DOI:10.16016/j.1000-5404.1979.03.004

蜱血淋巴试验检查立克次体的初步研究

训练部微生物学教研室　俞树荣　张淑莲　李芹阶　张邦燮

蜱的血淋巴试验为检查蜱标本中病原体的简便、快速方法。目前，国外应用本法于立克次体、病毒及细菌的实验感染蜱标本及自然界蜱的流行病学筛选检查，常获得比较满意的结果①—⑥。国内尚未见类似报导。本文就我们用Q热立克次体及北亚热立克次体实验感染Ornithodoros moubata后的血淋巴试验结果，以及初步检查自然界蜱类Q热立克次体的感染情况报告如下。

材料及方法

一、毒种：

1．Q热立克次体YS-8株，由云南省昆明市绵羊胎盘分离③，鸡胚卵黄囊8代；Henzerling株得自北京生物制品研究所，本室鸡胚38代。

2．北亚热立克次体，来源于北京生物制品研究所斑疹伤寒室，原传代情况不明，在本室以鸡胚卵黄囊传9代。

二、蜱：

Ornithodoros moubata，1953年从原中国协和医学院索取，在本室饲养繁殖。实验用半饱血的稚虫及成虫。

三、实验感染方法：

主要用体腔注射法。取新鲜立克次体感染卵黄囊膜（直接涂片检查卄—卅），以Hank's液作成10^{-1}悬液。将蜱先用无菌蒸馏水洗或酒精浸泡后用水洗三次，置于垫有无菌滤纸的平皿中。用50微升微量注射器取悬液在蜱侧缘每只注入0.01毫升，或用细毛细管注射。注射后针头或毛细管宜稍停片刻再拔，以无菌滤纸吸去从伤口回流的注射液（一般约回流1/3—1/2的注射量）。一部分蜱用感染动物喂血法⑦。注射或喂血完毕，将蜱编号分别置于盛沙粒（有一定湿度）的青霉素小瓶中，放室温（20—30℃）以备检查。并曾将感染蜱接种豚鼠，观察其发病及检查恢复期血清有特异性抗体上升获得证实。

四、血淋巴试验法：

将蜱充分水洗，用小镊子轻轻夹起蜱体，剪断一只腿的末端，血淋巴即从伤口溢出，清亮如水珠，滴在玻片上以接种针作涂片（一张玻片可涂8—10份标本），火焰固定后，用Gimenez法⑧染色及免疫荧光技术检查。

五、免疫荧光间接法检查：

Q热立克次体免疫兔血清（Ⅰ相补体结合抗体滴度1:512，Ⅱ相1:1024）及北亚热立克次体免疫兔血清（补结滴度1:256—512），染色时用1:16—32，羊抗兔IgG异硫氰酸荧光黄标记血清用1:4，以四甲基异硫氰酸玫瑰红标记牛血清白蛋白（1:16—20）作对比染色。首次检查及可疑标本复查时作正常蜱标本，不加中间层血清或加相应动物正常血清对照，以及阳性对照。荧光光源为国产超高压汞灯GCQ 200，用暗视野聚光器配合普通光学显微镜检查。发现标本中有荧光亮度达卅，并具形态特征的颗粒，判为阳性。

结　果

一、实验感染蜱的血淋巴试验

（一）Q热立克次体感染蜱检查

1．感染蜱血淋巴试验动态：10只YS-8

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

株体腔接种稚蜱，有9只在注射后3天用Gimenez染色法及免疫荧光法查见血淋巴中的立克次体，多在巨噬细胞胞浆内，形态纤细、典型，一般约7—8条，少的1—2条，也有的堆聚成团；第8天检查则全部发现胞浆内外均有立克次体，但仍以胞内为主（图1），严重者在一个视野里的所有巨噬细胞均充满立克次体，免疫荧光检查见胞外散在的

