

内蒙呼盟地区斑点热立克次体分离 与血清学鉴定

刘国栋* 王冰* 吴益民* 白斯古郎* 巴特** 刘国辉** 娄丹*

1984年我们在内蒙呼盟陈巴尔虎旗呼和诺尔草原,捕获纳氏革蜱(*Dermacentor nuttalli*)进行了病原体分离,从吸血蜱中分出一株立克次体,经动物感染试验和血清学鉴定证明,属于斑点热群立克次体。现将分离与血清学鉴定经过报告如下:

病原体分离

一、标本来源:1984年5月18日在内蒙呼盟陈巴尔虎旗呼和诺尔草原,海拔为576.6米,纬度 $49^{\circ}19'$,经度 $119^{\circ}26'$,自羊草干茎上和牛、羊身上采获纳氏革蜱(*Dermacentor nuttalli*)。

二、分离方法:利用成年雄性豚鼠进行立克次体分离。捕获的纳氏革蜱按吸血和未吸血分组,吸血蜱以20只为一组,饥饿蜱30只,每组两只豚鼠,按常规方法腹腔接种。逐日观察体温和阴囊反应。

血清学鉴定

一、毒株:试验应用的毒株,立氏、北亚、小蛛、派克等四种斑点热立克次体自WHO引进,康氏立克次体由兰州生物制品所转赠。

二、抗原:用于分群鉴定的抗原有点疹伤寒群的普氏立克次体,斑点热群西伯利亚立克次体,恙虫病群恙虫病立克次体以及Coxiella属的Q热立克次体。上述抗原由成都生物制品所,第三军医大学和北京生物制品所提供。为了试验条件一致,本室把分群抗原制成卵黄囊抗原。

三、鸡胚卵黄囊抗原制备:分别将标准毒株接种于4~5日龄的鸡胚卵黄囊内,置33~

35℃培养,按常法收取感染的卵黄囊膜,选用镜检立克次体生长丰富的卵黄囊膜2~3个,匀化后用pH7.4 0.01M PBS稀释,制成10%的悬液,分装小瓶备用,每瓶0.2毫升,置-65℃冰箱中保存,用时每次取出一瓶涂片,用后弃掉。

四、家兔和小鼠抗血清制备:用镜检含卅~卍的立克次体感染卵黄囊膜2~3个匀化,以SPG(蔗糖、谷氨酸、磷酸缓冲液)稀释成5%悬液作为免疫原。家兔(1,500~2,000克)1只和18~20克小白鼠20只(每组5只),腹腔注射1.5毫升(小白鼠0.5毫升),分别于第1、20日各注射一次,30天后放血,分出血清放-20℃下保存备用。血清对照采用正常家兔和小鼠血清,血清用前行56℃30分钟灭活。

五、试验方法:微量间接免疫荧光交互试验^[3]。其操作程序为,先用钢笔将9种抗原逐个点到2×12个圆孔载玻片上,每孔三行,每行3~4个点,含9种抗原与一个对照抗原。自然干燥,用丙酮固定,作为抗原片。以含10%正常卵黄囊的PBS稀释家兔血清(小鼠血清),作二倍系列稀释后加至抗原各孔之上(上复小片擦镜纸)见图1。

置37℃湿盒作用30分钟,自来水洗后,PBS浸洗5分钟,加第二抗体荧光标记物(兔抗鼠或羊抗兔的IgG荧光抗体,上海生物制品所生产,批号83-1,工作单位测定为1:15,用前生产,批号83-1,工作单位测定后为1:15,用前加入0.02%伊文思兰),37℃湿盒染色30分

