

内蒙通辽市斑点热群立克次体W-88株的分离与鉴定

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所

毕德增 范明远 于学杰 陈伟 赵立成 蔡虹

提要 1988年我们自通辽市一例发热、头痛、临床诊断为“上感”、用青霉素、病毒灵治疗无效的病人，分离出一株斑点热群立克次体W-88株。经动物感染试验、鸡胚卵黄囊培养和传代，达到立克次体纯培养，用泛影葡胺密度梯度离心纯化，制出立克次体抗原，用我室建立的抗西伯利亚立克次体群和种特异性单克隆抗体进行免疫荧光检测，与斑点热群立克次体7株国际标准株同从中国分离株对比鉴定。结果确定W-88株为西伯利亚立克次体，该例病人所患的疾病属北亚蜱传斑点热，此为我国在城市发现的北亚热病例首次报道。

关键词 斑点热群立克次体 西伯利亚立克次体 单克隆抗体

在我国经病原学证实的立克次体病，有流行性、地方性斑疹伤寒，恙虫病，斑点热及Q热五种〔1〕。其中蜱传斑点热群立克次体病是我国近几年在西北和东北地区新发现的病种〔2〕。

1958年从内蒙阿巴嘎旗居民血清中，首次查出有北亚热和立克次体痘的抗体〔3〕。1962年从黑龙江虎饶地区的东方田鼠〔4〕，1974年从新疆精河县草原革蜱〔5〕先后分离出斑点热群立克次体。其后从不同地区多种蜱中也分离出该立克次体。直到1984年才从新疆精河县斑点热病人中首次分离一株立克次体（同时从当地草原革蜱中也分离出来）〔6〕。1985年从内蒙呼盟陈巴尔虎旗病人中再次分离出一株（同时从当地草原革蜱卵中也分离出来）〔7〕。上述从病人分离的病原体经蛋白免疫印迹试验，证明均属西伯利亚立克次体〔8〕。1988年我们从内蒙通辽市病人中分离出第三株该立克次体，用单克隆抗体免疫荧光检测，证明亦属西伯利亚立克次体。

材料与方法

一、材料：

1. 菌株和单克隆抗体：斑点热群立克次体中国分离株，包括我室1984年自新疆精河县分离的An-84（人株）、FT-84（草原革蜱雌蜱）、MT-84（同前雄蜱）；1985年自内蒙陈旗分离的Se-85（人株）、TO-85（同前蜱卵）及1988年自内蒙通辽市分离的W-88（人株）共6株；另国内参考株——JH-74（同前蜱株）。斑点热群国际标准株，包括小蛛立克次体、澳大利亚立克次体、派克立克次体、西伯利亚立克次体（232人株与246蜱株）、康氏立克次体及立氏立克次体共7株。

2. 试剂：牛血清白蛋白、DNA酶I、复方泛影葡胺；羊抗鼠IgG、兔抗人IgG及羊抗兔IgG荧光抗体。

3. 单克隆抗体：斑点热群特异性McAb C₁₁-C₂亚类为IgG₃、西伯利亚立克次体种特异性McAb C₁₁-D₁亚类为IgG_{2a}均本室自制。

4. 立克次体抗原及免疫血清：包括斑点热群、斑疹伤寒群、恙虫病群及Q热18种抗原及抗血清。

*本课题为国家自然科学基金资助项目

5. 实验动物：小白鼠（符合一级标准）20克、豚鼠雄性300~350克、受精鸡蛋均为本所动物室提供。

二、方法：

1. 豚鼠感染试验：取病人静脉血分离血清，血凝块10%肉汤悬液腹腔接种雄性豚鼠2只，其中1只于发热高峰期取其心血接传第2代，另1只于4周后检查血清抗体。

2. 鸡胚卵黄囊传代试验：取血块肉汤悬液接种孵化6天的鸡胚卵黄囊内，34.5℃孵育，4~5天死亡再继续孵育48~72小时，使立克次体最大限度增殖（++~+++），卵黄囊膜涂片Giemn ez染色镜检，挑选制备抗原。

3. 立克次体抗原纯化：参照 Hanson方法〔9〕略作改进，卵黄囊膜先制成匀浆，低速（150×g）高速（22 500×g）差速离心，6%牛血清白蛋白处理1小时，再行差速离心，沉淀物用DNA酶I消解，再高速，其沉淀物加32~36~45%浓度的泛影葡胺进行密度梯度离心（65 000×g）75分钟，在离心管中的轻、重两条带分别取出，用SPG液（蔗糖、磷酸盐、谷氨酸缓冲液）混悬，分装低温保存。

4. 小鼠免疫血清制备：小鼠多克隆免疫血

清按Philip的方法〔10〕。单克隆抗体则用西伯利亚立克次体群和种特异性的小鼠腹水。

5. 间接免疫荧光检测：用聚四氟乙烯4×12圆圈模板玻片，加抗原，每种一排，按0.1微升分别滴入各排圆圈内，吹干，丙酮固定10分钟，加等量第一抗体，按1:8~1:4096稀释，置37℃水浴30分钟，用0.01MPBS洗10分钟，再分别加等量相应第二抗体，置37℃水浴30分钟，PBS洗10分钟，吹干，镜检。

