

立克次体病与衣原体病

专 辑

新平知

知平新

PDS

立克次体病与衣原体病专辑

目 录

重视人兽共患疾病的研究.....	(1)
综 述	
我国立克次体学研究概述.....	范明远(2)
国外立克次体学研究进展.....	汪 民(19)
立克次体的超微结构.....	孙纪申(45)
立克次体病的细胞免疫.....	魏文彬(49)
斑疹伤寒某些研究进展.....	安清武(53)
普氏立克次体在动物种群中循环的研究.....	陈渊民(58)
✓我国研究恙虫病的成就.....	于恩庶等(6)
台湾省的恙虫病.....	赵树萱(69)
Q热立克次体的毒力问题.....	范中善(74)
Q热立克次体的滴定方法.....	范中善(78)
国外衣原体学的研究进展.....	傅杰青(82)
原 著	
流行性斑疹伤寒引起严重肝功障碍二例.....	内蒙古哲里木盟卫生防疫站等(102)
扎鲁特旗斑疹伤寒血清流行病学调查.....	范明远等(104)
家庭非典型斑疹伤寒及其免疫指标观察.....	李 纯等(109)
流行性斑疹伤寒的今昔观.....	张清泉(112)
锦州地区地方性斑疹伤寒调查报告.....	锦州市卫生防疫站等(114)
✓云南恙虫病流行病学分析.....	陈渊民等(118)
玉林地区恙虫病立克次体分离和鉴定.....	文友基等(123)
酶联免疫法检查立克次体的初步研究.....	徐在海等(127)
铃头血蜱感染立克次体的实验研究.....	刘连珠等(129)
北京市鸕鸕热-鸟热血清流行病学调查和衣原体分离鉴定.....	胡 起等(132)
短篇报道	
斑疹伤寒毒株的分离和鉴定.....	成都生物制品研究所斑疹伤寒室(136)
四川Q热立克次体的分离与鉴定.....	俞树荣等(18)
Q热立克次体李林生物学性状的研究.....	范明远等(137)
Q热立克次体的分离和鉴定.....	孙柱臣等(142)
西藏阿里地区某边卡Q热的调查.....	乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所(138)
西藏昌都地区Q热调查报告.....	郭从厚等(81)
精河县Q热立克次体的分离与鉴定.....	孔昭敏等(48)
内蒙古地区Q热流行状态的分析.....	白 峰(139)
一个Q热疫源地的调查.....	刘连珠等(141)
恙虫病与钩体病混合感染一例报告.....	文友基(62)
✓革螨自然感染恙虫病立克次体的发现.....	于恩庶等(141)
从冬季恙虫病病人分离的立克次体研究.....	于恩庶等(111)
新疆精河县蜱传斑点热病例观察.....	乌鲁木齐军区后勤部军事医学研究所(101)
精河林立克次体免疫荧光染色研究初步结果.....	吕正文等(44)
小鼠血清鉴定不同种斑点热立克次体研究初步结果.....	吕正文等(126)
提高斑点热立克次体在鸡胚内繁殖量研究初步结果.....	汪 民等(77)
鸕鸕热-鸟热衣原体引起人群中原发性非典型肺炎爆发流行的研究报告.....	任贵方等(52)
天津地区人群中鸟热爆发流行的调查.....	胡 起等(117)
Q热反向血凝的实验研究.....	陶新华等(140)
河南省地方性斑疹伤寒病原体分离和鉴定.....	何家龙等(142)

重视人兽共患疾病的研究

立克次体病是人兽共患疾病之一。人、兽(动物)共患疾病,是指从动物到人类之间能够自然传播的疾病或感染,尤其在动物中间存在着某些储存宿主的疾病。这类疾病目前已知有150余种,广泛存在的病毒、衣原体、立克次体、支原体、细菌、螺旋体、真菌、原虫、蠕虫等对人有致病性的疾病,既包括通称的“有动物储存宿主的疾病”,亦包括“自然疫源性疾病”。

人兽共患疾病现在已经成为一门独立的综合性学科,其中不少疾病对人类或畜类构成严重威胁,甚至有时造成巨大的生物灾害。我国已知的人兽共患疾病有60余种,新近又发现弯曲菌病及蛙粪真菌病等新病种,可能还有更多的人兽共患疾病有待发现。

目前,国际上已将动物源性疾病(Zoonoses),作为监察和控制人类疾病流行的重要研究课题。为深入研究这类疾病,需要医学与兽医学紧密合作,并且也需要生物学、地质地理学、气象学及环境科学等方面的配合。这样,才能使一项包括学科较广的医、兽医生物科学进入一个新的历史阶段。因此,人兽共患疾病确应引起有关领导部门和科学工作者的重视。

为了保障人、畜健康,促进四化建设,加强国内外医学、兽医学学术交流和促进学科发展,于1979年12月正式成立中国微生物学会人兽共患疾病病原学专业委员会(Committee on Agents of Anthroponozoonoses, Chinese Society of Microbiology),魏曦教授任该专业委员会主任委员,共有人、兽医二十名委员。本专业委员会制定了1980~1982年三年学术活动计划。

本专辑是以立克次体病与衣原体病为主要内容,收录了中国微生物学会1979年(莫干山)学术年会立克次体专题讨论会的部份论文和综述;还有一部份有学术价位的资料,因历史原因未能及时公开发表,为了积累资料和广泛交流起见亦收入本专辑中,供研究参考。

