

山东恙虫病立克次体弱毒株分离方法研究

刘运喜 吴钦永 杨占清 彭佐林 苗仲水

(济南军区后勤部军事医学研究所 济南 250014)

苏明 丛乐滋

(中国人民解放军 54898 部队 临沂 273400)

摘要 恙虫病立克次体(Rt)弱毒株分离问题一直是较难解决的问题。分离过程中主要采取了以下措施:选择适当的病例;降低小鼠免疫力;严格掌握传代时间(接种后12~14d);所有传代小鼠均作腹膜涂片及肝、脾、肾印片以免漏检;严格控制动物饲养室温度等。结果成功地从恙虫病人全血、3种鼠类、4种恙螨中分离到38株Rt,成功率在25%~100%。毒株接种小鼠后可引起弓背、耸毛、发烧等症状,并引起肝肿大及脾肿大(2~5倍)。

关键词 恙虫病立克次体,弱毒株,分离

分类号 Q939.3

自1986年山东沂蒙山区发现恙虫病流行以来,相继在五莲、济南等地出现恙虫病例,许多学者作了一些调查研究^[1-3],但由于当地秋冬季恙虫病系恙虫病立克次体(Rt)弱毒株引起,病原分离工作一直是较难解决的问题,主要是传代小鼠不发病,腹膜涂片及内脏印片镜检不到Rt。我们在用小鼠分离各种标本中的Rt时,采取了一些有效措施,结果从恙虫病人全血、3种鼠类、4种恙螨均分离到Rt,且成功率较高,现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 标本采集

恙虫病人全血:取临床症状典型、发病时间最好不超过1周、未经治疗的病人静脉血5ml;
鼠类:在发病季节从疫区用鼠笼捕捉活鼠;恙螨:采集逐月捕获的活鼠体外所带恙螨,部分恙螨为小黑板采集或小鼠诱集。

1.2 实验材料

标本稀释液为无菌生理盐水;注射用环磷酰胺为上海华联制药公司生产(均为有效期内产品);小鼠;昆明种,16~18g,购自山东医科大

学动物中心,雌雄兼用;Giemsa染色液为常法配制;抗原抗体:羊抗人、羊抗鼠IgG荧光抗体分别购自上海生物制品所、军事医学科学院微生物流行病学研究所;抗体检测与分型用恙虫病立克次体抗原片购自北京生物制品所,含Gilliam, Karp, Kato 3型。

1.3 Rt分离

恙虫病人全血床边接种,每个病人为一组;同类鼠以3~5只的肝脾肾为一组,无菌研磨制成10%生理盐水悬液(w/v);以同种恙螨71~200只为一组,用含青霉素、链霉素(各100U/ml)的无菌生理盐水洗涤2~3次后,用组织匀浆器研磨成2ml悬液。上述材料每组各接种3只小鼠(0.5ml/只),接种后(用小黑板采集的恙螨以20~30只为一组挑入一只小鼠耳窝内任其叮咬三天后)2h、5d、10d各注射一次环磷酰胺(0.25mg/g体重)。每天观察记录小鼠发病情况,发病死亡者或濒死者及时解剖,未发病者于接种后12~14d腋窝放血,分离血清,-20℃冻存,解剖并观察肝、脾、肾病变。所有传代小

鼠均作腹膜刮液涂片,并作肝、脾、肾印片, Giemsa染色^[4],镜检未见Rt者,取肝、脾、肾用生理盐水制成10%悬液,盲传3~4代(鼠内脏、恙螨盲传4代)。传代后剩余的内脏组织置-50℃冰箱冻存备用。

