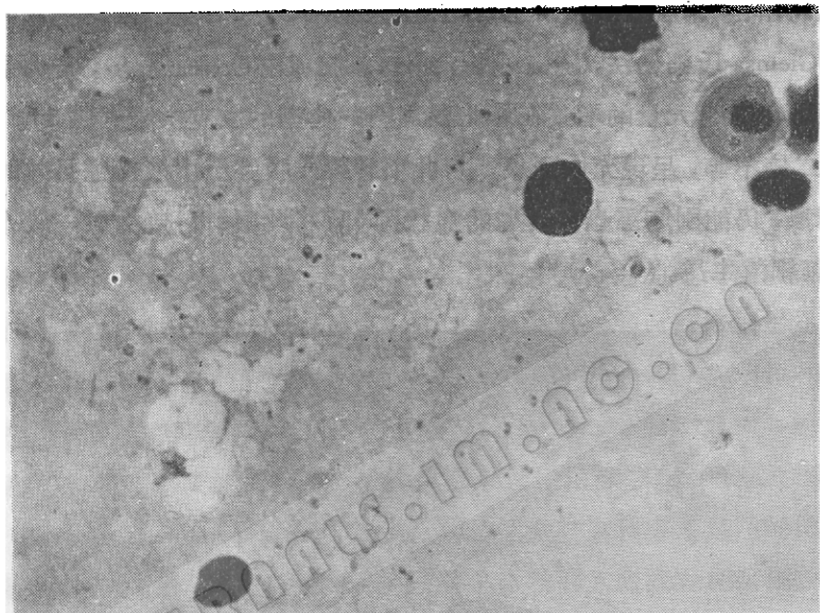


圖2 細胞外散在的恙蟲熱立克次體(雞胎培養,放大1,000倍)

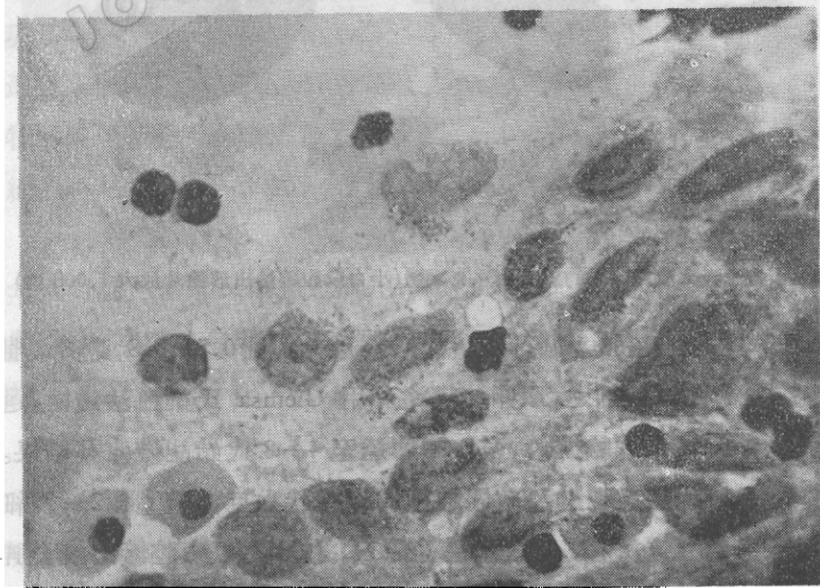


圖3 細胞內增殖的恙蟲熱立克次體(雞胎培養,放大1,000倍)

同一的病人血液，同時作過小白鼠及雞胎二種分離培養試驗的共 37 份，其結果有顯著的差別如表 2 所示。37 份試驗中，兩種試驗全為陽性結果的有 8 份，兩種試驗全為陰性結果的有 12 份，其餘 17 份的試驗結果互相參差可以比較之如表 3：

