

几株国内外 Q 热立克次体生物学特性的研究

范中善* 陈锦光 李秀珍 王亚贤 俞炜源 黄毅 唐红娣

(中国人民解放军军事医学科学院,河南)

Q热是人类和动物共患的立克次体病,其病原体是贝纳柯克氏体 (*Coxiella burnetii*),可通过多种途径进行传播。本文对几株Q热立克次体国际标准株和国内分离株的某些生物学特性进行了研究,结果如下。

材料与方 法

一、材料

1. 毒株 (1)国际标准株: *Henzerling* (以下简称H株) I、II相, *Grita* (以下简称G株) II相, *Nine Mile* (以下简称 N.M. 株) II相。

(2) 国内分离株: 七医株是第三军医大于

1962年由成都一位Q热患者血液及骨髓中分离获得。

流研-L株(以下简称L株): 1964年中国医科院流行病学微生物学研究所通化市一位Q热患者血液中分离获得。

兰 Q-6801株(以下简称01株): 1968年兰州生物制品研究所从西藏阿里地区一位Q热患者血液中分离获得。

2. 动物 (1)小白鼠: 3周龄,体重9—10克。(2)豚鼠: 体重250—300克,实验前连续

* 现调第二军医大学工作。参加该项工作的还有吴建民、孔惟惟、廉文明、周寿林、李忠富和康玉珍等同志。

测肛温 5—7 天,选体温较稳者。

3. 鸡胚: 胚龄 6—7 天的莱亨鸡胚。

4. 细胞: 鸡胚原代纤维母细胞及 D_6 、 L_{16} 传代细胞。

5. 立克次体稀释液为 pH 7.2—7.6 的普通肉汤。

二、方法

1. 鸡胚感染方法: 一定稀释度的立克次体悬液(以下简称毒悬液) 0.25ml 接种于卵黄囊, 37°C 孵育, 观察 7—12 天。传代材料为濒死鸡胚的卵黄囊膜, 用 Macchiavello 氏法染色、镜检。

2. 动物感染法: (1) 小白鼠: 取一定稀释度的毒悬液 1ml 腹腔接种, 观察 7 天, 取其肝脾印片, 用 Giemsa 氏法染色、镜检。

(2) 豚鼠: 取一定稀释度的毒悬液 1—2ml 腹腔接种。鼻腔感染是在全身麻醉下, 取 1ml 毒悬液慢慢滴入两鼻孔。感染后每天测肛温一次 (39.5°C 以上者为发烧), 共 3 周。一个月后进行补体结合试验 (效价在 1:8 以上为阳性)。

3. 组织培养感染方法: 取 1ml 细胞悬液注入小瓶盖盖玻片, 待长成单层细胞后, 加用细胞维持液稀释成一定浓度的毒悬液 1ml, 37°C 孵育, 不同时间取出一滴制片, 用 Macchiavello 氏法染色、镜检。

4. 气溶胶感染豚鼠的方法: 将豚鼠装入气溶胶感染箱内, 使口鼻暴露在气雾室中, 然后用毒悬液进行喷雾(其粒子质量中值直径 M.M.D. 在 $5\mu\text{m}$ 以下), 时间 8—15 分钟。感染完成后, 用来苏儿纱布擦动物全身, 以免交叉感染。其后处理同前。

5. 经动物传代提高或恢复毒力的方法:

(1) 豚鼠: 取 1:50 及 1:100 的鸡胚卵黄囊膜毒悬液 2—3ml, 腹腔感染豚鼠, 每天测肛温一次, 当热峰下降后, 解剖取脾传代。若 3 周内不发烧则于感染后一个月测定其补体结合抗体效价, 选试验阳性动物的脾继续传代。

(2) 小白鼠: 取 10^{-1} — 10^{-2} 稀释的鸡胚卵

黄囊膜毒悬液 1ml, 腹腔感染小鼠。7 天解剖取脾印片, Giemsa 氏染色镜检。将明显肿大而立克次体颗粒较多的脾混合继续传代。

6. $YSLD_{50}$ 、 $YSID_{50}$ 、 $TCID_{50}$ 、 $GPTD_{50}$ 及 $GPID_{50}$ * 的计算均按 Reed-Muench 方法进行。