1.4 血清抗体检测与分型

采用IFA法,病人血清 $\geq 1:80$ 、小鼠传代血清 $\geq 1:20$ 出现“+”以上的荧光反应判为阳性,

对在Gilliam, Karp, Kato三型间存在交叉反应的抗体阳性血清继续倍比稀释,直至能够分型为止,实验同时设阳性和阴性对照。

2 结果

2.1 各类标本分离结果

由表1可见,从各类标本中均分离到Rt,其中从须纤恙螨中分离Rt成功率最高,为100%。

表1 山东地区各类标本Rt分离结果

标本	接种组数 (标本数)	分离阳性 株数	不同代次镜检			成功率 (%)
			2	3	4	
恙虫病人全血	34(34)	14**	12	1		41.2
黑线姬鼠	18(56)	5**	1	1	2	27.8
大仓鼠	9(36)	3	2	1		33.3
褐家鼠	4(15)	1		1		25.0
小盾纤恙螨	23(1262)	7**	2		4	30.4
须纤恙螨	4(471)	4		2	2	100.0
临淮岗纤恙螨	4(500)	2	2			50.0
太平洋无前恙螨	4(500)	2	2			50.0
小计	99(2874)	38	21	6	8	38.4

* 小盾纤恙螨包括小鼠诱集,小黑板采集的部分。

** 其中一株仅抗RtIgG阳性。

表2 部分分离毒株引起传代小鼠内脏病变情况

毒株编号	材料	接种材料血清学分型*	镜检见Rt 代数	内脏病变					Rt分离株 血清分型*	LD ₅₀
				脾脏大 小(mm)	肝肿大	肝变 褐色	腹水 (ml)	腹腔 粘液		
B-16	病人全血	G	2	6×25	+	+	0.2~0.5	+	G	0
B-25	病人全血	G	2	6×25	+	-	-	+	G	0.2378
B-29	病人全血	G	2	6×25	+	+	-	+	G	-
B-32	病人全血	G	2	8×25	+	+	0.2	+	G	0.0205
S-1	黑线姬鼠	G**	2	6×30	+	-	-	+	G	-
S-8	黑线姬鼠	G**	3	8×39	+	+	-	+	G	0.0133
S-11	黑线姬鼠	-	4	7×39'	+	+	-	-	K	-
S-3	大仓鼠	-	3	2.5×19	+	-	-	-	G	-
S-4	大仓鼠	-	2	6×25	+	+	3.5	+	G	0.0422
S-9	大仓鼠	-	2	5×35	+	-	-	+	K	-
S-17	褐家鼠	-	3	6×25	+	-	-	-	G	-
D60243	小盾纤恙螨		2	8×30	+	-	0.2	+	G	-
Xu12031	须纤恙螨		3	7×38	+	-	-	+	G	-
L-2	临淮岗纤恙螨		3	3×18	+	-	-	+	G	0.0133
T-1	太平洋无前恙螨		2	4×25	+	+	0.1	+	G	0

* G为Gilliam型, K为Karp型Rt。 ** 其中一只野鼠的血清型。

2.2 传代小鼠临床症状及内脏病变

2.2.1 临床症状: 毒株接种小鼠后, 均可引起弓背、耸毛、发烧(以身体蹭饮水瓶中的水、呼吸急促)。体重降低、厌食、活动减少等症状, 部分毒株可引起小鼠死亡, 死亡一般出现在接种后5~8d。接种后10d以上临床症状即消失。

2.2.2 小鼠内脏病变: 毒株接种后可引起脾脏肿大为正常鼠脾2~5倍(体重16~18g的正常小鼠脾大小为 $2.5 \sim 3 \times 15 \sim 17\text{mm}$), 肝脏除肿大外, 有时伴有出血点, 有些毒株可使肝脏变黄褐色(表2)。

3 讨论

本研究结果表明, 采取一些有效的措施, 从各种材料中均能成功地分离到弱毒株的 Rt, 且成功率较前人高^[4]。我们认为分离成功的关键在于以下几个方面:

(1) 恙虫病病人除选择具有典型临床症状外, 发病时间最好在1周内, 且未经抗生素治疗, 床边接种。本实验中有几组病人发病时间在9~15d, 取其全血接种小鼠后, 虽经同样处理, 但未能成功地分离到 Rt。

