

# 国内外钩端螺旋体活菌苗研究动态

鲍 行 豪

(浙江省卫生防疫站,杭州)

钩端螺旋体(以下简称钩体)死菌苗,已广泛用于预防人类和各种动物的钩体病,并已取得肯定的效果。然而,在用于动物时,不少学者相继发现,死菌苗虽可防止钩体病临床症状的出现,但尚不足以制止免疫动物肾脏带菌或尿中排菌<sup>[1-4]</sup>。

White<sup>[5]</sup>等认为,制备死菌苗时,由于使用了福尔马林(以下简称福尔马林菌苗)或其它杀菌剂,破坏了钩体表面的外膜抗原,降低了它的免疫原性。Stalheim<sup>[6]</sup>改用钨酸代替福尔马林,虽可使钩体结构保持完整,但死菌苗仍不能制止地鼠和猪的肾脏带菌和排菌,仅能缩短排菌期和减少排菌量。

尿的传播作用,早已被认为是动物与动物,动物与人之间钩体传播的一种主要方式。因此,一种有效的菌苗制剂,除能防止发病外,还应能制止尿中排菌。为了控制传播,各国学者探索有效的钩体菌苗、减毒及无毒活菌苗的研究与试用,就是其中的一个重要方面。

本文试将近年来国内外钩体减毒及无毒活菌苗的研究进展情况,作一简略介绍。

## 减毒活菌苗

### 一、照射菌苗

Hubbert 等<sup>[7]</sup>用 10 万伦琴的  $\gamma$ -射线照射黄疸出血型钩体培养物制成菌苗(简称照射菌苗),接种 12 只豚鼠,免疫后 24 天用同型强毒株攻击,其中 11 只豚鼠未出现任何症状。心血及肾组织培养均为阴性;对照组全部发病,6 只死亡,心血培养有 6 分为阳性,肾组织培养有 7 分阳性。作者同时用照射菌苗,福尔马林菌苗和超声波处理菌苗(以下简称超声波菌苗)进行

比较试验,结果表明,后两种只有不完全保护作用,而照射菌苗则有完全保护作用,即不仅可防止发病和死亡,还能消除带菌状态(表 1)。

表 1 三种菌苗的保护作用

种 类	试验豚鼠数	临床表现		培养结果	
		发病	死亡	阳性血培养	阳性肾培养
照射菌苗	12	1	0	0	0
福尔马林菌苗	13	4	2	3	2
超声波菌苗	11	7	1*	4	2
对照组	13	3	6	6**	7

\* 心脏穿刺时死亡。

\*\* 仅进行了 6 分血培养。

Stalheim<sup>[6]</sup>将两株波蒙那钩体(*Leptospira pomona*)培养物,用  $\gamma$ -射线照射后免疫地鼠及小猪,14 天后用同型有毒株(MLS 及 Wickard 毒株)活菌攻击,发现全部用 MLS 攻击的 20 只豚鼠均未发病,亦未出现肾脏钩体病;然而用嗜肾株 Wickard 株攻击的 20 只豚鼠,则有 11 只肾脏带菌;被攻击的 14 只小猪,有 12 只获得完全保护。但是,用另一菌株 DM<sub>2</sub> 株的照射菌苗免疫的 14 只小猪中,有 2 只肾脏带菌。在他的实验中,对照组所有地鼠及小猪全部发病或死亡,肾脏中均可检出钩体,肾组织均有钩体病的组织学变化。

Castelli 等<sup>[8]</sup>报道,用 20 万拉特剂量的 <sup>60</sup>Co 照射黄疸出血型钩体强毒株(Policlinico)及弱毒株(Dellatte)培养物获得活菌苗,分别免疫 15 只豚鼠,21 天后用同型强毒株攻击,结果分别有 12/15 和 11/15 存活,两种照射菌苗之间无显著差别;对照组 9/10 死亡,存活的一只也表现肾脏带菌。以上实验证明照射菌苗对实验动物

有良好的保护作用。

Babadieri<sup>[9]</sup> 反复比较了照射菌苗和福尔马林菌苗的效果以后,提出了不同的看法。他将黄疸出血型钩体强毒株(Policilnico 株)及弱毒株(Dellatte),波蒙那型钩体弱毒株(New Jersey)等的培养物通过钴弹处理制成照射菌苗,同时做成福尔马林菌苗。将这些菌苗分别免疫豚鼠,每组 20 只,21 天后用 Policilnico 株攻击。结果发现,黄疸出血型钩体强毒株的照射菌苗和福尔马林菌苗对豚鼠都只有部分保护作用,两种菌苗的保护作用之间没有统计学差异;而弱毒株的照射菌苗,比相应的福尔马林菌苗对较多的动物有保护作用,但两种菌苗的作用亦无统计学上的差异。用波蒙那钩体制成的两种菌苗,看起来效果虽比上述菌苗差,但对黄疸出血型强毒株的攻击有显著保护作用,不过两种菌苗间亦无差异。这些实验证明,照射菌苗并不比福尔马林菌苗好。