表 2 37 份試驗結果比較表

試驗份數	小白鼠試驗		雞胎試驗	
	陽性	陰性	陽性	陰性
37	15	22	18	19
百分率	40.5%	59.5%	48.7%	51.3%

表 3 17 份試驗結果比較表

試驗份數	雞胎試驗陽性 (小白鼠陰性)	小白鼠試驗陽性 (雞胚陰性)
	10	7
百分率	59%	41%

(2) 脾臟：病人死亡後屍體解剖時，以無菌手續採取脾臟約 1 克，用滅菌乳鉢研磨，加 10 毫升肉湯培養基稀釋，接種小白鼠及豚鼠腹腔內，每次試驗用小白鼠三隻，每隻 0.5 毫升，豚鼠二隻，每隻 2—3 毫升，共作 3 例，其中 2 例為陽性。感染的小白鼠腹腔滲出液及脾臟塗片，用 Giemsa 氏染色法，均能發現典型的細胞內增殖的立克次體。在豚鼠感染後 12—16 日體溫上升至 40°C 以上，持續 3—5 日，食慾減退，體重下降，約在第三週至第四週死亡，解剖所見腹壁淋巴腺充血腫脹，腹腔內有漿液性滲出物，脾臟約增大一倍，脾臟塗片能檢見立克次體，但較小白鼠的脾臟塗片中為少，腹腔液中更為少見。但由受感染的豚鼠在發熱的第二、三日體溫上升至最高時採取心血，移植於雞胎卵黃囊，約經 4—6 次試驗傳代後，作卵黃膜塗片用 Giemsa 氏染色法，即可發現散在於細胞外及細胞內增殖的典型的恙蟲熱立克次體。將此種恙蟲熱立克次體發育良好的雞胎卵黃膜多次接種於一般人工培養基，如普通肉湯、瓊脂斜面、血液瓊脂培養基、Dorset 氏卵黃培養基，均無細菌生長，而此項卵黃膜懸液 1:50 稀釋後接種於小白鼠腹腔，每隻 0.5 毫升，在 6—9 日後即發病乃至死亡。解剖後以小白鼠腹腔滲出液及脾臟塗片，用 Giemsa 氏染色法可檢見典型的細胞內增殖細小的雙球形深紫藍色立克次體，與病人體中初分離的及屢次通過小白鼠傳代而未經雞胎培養的不能區別。

另外一例因屍體腐敗，有嚴重的雜菌污染情形，試驗動物於接種後 3—4 日全數死亡，因而未獲得結果。

2. 恙蟲檢查

由鼠類耳殼內挑出恙蟲，在昆蟲解剖鏡下鑑定其種屬。^{*} 將同種的恙蟲計數

^{*} 恙蟲種屬鑑定工作主要由甘懷傑，柳忠旋，周祖傑，羅澤陶等同志担任。

放進盛有一滴生理鹽水的凹玻片中。每次約須收集 120—150 個以上,若一隻鼠耳中恙蟲不足數時,則以 2—5 隻鼠耳中同種的恙蟲混合起來,然後用無菌的無鉤鑷子的尖端將全部恙蟲仔細研碎,再行逐次滴加 1.0 毫升無菌生理鹽水或肉湯培養基,吸入注射器混合後,分別接種於 2—3 隻小白鼠。每隻腹腔內注射 0.3—0.5 毫升,觀察四週。受感染的小白鼠約在接種後 9—23 日發病並迅速死亡。在小白鼠瀕死前或死亡不久時即行解剖,以腹腔滲出液、脾臟及肝臟塗片,用 Giemsa 氏染色法檢查,其陽性者有典型細胞內增殖的立克次體(圖 4)。再將此項感染的小白鼠腹腔滲出液或脾臟繼續接種另外一批健康小白鼠及豚鼠,以觀察其致病性。共檢查 59 份,有 6 份為陽性,佔 10.17%。陽性結果與恙蟲種類和數量的關係如表 4,表 5。

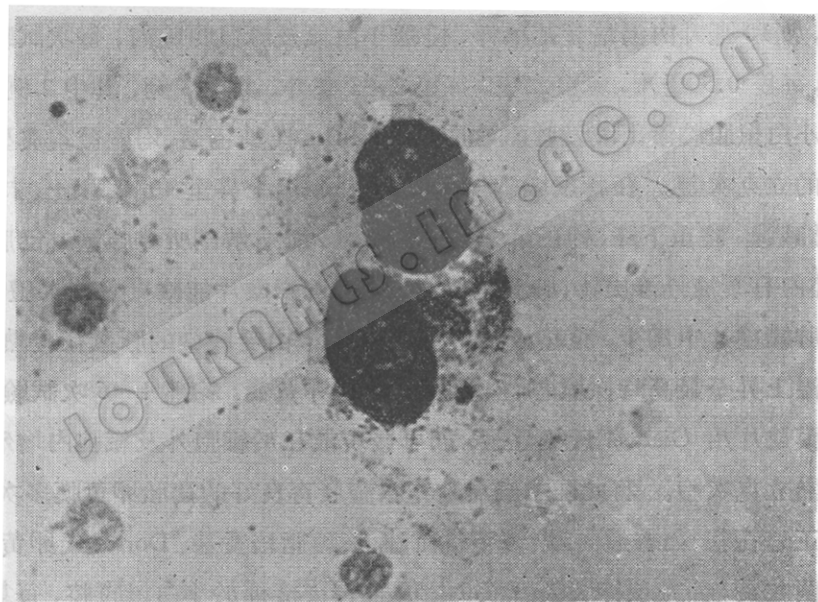


圖 4 由恙蟲分離的恙蟲熱立克次體(小鼠腹腔滲出液塗片,放大 1,000 倍)