*沈阳军区后勤部军事医学研究所

*内蒙呼盟兽医工作站

**内蒙呼盟陈巴尔虎旗完工卫生院

**辽宁大学实习生

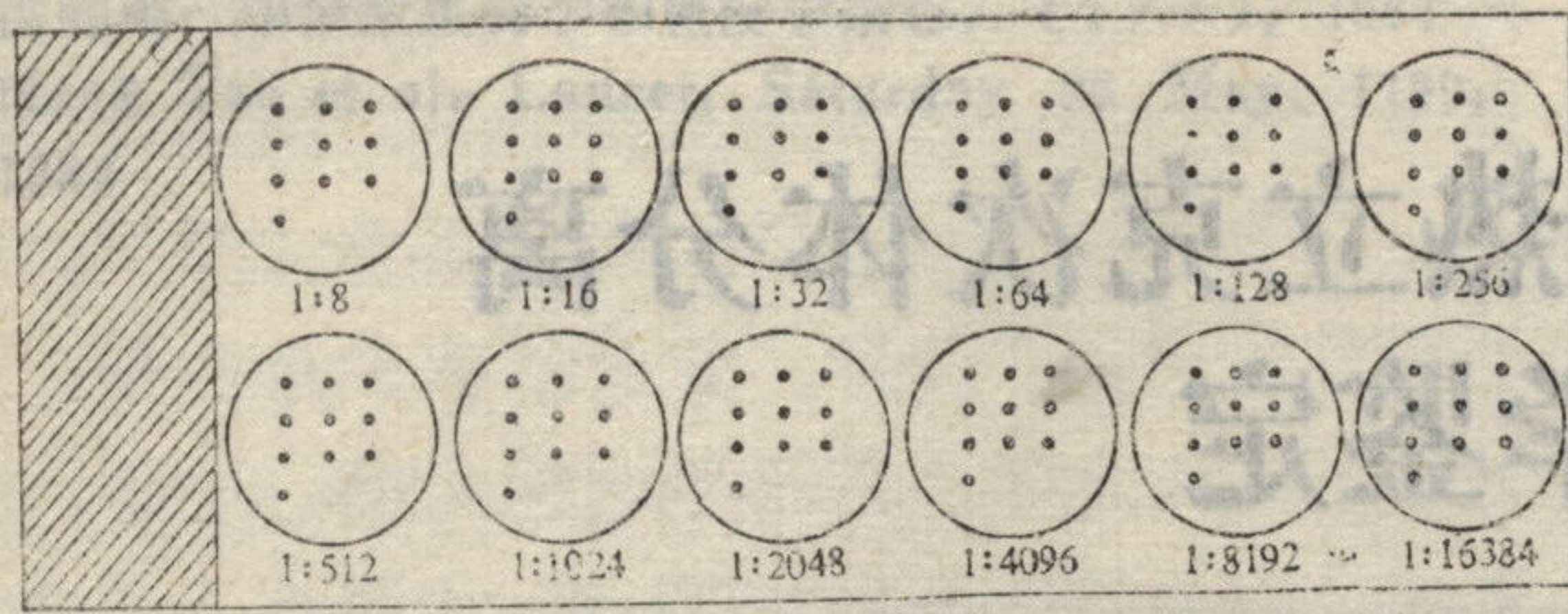


图1 抗原加第一抗体示意图

钟，自来水洗，换PBS浸洗5分钟，干燥后加缓冲甘油封片，用日制的Olympus荧光显微镜检查，结果判定，以在小鼠血清或家兔血清最高稀释度下仍可清楚见到发草绿色荧光的立克次体判定终点，以比终点低一倍的稀释度作为抗体滴度。

试验结果

一、病原体的分离：

1. 豚鼠体温和阴囊反应：吸血蜱组的感染豚鼠在第一代接种后3~4天出现高热和阴肿反应，剖杀后用睾丸鞘膜和脾混合制成20%悬液进行双线传代，均能在传代后第3~4天出现高热和阴肿反应。被感染的豚鼠能作直系传代。分离物多次对豚鼠的实验感染情况，见表1。

表1 呼盟株(G758)对豚鼠的实验感染

实验号	潜伏期(天)	最高温度(°C)	阴囊反应出现时间(天)
G758	4	40.1	4
G771	3	40.0	3
G297	5	39.7	5
G263	4	40.2	4
G929	4	39.9	8
G012	5	39.8	3
平均	4.2	40.0	4.5

