DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.02.006

非洲钝缘蜱(Ornithodoros moubata)感染Q热立克次体的免疫荧光检测

刘连珠 况明书 刘丽娟 张邦燮*

(寄生虫学教研室)

非洲钝缘蜱是非洲地区的一种常见软蜱，根据其嗜血习性至少包括4个近似种，它是蜱传回归热的重要媒介[1]。Davis早在1943年就证明非洲钝缘蜱可实验感染Q热立克次体[2]。1951年Jadin在刚果从自然界捕捉的非洲钝缘蜱中分离出Q热立克次体[3]。1979年作者等曾发表了我们早期（1964）用非洲钝缘蜱实验感染Q热立克次体的资料[4]，作者等并提出非洲钝缘蜱吸血习性广泛；耐饥力和繁殖力强；饲养管理方便；对Q热立克次体较为敏感，且能长期储存病原体，因而我们提出利用该蜱在实验室保存立克次体的建议。但非洲钝缘蜱感染Q热立克次体的敏感度如何？实验感染后用免疫荧光技术及Gimenez染色法两种方法对比检查的效果，本文再次以非洲钝缘蜱用不同稀释度Q热立克次体进行感染并对其敏感性作进一步观察。

材料与方法

非洲钝缘蜱 (Ornithodoros moubata)，本种在我室长期保存已达30年，自1980年后饲养于温度25°C±1，相对湿度70—80%的恒温室中，本次试验均为同一令期的稚虫。

Q热立克次体(Coxiella burneti)，系Henzerling株，小白鼠2代转鸡胚卵黄囊3代，镜检立克次体量为++—+++，以此鸡胚卵黄囊用Hank's液配成10%的卵黄囊悬液，并依次稀释为10^{-2}、10^{-3}……10^{-12}等12个不同的稀释度备用。

感染方法：血腔注射法，将备用的蜱分成12个组，每组10只，先以无菌生理盐水反复冲洗蜱体表面数次。使用10微升的微量注射器自蜱体第3对足后侧缘徐徐注入含立克次体的卵黄囊悬液，每只蜱注射量为10微升，注射后停针1—2分钟，然后退出空针，否则注射物易外溢。

血淋巴试验：血腔注射感染35天，每组取5只蜱，先以无菌蒸馏水冲洗，以眼科剪刀剪去前足末端，血淋巴液自动从断肢处溢出。每只蜱同时涂2个标本，分别做免疫荧光抗体及Gimenez染色检查。

免疫荧光间接法检查：Q热立克次体免疫血清及荧光抗体标记血清的制备，均按本室常规方法进行。

---

* 仪器中心室

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

荧光显微镜为日本Olympus落射光AH、RFL型，配用 BG_{12} 及 OG^{515} 滤光片，光源为超高压汞灯 200W，特异性荧光亮度的判定按＋—卌制，以“++”以上亮度并具有Q热立克次体形态学特征者始判定为阳性反应。

结　　果

非洲钝缘蜱以血腔注射法感染Q热立克次体，感染后第35天各不同稀释度组，每组取蜱5只，每只蜱的血淋巴液均分别涂片2张，各用荧光抗体技术及Gimenez染色法进行检查，结果如表1。

表1　非洲钝缘蜱血淋巴试验立克次体检查结果

感染卵黄囊立克次体稀释度	免疫荧光检查		Gimenez染色法	
	阳性数/检查蜱数	立克次体数量*	阳性数/检查蜱数	立克次体数量*
10^{-1}	5/5	卌—＋	5/5	++—卌
10^{-2}	5/5	卌—++	5/5	++—卌
10^{-3}	5/5	卌—++	5/5	＋—卌
10^{-4}	5/5	卌—++	4/5	＋—卌
10^{-5}	4/5	＋—++	4/5	＋—++
10^{-6}	1/5	＋	1/5	＋
10^{-7}	1/5	＋	0/5	－
10^{-8}	1/4	＋	0/5	－
10^{-9}	0/5	－	0/5	－
10^{-10}	1/5	＋	0/5	－
10^{-11}	0/5	－	0/4	－
10^{-12}	0/5	－	0/5	－