表 4* 自恙蟲分離立克次體陽性結果與恙蟲種類和數量的關係

帶恙蟲的鼠號	恙 蟲 種 類	恙蟲數目	接種日期	檢查日期	接種後發病或死亡日數
72	<i>Neoschongastia</i> sp.	300	6,24	7,7	13
73+77	<i>T. deliensis</i>	158	6,24	7,8	14
78	<i>T. deliensis</i>	130	6,24	7,9	15
95+96	<i>Neoschongastia</i> sp.	107			
	<i>Walchia</i> sp.	60	6,28	7,21	23
160+161	<i>T. deliensis</i>	162	7,10	7,19	9
454+470+479	<i>T. deliensis</i>	123	7,22	8,10	19

表 5* 由各種恙蟲分離立克次體的比較表

恙 蟲 種 類	試服份數	陽性份數	陽性百分率
<i>T. deliensis</i>	21	4	19.05%
<i>Neoschongastia</i> sp.	19	1	2.26%
<i>Neoschongastia</i> sp.	19	1	5.26%
<i>Walchia</i> sp.			
總 計	59	6	10.07%

3. 鼠類檢查

由恙蟲熱患者最多的地區如廣州市越秀區小北路一帶集中捕鼠，先由鼠體心臟採血 3—10 毫升，準備作外斐氏反應 (Weil-Felix reaction)，然後解剖，摘取鼠脾，儲於 0°—5°C 冰箱中。取對 OXK 呈陽性反應 (效價在 1/40 以上) 的鼠脾於滅菌的乳鉢中研磨，加 5 毫升肉湯培養基稀釋，接種 2—3 隻小白鼠，每隻腹腔內注射 0.5—1.0 毫升，觀察四週。共作 97 次試驗，計有 10 次為陽性結果，佔 10.3 %。如表 6；

表 6*

鼠 號	鼠 類	外斐氏反應 (OXK)			接種日期 月 日	檢查日期 月 日	接種後發病 或死亡日數
		1:20	1:40	1:80			
74	食蟲鼠 <i>Suncus murinus</i>	++	+	○	6,25	7,5	10
131	食蟲鼠 <i>Suncus murinus</i>	++++	++++	○	7,5	7,25	20
136	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	+++	+++	++	7,5	7,18	13
155	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	++++	++++	+	7,19	7,25	6
282	家鼠 <i>R. rattus</i>	++	+	+	7,20	7,29	9
500	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	+++	+++	++	7,25	8,8	14
511	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	+++	+++	+	7,25	8,10	16
562	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	+++	+++	++	7,25	7,30	5
578	溝鼠 <i>R. norvegicus</i>	++	+	+	7,25	7,30	5
601	家鼠 <i>R. rattus</i>	+++	+	+	7,26	8,8	15

** 食蟲鼠係鍾之英及羅澤均同志鑑定

+ = 上層不夠清晰而管底有輕微的沉澱，經搖盪後有確實的微細顆粒的菌體凝集現象。

++ = 上層顯著的較對照管清晰，管底有中等沉澱，經搖盪後有顯著的菌體凝集現象。

+++ +++++ = 上層完全清晰，管底有強度的沉澱現象，經搖盪後呈強度的菌體凝集現象。

○ = 未做。

* 表 4, 表 5, 表 6 係引自廣州市恙蟲病實驗室工作總結報告

受感染的小白鼠在接種 5—20 日發病或死亡,解剖後以腹腔滲出液及脾臟塗片,用 Giemsa 氏染色法檢查有典型的細胞內增殖的立克氏體(圖 5,圖 6)。然後將此項感染的腹腔滲出液或脾臟繼續接種另外的健康小白鼠、猴、家兔及豚鼠以觀察其致病性。

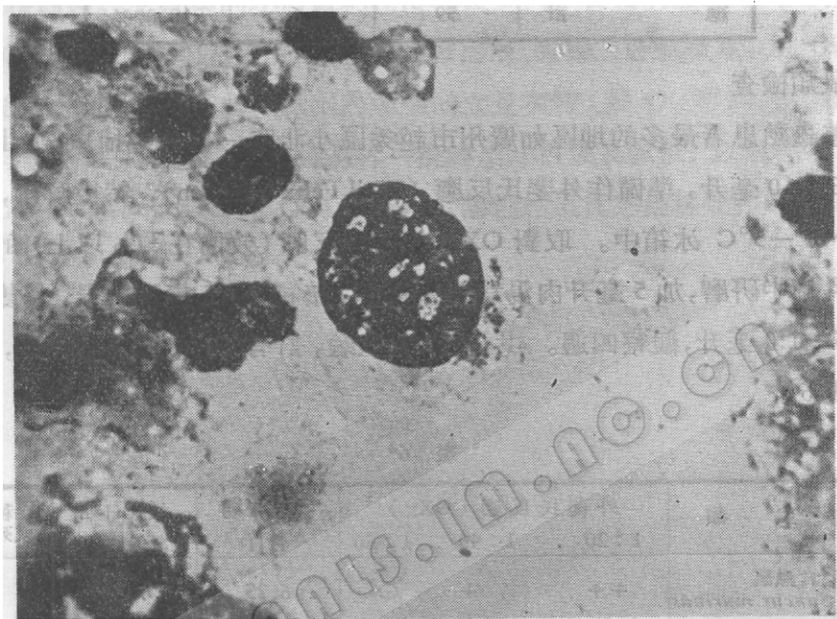


圖 5 由鼠體分離的恙蟲熱立克次體 (小白鼠腹腔滲出液,放大 1,000 倍)