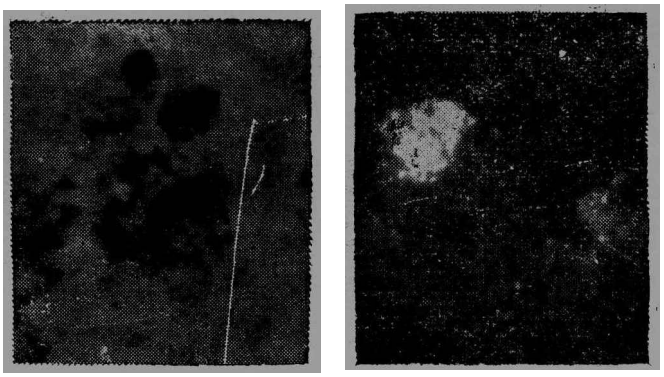


图1 Q热立克次体YS-8株感染O.moubata第8天的血淋巴试验
左：Gimenez染色（×1000） 右：免疫荧光染色（×800）

也多(卅—卌)；待第13天直止278天检查，主要在细胞外散在，常不易见到完整细胞。10只Henzerling株同法感染的稚蜱，开始发现立克次体似较YS-8株为迟，感染后3天未见明确的立克次体，7天多数能查到，而14天后的Gimenez染色法及免疫荧光检查与YS-8株感染者不能区别。22只蜱及12只蜱以喂血法感染（分别在感染Q热立克次体的家兔及豚鼠发热高峰时吸血）者，于第10天及14天检查均为阴性。

2．感染稚虫及成虫的血淋巴试验：分别体腔注射Q热立克次体Henzerling株于稚蜱及成蜱后，用血淋巴试验证明其敏感性有所不同。感染成蜱血淋巴中用Gimenez及免疫荧光法发现立克次体较感染稚蜱者晚，数量也少，约在感染2月后检查则两者不显差别，见表1。

表1 感染稚虫及成虫血淋巴试验比较

	感染后天数		
	8	24	58
稚虫	7/9 (十－卅)*	6/7 (十—卅)	7/7 (十—卅)
成虫	0/5	2/4 (十—廿)	4/4 (十—卅)

* 1. 分母为感染蜱数，分子为阳性数，括弧内为立克次体数量
2. 24天后稚虫死去两只，成虫死去一只

3．Gimenez染色法及免疫荧光法检查比较：从23只感染蜱，于感染后58天用两种方法检查发现，Gimenez染色法似较免疫荧光检查敏感，如表2。

（二）北亚热立克次体感染蜱检查

北亚热立克次体感染蜱血淋巴发现立克次体较Q热感染者晚，数量也较少。感染的16只稚蜱于第3天用Gimenez染色检查，发现多数蜱血细胞少，有3只查见立克次体，呈短杆状，位于巨噬细胞浆内，数目很少，

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

表2　23只感染蜱血淋巴Gimenez染色及免疫荧光检查

	阳性数	符合情况			
		G^+/IF^+*	G^+/IF^-	G^-/IF^+	G^-/IF^-
Gimenez法	22	19	3	0	1
免疫荧光法	19				

* G为Gimenez染色法，IF如为免疫荧光检查

约30个视野发现3—6条；感染后7天有4只蜱血淋巴发现少量立克次体(+)；11天用Gimenez染色法检查有9只蜱血淋巴试验阳性，立克次体多在胞浆内，个别亦见于胞核，形态典型，也有的成双排列，并两端浓染，数目也增多(中)，此时免疫荧光检查9只中仅5只为阳性；16天Gimenez染色检查，全部蜱均查见立克次体，胞内外均有，主要在胞内，免疫荧光检查仍有一只为阴性，阳性者细胞内常见较大的亮团及弥散性荧光；23天则Gimenez染色与免疫荧光检查全为阳性，立克次体繁殖量亦较前为多（图2）。