从表中所列数据可以看到豚鼠潜伏期为4.2天左右，体温一般在40°C上下。

雄性豚鼠除有规律地表现体温反应外，还能规律地产生阴肿反应，表现为水肿和充血(见图2)。阴囊反应开始不甚明显，以后逐渐增大，用手指推压睾丸不能使其缩回腹腔。发病的豚鼠解剖时，可见到睾丸鞘膜炎，有溢血及渗出液。豚鼠都能恢复健康，无死亡现象。



图2 呼盟立克次体感染豚鼠的阴囊红肿反应

2. 鸡胚传代：将第一代感染的豚鼠材料接种于5日龄鸡胚中，置33°C培养，在4~6天内死亡。死亡后的鸡胚再继续培养24~48小时，解剖取卵黄囊涂片可获立克次体，以后在鸡胚中连续传代，均能规律地引起鸡胚死亡。用20%感染卵黄囊悬液以复制豚鼠的实验感染，能引起典型的体温曲线和阴囊反应(见图3)。

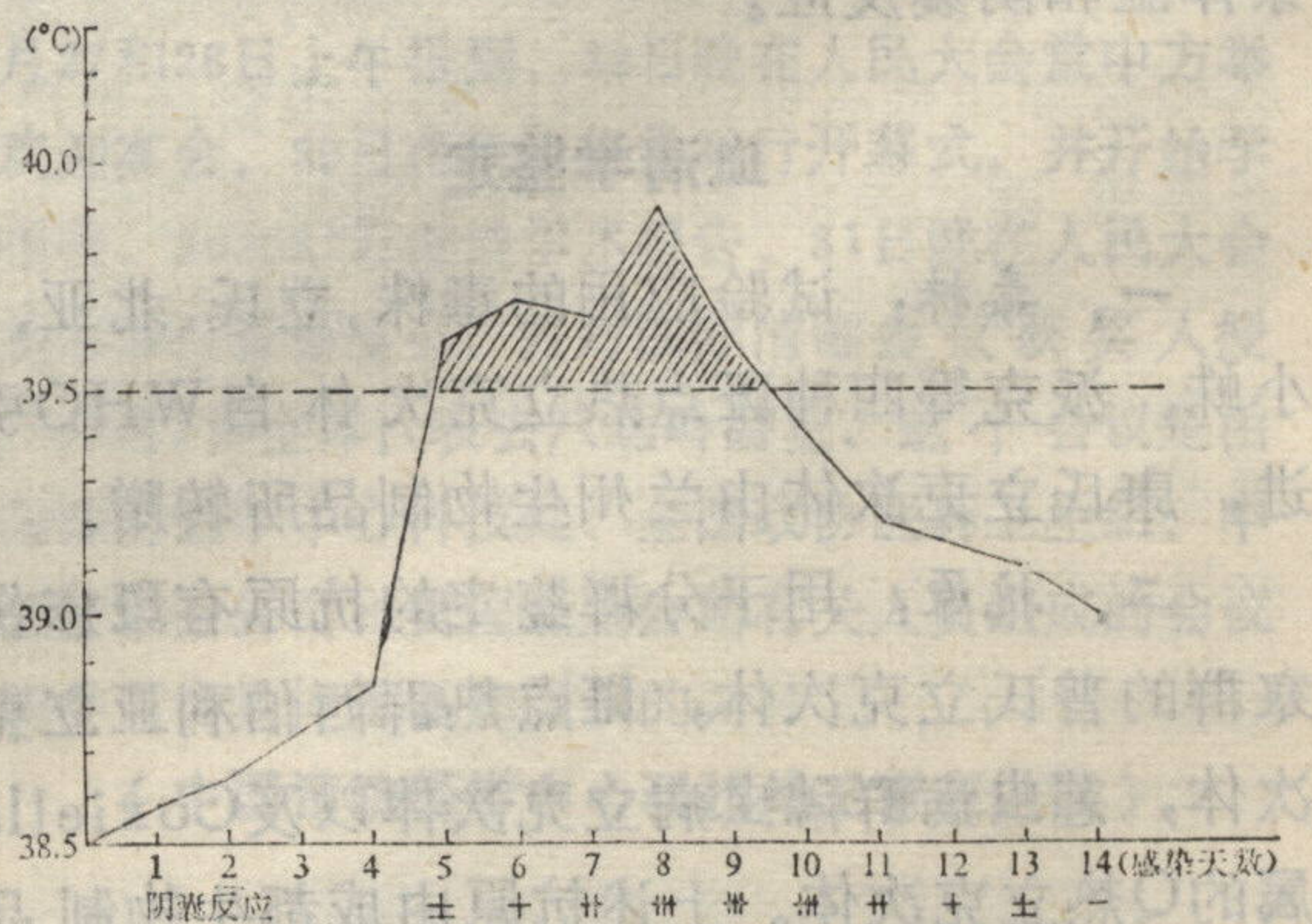


图3 呼盟株感染豚鼠的体温曲线和阴囊反应

3. 立克次体的形态：分离株以间接免疫荧光法染色镜检，呈杆状或短杆状，周围有草绿色的荧光亮圈，位于胞浆中，见图版5页。Giemsa和Macchiavello染色呈红色。

二、血清学鉴定:

1. 分群鉴定: 用呼盟株的家兔抗血清与分群抗原(斑疹伤寒群普氏立克次体为代表株, 斑

点热群为西伯利亚立克次体, 恙虫病群为恙虫病立克次体以及Coxiella属的Q热立克次体)进行微量间接免疫荧光试验, 结果见表2。

表2 呼盟立克次体家兔抗血清与四种群抗原免疫荧光试验结果

群 抗 原	呼株家兔免疫血清抗体滴度									正常兔血清对照 (1:8)
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	1:2048	
斑疹伤寒 R. prowazeki*(W)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
斑点热 R. sibirica(Barbash)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