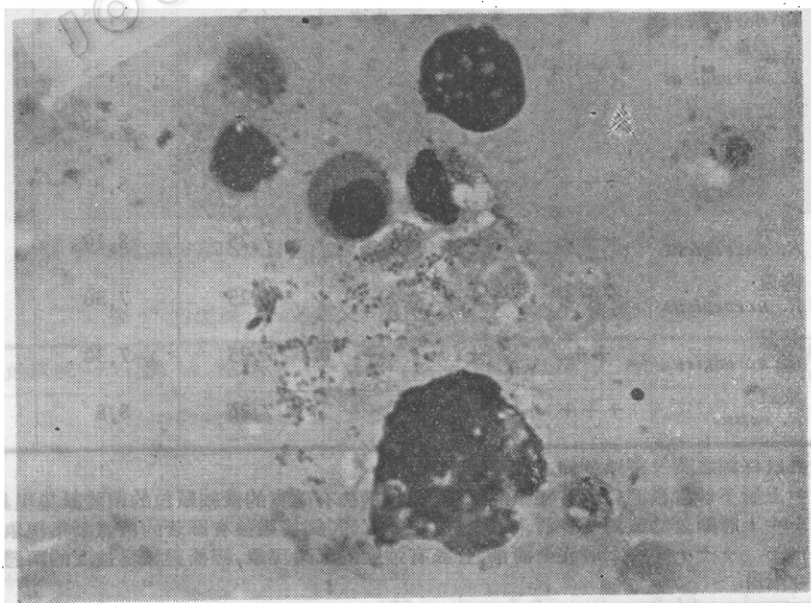


圖 6 由鼠體分離的恙蟲熱立克次體 (小白鼠腹腔滲出液,放大 1,000 倍)

動物致病性

將以上在廣州分離培養所獲得的恙蟲熱立克次體分別進行了各種動物試驗，以觀察其致病性。

1. 家兔接種試驗

將 74 號鼠脾感染的小白鼠腹腔滲出液接種於白色家兔皮內及眼前房。(1) 皮內注射 0.2 毫升，在 24—48 小時後局部呈現輕度紅腫；72 小時後開始紅腫，浸潤為硬塊，直徑 $1\frac{1}{2}$ 毫米，繼而凸起成丘疹，漸成為疱疹；至第六日潰爛；第八日結成紅褐色痂膜，周圍紅腫消失；至 10 日後漸次脫痂平復。全身症狀無顯著變化，至第七日體溫上升至 39.7°C 後因家兔生產，未繼續測定。(2) 眼前房內接種 0.5 毫升，第二日體溫上升至 39.8°C ，次日即行下降；至第四日體溫再次上升至 40.3°C ，接種的一側眼結合膜開始發炎，角膜充血，羞明多淚；至第八日全眼發炎，局部有熱感，角膜溷濁；第十一日體溫趨於正常 39°C 。第十六日抽取眼前房水塗片，用 Giemsa 染色法檢見有可疑的立克次體。第廿二日採血作血清學檢查對 OXK 呈 1:160 的易生凝集反應，對恙蟲熱立克次體抗原^[5]呈陽性補體結合反應(1:80)。(3) 將含有大量恙蟲熱立克次體的雞胎卵黃膜用肉湯培養基作 1:50 稀釋，接種家兔耳靜脈內，每隻注射 5—7 毫升，僅少數家兔於接種後第五日溫度上升至 40°C ，持續二日；第七日解剖所見，僅脾臟腫大，肺部有數點呈發炎現象，塗片檢查僅能檢見極少數的立克次體。在大多數家兔中不引起溫度上昇等變化。

2. 猴體接種試驗

將 74 號鼠脾感染的小白鼠腹腔滲出液接種於猴（廣西梧州產的金絲猴）的皮內，注射 0.2 毫升，同時注射 0.5 毫升於腹腔內。至第五日，皮內注射的局部開始呈紅腫丘疹；第六日中央潰爛，繼而結痂，逐漸變為紫褐色，體溫上升至 39.9°C 持續二日。第七日採取靜脈血液二毫升接種於雞胎卵黃囊內，至第十一代檢見有典型立克次體。第廿二日採血對恙蟲熱立克次體抗原呈陽性補體結合反應(1:160)。

3. 小白鼠靜脈接種試驗

我們將 1:50 稀釋的卵黃膜懸液注射於 15—20 克體重的小白鼠靜脈內，每隻 0.5 毫升，在 4—6 日有 90% 以上或全數發病，迅速死亡。解剖所見脾臟增大一、二倍不等，高度充血，肝臟在肉眼觀察無顯著變化，腹腔內不能發見滲出液。