* ＋每视野立克次体10个以下；++为10—100个；卌为101—1000个；卌为1000个以上。

免疫荧光检查：10^{-1}—10^{-4}各组全部阳性，立克次体数量较多，形态典型，有大量细胞内寄生者，亦可见散在分布于细胞外者，多数标本为卌—卌，少数标本为＋—++。荧光为亮绿色，亮度多数为卌，少数为++。10^{-5}组4只阳性，立克次体数量为＋—++。10^{-6}、10^{-7}、10^{-8}、10^{-10}每组各有一只标本立克次体阳性，立克次体数量少，但只有在荧光亮度卌以上者始判断为阳性，遇有可疑标本则重复一次染色以确定之。

在Gimenez染色标本中，10^{-1}—10^{-3}三组中，血淋巴检查立克次体全部阳性，不少血细胞内寄生有大量立克次体，形态典型，细胞外亦有许多散在性分布的立克次体，多数标本的立克次体数量为卌—卌，个别标本立克次体数量为++。10^{-4}—10^{-5}两组中各有4只标本阳性，细胞内外均可查见立克次体，但其数量显著减少，一般为＋—++。10^{-6}组一只阳性，仅细胞外有散在性分布的立克次体，未见有细胞内寄生者。10^{-6}以下各组，Gimenez染色法全部阴性。

在全部检查的59只蜱类标本中，Gimenez染色法及免疫荧光检查两者均阳性者22只，占37.29%；两者同时阳性者28只，占47.46%，故二者的总符合率为81.75%。Gimenez染色

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

阳性而免疫荧光阴性者2只；Gimenez染色阴性而免疫荧光阳性者6只，两者检查技术的比较，前者总阳性率为40.69%，后者为48.27%，故免疫荧光技术检查似略优于 Gimenez 染色法。表2。

表2　非洲钝缘蜱感染立克次体后血淋巴液两种检查方法比较

方　法	阳性/检查蜱数（%）	符　合　情　况			
		* IF⁺/G⁺	IF⁺/G⁻	IF⁻/G⁺	IF⁻/G⁻
免疫荧光检查	28/58(48.27%)	22	6	2	28
Gimenez染色法	24/59(40.69%)				

* IF表示免疫荧光技术　　G表示Gimenez染色法

讨　论

非洲钝缘蜱对Q热立克次体是一种较敏感的节肢动物，感染Q热立克次体的动物在发烧期间，以此吸血感染很易获得成功[4]。作者等未发表的资料中非洲钝缘蜱感染Q热立克次体后，用免疫荧光技术检查其阳性率为92.5%。俞树荣等采用血腔注射法感染Q热立克次体 Ys-8 株，3天后用Gimenez 染色法及免疫荧光法在血淋巴中能明确查见立克次体，而Henzerling 株则在7天始能查到，而喂血感染法10、14天的检查仍为阴性[6]。似乎说明一、非洲钝缘蜱在Q热立克次体不同株的感染有所不一致；二、血腔注射法能较早地在血淋巴中查出立克次体。但上述感染材料均为10^{-1}的立克次体浓度。本实验采用不同的稀释度的病原体含量用血腔注射法感染非洲钝缘蜱，用Gimenez 染色法及荧光免疫技术检查同一份标本，借以测定非洲钝缘蜱对Q热立克次体的两种检查效果的比较。实验结果表明：以血腔注射法感染非洲钝缘蜱，在10^{-1}—10^{-5}浓度范围内，无论Gimenez 染色法或免疫荧光检查法均可成功地查见立克次体，病原体寄生于血细胞内，数量多，形态典型。蜱的血淋巴检查，确为一种简便、快速而可靠的检查方法，而非洲钝缘蜱感染Q热立克次体确为一种敏感的节肢动物，在实验室用以保存病原体甚为理想。