结 果

一、病例简介：男性，47岁，蒙族干部，常住通辽市。1988年4月16日发病，发热37~38℃，门诊诊断为“上感”，3天后因病情加重（4月19日）住院，仍诊断为“上感”，用青霉素、病毒灵治疗无效，入院后第6天血清外斐氏反应OX₂ 1:40，第8天改投四环素治疗，第9天（发病第13天）外斐氏OX₂ 1:320，两次血清增长8倍，OX₁₉，OX_k无动态改变，提示可能是感染了斑点热。发病第16天（5月1日）抽血作特异性血清学和病原学检查。

二、病人特异性血清学检查：结果如表1所示。

表1 病人血清免疫荧光检测结果

立克次体 抗原种类	血清稀 释 度 (1:)										正常血清	阳性血清
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	对 照	对 照
西伯利亚立克次体 (<i>R. sibirica</i>)	+++	+++	++	++	—	—	—	—	—	—	—	+++
普氏立克次体 (<i>R. prowazekii</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
莫氏立克次体 (<i>R. mooseri</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
恙虫病立克次体 (<i>R. tsutsugamushi</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++
Q热立克次体 (<i>Coxiella burnetii</i>)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+++

从表1可以看出，对照成立，病人血清只与北亚热抗原呈阳性反应，效价1:64，而与其它群立克次体抗原均呈阴性反应，结果表明该例病人系感染了斑点热。

三、豚鼠感染试验：将病人血块悬液接种2只豚鼠（No.1、2），其中No.1豚鼠接种后第6天发热达40℃，热期持续5天，取心血、脾脏分别接种鸡胚，均未分离出立克次体。

四、鸡胚传代试验：将病人血块悬液直接接种鸡胚卵黄囊，传至第3、4代查见少量立克次体；取第2代卵黄囊膜肉汤悬液接种豚鼠（No.6），第3天发热，第4天达41℃，热期持续5天。接种后第5天（发热第3天）取其心血接种卵黄囊，传至第4代立克次体繁殖量达卅~卅卅，从而分离到1株立克次体。试验证明

鸡胚、豚鼠交替感染传代效果较好。

五、立克次体分离株W-88株鉴定：根据患者姓名第一字母命名为W-88株。该株卵黄囊培养物，经纯化后进行免疫荧光检测。

1. W-88株与国内已知株及国际标准株斑点热群特异性鉴定结果见表2。

表2 西伯利亚立克次体（232株）群特异性单克隆抗体免疫荧光检测结果

SFG抗原	群特异性单克隆抗体稀释度（1：）										正常小鼠
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096	血清对照
国际株											
小蛛立克次体	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
澳大利亚立克次体	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
康氏立克次体	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—
派克立克次体	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
立氏立克次体	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
西伯利亚立克次体232株	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
西伯利亚立克次体246株	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
中国株											
An	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
FT-84	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
MT-84	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
Se	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
TO-85	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—
W-88	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—
JH-74	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—	—	—

从表2可以看出，W-88株同国内其它分离株与国际标准株存在着强烈交叉反应，具有群内交叉反应特点。因此表明W-88株具有斑点热群特异性，属于斑点热群立克次体中的某一个种。

5个分离株，连同国内参考株JH-74株亦均属西伯利亚立克次体。

讨 论

2. W-88株与国内已知株及国际标准株种特异性鉴定结果（表3）。

斑点热群立克次体病，临床表现具有四大特征：虫咬溃疡（初发病灶—焦痂）、局部淋巴结肿、发热和皮疹。除此，剧烈头痛也是大多数病例所具有的症状。临床以病情分为轻、中、重三型，本例显然属于轻型。虫咬溃疡常被临床医生所忽略，故在临床诊断上，了解本病的流行病学资料，特别是与蜱螨的接触史是十分重要的。另外，血清学检查是诊断本病不可缺少的步骤，外斐氏反应有一定参考价

从表3可以看出，W-88株与国内全部分离株一样，只与西伯利亚立克次体（232人株）单克隆抗体呈阳性反应，而与斑点热群其它5种标准株呈阴性反应，由此表明W-88株具有群内种特异性反应的特点，与西伯利亚立克次体属于同一个种。用单克隆抗体检测我室其它

表3 西伯利亚立克次体（232株）种特异性单克隆抗体免疫荧光检测结果

SFG抗原	种特异性单克隆抗体稀释度（1：）									正常小鼠
	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	血清对照
小蛛立克次体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
澳大利亚立克次体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
康氏立克次体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
派克立克次体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
立氏立克次体	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
西伯利亚立克次体232株	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—
西伯利亚立克次体246株	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—	—
An-84	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—	—
FT-84	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	—	—
MT-84	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	—	—
Se-85	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	—	—	—
TO-85	++	++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
W-88	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	—	—	—
JH-74	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	—	—