肺臟有局部或大部發炎，胸腔內常積有 0.3—0.5 毫升粘稠狀液體，塗片檢查用 Giemsa 氏染色法，可檢見肝臟塗片中有大量的細胞內外的恙蟲熱立克次體（圖 7）。脾臟中僅稍次於肝臟，而遠較一般腹腔內接種者為多。肺臟塗片則多為細胞外散在性的恙蟲熱立克次體，兩極濃染，與雞胎卵黃膜塗片所見的相同。繼續用此項鼠脾肝混合研磨，按重量用肉湯培養基稀釋為 70—100 倍，注射於另外一批健康小白鼠的靜脈內，每隻 0.5 毫升，則普通的在第 10—12 日發病，有 60% 以上死亡。脾、肝、肺塗片檢查與用卵黃膜接種的相同，但僅能發見較少量的立克次體。若用 1:50 稀釋的肝臟懸液靜脈內注射小白鼠時，小白鼠在注射後，常有死亡。用同濃度健康小白鼠的脾肝懸液作靜脈注射時亦有此現象。同樣濃度的鼠肝懸液，行小白鼠腹腔內接種後不致即時死亡，但在接種後約 8—10 日始有發病，只能在腹腔滲出液及脾臟塗片上檢見少數的恙蟲熱立克次體，肝臟及肺臟塗片上幾不能檢見立克次體。

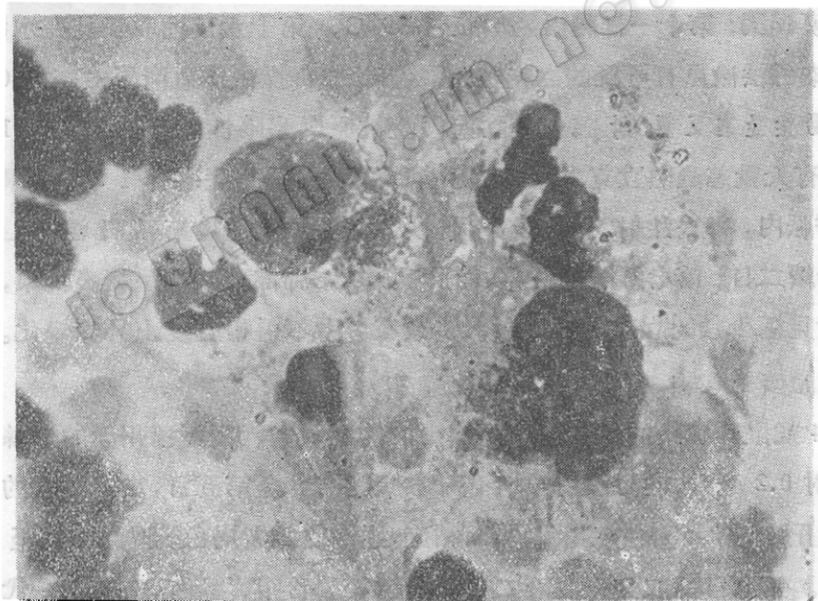


圖 7 小白鼠肝臟內的恙蟲熱立克次體（擴大 1,000 倍）

4. 小鼠經口傳染試驗

先將已經由恙蟲熱感染而發病瀕死的一隻小白鼠放進健康鼠罐內（內有二隻小白鼠一隻小田鼠（Hamster）），不放飼料。一日後發現病鼠屍體已被健康小鼠剝食殆盡，只剩下鼠皮及腸部。繼續放進一隻恙蟲熱立克次體感染的病鼠，次日又發現被吃了。自第四日起即每日放入定量的飼料和一般飼養法相同，並將小白

鼠和小田鼠分罐飼養。第五日發現其中小白鼠死亡一隻，解剖後未發現有何病變，脾臟塗片亦未檢見立克次體。第十八日發現尚存的小白鼠有發病情形，皮毛棘立，運動迂緩，閉目無神。即將其殺死，解剖後發現脾臟增大約一倍，腹腔內沒有滲出液，脾臟塗片檢查時用 Giemsa 塗色法，僅能見有可疑的立克次體。即將此小白鼠的脾臟用無菌乳鉢研磨，加 8 毫升肉湯培養基稀釋後，再接再種於健康小白鼠三隻腹腔，每隻一毫升，及豚鼠一隻腹腔，注射 4 毫升。至第七日有一隻小白鼠發病死亡，解剖後，發現腹壁及鼠蹊部淋巴腺充血腫脹，腹腔內有少量滲出性粘液，脾臟增大一倍以上。塗片檢查，用 Giemsa 染色法，鏡檢有相當豐富的典型的恙蟲熱立克次體，即將此鼠脾繼續作傳代試驗。其餘二隻小白鼠亦陸續發病，解剖後檢查結果亦相同。