中国微生物学会人兽共患疾病病原学专业委员会

1980 北京

C0139175



数字图书馆
PDG

我国立克次体学研究概述

中国医学科学院流行病学微生物学研究所

范明远

立克次体病是人和动物共患的传染病。致病性立克次体引起的人类立克次体病虽有数十种之多,其中具有普遍意义和主要的仅为十余种。我国迄今已证实有流行性斑疹伤寒、鼠型斑疹伤寒、恙虫病、Q热、北亚热及立克次体痘等六种立克次体病。研究的比较早和比较多的是斑疹伤寒,虱媒斑疹伤寒是世界卫生组织流行病学监测项目之一(Brezina R et al, Bull WHO 49(5): 433, 1973)。我国古代典籍中虽有本病的记载,但近代有可靠记录的是1850年在上海发生的严重流行,其后曾发生十几次大的流行,其中有七次是伴随着战争、饥荒和水灾的发生而流行^[1]。我国于1933年首次分离出斑疹伤寒病原体^[2]。而对其他立克次体病的研究则很少。

解放后即开展了斑疹伤寒的研究和防治工作;对其他立克次体病亦陆续开展了调查研究。三十年来,科研工作者和医疗卫生防疫工作者对立克次体和立克次体病做了大量调查研究工作,成绩显著。虽然目前还存在着斑疹伤寒的局部流行,但基本上控制了该病大的爆发流行。东南沿海诸省的恙虫病疫源地基本查清,对西南边缘省份的疫源地亦做了若干调查。此外,还发现了Q热、蜱传斑点热(北亚热)以及立克次体痘等立克次体病。对立克次体病的血清学、免疫学、病原学、流行病学以及临床症状及防治措施等方面进行了若干调查研究工作。现仅就解放后有关立克次体病的流行病学及微生物学的研究工作综述于下。

流行性斑疹伤寒与鼠型斑疹伤寒

流行概况: 流行性斑疹伤寒由普氏立克次体(*Rickettsia prowazeki*),鼠型斑疹伤寒由莫氏立克次体(*Rickettsia mooseri*)所

引起。解放前没有精确的统计数字与之比较,但从零星资料分析,以虱子为媒介的流行性斑疹伤寒的流行是十分严重的,病死率很高,主要发生在我国北方(东北、华北、西北)若干省份;以蚤类为媒介的鼠型斑疹伤寒,在国内大多数地区呈散在发生。解放后,斑疹伤寒仅有两次流行高峰,即1951~52年和1961~62年,都是在人口流动频繁或经济困难、卫生条件差的情况下发生的,由于特效药物的治疗和采取正确的预防措施,病死率递减是明显的。由于人们的重视和工作的开展初步阐明了西南边缘省份流行性斑疹伤寒的某些流行规律。云、贵、川三省交界的高寒山区所发生的斑疹伤寒,经血清学、病原学及流行病学调查,证实以流行性斑疹伤寒为主;流行区健康人群血清补体结合抗体阳性检出率,云南昭通地区为30.2%^[3];四川宜宾地区为38.7%^[4];贵州调查1,828人来自三类地区,其一为20年以上没有斑疹伤寒流行,人群抗体阳检率为26.7%;其二为多年无流行,只是近年发生过局部小流行,人群抗体阳检率为58.6%,其三为常年有散发病例或局部小流行,人群抗体阳检率为71.9%。各年龄组抗体阳检率比前两类地区为高。第一和第三类地区各年龄组(特别是10岁以下小年龄组)的阳检率、抗体效价等均存在非常显著差别。流行地区人群抗体阳检率虽高,但仍有相当数量易感者,加之传染源和传播媒介存在,因而导致散发病例不断,甚至出现局部流行。由于人群交往日益频繁,本病可作近程或远程传播,因此第三类地区为防治重点^[5]。1979年在内蒙古盟地区,对流行区及非流行区健康人群补体结合抗体的阳检率进行比较,结果流行区阳检率为14.3%,抗体效价为1:37;非流行区阳检率为70%,抗体效价为1:23,两地调查结果差别显著。非流行区

抗体阳检率高,说明是该地不发生斑疹伤寒的主要原因;流行区抗体效价高,说明是新近感染所致^[6]。该病的发生或流行,显然与当地健康人群抗体水平的高低有密切关系。因此,非流行区健康人群抗体水平达50%以上,发生流行的可能性就不大。大、中城市流行性斑疹伤寒的流行,根据最近几年资料统计,大多数发生在收容站(所)里,与人群流动频繁,卫生条件差有直接关系。

传染源问题: 历来认为流行性斑疹伤寒的传播环节,是人——虱——人的单一循环,病人是该病的唯一传染源,感染普氏立克次体的体虱则发病死亡。故在两次流行的间歇期间,普氏立克次体存在于何处的问题,是国内外没有解决的老问题。关于流行性斑疹伤寒人以外宿主的研究,1959年于河北张家口检查36匹马血清中,有20匹对流行性斑疹伤寒补体结合试验呈阳性反应(效价1:10~1:80),中和抗体试验阳性者4份(效价1:20~1:80);1965年于内蒙库伦旗半农半牧区调查,显示抗普氏立克次体的补体结合抗体,健康人群阳检率为31.1%,绵羊30.4%,山羊7.5%,黄牛32头全部为阳性^[7];1977年于四川宜宾检查69头家畜的斑疹伤寒补体结合抗体,阳检率为59.4%(41头);其中黄牛14/15、水牛12/18、猪12/22、山羊3/14为阳性^[4];1979年于内蒙扎鲁特旗流行性斑疹伤寒流行区,检查病家自养驴的血清53份,斑疹伤寒补体结合抗体阳性者33份,阳检率为62.3%(效价分布:1:8二十一份,1:16八份,1:64四份)^[6]。法国学者Reiss-Gutfreund等在北非、中东、东欧检查了各种家畜的血清抗体,并从山羊、绵羊及家畜寄生蜱中分离出普氏立克次体^[8]。上述结果,初步证实了家畜、蜱类,甚至部分野生动物为普氏立克次体的保藏者。因此考虑,在自然界中存在着流行性斑疹伤寒两个传播环节,即家畜——蜱——家畜及人——虱——人的可能性。人群感染流行性斑疹伤寒的第一传染源有可能来自家畜,人类由于偶然机会被蜱叮咬或蜱粪进入粘膜、皮肤,使两个环节联结