Zupancicova Majerska M 等1972年报告他们在捷克斯洛伐克采得的边缘革蜱 (Dermacentor marginatus) ♀蜱，喂以健康豚鼠，5 — 6天后用Gimenez染色法及免疫荧光法检查落矶山斑点热立克次体，作者对14只蜱的血淋巴液、胃、马氏管、唾液腺、神经节、卵巢等各组织进行检查，认为Gimenez染色法查得的立克次体数量似乎优于免疫荧光技术，特别是在卵巢涂片中所见立克次体数量较多[8]，俞 树 荣 等 在血腔注射感染的23只非洲钝缘蜱的检查中，Gimenez 染色及免疫荧光检查两者均为阳性者19只，Gimenez 法阳性免疫荧光阴性者3只，而免疫荧光阳性Gimenez 法阴性者无，因而作者认为Gimenez 法阳性率高于免疫荧光检查法[6]。我们本次实验的结果显示：Gimenez 染色法和免疫荧光检查在10^{-1}—10^{-6}各组中，除前者在检查时立克次体数量较多，且多为细胞内成团寄生，因而便于检获，其他在阳性率方面似无明显不同。10^{-5}以下各组，免疫荧光法还可查出少数阳性标本，而Gimenez 染色法则无此现象，且免疫荧光检查在58分标本中总阳性率为48.27%，而Gimenez 染色法为40.69%，故我们认为免疫荧光检查似优于 Gimenez 染 色法，特别表现在轻度感染各组的蜱类标本中

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

是如此。

当蜱吸食含有Q热立克次体的血液，可以很快繁殖，Smith（1940）就指出血蜱Haemaphysalis humerosa的肠上皮细胞是立克次体的繁殖场所，其肠腔亦含有很多立克次体。蜱同蜱的粪便在多数情况下，自然集中了贝氏立克次体，安氏革蜱（Dermacentor andersoni）的成虫$10^{-11.7}$的浓度，稚虫10^{-8}—10^{-12}的浓度，可使豚鼠感染，而安氏革蜱的粪便，10^{-8}的浓度亦可使动物感染，足见敏感的蜱类，感染Q热立克次体后，其组织内病原体的含量是很高的。我们曾将注射不同浓度的Q热立克次体于非洲钝缘蜱体内，于感染后48天的蜱悬液接种豚鼠，从动物发病情况及Q热补体结合试验，均证明10^{-1}—10^{-12}各组动物均获得感染，说明免疫荧光抗体或Gimenez染色阴性者，动物分离仍为获阳性结果。

参 考 文 献

（1）Service MW: A guide to Medical Entomology. Macmillian Hong Kong, 1980

（2）Davis GE: American Q Fever, Experimental transimsion by the Argasid ticks Ornithodoros moubata and O. hermsi. Pub Health reports 58: 984—987, 1943

（3）Derrick EH: The Epidemiology of Q Fever: A Review. The Med J Australla 1(8): 245—253, 1953

（4）刘连珠等：非洲钝缘蜱对Q热立克次体实验感染的研究。流行病学杂志 (3):199—203, 1979

（5）Berge TO & Edwin: World Distribution of Q Fever: Human, Animal and Arthropod Infection. Am. J. Hyg 57(2):125—143, 1953

（6）俞树荣等：蜱血淋巴试验检查立克次体初步研究。流行病学杂志(3):195—198, 1979

（7）Rehacek J, et al: Haemocyte test——An easy, quick and reliable method for the detectoin of Rickettsiae in ticks. Acta Virol 15(3):237—240, 1971

（8）Zupancicova-Majerska M, et al: Localization of Coxiella burneti and ricketsiae of Rocky Mountain spotted fever grop in ticks. Acta Virol, 16(1):63—70, 1972

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net