試驗室傳染的一例

本文作者之一，於 10 月 17 日作小白鼠尾靜脈注射時，因針頭堵塞，不慎將含有極豐富恙蟲熱立克次體的材料蘸入眼中，當時曾用 3% 硝酸銀點眼，二三日內亦未覺眼部有何變化。但至第十二日（十月廿九日）全身感覺不適，有寒戰，扁桃腺腫大，喉部咽下困難並有疼感，體溫正常。次日（十月三十日）午後體溫上昇（ 38.6°C ），頭疼，全身困倦，關節及肌肉酸痛無力，食慾缺乏。即服磺胺劑約 8 克，扁桃腺腫脹消退，無疼感，但至發病後第三日（十月三十一日）體溫仍高，稽留在 38.7°C — 38.8°C 左右，我們疑為受恙蟲熱感染，雖經診視但全身無斑疹，淋巴腺無腫脹現象，亦不能發現有潰瘍，惟雙目呈輕度發炎；脾臟僅能觸知，無疼感；肝臟無變化；發熱期的血片檢察，發現大單核細胞增多，細胞內有類似的恙蟲熱立克次體。即採取靜脈血液約 8 毫升，分別接種於三隻小白鼠的腹腔內，每隻注射一毫升全血，另雞胎五個行卵黃囊內接種，每個注射一毫升全血。然後令患者臥床休息，口服氯黴素，第一次服量 1 克，以後每四小時 0.5 克。至第五日晨（服藥後十五小時），體溫即降至 37.4°C ，晚九時即降至 36.8°C ，繼續服了氯黴素至 6 克後患者食慾恢復並能起立行走，乃減量至每四小時服 0.25 克。又服三次後，患者已不覺有病，能夠外出散步，乃停止服藥。惟患者自覺脾臟有強烈的壓痛，深呼吸時亦有痛感。間隔三日，又有輕度的再歸性體溫上昇（ 38.2°C ），頭疼，乃又口服少量氯黴素（0.25 克三次），體溫即復正常。病後第九日患者已完全恢復健康，照常參加工作。

雞胎卵黃囊培養結果，在第一、二代即能發現典型的散在細胞外的恙蟲熱立克次體。小白鼠在接種後第九日相繼有發病現象，第十二日其中一隻於瀕死前解剖檢查，發現腹壁淋巴腺腫脹，脾臟增大一倍以上，有少量的粘稠性的腹腔滲出液。塗片檢查，鏡檢均有大量典型的細胞內增殖的恙蟲熱立克次體。其餘二隻解剖後檢查結果相同。繼續傳代試驗結果亦同。病人血清學檢查呈陽性補體結合反應(1:512)，對 OXK 的凝集，反應效價為 1:320。

恙蟲熱立克次體的保存

1. 恙蟲熱立克次體在雞胎卵黃囊內已經習慣生長後，再行傳代培養至第五、六日，然後將此項接種過的雞卵用棉花個個包裹，放在填有棉墊的木箱或面盆中，上蓋棉花紗布，加蓋但不可嚴密封閉，使與外界通空氣，如此即可放在火車廂內穩妥處攜帶，但途中必須避免擠壓和激烈的震盪。當 8 月下旬廣州至武昌的車廂內溫度白天為 33—35°C 夜間為 30°C，漢口至北京車廂內溫度白天約 30°—33°C 夜間約 28°—30°C，如此由廣州帶至北京經過 65 小時的旅途，共 30 個雞胎僅有五個死亡的，而且繼續傳代的結果良好。相反的，我們在八月初將恙蟲熱接種後 5—6 日的胎卵密封在暖水瓶中由廣州帶到武昌，18 個雞胎中經過 42 小時即死却 12 個，反不如保存在自然氣溫中的成績。

2. 受恙蟲熱感染的小白鼠脾肝，若以無菌操作法採取後保存於 0°—5°C 冰箱中，可以保存 72—96 小時，超過 96 小時以上，即有大部立克次體趨於死亡。雞胎卵黃膜內的恙蟲熱立克次體在 0°—5°C 中僅能保存 48 小時，過久時則傳代接種的結果不良。受感染的動物脾肝，加 50% 甘油肉湯冷藏保存二週以上，尚有致病性。

3. 我們對於恙蟲熱立克次體的乾燥保存的初步的經驗如下：將恙蟲熱立克次體發育良好的雞胎卵黃膜一個，在滅菌盛有玻璃珠的小廣口瓶中搖碎，加入 5 毫升的卵黃液，或脫脂牛乳混合後，即刻分裝在乾燥安瓶中，每個 0.2 毫升，放在乾燥罐內置於 -18°C 冰箱預凍 24—48 小時。從冰箱中取出後，仍以冰塊包圍，立刻開動真空抽氣機，至半小時後撤去冰塊，在 1/2 馬力的真空抽氣機下約四小時可以徹底乾透，乃在真空下熔封安瓶。此項乾燥保存的恙蟲熱立克次體置於 0°—5°C 冰箱中，其致病性至少能保存三個月以上。