(2) 降低小鼠免疫力。采用两种方法, 一是用环磷酰胺处理小鼠, 该法被前人证实是行之有效的办法, 但处理不当容易引起小鼠死亡^[4]。我们对小鼠处理次数视其状态而定, 1~2代一般处理2次或2次以上, 3代后处理1~2次即可, 原则上使传代小鼠处于不活跃状态; 二是定量加入鼠饲料, 控制其饮食以降低其免疫力。在我们最初的分离实验中, 不采用免疫抑制剂环磷酰胺处理传代小鼠, 结果未能成功地分离到 Rt。

(3) 严格掌握传代时间, 一般控制在接种后12~14d。据文献资料^[5], Rt进入鼠体内7d, 血清中可检测到抗体, 2周后即有免疫排斥反应。我们的结果表明^[6], 小鼠接种 Rt 后13d左右用IFA法可测到 IgG 抗体说明选择12~14d传代是良好时机, 因为这时小鼠刚开始产生免疫排斥反应。对接种 Rt 后17d、28d小鼠解剖检查, 腹膜涂片及肝脾肾印片染色后镜检, 未能检见

到 Rt, 但小鼠脾脏仍肿大。另外, 当一组(3只)传代小鼠仅余1只时(特别是第一代), 应密切注视其临床表现, 当小鼠表现极度衰弱时, 无论是否到接种后12~14d, 均立即传代, 以免失传。

(4) 所有传代小鼠无论是否发病均应作腹膜涂片及肝脾肾印片, 染色后仔细镜检 Rt, 以免漏检, 我们的实验结果, 一组同种体重相近(16~18g)的传代小鼠虽同样处理, 但对 Rt 敏感性不同, 有的鼠腹膜涂片及内脏印片可检见丰富的 Rt, 有的就少见甚至检不到 Rt。

(5) 传代后多余毒料应无菌低温保存, 以便 Rt 在传代过程中因污染失传后再复活。据我们的实验, Rt 弱毒株(B~16, Xu1041株)在-50℃冰箱中连续放置半年后再复活, 仍保持不死。

(6) 严格控制动物饲养室温度。因小鼠注射环磷酰胺后, 免疫功能降低, 抗病能力差, 室温要恒定, 一般应控制在 $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。当有些小鼠发烧严重, 极为虚弱时, 要在鼠笼中加入棉絮以保持其体温, 并将鼠饲料放入笼内以利其进食, 延长小鼠生存时间, 使 Rt 在小鼠体内充分繁殖, 这样才能获得含 Rt 较丰富的毒料, 以便进一步研究分离株的生物学特性。

此外, Rt 毒株一般随传代次数的增加, Rt 量亦增加, 个别毒株(如 B~16)传至2~4代时即可检见丰富的 Rt, 但到第5代用环磷酰胺处理次数不够, 腹膜涂片上很难检见 Rt, 到第6代增加环磷酰胺处理次数, 又可检见 Rt, 说明 Rt 在小白鼠体内可稳定贮存, 不易失传。

参 考 文 献

- [1] 陈香蕊, 魏晋举, 杨玉富等. 军事医学科学院院刊, 1989, 13(1): 43.
- [2] 王勤忠, 崔 嵩, 李 忠等. 中国人兽共患病杂志, 1995, 11(5): 47.
- [3] 杨玉富, 王均利, 姚允超等. 中华流行病学杂志, 1987, 8(5): 280.
- [4] 郭恒彬, 于明明, 吴光华等. 中国人兽共患病杂志, 1992, 8(2): 6.
- [5] 沈鼎鸿主编. 人类病毒及立克次体感染. 上海: 上海科技出版社, 1964, 689.
- [6] 刘运喜, 吴钦水, 孙海龙等. 解放军预防医学杂志, 1997, 15(4): 257.