值。OX₁，往往在恢复期效价增高，而OX₂有的病例反应不明显，有的病例阳性反应存在于整个疾病过程〔11〕。本例出现对OX₂的血清学动态改变，具有诊断意义。

病原学检查是最准确的诊断，也是最可靠的证据。发病早期（发热期）立克次体分离成功机会较大，用病人血液接种豚鼠并作鸡胚传代，病原体是不难分离的。本例是在发病第16天，在已开始应用四环素的情况下进行分离，以病人血凝块悬液接种豚鼠未分离成功，而将上述材料直接接种鸡胚卵黄囊，通过一代豚鼠，再回种鸡胚才分离成功。

对斑点热群立克次体的鉴定，国内、外均用微量免疫荧光方法，但在群内种间水平上的鉴定尚有一定难度。多克隆免疫血清免疫荧光检测，群内种间交叉反应严重，有的鉴定不出来或鉴定错误，这在国内、外都是有教训的。我室建立一系列分子立克次体学方法，用于种的鉴定，结果明确而可靠。先后用蛋白免疫印迹进行抗原分析〔12〕、DNA内切酶图谱分析、脂肪酸气-质谱分析都证明我室分离株6株（包括W-88在内），还有国内参考株JH-

74株均属西伯利亚立克次体。W-88株所引起的病种可确定属北亚蜱传斑点热（北亚热）。

前已述及，我室曾从新疆、内蒙病人中先后分离出西伯利亚立克次体，上述两地虽相距上千公里但都处于北纬45°~50°之间。而这次从通辽市病人分离出第三株该立克次体，证明北亚热南移至45°~40°之间的地区。根据媒介蜱的分布，实际上该病的地理分布，可能存在于我国的广大地区。由于人们对本病认识上的不足，误、漏诊者常见，本例两次被误诊为“上感”即是实例。如将斑点热群立克次体各个种制成单抗试剂盒，必将有利于在我国发现更多种类的斑点热群立克次体。

Isolation and Identification of the W-88 Strain of Spotted Fever Group Rickettsiae from A Human Case in Tongliao City, Inner Mongolia Bi Dezeng, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing

One strain of spotted fever group (SFG) rickettsiae was isolated from a patient with

febrile and headache who was misdiagnosed as common cold. The rickettsia was isolated by inoculation of yolk sacs of embryonated hen eggs with the patient's blood. The isolate was named as W-88 following the initial letter of the patient's name. It is the first time to report the isolation of SFG rickettsiae from human being who lived in city in China. In this study we compared the antigens of W-88 strain with seven prototype strains of SFG rickettsiae and six Chinese strains of SFG rickettsiae with one species-specific monoclonal antibody and one group reactive monoclonal antibody by indirect-immunofluorescences assay. The results demonstrated that W-88 strain and other Chinese strains JH-74, An-84, FT-84, MT-84, Se-85, To-85 of SFG rickettsiae were found identical to *Rickettsia sibirica* (strains 232 and 246) and differ from other prototypes of SFG rickettsiae.

Key words Spotted fever group rickettsiae *Rickettsia sibirica* Monoclonal antibody

参 考 文 献

1. Fan MY, et al. Rickettsiology in China. American Society for Microbiology News 1986; 32(9): 469.
2. Fan MY, et al. Epidemiology and ecology of rickettsial diseases in the People's Republic of China. Rev Infect Dis 1987; 9(4): 823.
3. 范明远, 等. 某地区斑疹伤寒、北亚蜱性斑疹伤寒、Q热及立克次体痘的血清学调查. 中华卫生杂志 1964; 9(1): 46.
4. 王基钦, 等. 黑龙江虎饶地区蜱传斑疹伤寒立克次氏体

的分离和鉴定. 卫生流行病学专题总结选编(1955~1965). 沈阳军事医学研究所. 1965: 93.

5. 孔昭敏, 等. 新疆精河县蜱媒斑点热组立克次体的分离和鉴定. 微生物学通报 1982; 9(1): 11.
6. Fan MY, et al. Isolation of a spotted fever group rickettsia from a patient and related ecologic investigation in Xinjiang of China. J Clin Microbiol 1987; 25(4): 628.
7. Fan MY, et al. Rickettsial and serologic evidence for prevalent spotted fever rickettsiosis in Inner Mongolia. Am J Trop Med Hyg 1987; 36(3): 615.
8. Fan MY, et al. Antigenic analysis of Chinese strains of spotted fever group rickettsiae by protein immunoblotting. Am J Trop Med Hyg 1988; 39(5): 497.
9. Hanson BA, et al. Some characteristics of heavy and light bands rickettsia prowazekii on Renografin Gradients. Infect Immun 1981; 34: 596.
10. Philip RN, et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. J Immunol 1978; 121(5): 1961.
11. Lyskovtsev MM. Tickborne rickettsiosis. State Publishing House of Medical Literature, Moscow (Translated by Mrs. Maria Tittel, Translation edited by Harry Hoogstraal, Ph. D.), 1963, 115.
12. 范明远, 等. 斑点热群立克次体内蒙W-88株抗原的蛋白免疫印迹分析. 中国人兽共患病杂志 1990; 6(1): 5.

(本文承内蒙哲盟盟医院和内蒙医学院提供有关资料, 谨致谢意)

(1989年7月10日收稿, 1989年8月3日修回)