討 論

1. 日本學者早川等^[6] 曾將日本北部的恙蟲熱立克次體 (*R. tsutsugamushi*, Ogata 緒方^[7] 或 *R. orientalis* Nagayo 長與^[8]) 和東南亞地區的恙蟲熱立克次體作了一個有系統的比較試驗，在形態學、血清學和免疫學上，二者之間差別很少，惟對於試驗動物的致病性，日本種及台灣種則較熱帶種的毒力強。特別有興趣的，日本強毒的恙蟲熱立克次體種在星加坡通過試驗動物一年以上，其毒力逐漸減弱，以至與熱帶的恙蟲熱立克次體幾無差別，即家兔眼前房內注射後所引起的角膜反應不若以前嚴重，細胞內增殖的立克次體數目亦不如在東京發育的豐富。日本學者認為這種變化可能是因氣候的影響所致。至於廣州市所發現的恙蟲熱立克次體究竟與日本種（或台灣種）相同或與熱帶亞種相同，或介於二者之間的問題我們尚不能證明，惟：（1）1946—1948 年廣州市恙蟲病人死亡率為 50—60%^[1,2]；（2）每個患者均有一個以上的焦痂（Eschar）及嚴重的皮膚斑疹^[3]；（3）動物致病性較強，如小白鼠腹腔滲出液及脾臟的塗片檢查可發現大量細胞內堆集的立克次體，家兔眼前房注射後，引起的嚴重的角膜炎及對豚鼠有致病性。根據以上三點可以推斷廣州市發現的恙蟲熱立克次體可能與日本種（或台灣種）相近，而較熱帶種^[9] 的毒力為強。

2. 根據上述的試驗結果，雞胎卵黃囊在分離恙蟲熱立克次體的試驗上，比較小白鼠接種試驗易獲得陽性結果。例如表 3 所述 17 份分離試驗中有 10 份是陽性 7 份是陰性。至於雞胎分離培養陰性結果，常係因手續不嚴密以致血液中若含有極少量雜菌的污染，接種後的雞胎受雜菌感染即行死亡，而小白鼠則有較強的抵抗力，少數雜菌的污染可不影響小白鼠的試驗結果，此外在雞胎培養過程中，我們容易掌握溫度的條件（33°—35°C），恙蟲熱立克次體的毒力，不致因溫度的影響而引起變異。從我們的經驗中證明恙蟲熱立克次體在雞胎卵黃囊內一般地發育良好，且不引起雞胎死亡，雖經 20 代以上的傳代接種，對於小白鼠腹腔內和靜脈注射，仍能保持其不變的致病性。如前面的試驗所證明，若將含有豐富恙蟲熱立克次體的雞胎卵黃膜懸液作成 1：50 液接種於小白鼠靜脈後，在 4—6 日即有規律的使小白鼠感染發病，90% 以上死亡。此項方法可以獲得豐富的恙蟲熱立克次體。根據 Smadel 等^[11] 的報告，用小白鼠靜脈注射的方法適合於恙蟲熱疫苗的大量製造；由我們的試驗看來，以雞胎卵黃膜培養的恙蟲熱立克次體充作大

量小白鼠靜脈接種材料，實較用感染小白鼠的肝臟或脾臟懸液為便利，且能獲得較優良的結果。在分離培養時最好能同時並用雞胎及小白鼠接種二種方法，則更為可靠。

3. 從上述分離培養的結果，病人材料中有 39 份為陽性，恙蟲中有 6 份為陽性，鼠類有 10 份為陽性。由三種不同來源分離所得的恙蟲熱立克次體不論在形態學或動物致病性上都無顯著差別。所以我們認為廣州市恙蟲熱的流行病學上的三種重要環節，即病人、傳染媒介、和保藏宿主三者間有其一定的聯繫關係。由於小鼠經口傳染試驗，初步證明恙蟲熱在鼠羣中可以因互相殘殺剝食而連續的發生傳染（或隱性傳染），不必完全依賴傳染媒介。這種傳染可能是經口腔創傷而引起的。遇有適當的機會即可以引起新的鼠羣流行而逐漸波及人類，因此更進一步說明大力捕鼠可以相對的減少恙蟲熱對於人類傳染的威脅。同時試驗室處理傳染性的動物屍體及防禦細菌戰時，必須將動物屍體燒毀或經有效的消毒手續後始可埋藏土中，以保無虞。