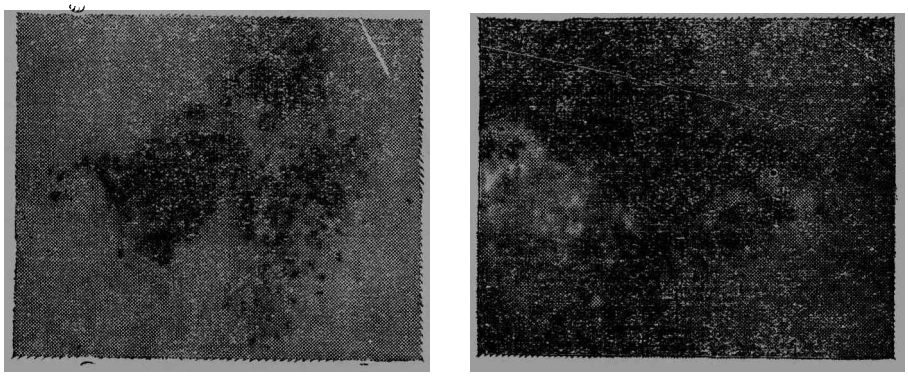


图2　感染O.moubata 23天血细胞中的北亚热立克次体

左：Gimenez染色（×1000）　右：免疫荧光染色（×800）

二、自然界蜱类的血淋巴试验

自然界蜱为1977年8—9月采自云南昭通地区冷冻厂的绵羊、山羊及牛（来自该地区6个县）的体表，检查的473只分属血蜱(Haemaphysalis SP.)、硬蜱(Ixodes SP.)及微小牛蜱 (Boophilus microplus)。取血淋巴经Gimenez染色法检查，在巨噬细胞内外见到类似立克次体（图3）的有39只；Q热免疫荧光检查有8只阳性，其中4只（未定种的3只血蜱和1只微小牛蜱，得自永善、彝良的绵羊和山羊）与Gimnz法阳性相符，另4只（1只未定种血蜱及3只微小牛蜱，得自永善绵羊及昭通乳牛)为Gimenez染色检查阴性者。

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

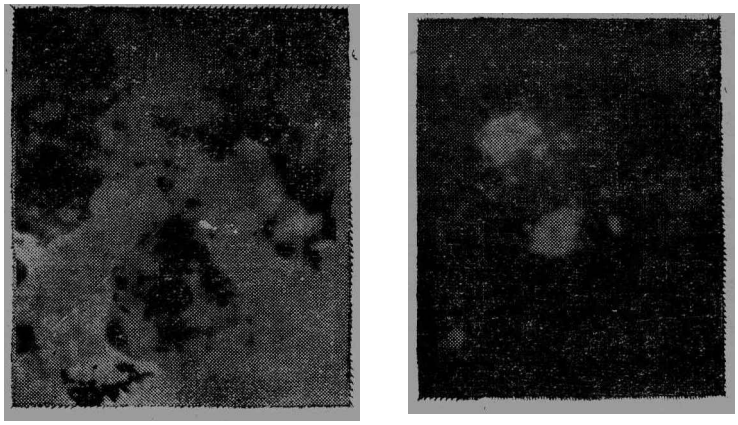


图3 未定种血蜱的血淋巴试验
左：Gimenez染色（×1000） 右：免疫荧光染色（×800）

讨 论

一、蜱对立克次体十分敏感，无论用接种法或喂血法均能感染成功。以血淋巴试验可以证明立克次体存在于巨噬细胞中和分散在细胞外。Zupăcicova-Majerska等[9]将Q热立克次体注射到单峰驼璃眼蜱（Hyalomma drom·darii）稚虫，检查其长成的成虫，发现立克次体广泛分布于血淋巴及结缔组织（气管丛、肌肉及皮下）中，其他器官如马氏管及唾液腺很少。Балашов等[10]检查亚洲璃眼蜱（H. asiaticum）稚虫叮咬感染Q热立克次体的豚鼠后长成的成虫，发现立克次体主要存在于中肠上皮细胞、血淋巴和皮下组织。有的资料指出，对自然界蜱类作立克次体检查也以血淋巴的阳性率最高，凡是其他器官或组织阴性者，其血淋巴均为阳性。因而，蜱的血淋巴试验在快速检出病原体上有实用意义。

一般认为稚蜱更比成蜱敏感，是否与不同期蜱的代谢差异有关，有待进一步研究。我们曾试将感染蜱成虫置于 37 ℃ 24—48 小时或喂血后并未见在发现立克次体上有明显差别。Rehacek等[11]也曾证明同一批游离蜱吸血前后的血淋巴试验阳性率并无明显差别，仅有个别组吸血后的阳性率比吸血前高，可能因吸血而刺激存在于器官中的立克次体，使之释放到体腔，从而被血细胞吞噬。稚蜱和成蜱对立克次体敏感性的差别，随着感染时间的延长而不显著。从我们对比 Henzerling 株感染稚虫及成虫的结果来看，稚虫感染早期血淋巴试验阳性率较成虫者高，立克次体数量亦较多；但约在2月以后检查则两者并无区别。

蜱实验感染立克次体后血淋巴试验的敏感性，尚与所用毒株及感染方法不同而有异。我们用Q热立克次体 YS-8株及Henzerling 株体腔接种感染稚蜱，可能由于YS-8 株为由绵羊胎盘分离不久，鸡胚传代不多，毒力较强；而 Henzerling 株为实验室长期用鸡胚保存者，毒力较弱，因之 YS- 8 株感染后血淋巴试验出现阳性较早。喂血法感染者似不如体腔接种法能在早期得到血淋巴试验阳性。这可能因为立克次体感染后虽广泛分布于血淋巴及器官，但喂血法需立克次体先在肠上皮细胞中繁殖，再由此进入血淋巴之故。Гольдин等[12]亦曾报告，叮咬感染北亚热立克次体的纳氏革蜱（Dermacentor nuttalli），在消化道查见立克次体较血淋巴早几天，到感染11天后，消化道与血淋巴中发现立克次体基本一致。