作者认为,至少在豚鼠试验中,照射菌苗不比福尔马林菌苗更好。照射菌苗不能完全防止肾脏带菌;又不能长期保存,必须立即使用。因此,用照射菌苗代替福尔马林菌苗,在实际上并无多大优越性。但试验证明,照射菌苗是完全安全的,不引起豚鼠的钩体病及肾脏带菌,接种后 21 天活杀检查未见病理改变。

## 二、链霉素菌苗

Stalheim<sup>[6]</sup> 以 60 微克链霉素处理波蒙那钩体 DM<sub>2</sub> 培养物制成的菌苗(简称链霉素菌苗),不能在体内或体外繁殖,链霉素只对钩体的动力及呼吸有少许影响。当用链霉素菌苗接种地鼠和小猪,14 天后用强毒株攻击,能保护 16/20 的地鼠及 7/7 小猪不死;免疫组的地鼠,除去嗜肾的 Wickard 株攻毒时有少数肾脏带菌外,其余活存动物肾组织培养均为阴性;而对照组全部发病或死亡,死亡动物肾组织培养均为阳性。这证明此种链霉素活菌苗有良好的免疫原性。

## 无毒活菌苗

Буховед<sup>[10]</sup> 曾用 15 毫升无钩的流感伤寒型钩体无毒株培养物注射给黄鼠,不致病,却有良

好的免疫原性,可使接种动物抵抗有毒株攻击。作者用这株无钩无毒株制成活菌苗,以 0.05—1 毫升分别接种 500 只黄鼠,则免疫动物可抵抗 200 倍致死剂量有毒株的攻击。用此菌苗接种 3.5—4 个月的乳牛,无一发热,乳牛仍生长良好,2 周后血、尿检查均未发现钩体。即使用大剂量有毒株攻击,乳牛也不发病。试验还证明,用无钩无毒活菌苗皮下接种一次,活菌可在试验动物体内存在 6 天,在这期间,可以有规律地从接种动物血液及注射部位找到该菌,也能从肝、脾、肾中分离到同型钩体。因此,作者肯定了无钩无毒株动物试验的预防效果,这为制备无毒活菌苗提供了新的途径。

Stalheim 等<sup>[11]</sup> 分别将 5 株波蒙那型钩体在改良 Tween 综合培养基上转接 4 次,发现其生长速度、生长量及抗原性等,均与在含兔血清培养基上生长的相同,但已失去对地鼠、豚鼠、猪和牛的毒力。再将此失毒株在上述综合培养基上连续转接 3 次,或在地鼠体内通过 2 次,均未发现毒力恢复。因此,作者认为可用此无毒株作免疫原,制备活菌苗。此后,Stalheim 等<sup>[12,13]</sup> 连续数年用波蒙那钩体无毒株 DM<sub>2</sub> 制成活菌苗,先后在地鼠、猪与牛中试用,结果证明,该菌苗有足够的保护力,在观察期间未见任何毒性。

作者进一步对无毒活菌苗的安全性及其不感染性的稳定程度作了研究。给猪和牛分别接种 50—75 毫升和 250 毫升,未引起钩体尿症和肾脏钩体病;给孕牛接种,不使孕牛流产和产生畸胎,小牛出生后一切正常;血液时无钩体抗体,其尿及肾组织均未检出钩体。证明大剂量接种对猪及孕牛也是安全的。

活菌苗接种后 14 天的地鼠、猪及牛,用同型毒株及嗜肾株攻击。结果发现对 MLS 毒株攻击的地鼠具有完全保护;用嗜肾的 Wickard 菌株攻击,有 21/24 的地鼠获得完全保护,仅 3 只出现肾脏带菌;对照组地鼠全部死亡,由死亡动物中都分离到钩体,并有肾组织损害。