起来,从而形成人间虱传斑疹伤寒的流行。在我国尚无病原体分离的报告,如从节肢动物及动物找到充分的病原学证据,将会对动物传染源的论点以有力的支持,从而有可能解决普氏立克次体在流行间隙期间的贮存场所问题。

对虱粪保存普氏立克次体时间的研究,证实夏季室温中,普氏立克次体的生活力在虱粪中至少能保持149天,从而支持流行性斑疹伤寒流行间歇期虱粪保存病原体的假说^[9]。

复发性斑疹伤寒亦称Brill-Zinsser氏病,和原发性斑疹伤寒,都是由普氏立克次体引起的流行性斑疹伤寒,前者临床表现较轻并具有独特的流行特征(查不到虱媒),多被漏诊和误诊,但在流行过程中仍有传染源的作用。1964~65年宁夏检查111例现症患者阳性补体结合血清中,除典型原发性流行性斑疹伤寒患者外,有相当一部份是非典型的患者,认为很可能是复发性斑疹伤寒,给予复发论者以支持。复发说主要依据是,首次患流行性斑疹伤寒后数十年,普氏立克次体一直存活于康复者体内的组织器官中,在一定条件下,这种复发病例成为虱子感染的源泉,为在患者周围斑疹伤寒的发生和流行创造了条件。这个假说的立足点就在于斑疹伤寒新的爆发,仅仅是患过斑疹伤寒的病人,由其内源性引起^[10]。

国外有从康复者淋巴结中分离普氏立克次体的少数报告(Price WH: J Bact 69:106, 1955),我国1964年从一例长期从事立克次体实验室工作者的甲状腺瘤Giemsa染色的病理切片中,观察到腺瘤间质细胞和小血管周围的巨噬细胞胞浆中,有立克次体相似的小体,经分离鉴定为一株普氏立克次体(S株)^[11]。证明该立克次体可长期在人体中存活。这些例证,能否就成为复发说的主要依据?重要的是应取得更多的流行病学证据。

生态学的调查: 鼠型斑疹伤寒旧称地方性斑疹伤寒,某些家、野鼠是莫氏立克次体的贮存宿主,某些蚤类(如印鼠鼠蚤等)是该病的主要媒介昆虫,具有地方性散发的特点,临床症状远较虱传斑疹伤寒为轻。流行性斑疹伤寒和

鼠型斑疹伤寒往往伴随发生，两者的临床症状相似，只有轻重之分；血清学及免疫学反应相互交叉，只有程度高低之分；甚至某些流行病学特点也不易分开，如莫氏立克次体亦可借助于人虱为病媒，在冬春季造成流行，此时临床症状加剧，病死率升高，两者之间有时很难找出本质上的区别，需要证实的问题是两者之间在发生学上有无内在联系。1978年锦州市郊和黑山县发生54例鼠型斑疹伤寒，补体结合分型效价，莫氏立克次体为 $1:32 \sim 1:512$ ，普氏则完全为阴性^[12]。通常即使用颗粒性分型抗原，进行补体结合试验亦有某种程度的交叉反应；以普氏与莫氏两型效价相差2倍以上，作为判断型别的标准，但两型中一个型别完全呈阴性反应的情况较少见。

1955年从云南下关病家中捕得的35只沟鼠中，21份对莫氏呈阳性补体结合反应，从鼠脑中分离出2株莫氏立克次体，可以证明鼠类是当地鼠型斑疹伤寒的自然界保藏宿主，其中R14株具有典型莫氏立克次体特性^[13]。1956年从昆明市及郊区的沟鼠、黄胸鼠及鼠蚤共分离出5株莫氏立克次体，说明该病原体与鼠类及蚤类的密切关系^[14]。1957年从云南双江地区的鼠类及热带鼠螨(*L. bacoti*)亦分离到莫氏立克次体^[15]。1959年福建甚至还从猪中分离莫氏立克次体。沟鼠及黄胸鼠携带莫氏立克次体较为普遍，鼠类受到感染后，可终生携带莫氏立克次体，鼠类和蚤类密切相关，蚤类感染莫氏立克次体后并不致死。因此，在悠久的历史中，鼠、蚤与莫氏立克次体是共生的。流行性斑疹伤寒在进化史上可能远较鼠型斑疹伤寒出现为迟。没有虱子也就没有流行性斑疹伤寒的流行；同样，没有鼠和蚤也就不会发生鼠型斑疹伤寒，不论在农村或城市，杀虫灭鼠都是防病的重要预防措施。

病原体的分离：为了证明国内各地斑疹伤寒的确实诊断和疫苗制造，分离斑疹伤寒毒株工作甚为重要。1949年在大连一次流行性斑疹伤寒流行中，从病人及病鼠共分离出三株普氏立克次体^[16]，其中“T”株应用于立克次体

凝集反应抗原及疫苗试制均获得较满意的结果。1952年从大连病人分离的“H”株^[17]及1955年从下关鼠类分离的R14株^[13]，均符合莫氏立克次体的标准株要求。1955年从图们分离的普氏立克次体图2号及10号株，虽不对虱子致病，但经虱、鼠交替传代及小白鼠X线照射后，仍提高了两株的毒力。普氏立克次体兰州株(王株)经血清学、免疫学检定，同国际标准株比较毫无逊色^[18]。此株已参与我国斑疹伤寒鼠肺疫苗的生产。