恙虫病 R. tsutsugamushi(Karp)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Q 热 C. burneti(Henzerling) II相	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
正常卵黄囊抗原对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

* 群抗原代表株, () 株。

试验结果表明: 分离株与斑疹伤寒群、恙虫病群及Coxiella属的立克次体抗原结构不同, 与斑点热群的立克次体有血清学关联, 属于该群成员。

小蛛、康氏、派氏等五种斑点热立克次体和国内过去分离的虎林株[1]、精河株[2], 以及黑龙江立克次体为分型鉴定抗原。用分离株的小鼠抗血清进行微量间接免疫荧光交互试验, 结果见表3。

2. 种的鉴定: 以WHO引进的立氏、北亚、

表3 斑点热群立克次体小鼠抗血清的微量间接免疫荧光交互试验结果

小鼠免疫血清	序号	斑点热群抗原									正常卵黄膜抗原对照
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
立 氏 R株 (1:8192)	1	100*	12	12	19	20	18	20	5	—	—**
北 亚 Barbash株 (1:27307)	2	—	100	50	—	1	1	1	—	—	—
康 氏 Simko株 (1:6827)	3	1	50	100	3	8	6	8	1	—	—
派 氏 Fsuo株 (1:21845)	4	2	3	3	100	8	7	8	1	—	—
精 河 (1:13653)	5	1	9	8	—	100	80	80	2	—	—
虎 林 84* (1:16384)	6	—	4	2	1	83	100	83	1	—	—
呼 盟 (1:54613)	7	1	5	5	19	80	70	100	2	—	—
黑 龙 江 03* (1:15019)	8	3	2	2	1	9	8	9	100	—	—
小 蛛 Kaplan株 (1:16384)	9	—	—	—	—	—	—	—	—	100	—
正常小鼠血清对照	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