用波蒙那钩体 Ohio 及 DM 毒株攻击用活菌苗接种的 16 头猪和 13 头牛,均获完全保护;对照组则全部发病,并出现钩体尿症及肾脏钩

体病,肾组织有肉眼可见及显微镜下的病变。

以上事实表明无毒活菌苗的免疫原性很强。

Ryu 等<sup>[49]</sup>用小白鼠及豚鼠试验了活菌苗和经福尔马林、石炭酸及加热杀死的菌苗,发现这两类菌苗对动物的免疫原性无显著差别。

国内有关钩体活菌苗的研究工作开展较晚。应溥康等<sup>[50]</sup>于 1975 年获得一株无钩的 N 株和一株有钩的 L 株,经鉴定均为波蒙那型。N 株除形态特殊外,对实验动物均无致病力,接种动物后可在其血液中停留 1—4 天,以后即消失,剖检动物各脏器均不带菌,具备作活菌苗的条件。此后他们用 N 株的 13 天培养物制成活菌苗,以 0.5 毫升一次皮下接种作地鼠保护力试验,14 天后用同型强毒株 0.5 毫升攻击,结果 10 只被免疫地鼠全部活存,剖检无病变,肾培养均为阴性,而对照组 80% 死亡,存活的 100% 肾脏带菌。这证明 N 株活菌苗有高度免疫力,并可阻止肾脏感染,其免疫持久时间至少 8 个月。用 N 株 1:20 稀释的活菌苗 0.5 毫升皮下免疫地鼠,就能有效地保护动物经受波蒙那型强毒株的攻击。他们还证实用 N 株活菌苗作皮下接种免疫一次,其对异型株的交叉免疫性可使动物推迟死亡,减轻病情;免疫二次对犬群、致热群和流感伤寒群毒株的攻击均有不同程度的保护作用,对黄疸出血群和秋季群菌株的攻击则不能抵御。用 N 株活菌苗接种小猪,观察 60 天,用多种方法试验,证明该活菌苗是安全的。

林亚杰等<sup>[46]</sup>用小猪作保护试验,也证明可给小猪以高度免疫力,但其保护时间不到 2 个月。王枢群等<sup>[47]</sup>从 34 株波蒙那型钩端螺旋体菌株中筛选出一株弱毒株  $L_{18}$  菌株。用它制成活菌苗,接种地鼠不发病,但在体内可存留 3 天,而在地鼠体内只能传一代。用培养基及地鼠交替传十代,再感染地鼠,仍不引起发病,  $L_{18}$  株在地鼠体内只能停留 3 天,说明虽经传代,仍未见毒力增高。用  $L_{18}$  株制成活菌苗,以总剂量 1.5 毫升分一次或二次免疫地鼠,14 天后攻毒,均获完全保护作用,而对照组全部死亡。还证明  $L_{18}$  活菌苗的免疫持续时间可达 9 个月。他

们<sup>[48]</sup>又进一步作了仔猪和半成猪的免疫力试验,证明  $L_{18}$  活菌苗有很强的免疫力。

国内研究结果表明,我国选出的 N 株和  $L_{18}$  株,经对地鼠的毒力、毒力稳定性、免疫力及其持久性试验,以及对仔猪、半成猪的保护力及免疫力试验,证明此类无毒菌株用于兽用活菌苗的制造是安全有效的。

## 几点说明

关于无毒活菌苗,尚须说明几个问题。

### 一、抗原性与免疫性

用显微镜凝集试验和凝集素吸收试验证明,在综合培养基中生长的波蒙那钩体无毒株,其抗原性与在含有兔血清培养基中生长的完全一样,抗原性丰富。当加热杀死免疫家兔,可产生高效价 ( $1:10^2$ ) 的血清抗体。用无毒活菌苗免疫地鼠、猪及牛,被免疫动物产生血清抗体效价,除在地鼠中较低 ( $1:30$ ) 外,均为  $1:10^2$ — $1:10^3$  (几何平均效价)。

由上所述,无毒活菌苗对试验动物有很好的保护作用,又可诱生较高水平的血清抗体,证明无毒活菌苗具有强的免疫原性。但它们的免疫机制尚不清楚。通常活菌苗免疫动物产生抗体的水平,较死菌苗免疫时为高。至于对肾脏钩体病的免疫性是否与较高水平的血清抗体有关,根据现有资料,尚不足作出定论。免疫性可能是体液免疫作用;也可能包括某些细胞免疫;或是由于活钩体在机体内产生了毒素,毒素的抗原性诱生了免疫性。虽然尚未证实无毒波蒙那钩体在体内可以繁殖,但已观察到它在地鼠体内可以活存 72 小时或更长时间。而无钩无毒的流感伤寒型菌株,可在机体内活存 6 天<sup>[40]</sup>,而 N 株可存留 4 天。因此,可能是由于活钩体存在的刺激作用,造成了较高水平的抗体反应。

### 二、免疫性的持续时间

据 Stalheim<sup>[42]</sup> 的试验结果表明,无毒波蒙那钩体活菌苗的免疫性,在地鼠中可持续 3 个月(最长观察时间),在猪、牛体内分别为 7 个月和 14 个月。而无钩无毒的流感伤寒型活菌苗,在黄鼠体内免疫性的持续时间可达 18 个月<sup>[40]</sup>,

波蒙那型N株在地鼠体内免疫持久期至少8个月,但在猪体中则不到2个月。这表明无毒活菌苗免疫性持续时间也是比较长的。

### 三、保存问题

在活菌苗的保存期间,要求活菌不会减少太多,免疫原性不受影响。Stalheim<sup>[13]</sup>证明,用10%甘油作保护剂,将波蒙那钩体无毒活菌苗密封在安瓿中,经控速冰冻后贮于液氮中,6个月后活菌数仅减少10—100倍。