毒株的变异性：普氏立克次体通过虱、鼠交替传代，不但保持了高度毒力和完整的抗原性，而且也获得了莫氏立克次体的若干特性。这种鼠化的普氏立克次体，能引起豚鼠阴囊肿大(但鞘膜涂片中立克次体数量不多)，其疫苗在人群预防注射后，可同时引起对莫氏立克次体的补体结合及中和抗体同等程度的增高^[19]，故单纯用普氏立克次体生产鼠肺斑疹伤寒疫苗，是可以同时预防流行性及鼠型斑疹伤寒的。同样，莫氏立克次体在初期单独进行小白鼠滴鼻感染鼠肺制出的疫苗原液，不能呈现对普氏立克次体的完全免疫，若经过虱、鼠交替传代后，则逐渐呈现对普氏立克次体的完全免疫^[13]。

疫苗的研究：1946年开始在解放区的大连卫生研究所(生物制品研究所)及佳木斯卫生技术实验厂，研制小批量的斑疹伤寒鸡胚卵黄囊膜疫苗，前者还同时试制出鼠肺疫苗，当时对预防斑疹伤寒的流行做出一定的贡献。1950年长春、北京及上海各生物制品研究所亦开始研制斑疹伤寒疫苗。1951年，为了扩大当时对斑疹伤寒疫苗的需求，还研究成功兔肺斑疹伤寒疫苗。通常家兔对普氏立克次体不敏感，接种该立克次体后，不能引起肺部的广泛感染，因此用兔肺扩大疫苗产量是困难的。当用饥寒交迫予处理家兔3天后，再从气管接种普氏立克次体悬液，增强了兔肺对普氏立克次体的感受性，获得立克次体纯培养，可在兔肺连续传代达10代以上，解决了当时П.Ф.Здоровский在兔肺连续传代所遇到杂菌污染的困难。同时

观察到兔肺中的立克次体包涵体,认为是普氏立克次体在兔肺发育阶段中的特点。用上述冻饿法,使家兔获得85%的感染率,兔肺疫苗经血清学、免疫学检定、符合疫苗产品的要求^[20]。1952年试将斑疹伤寒鼠肺疫苗进行真空冷冻干燥,用蔗糖明胶和乳糖明胶两种基质进行对比试验,前者干燥疫苗稀释至1:1536免疫小白鼠,以2个LD₅₀立克次体毒素攻击,能使50%小白鼠免于死亡,后者干燥疫苗稀释至1:1152免疫小白鼠,也能保护50%小白鼠不死亡,证明两者无明显差别。斑疹伤寒干燥疫苗的抗毒免疫效价比冻干前降低2~3倍,但并未丧失疫苗的免疫特性,尚能达到当时液体疫苗有效标准的最高要求^[21]。1953年在大连生物制品研究所举办了全国斑疹伤寒疫苗生产学习班,统一了疫苗生产工艺规程,1958年中央卫生部批准了《精制流行性斑疹伤寒鼠肺疫苗及检定规程》,在全国统一了斑疹伤寒疫苗生产标准。目前我国仍用经鼠虱交替传代的单一的普氏立克次体株生产鼠肺斑疹伤寒灭活疫苗,人体免疫效果尚好。国外已用普氏立克次体弱毒株“E”株进行活疫苗生产,免疫效果虽优于灭活疫苗,但后发反应仍达0~14%。故研究亚单位化学提纯疫苗,乃是今后疫苗的发展方向。

兔化虱种的培育:斑疹伤寒立克次体的研究和疫苗生产,其毒株必须通过人的体虱(*Pediculus humanus corporis*)培养和传代,才能保持毒力和免疫原性的稳定。人虱系单嗜性昆虫,离开人血而代以其他动物血喂养,均不成功。因此,国内外都在志愿者身上喂养和繁殖大量实验用虱,由此而使供血者健康造成不应有的痛苦和损害。1956年研究用人、兔交替喂虱法,驯化成功一株嗜兔血的人虱虱种,称为兔化人虱。交替法是在人虱变态期完全喂兔血,到成虫阶段逐代以增加喂兔血天数,减少喂人血天数,使其逐渐适应于兔血,经过6个月(6代)强化人虱以兔血生活和传代,最终完全摆脱了人血,变成嗜兔血的虱种^[22]。兔化人虱对普氏立克次体的敏感性

以及保持高度毒力和免疫原性与正常人虱无异^[19]。1959年卫生部生物制品委员会批准,在全国斑疹伤寒疫苗生产中推广使用。迄今已传代25年。人、兔交替喂虱法较美国G.H. Culpper的淘汰法为优,一是成本低,二是具有可重复性,是国际上研究成功的第二株兔化人虱虱种,在我国之后苏联B.A. Пшеничников亦报告用交替法驯化成功另一株兔化人虱。1954年试验成功大白鼠乳鼠皮膜喂虱法^[23]。改进了苏联B.A. Пшеничников的人皮膜法和美国Fuller的鸡皮膜法,乳鼠皮膜取材容易,性能良好,便于保存,可使成批幼虱通过皮膜直接吸吮感染立克次体,比波兰Weigl的虱肛显微注射法,向前推进了一步。