注: * 表中数字为各血清型异种抗体占同种抗体滴度的百分比(%), **为1:8阳性, () 为同种抗体三次重复试验的几何平均滴度。

* 84为虎林株, 03为萝北株

由表中可看出,呼盟株与斑点热群中五种立克次体及立克次体黑龙江株抗原结构有明显的差别,但与东北虎林株〔1〕和新疆精河株〔2〕相同,三者为一型。

讨 论

自我国内蒙呼盟地区草原革蜱(*Derma-centor nuttalli*)中分离出一株立克次体,对实验动物有致病性,能引起豚鼠典型的发热和阴囊红肿反应;对鸡胚能规律地引起死亡,并可继续传代。感染动物的睾丸鞘膜、脾脏及鸡胚卵黄囊膜涂片镜检,均可见到立克次体。应用微量免疫荧光试验〔3,4〕,分离株的家兔抗血清与斑点热群抗原发生阳性反应(1:512),但与普氏、恙虫病及Q热立克次体抗原呈阴性反应,表明该毒株属于斑点热群立克次体。

用分离株的小鼠抗血清与自WHO引进的立氏、北亚、康氏、派克、小蛛和国内分离的虎林、精河、黑龙江立克次体为代表毒株,以微量免疫荧光交互试验〔4〕,进行分型鉴定,结果证明,自内蒙呼盟新分离的立克次体株与斑点热群五种立克次体及立克次体黑龙江株的抗原结构不同,存在明显差别。与东北分离的立克次体虎林株〔1〕和新疆分离的立克次体精河株〔2〕相同,三者均为斑点热群中一个新种的成员,同时证明小鼠抗血清具有种的特异性。

本试验所采用的微量免疫荧光技术为Wang(1971)所创建〔3〕,后由Philip(1978)用作斑点热群鉴定,取得较好的结果〔4〕,国内为新建,是先进的,可靠的。

上述新分离的立克次体,在我国内蒙呼盟地区是首次证实。这一证实,无论在理论上和实际上都有着重要意义,对我国斑点热立克次体的分布、流行病学、微生物学及临床研究提供了科学依据;对在野外施工、执行任务中预

防蜱传疾病有指导作用。

摘 要

本文报告自我国内蒙呼盟地区分离的一株立克次体,经动物试验和初步血清学鉴定,证明属于斑点热群立克次体。以分离株的小鼠抗血清与自WHO引进的五种斑点热立克次体及国内三个地方株应用微量间接免疫荧光交互试验〔3,4〕作了分型鉴定,结果表明呼盟株与斑点热群中立氏立克次体、北亚立克次体,派氏立克次体、康氏立克次体、小蛛立克次体及立克次体黑龙江株的抗原结构不同,存在明显差异,但与国内过去分离的虎林株〔1〕、精河株〔2〕相同,可能是斑点热群中一个新种的成员。

ABSTRACT

This paper reported that a strain of *Rickettsia* which was isolated from Hu Meng, Inner Mongolia Autonomous Region in China was proved to be Spotted Fever *Rickettsia* (SFR) by animal test and general method of serological identification. The results of indirect microimmunofluorescence cross test, which was carried out by using mouse species antibodies and 5 species of SFR which were obtained from WHO or 3 species of other region in China, showed that the strain of Hu Meng was clearly differentiated from the other members of SFR in structure of antigen, eg, *R. prowazeki*, *R. sibirica*, *R. rickettsii*, *R. akari*, *R. conori*, and Helonjiang strain. But it was identical with Hulin strain and Jinghe strain. The all of these three strains were a new strain among SFR.

参 考 文 献

1. 王基钦等: 卫生流行病学专题总结选编(1955~65) 93~97页, 沈阳军区后勤部军事医学研究所, 1965
2. 孔昭敏等: 微生物学通报, 9(1): 11, 1982
3. Wang SP: A micro immunofluorescence method P 273. Study of antibody response of TRIC organisms in mice. In trachoma and related disorders caused by chlamydial agents. Edited by R.L. Nichols, Excerpta Medica, Amsterdam, 1971
4. Philip RN et al: J Immunol, 121(5): 1961, 1978
(张兴旺副研究员协助蜱种鉴定, 在此表示感谢)

湖南衡阳地区新轮状病毒腹泻的流行病学观察

(正文见261页)