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

二、血淋巴试验中Gimenez染色检查常比免疫荧光法敏感。曾有在蜱卵巢涂片用Gimenez染色法发现落矾山斑点热立克次体比用免疫荧光检查多的报导。但在自然界蜱类检查中，前者不能区别立克次体及类似立克次体的微生物。我们检查实验感染Q热及北亚热立克次体的蜱血淋巴，也发现用Gimenez染色法检出率比免疫荧光法高。免疫荧光技术不如Gimenez染色法敏感，是否因一部分立克次体没有与特异性抗体结合所致，有待进一步阐明。

三、由于蜱能在体内长期保存立克次体，可经期经卵传递，因而可能将现场材料接种蜱体后，作为后送标本的手段。有人报告Q热立克次体在O.moubata体内存活1298—1303天而不会产生自净现象。我们曾查到278天，立克次体在蜱体内繁殖良好，并能经蜱传蜱，除非接种时有杂菌污染，否则蜱一般不易死亡。立克次体在蜱体内也不发生抗元性变异，可以考虑作为简便、理想的保种方法。

四、自然界蜱类检查，39只Gimenez法阳性蜱中几有一半采自昭通乳牛，其他主要得自永善和彝良的牛、羊，免疫荧光技术有8只阳性。显然，在Gimenez染色阳性中可能有类似立克次体的其他微生物或非病原性立克次体。但值得注意者，免疫荧光阳性而与Gimenez相符的4只蜱为采自永善及彝良的羊群。从宿主Q热血清补体结合试验阳性率来看，也以此两地较高。如绵羊永善为9.5%，彝良25%，昭通4.7%；山羊彝良12.5%，大关3.3%，鲁甸15只山羊无阳性。曾以其中3只蜱（2只未定种血蜱，1只微小牛蜱）分别接种豚鼠分离，动物虽有不规则发热，但恢复期血清补体结合试验未能证实Q热感染。这批蜱分离前曾在冰箱放置多日，均为饥饿蜱，接种前也未经37℃孵育，是否与分离阴性有关；抑或因血淋巴涂片时混入蜱几丁质，或血清中的非特异性因素（不仅在野生啮齿动物及其体外寄生虫，而且在家兔和其他实验动物都可能有沙门氏菌和李斯特菌感染）而造成免疫荧光检查的非特异性结果，有待进一步研究。

小　结

Q热立克次体实验感染O.moubata可用血淋巴试验检出立克次体。随毒株不同，立克次体在血淋巴中出现时间有异，成蜱不如稚蜱敏感。北亚热立克次体感染O.moubata后，在血淋巴中检出病原体常较Q热立克体晚，繁殖量也比Q热差。Gimenez染色检查每较免疫荧光技术易于获得阳性。关于云南昭通地区自然界蜱的血淋巴检查，因未能从阳性蜱分离出立克次体，尚难以作肯定结论。

（自然界蜱的采集及初步分类承贵州省畜科所王修文同志大力协助，云南省昭通地区防疫站有关同志参加家畜血清学调查，特此一并致谢。部分参加此工作者尚有曹俊杰、万中举、向信礼同志。）

参考文献

1. Rehácek, J. et al : Acta Virol. 10 (4):374 1966
2. Burgdorfer, W. : Amer. J. Trop. Med. Hyg. 19(6):1010 1970
3. Rehácek, J. et al: Acta Virol, 15 (3):237, 1971
4. Шаимов, М. С. идр: ЖМЭИ (4):7 1971
5. Burgdorfer, W. et al: Amer. J. Trop. Med. Hyg 23(1):109, 1974
6. 第三军医大学微生物教研室等：流行病防治研究，(3):233,1976
7. 刘连珠等：三医大科技，(4):1,1978
8. Gimenez,D. F.: Stain Technol., 39: 135,1964
9. Zupčicova-Majerska, M. et al : Acta Virol. 16(1):63, 1972
10. Балашов, Ю. С. идр: Паразитология 6(1):22 1972
11. Rehácek, J. et al: J. Hyg, Epid. Microbiol. Immunol. 15(4):424, 1971
12. Гольдин, Р. Б.идр : ЖМЭИ(8):31,1969

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