实验病理学的研究:国外曾证实莫氏立克次体感染小白鼠,发生肢体麻痹现象。1952年国内报告莫氏立克次体感染大白鼠试验,亦证实有肢体麻痹现象,系因该立克次体对中枢神经系统有程度不同的毒力和亲和力,对其病理形态学进行了系统观察,认为大白鼠四肢麻痹是由莫氏立克次体所致^[24]。1954年用普氏和莫氏两型立克次体实验感染小白鼠肺脏,在病理切片中,两型立克次体所致鼠肺病变,主要为支气管炎,两型立克次体在肺内出现时间、细胞内外分布数量以及分布状态均有明显差别,特别是莫氏立克次体具有细胞外分布的特点,分析认为,该立克次体存在着于细胞外生长繁殖的可能性^[25]。

立克次体干扰素:关于立克次体干扰素的研究,国外只有三篇文献简报(Smadel等: *Science*, 140: 153, 1963; Hopps等: *Bact Proc*, 115, 1964; 河野等: 17回日病毒总记, 220, 1969),他们分别研究了恙虫病立克次体和莫氏立克次体,证明有干扰素产生。我国在同一时间证实了普氏立克次体的干扰素。1963年用普氏立克次体滴鼻感染普氏立克次体后,在肺组织悬液的上清液中,获得一种立克次体干扰素(Rickettsial Interferon),高速离心(16,000rpm/分)35分钟尚不能使其沉淀;干扰素不能透析,如用酸、碱透析以及

60°C30分钟处理均不能使其受到破坏,但可被0.01%胰旦酶破坏。该干扰素对立克次体和牛痘病毒有干扰作用。家兔皮内试验是测知干扰素的比较敏感的试验,干扰素能使普氏立克次体在家兔皮内引起的反应(Giroud试验)推迟、减轻和反应过程的缩短。系统研究了鼠肺内普氏立克次体产生干扰素的动态。发现它能使鼠肺中立克次体繁殖受到一定的抑制。感染鼠肺24~96小时为产生干扰素的适应时间。小白鼠经腹腔注射干扰素。24小时后,经尾静脉注射1 LD₅₀ 1:256的活立克次体毒悬液,有3/4的动物受到保护而不致死于毒性作用。初步观察立克次体干扰素的有效期,在4°C至少可保存3个月[26]。

组织培养:关于立克次体组织培养的研究,1966年报告用普氏立克次体鼠肺传代毒株,感染鼠肺单层细胞,于48~96小时开始繁殖,4~7天达高峰,约80%的细胞受到感染,在发育过程中,立克次体形态呈丝状→链状→长杆状→短杆状。梭形及多边形上皮细胞被大量增殖的立克次体所胀破,细胞退化;巢形细胞在感染早期出现空泡,立克次体寄生于空泡之间隙中;纤维母细胞虽充满了立克次体,但仍保持细胞的完整性[27]。关于单层细胞的选择,除上述鼠胚细胞外,另曾用小白鼠鼠胚皮肤,鸡胚,豚鼠、大白鼠及金地鼠肾,金地鼠睾丸等4种原代单层细胞;Detroit-6及Walker氏肉瘤256两种传代细胞。上述细胞中,鼠胚肺、鼠胚皮肤及D-6三种细胞对立克次体敏感性相似,均能使小白鼠发病,适用于普氏立克次体培养和诊断抗原的制备。其中D-6细胞易形成巨细胞和融合细胞团,即使有丝分裂受到破坏时,也不影响立克次体繁殖,认为该细胞是一种特异性的形态学变化[28]。

血清学试验:自40年代用鸡胚卵黄囊膜和鼠肺大量培养立克次体的基础上,特异性血清学试验开始有了发展。我国于1949~1950年即开始研究了特异的立克次体凝集反应,曾用冻融法及超声波法处理立克次体抗原,试验证明用处理后的抗原所作的立克次体凝集反应,

其敏感性与特异性均比外斐氏反应为优,其玻片反应法比当时国外立克次体凝集反应法为简便和快速[29, 30]。外斐氏反应在斑疹伤寒新流行区,其准确率可达80~90%,单份血清以1:160为诊断参考效价,双份血相差4倍以上则更有意义,因操作方法简便,故在一般基层医疗卫生单位仍被采用;但在斑疹伤寒老区,对感染过斑疹伤寒或复发性患者以及疫苗免疫者,该法75%的结果不准确,另外,对若干非立克次体病甚至对孕妇亦产生非特异性反应,对实验感染斑疹伤寒的豚鼠血清不产生反应性等,因此,外斐氏反应有其一定局限性,对其结果必需慎重分析,才能判断准确。立克次体凝集反应虽然能比较准确反应机体内的疾病状态,纯化的颗粒性抗原亦能分型(流行性和鼠型斑疹伤寒),但抗原耗量较大,不甚经济,是其缺点。不过,立克次体凝集反应与补体结合反应,对斑疹伤寒诊断是特异的,可靠性也是肯定的。

立克次体红细胞凝集试验:1953年张希曼等在国外,首次报告从普氏立克次体卵黄囊膜培养物中提出一种称为红细胞致敏物质(Erythrocytes Sensitizing Substance,简称ESS),其理化性质属于耐热性、耐碱性多醣质,可致敏绵羊红细胞和人O型血细胞,以红细胞为载体的抗原抗体反应,可应用于斑疹伤寒诊断(Chang SM J Immu, 70:212,215,1953)。1963年从斑疹伤寒鼠肺疫苗中提取ESS,即疫苗9份,加2N之NaOH 1份,置100°C水浴中加热30分钟,冷却后移置透析袋中,以磷酸缓冲液(pH 6.8)在冰箱透析过夜,ESS 2毫升加洗涤3次之O型血细胞0.1毫升,37°C致敏1小时,离心洗涤,稀释成1%血细胞悬液即可用于血凝试验,检查19例临床确诊之斑疹伤寒患者36份血清,结果证明抗ESS抗体出现早(发病5~7天),而且效价亦高(1:400~1:3,200),比外斐氏反应约高10~640倍,对233份非斑疹伤寒及正常人血清检查,认为1:50以上即有诊断价值[31],临床应用具有良好的敏感性和特异性[32]。1977年将抗原与5%绵羊