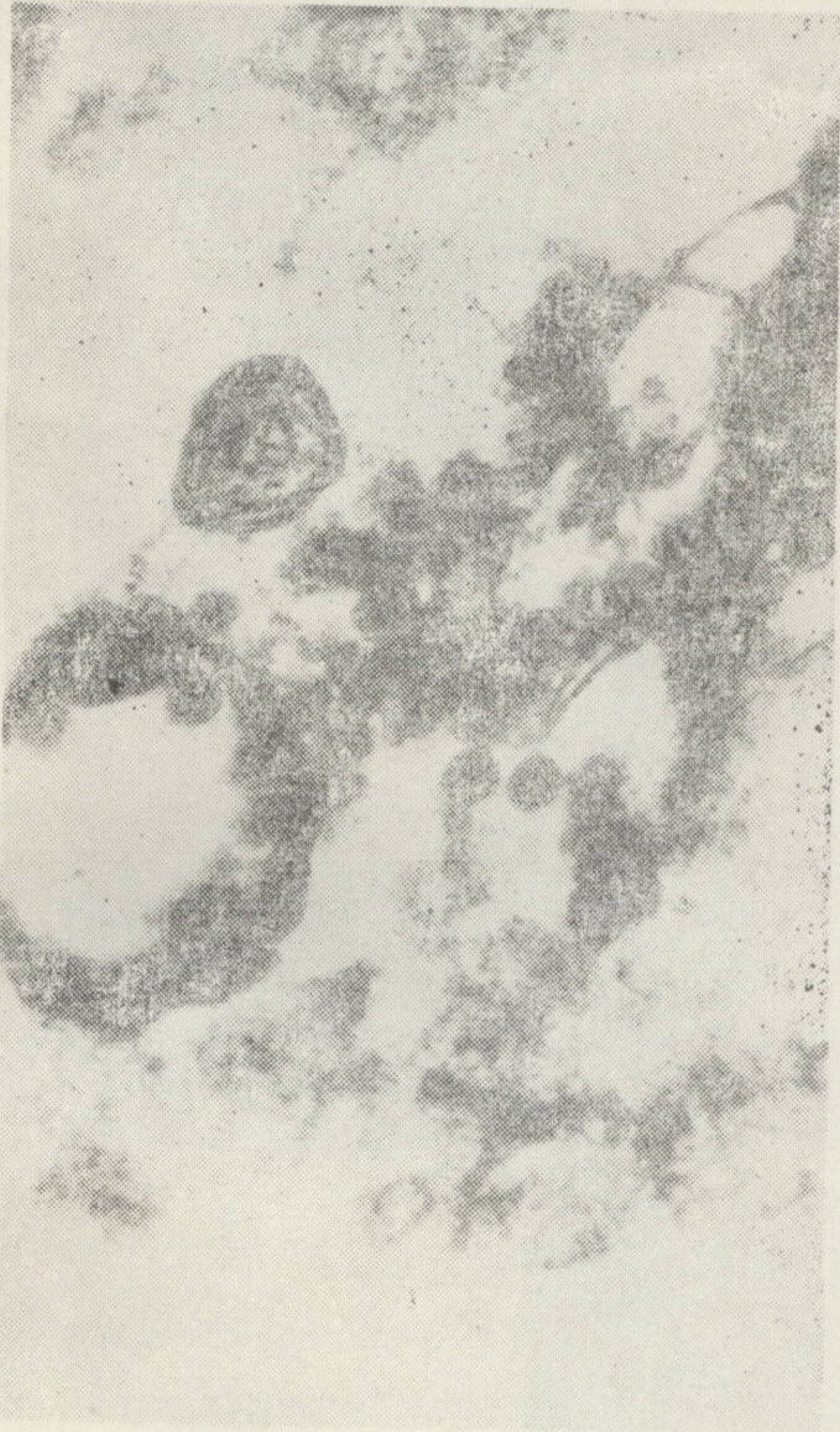


图1 普通轮状病毒薄切片电镜照片 ×60,000



图2 新轮状病毒薄切片电镜照片 ×60,000

内蒙呼盟地区斑点热立克次体分离与血清学鉴定

(正文见265页)