实验结果

一、Q 热立克次体在鸡胚上的繁殖及滴定

Q 热立克次体在鸡胚上繁殖最佳的部位是卵黄囊膜, 为了综合利用鸡胚, 我们测定了全胚蛋(去蛋清)的滴度, 7 天的观察结果表明: H 株与 01 株在卵黄囊膜上的繁殖滴度要比全胚蛋约高 25—50 倍。为了阐明稀释度较高者是否无立克次体, 我们将镜检阴性的卵黄囊膜悬液再接种鸡胚。7 天后发现初为阴性者, 通过“盲传”却产生了阳性, 说明观察时间应适当延长(本试验为 12 天)。

Q 热不同毒株在鸡胚上的繁殖滴度也不同。结果见表 1。

表 1 Q 热不同毒株的鸡胚滴定(观察 12 天)

毒株	lg $YSID_{50}/0.25\text{ml}$	lg $YSLD_{50}/0.25\text{ml}$
H (H 相)	6.3	5.0
N. M.	6.3	4.9
L	4.0	3.7
七医	5.5	6.0

二、Q 热立克次体对豚鼠的感染及滴定

豚鼠对 Q 热立克次体不同毒株的敏感, 在临床上的表现不同。N. M. 株和七医株的比较结果见表 2。

表 2 Q 热不同毒株感染豚鼠的临床表现

毒株	发烧动物数*	平均潜伏期(天)	平均热程(天)	平均热峰(°C)
N.M.	9/16	2.9	3.1	40.0
七医	24/24	3.0	5.9	40.5

* 分母为试验动物数; 分子为发烧动物数。

腹腔感染豚鼠所产生的热型反应, 可以滴

* $YSLD_{50}$ = 鸡胚半数致死量, $YSID_{50}$ = 鸡胚半数感染量, $TCID_{50}$ = 组织培养半数感染量, $GPTD_{50}$ = 豚鼠半数感染剂量, $GPID_{50}$ = 豚鼠半数感染剂量。

定Q热立克次体的毒力,不同毒株其滴度不同。但该法缺点较大,常遇到对照动物发烧或实验动物的不规则发烧。因此,使用该法的同时,可辅以半数感染量的测定。结果见表3。

表3 Q热不同毒株的豚鼠测定结果

毒株	lg GPTD ₅₀ /ml	lg GPID ₅₀ /ml
H(II相)	6.5	6.9
N.M.	4.3	4.2
L	8.9	9.9
七医	9.0	9.2
01	7.8	—

三、Q热立克次体在组织培养上的繁殖及测定

经试验表明, Q热立克次体在原代鸡胚纤维母细胞及传代细胞L₁₆和D₆中均能繁殖,其中以L₁₆最佳。H(II相)株和01株在L₁₆细胞上的lgTCID₅₀/ml平均为3.9及3.5。

四、Q热立克次体气溶胶感染豚鼠的实验结果

用已知滴度的毒悬液进行豚鼠鼻腔滴入试验,结果表明除01毒株外,其他各毒株均能造成豚鼠不同程度的呼吸道感染。在此基础上,选用G株和七医株进行气溶胶感染豚鼠的试验,结果见表4。

表4 Q热立克次体气溶胶感染豚鼠的试验结果*

毒株	发烧动物数	补体结合阳性动物数
G	20/28	16/23
七医	40/47	40/40

* 分母为试验动物数,分子为阳性动物数。

五、Q热立克次体动物传代的结果

(一) H(II相)株腹腔感染豚鼠连续传代结果

将H(II相)株在豚鼠上连续传3代,第一代从感染后2—3天开始发烧(40℃以上),一般持续3—4天。第2代热峰下降,潜伏期延长(1—2周)。第3代接种8只动物,观察3周均未发烧,补体结合试验阴性。