红细胞等量混合, 室温致敏15分钟, 用间接血凝玻片法检查150份斑疹伤寒患者血清, 阳检率为100%; 97份接触者, 阳检率为25.7%; 30份健康者全部为阴性。患者发病第一周阳检率占31%, 10日内72%, 10~30日占28%, 间接血凝与外斐氏反应符合率为80.3%, 阳检率高于外斐氏反应, 同时无非特异性凝集^[33]。1979年报告斑疹伤寒恢复期血清35份用间接血凝(1:800作为单份血清诊断标准)与补体结合对比试验, 两者符合率为94.4%^[34]。同年报告, 4毫升ESS加0.1毫升绵羊红细胞, 37°C致敏1小时, 试管法0.4毫升稀释血清加0.1毫升致敏血细胞, 室温过夜, 观察结果, 检查斑疹伤寒恢复期血清, 距病后1个月11份, 12个月18份, 间接血凝几何平均滴度分别为1:3629, 1:422.5; 补体结合为1:681.6, 1:296.2; 外斐氏反应1:85.1, 1:25.5, 说明间接血凝比较敏感; 但作流行病学回顾性调查以补体结合反应较好(阳检率为45.1%), 间接血凝反应为(7.1%)与外斐氏反应(2.8%)均不理想, 同时用半胱氨酸处理血清, 证明血凝抗体为IgM^[35]。间接血凝是以抗原检查抗体的方法, 抗体的产生需要时间过程, 因此用抗体检查抗原的反向血凝试验方法, 才能真正达到早期诊断的目的。国外有关反向血凝研究报导极少, 且尚处在实验室试验阶段。间接血凝如同补体结合全抗原(可溶性抗原)均为属的特异性。

补体结合颗粒性抗原具有型的特异性, 能够清楚鉴别普氏与莫氏立克次体。该反应在流行病学上, 对斑疹伤寒回顾性调查, 具有特殊的价值, 因罹患该病后, 特异的补体结合抗体可保持数年乃至数十年之久。若从某一个地区居民的血清中, 检查其对斑疹伤寒立克次体的补体结合效价, 即可以测定其过去一段时期内的斑疹伤寒流行情况, 借以推知其免疫性, 并对于当地斑疹伤寒的流行趋势和临床症状作到比较接近的估计。

以往患过流行性斑疹伤寒者, 又继发感染鼠型斑疹伤寒或予先经流行性斑疹伤寒疫苗免疫的人, 再患鼠型斑疹伤寒时, 血清学反

应往往是普氏立克次体抗体反应占优势, 或二者强度交叉, 即使用特异性抗原或毒素中和试验都不能区分。反之, 若先有莫氏立克次体原发性感染或免疫, 又发生继发性普氏立克次体感染时, 血清滴度以莫氏立克次体占优势, 或出现强度交叉现象。用豚鼠作试验, 用普氏和莫氏立克次体分别进行感染或抗原免疫, 3周后采血为测定基础免疫(或原发感染)后抗体变化; 然后再用普氏立克次体活毒攻击, 8周后采血, 同时用全抗原和普氏、莫氏特异性分型抗原作补体结合试验, 证明(1)在普氏和莫氏立克次体原发性感染后的豚鼠血清(包括普氏攻击对照组), 全部都能用特异性抗原明确分型; 而用全抗原时, 普、莫氏抗体效价基本相等或相差1~2管, 不能明确分型, 但用颗粒性抗原仍具有严格的分型特异性; (2)先经过莫氏立克次体原发感染或基础免疫, 再经过普氏立克次体活毒攻击的豚鼠血清, 普氏及莫氏抗体同时升高, 滴度相近; 不仅用全抗原不能分型, 即使用特异性抗原也不能明确分型。上述结果与人体反应基本相似^[36]。

立克次体病急性期血清补体结合试验中有所谓“高价抗原需求”(HAR)及“不耐热性”(HL)现象存在, 血清补体结合试验效价随所用抗原量的增加而增高, 同时血清灭活的温度对效价也有明显影响, 灭活温度超过56°C时, 血清效价常较低。例如选择流行区发病典型的原发性斑疹伤寒患者血清(No.29)和非流行区一个散发病例血清(No.161)进行比较试验, 结果表明No.2血清在56°C灭活时, 抗原单位高时(8个单位)抗体滴度也高(达1:640), 反之抗原单位低时(如2~4单位)抗体滴度也低($\leq 1:160$), 并具有“不耐热性”, 血清在60°C灭活时, 抗体滴度普遍降低($\leq 1:160$)。这些特征认为是原发性斑疹伤寒患者; No.161血清没有这些特征, 与复发性斑疹伤寒患者相符^[10]。