Alexander<sup>[19]</sup>将加有10%甘油的犬型钩体安瓿,以每分钟降温65℃的速度迅速冰冻至-130℃,然后贮存在液氮冷冻器的蒸发部分,冻后1天,活菌数降低10—100倍,以后存放5年,活菌数基本无变化,血清学特性亦无改变。作者用此法保存103个血清型培养物,除9个外,其余保存7—38个月均能存活。试验中曾用糊精,维生素C、牛血清白蛋白等作保护剂,效果均差。有的学者曾用甘油和兔血清作保护剂,发现犬型钩体贮存22个月后,死亡数极少。但因兔血清具有过敏原性,未作进一步试验。而Буховед将无钩无毒流感伤寒型钩体活菌苗存放在室温中12个月仍可应用。

就其它种类活菌苗来说,仅需接种一次,就能获得持久的免疫力。这是因为机体接受活菌苗接种,其所引起的后果实际上是一次轻型感染,由此即可产生坚强的免疫力。但是钩体活菌苗在这些方面还未作出肯定的结论。特别是一种兽用活菌苗却未必适合于人用。由于人或许对钩体的感染是最为敏感的生物。对敏感动物无致病性的菌株,对人则可显示出毒力。1938年van Thiel就曾报告过这样的事实,有5名刚果黑人,接受一株对豚鼠无致病力的Coppee株钩体的活菌苗接种后,全部发生了感染,其中一人病情还特别严重。

人类感染尚有一点与动物感染不同,因前者引起肾脏带菌并不构成流行病学上的威胁。而在家畜,特别是猪和牛群中则与此相反。故兽用菌苗应着重解决肾脏带菌问题。

从以上现有不多的资料来看,目前钩体活菌苗的研究还只停留在动物试验研究上,至今

仅有一次人体试验的失败报道。对于动物试验的结果,各国学者尚有不同看法。所以,要广泛使用这种有代谢活性而又不“繁殖”的减毒或无毒活菌苗,还须作进一步研究。

目前国内外使用的死菌苗,对预防钩体病的效果是好的。但所用菌苗要与流行区的菌型一致,否则,由于死菌苗交叉免疫原性不强,效果就不好。

为了克服死菌苗的缺点,我们应着手研制一些新型菌苗。一种理想的钩体菌苗制剂,应该安全;不仅能防病,而且应能制止肾脏带菌或尿中排菌;有足够的免疫力和较长的免疫保持时间,接种剂量应尽可能少;对异型菌株的交叉免疫性应强而广泛。

### 参 考 文 献

- [1] Brunner, K. T.: *J. Immunol.*, **64**: 365—372, 1950.
- [2] Scheidy, S. F.: *J. A. M. A.*, **131**: 366—368, 1957.
- [3] Santa Rosa, C. A. et al.: *Am. J. Vet. Res.*, **25**: 1277—1280, 1965.
- [4] Stalheim, O. H. V. and J. B. Wilson: *Am. J. Vet. Res.*, **25**: 1277—1280, 1965.
- [5] White, F. H. and C. F. Sipson: *J. Infect. Dis.*, **115**: 123—130, 1965.
- [6] Stalheim, O. H. V.: *Am. J. Vet. Res.*, **28**: 1671—1678, 1967.
- [7] Hubert, W. T. and J. N. Miller: *J. Immunol.*, **95**: 759—765, 1965.
- [8] Castelli, M. et al.: *Abs. Hyg.*, **46**: 365, 1971.
- [9] Baoudieri, B.: *Bull. WHO*, **48**: 587—590, 1973.
- [10] Буховед и др.: 转引自《国外医学参考资料(钩体病防治专辑)》,后字236部队编,1971年,第52页。
- [11] Stalheim, O. H. V.: *Am. J. Vet. Res.*, **29**: 1463—1471, 1968.
- [12] Stalheim, O. H. V.: *Am. J. Vet. Res.*, **32**: 851—862, 1971.
- [13] Stalheim, O. H. V.: *Am. J. Vet. Res.*, **34**: 173—174, 1973.
- [14] Ryu, E. and Coll: *Vet. Bull.*, **45**: 563, 1975.
- [15] 应溥康等: 生物制品通讯, **8**: 4—14, 1979.
- [16] 林亚杰等: 同上, **8**: 164—168, 1979.
- [17] 王枢群等: 中国医学科学院学报, **1**: 87—92, 1979.
- [18] 中国医学科学院流行病学研究所钩体病组: 流行病学防治研究, **4**: 289—292, 1978.
- [19] Alexander, A. D., E. F. Lessel and L. B. Evans et al.: *J. Syst. Bact.*, **22**: 165—169, 1972.