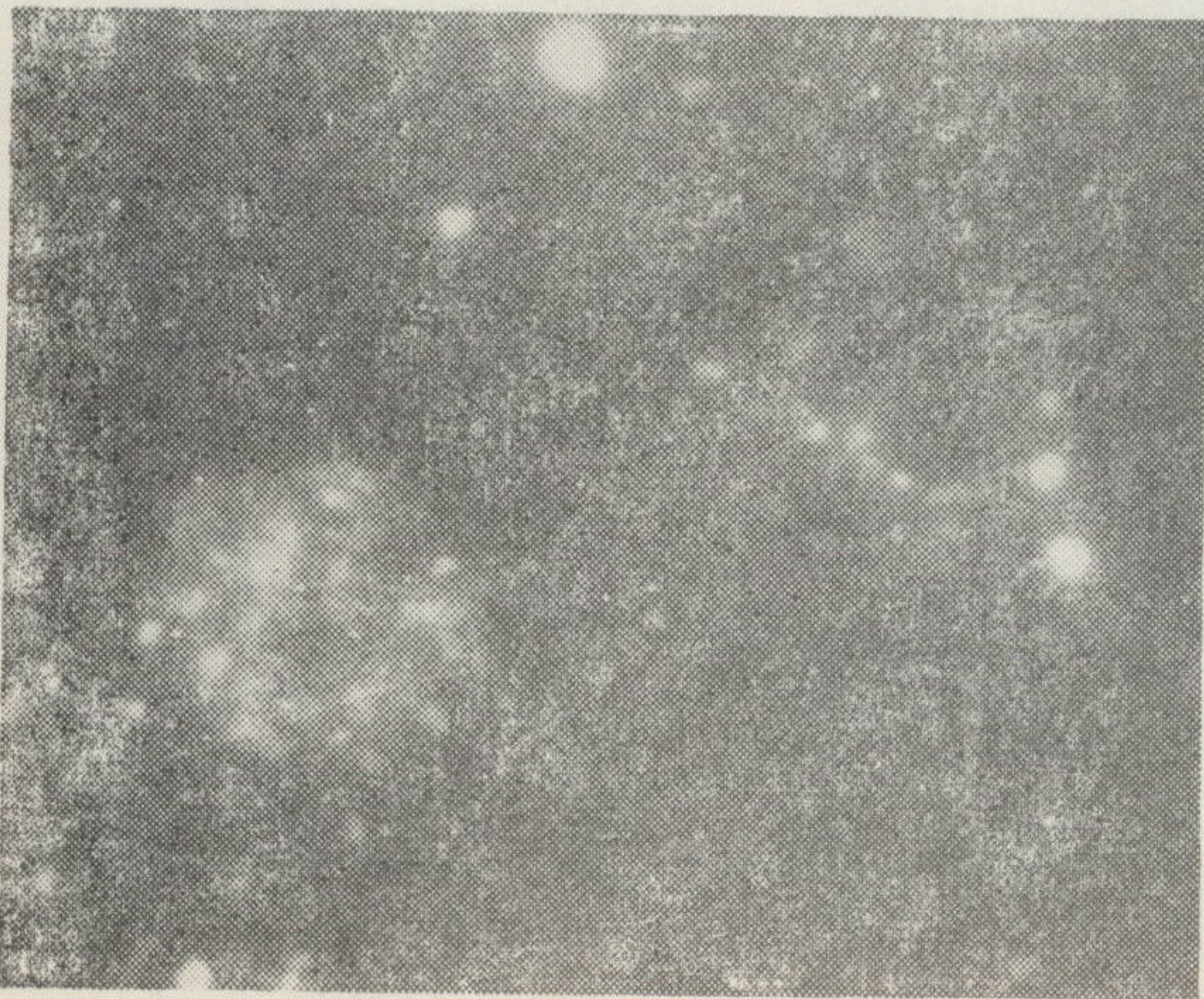


图4 呼盟立克次体感染豚鼠的睪丸鞘膜涂片 ×1,000