(二) H株经小白鼠连续传代结果

1. H(II相)株在小鼠体内传20代,脾明

显充血,中度肿大,比正常脾重2—4倍,脾印片镜检出少量立克次体颗粒,用其悬液接种鸡胚,立克次体颗粒大大增加。

为了解H株在小鼠体内传代过程中毒力变化情况,将不同代数的小鼠脾悬液在鸡胚上传3代以增加其繁殖量,感染豚鼠,比较其热型反应和补体结合反应情况,结果见表5、6。

表5 H株传不同代在豚鼠上的测定结果

感染材料	lg GPTD ₅₀ /ml	lg GPID ₅₀ /ml
H _{E22}	6.0	6.9
H _{M6E3} *	5.8	7.7
H _{M10E3}	5.5	8.4
H _{M13E3}	7.0	6.3
H _{M20E3}	8.4	8.4

* H_{M6E3}表示H株在小鼠传6代又在鸡胚传3代,其余类推。

表6 H株传不同代对豚鼠致病性比较

感染材料	发烧豚鼠数	平均	平均	平均
		潜伏期(天)	热程(天)	热峰(℃)
H _{E22}	4/4	6.8	1	39.7
H _{M20E3}	4/4	3.5	3	40.6

由表5、6可见, H(II相)株在小鼠体内传20代后,对豚鼠的毒力有增强的趋势,lg GPTD₅₀/ml大约提高2.4。

2. H(I相)株在小鼠体内传18代,其lg GPTD₅₀/ml由6.3提高到9.7。

讨 论

1. 关于Q热立克次体的毒力问题: Q热立克次体几乎遍布全世界,其毒株约有几十种,但其毒力差异很大,分强毒力组、中等毒力组和弱毒力组。Brezina认为可分为毒力强的美洲组和毒力较弱的欧洲组和澳大利亚组^[4]。

本文研究的6株Q热立克次体中有3株是我国的毒株,通过对动物、鸡胚或气溶胶感染试验,初步证明了它们的毒力都不高,基本属于中等毒力组。此外, Q热立克次体的毒力并不是一成不变的。一般来说,在动物或节肢动物体内传代,其毒力可能提高或恢复;而在鸡胚上传代,则可能降低,本实验也证明了这一点。多数

人认为Q热同株 I 相的毒力要比 II 相高。也有人认为相的变异并不伴有毒力的改变^[2]。众所周知, Q 热立克次体长期在鸡胚上传代会逐渐变成稳定的 II 相株。长期在动物上传代, 结果有两种可能: 一是因毒株毒力不强, 在传代过程中不适应而逐渐被淘汰; 另一是在动物上逐渐适应下来变成了 I 相。本试验亦证实了这一点。

2. 关于 Q 热立克次体的滴定方法: Q 热立克次体的滴定方法已有不少研究, 但病灶计数法^[3]、空斑法^[4]都不理想。传统的滴定方法还是豚鼠热型反应和鸡胚半数致死量的测定, 前者豚鼠虽然敏感, 但烦琐费时, 豚鼠体温的个体差异受外界影响很大, 被判为发烧动物的补体结合反应有时却是阴性。后者虽然时间较快, 但敏感性较差, 毒力较低的毒株还不能使用。豚鼠半数感染量测定的方法虽然时间长, 操作烦琐,

但实验结果比较客观。可惜的是, 此法并不能完全代表病原体的毒力。

理想的 Q 热立克次体滴定方法还有待深入研究。目前我们建议用豚鼠半数特异性发烧剂量(GP_{50} 、 TD_{50})来表示 Q 热立克次体的毒力。具体作法是: 将待滴定的材料连续 10 倍稀释, 每一稀释度接种 4 只豚鼠, 感染后第 3 天测体温, 连续测 2 周, 感染后一个月进行补体结合试验。动物发烧又能产生补体结合抗体的为阳性, 以此计算结果。此法最大优点是解决了豚鼠发烧不规则的问题。

参 考 文 献

- [1] Brezina, R. et al.: *Amer. J. Hyg.*, 61: 362, 1955.
- [2] Яковлев, А. И. и др.: *Ж.М.Э.И.*, 8:74, 1962.
- [3] Weiss, E. et al.: *J. Bact.* 72(2): 235, 1956.
- [4] Medade, J. E. et al.: *Appl. Microbiol.*, 19(6): 963, 1970.