4. 由於實驗室傳染的一例觀察所得，我們相信恙蟲熱的傳染可以由健康粘膜組織侵入，亦不必以恙蟲為傳染媒介。凡含有恙蟲熱立克次體的材料如病人血液，受感染的動物臟器或體液，經過刺傷皮膚或侵入眼結膜、口腔或鼻腔粘膜，均可以引起傳染，初期硬結及潰瘍或焦痂（Eschar）往往缺如。此外在診斷上患者發熱初期的血片檢查厚滴標本可能是一個早期診斷的方法，可惜我們的經驗太少，希望臨床學者向這個方向試驗。一般試驗室傳染均較自然感染的為嚴重，但由本例觀察，早期口服氯黴素，可以縮短病程，保障工作人員的安全。

結 論

1. 本文敘述廣州發現的恙蟲熱立克次體的分離培養及對於各種動物的致病性。根據初步形態學血清學及動物試驗證明了從病人材料、恙蟲體及鼠體三種來源分離的立克次體為屬於相同種屬的恙蟲熱立克次體，初步說明廣州市恙蟲熱流行病學與傳染媒介及病原保藏宿主的關係，此種恙蟲熱立克次體和日本種（或台灣種）相近，而較東南亞地區亞種的毒力為強。

2. 用雞胎卵黃囊接種方法培養恙蟲熱立克次體，在初步分離與保存苗種方面，均較適宜。在大量製造恙蟲熱疫苗工作上，以感染的卵黃囊接種小白鼠靜脈，較易獲得良好結果。

3. 小鼠經口傳染證明了鼠類互相殘殺剝食可以連續不斷的使恙蟲熱在鼠羣中發生傳染而威脅人類，並推論到捕鼠是減少恙蟲熱流行的重要因素。

4. 從實驗室傳染的病例觀察所得，恙蟲熱立克次體能經眼結合膜而引起感染。

5. 初步總結了恙蟲熱立克次體的保存方法。

聲明和致謝

(1) 本文中一部分試驗工作尙有林全勝、邢祖培、黃爾秀、周素蘋、楊少娟、孫任等同志參加，特此聲明。

(2) 本文所刊圖片，承北京中國協和醫學院病理科蔣漢澄同志惠予攝製，謹此致謝。

參 考 文 獻

- [1] 彭淑景、謝敏貞，中山醫報，1949，4(1,2)，3—6。
- [2] 施復蒼，中山醫報，1949，4(1,2)，18—31頁。
- [3] 朱師晦、張孝、曾梅輝、張元銘，中華醫學雜誌，1950，36(10)，421—423。
- [4] 梁柏齡、張念堯，廣州衛生，1951，1(5,6)，294—297。
- [5] 趙樹萱，中山醫報，1952，7(3,4)，147—152。
- [6] Hayakawa, Kiyoshi (早川清) and Hokari, Kishio, A comparative study of Japanese and Tropical (Scrub Typhus) Tsutsugamushi Diseases (*R. orientalis* var. *tropica*), 1947.
- [7] Ogata, N. (緒方規雄), *Zentralbl. f. Bakt. Parasit und Infect*, 1931, 122 (1st Abt. Orig), 249.
- [8] Nagayo, M. (長與) Miyagawa, Y., Mitamura, T., Tamiya, T., Sato, K., Hazato, H. and Imamura, A., *Jap. Jour. Exp. Med.* 1931.
- [9] Blake, G. E. et al. *Am. Jour. of Hygiene*, 1945, 41, 31.
- [10] Maxen, K. F., *Rickettsia Disease of Man*. 1948, 36-46.
- [11] Smadel, J. E., Rights, F. L. and Jackson, E. G., *Soc. Expt. Biol. and Med. Proc.* 1946, 61, 308.
- [12] Plotz, H., Bennett, B. L. and Reagan, R. L., *Soc. Expt. Biol. and Med. Proc.*, 1946, 61, 313.

STUDIES ON RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI ISOLATED IN CANTON

CHAO S. H., CHAO C. F., HSU C. K., WU C. W. and YANG S. Y.

National Vaccine and Serum Institute, Peking

This paper describes the isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* in Canton city, China and its pathogenicity to experimental animals. For isolation, developing chick embryos were used. White mice, hamsters, guineapigs, rabbits and monkeys were found to be susceptible by intracutaneous, intraperitoneal, intravenous or intraorbital (anterior chamber of the eyes of rabbits) inoculations. Strains isolated from patients, mites (*Trombicula deliensis*), rodents (*Rattus rattus*, *Rattus norvegicus*) and shrews (*Suncus murinus*) were found to be identical serologically. They were identified as *Rickettsia tsutsugamushi*.

For the production of vaccine, white mice were used. They were infected by intravenous injection of material prepared from infected yolk sacs and the lungs, liver and spleen were taken on the 5th day or so just before the death of the animal for the preparation.

It was found that healthy mice could be infected by allowing to feed on the carcasses of infected ones and this finding may be of importance in the natural transmission of the disease among rodents.

A case of laboratory infection through normal conjunctiva following an accident was reported. Preliminary experiments for transportation of the *Rickettsia* and their preservation by freeze-drying have been conducted with satisfactory results.