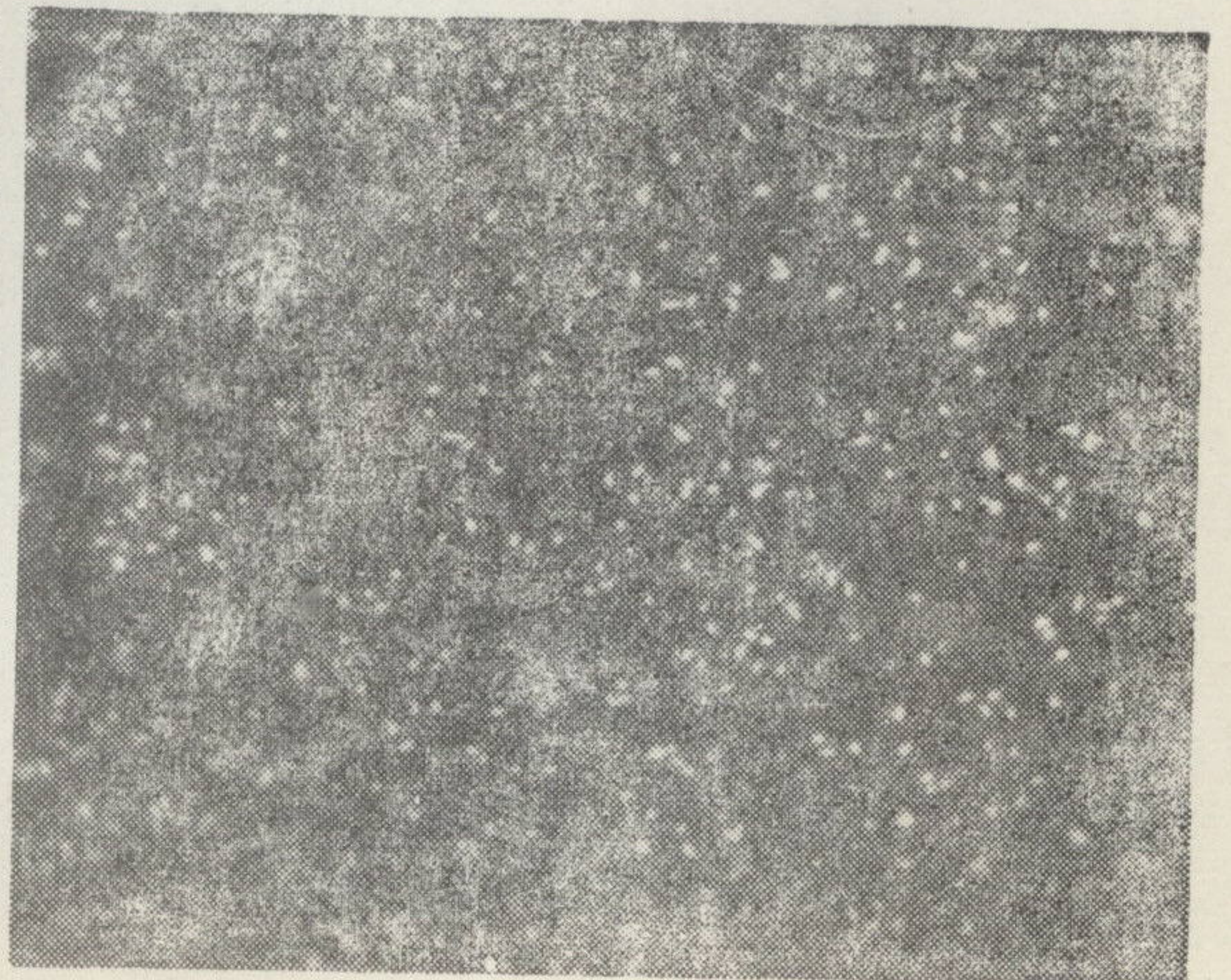


图5 呼盟立克次体感染鸡胚的卵黄囊涂片 ×400