恙虫病

历史及流行概况: 恙虫病在我国古代典籍

中称为沙虱毒(热)。魏晋南北朝时代葛洪(公元281~361)在岭南一带观察并记述了人类沙虱毒的发生与沙虱(恙螨)的叮咬有关,这是符合该病现代流行病学规律的,是祖国医学上的一大贡献。日本学者丹波及川村都曾介绍过葛洪有关沙虱毒的著作^[37,38]。1916年Hatori首先报告我国台湾的恙虫病;现在国际上常用的恙虫病立克次体毒株Pescardores株,即是1935年从澎湖岛恙虫病病人中分离出来的。我国大陆上的恙虫病,1923年报告在武汉的病人脾内曾观察到一种微生物,认为可能是恙虫病立克次体。魏曦1943年于昆明观察到二例OX_K阳性反应的病人。1946~48年在广州首先发现典型恙虫病病人,血清学OX_K阳性,同时还获得病原学的证据^[39,40];1950年在广西桂林^[41];1951年在福建平潭^[42];1956年在云南保山^[43];1963年在四川西昌^[44],先后证实有恙虫病。1952年从病人、纤恙螨及鼠类分离出恙虫病立克次体,从病原学上阐明了恙虫病的自然循环^[45]。我国以东南沿海和西南各省为恙虫病多发地区,长江以南江西、湖南、湖北、广西、安徽仅有散发病例,西藏也证实有恙虫病。西北的陕西、甘肃,东北的黑龙江、吉林、辽宁三省以及北京、内蒙等地亦有OX_K外斐氏反应阳性者,说明恙虫病的分布较为广泛。恙虫病自然疫源地实际上可能远不止上述地区,随着人们对该病认识上的提高和调查研究的深入,对我国恙虫病的实际分布情况将会有更多的了解。

人群易感性: 凡未接触过恙虫病的人群,其易感性是普遍的。在地方性多发疫区,幼儿时期即易受感染,逐步获得免疫性,故在疫区中的居民,恙虫病的发生多呈散在流行,非疫区的外来人群常发生较大的流行。由于各地自然地理条件、生物区系的不同;毒株毒力的强弱和人群免疫水平的高低,以及接触机会的多少,决定感染和发病的可能性,年龄、性别、职业及季节性亦因当地自然条件、人民生活及生产习惯而有所差异。福建严重疫区平潭1953~56年的调查指出,年平均发病率为700~

1,000/10万人,特效抗生素治疗前病死率为13~16%,治疗后病死率降至0.2~0.4%^[42];浙江病死率为9.6%^[46],广州为5.4%^[47],主要因治疗过迟所致。

季节性: 恙虫病发病季节比较分明,一般多在夏秋季发生,福建沿海7月中旬为流行高峰;浙江、福建(内陆山区)、广东一般在6~7月;四川西昌、云南怒江则在8月份。有的地区6月与10月两个月的病例比较集中,正值早、晚稻收割季节,与受染者的暴露机会有关。

媒介恙螨: 纤恙螨属是恙虫病的主要传播媒介。在我国大陆上已证实主要传播媒介为地里纤恙螨(*Trombicula deliensis*);在台湾为红纤恙螨(*Trombicula akamushi*)。据东南沿海及西南诸省调查资料,从地里纤恙螨幼虫分离出恙虫病立克次体的株数最多,印度囊棒恙螨(*Euschongastia indicum*)次之,其他诸如高湖纤恙螨(*Trombicula Kaohuensis* sp.)、巨多齿恙螨属(*Acomatacarus* sp.)、新肋恙螨(*Neoschongastia* sp.)盾纤恙螨、(*Trombicula Scutellaria*)、中华背展恙螨(*Walchia chinensis*)虽有分离恙虫病立克次体的报告,但阳性率不高。此外,从福建的刺毛灰鼠(*Rattus confucianus*)体上的毒棘厉螨(*Echinalaelaps echidminus*)^[48]及家鼠体上的硬蜱(*Ixodes* sp.)^[49],证明能感染恙虫病立克次体。但革螨和硬蜱的恙虫病生态学尚不清楚,因此,在流行病学上的意义也很难估计。1952年报告用滤纸片等简单方法培育地里纤恙螨^[50];1956年在系统研究了培育纤恙螨方法的基础上,详细描述了地里纤恙螨生活中每一变态期的形态和特征^[51]。福建研究用硫化钾溶液^[52]、浙江用苯甲酸苄酯及苯二甲酸二丁酯^[46]证实对纤恙螨有防护和杀灭作用。实验室培育地里纤恙螨,从其稚虫及第2代幼虫分离出恙虫病立克次体,据此认为可经卵传递^[53]。不过,对纤恙螨是从宿主动物藉吸血(体液)感染恙虫病立克次体抑或纤恙螨自行经卵连续传递病原体的问题,尚有争论。经卵传递恙

虫病立克次体,说明纤恙螨在恙虫病生态学上,不仅起传播媒介作用,而且也是恙虫病立克次体的贮存宿主。

宿主动物:携带纤恙螨的鼠类,在台湾有赤家鼠(*Rattus rufescens*)、白腹鼠(*Rattus coxingi*)、板齿鼠尼伯尔变种(*Bandicota indica nemorivaga*)、黑家鼠(*Rattus rattus rattus*)、罗赛鼠(*Rattus losea*)、沟鼠(*Rattus norvegicus socer*)、麝鼯鼠(*Pachyura murinus*);广州携带地里纤恙螨的鼠类有沟鼠、斯氏家鼠(*Rattus rattus sland-eri*)、小家鼠(*Mus musculus*)及臭鼯鼠(*Suncus murinus*)等^[54];福建有罗赛鼠、野外鼯鼠(*Mus bactrianus kakhyenensis*)、小家鼠、家鼠、沟鼠及臭鼯鼠等^[55];浙江有刺毛灰鼠、黑线姬鼠(*Apodemus agrarius*)、黄胸鼠(*Rattus flavipectus*)、罗赛鼠及食虫鼠等^[46]云南有黄胸鼠、大足鼠(*Rattus nitidus nitidus*)及斯氏家鼠等^[56~58];四川有小家鼠、灰腹鼠(*Rattus chianinus*)、沟鼠、猎食姬鼠(*A.a.chevrieri*)及白腹鼠(*Rattus andersoni*)等^[44]。直接从鼠类脏器分离恙虫立克次体的有野外鼯鼠、小家鼠及臭鼯鼠等。福建还从18只家兔及1头猪中分离出恙虫病立克次体^[55]。用感染鼠喂猫使猫感染,并从其脾内证实有恙虫病立克次体^[59],因此,推测鼠群间由于相互残食,可造成另外的传播途径。

毒株分离:从病人血液、动物脏器及纤恙螨分离恙虫病立克次体最简便方法是小白鼠腹腔接种法,亦有用病人血液直接接种繁育7天的鸡胚卵黄囊,其阳性分离率均很高,如1952年用两法并行检查患者血液,鸡胚分离率为48.7%,小白鼠为40.5%,其中17份鸡胚阳性,小白鼠却为阴性^[45],但福建毒株在鸡胚发育不好,不易适应。弱毒株用小白鼠分离,往往不发病或虽有病变也不死亡,腹膜涂片镜检也不能检出立克次体,因此不易判断有无感染,若用已知恙虫病立克次体强毒株1000个LD₅₀攻击被接种的小白鼠,不死者即可判为阳性,说明有立克次体感染。试验证明恙虫病立

克次体在动物血中可生存14周,在脑、脾可生存142天以上。从动物分离,常用脑、脾、肾混合材料接种小白鼠,尤其肾脏分离阳性率最高,脑、脾次之^[60]。试验证明肾上腺激素能提高小白鼠对恙虫病立克次体的感受性^[61]。对小白鼠不敏感的弱毒株,有的可适应地鼠肾单层细胞,不论以实验感染材料抑或从自然界鼠类直接用组织培养法分离,胰酶消化的地鼠肾单层细胞培养恙虫病立克次体效果均较好^[62]。

毒株的毒力:Smadel认为立克次体毒素与其他立克次体相似。如用Gilliam株卵黄囊膜感染材料,能在几小时内杀死小白鼠,这种毒性物质能被同株免疫血清所中和,对其他株免疫血清没有或仅有少量中和抗体。我国广州株毒力与日本株相近,比东南亚株强,对小白鼠LD₅₀介于 $10^{-7} \sim 10^{-8}$;浙江、四川、福建株依序介于 $10^{-6} \sim 10^{-8}$;云南株则介于广州株和福建株之间。我国澎湖恙虫病病死率为0~3%,认为是弱毒型,用澎湖株给日本农民感染免疫,结果都发生了典型的临床症状,甚至发生死亡者,但康复后的感染者。20年内却未再发生恙虫病。强毒株侵入人体,典型发病者才能获得强固免疫,发病时间长者,OX_K抗体效价亦高,但弱毒株并非如此。浙江、福建、广州株之间已证实有交互免疫性,但感染量不能低于 10^{-4} 。自永嘉地区地里纤恙螨分离而得的浙江株的毒力,LD₅₀高于7.00,经实验室处理(反复冷冻、快速传代结合紫外线及氮芥处理)发生变异,毒力降低达6个对数,稳定在LD₅₀1.00左右,该株减毒后的抗原性较好,国内异株之间也有较长时期的交叉保护力,通过各种细胞培养没有毒力回升现象。如能使毒力继续降低并加以纯化,可能用于制备活疫苗^[63]。广州“49株”于睾丸单层细胞中传代及加入氰化钾等综合处理,获得弱毒变异株,对小白鼠LD₅₀≤ 10^{-1} ,但转种鸡胚、小白鼠后毒力回升^[64]。福建从罗赛鼠分离的L₁₁、C₄₁、C₄₄,经小白鼠传代适应后,再经猴肾、地鼠肾单层细胞培养,毒力下降,基本上不致死小白鼠,其中C₄₄毒力一直稳定,对小白鼠的LD₅₀为零,确

系国内外少有的弱毒株,然而再稀释1000倍却仍引起人的发病,说明人对恙虫病的易感性远远超过小白鼠,同时也说明单纯用C₄₄弱毒株试制恙虫活疫苗,对人是^{不安全的}。因此提出以灭活疫苗作为基础免疫,再以弱毒活疫苗作加强免疫相结合的方法,用以减轻弱毒活疫苗对人体的反应性,并增强基础免疫的效果。在动物试验上的结果:①灭活疫苗作为基础免疫,可以降低亚弱毒株在加强免疫时对小白鼠的死亡率;②灭活疫苗对抗强毒攻击可以达到相对保护,免疫指数介于1.00~5.00;③灭活疫苗作为基础免疫与弱毒活疫苗的加强免疫相结合,可以达到完全保护强毒“B株” 10^{-2} ~ 10^{-6} 的攻击;④经过小量的人体反应和效果观察,初步证明是安全有效的,上述试验进一步肯定了C₄₄株的弱毒特性,强固的免疫原性^[65]。从泰国分离的TA₈₇₈及TA₈₈₈均为弱(无)毒株,可能是两个新的血清型。有的毒株在临床上仅能引起发烧,而无焦痂和淋巴结肿等症状(Robinson PM J Inf Dis, 134(2):193, 1976)。从自然界分离原始弱(无)毒株或人工诱导变异减毒株,仍是今后待进一步研究的重要课题。

毒株的抗原性:恙虫病立克次体抗原性比较复杂,株与株之间血清反应及免疫抗体常有差异。各株间抗原性差异,可用补体结合试验、中和试验、荧光抗体技术和交叉免疫保护力试验证实。用特异性颗粒性抗原作补体结合试验,恙虫立克次体至少可分为Gilliam(印缅边界)、Karp(新几内亚)、Kato(日本)、pescardores(澎湖)及Seerengayee(马来西亚)等株。常用Gilliam、Karp和Kato三个标准株,检查分析病人、恙螨或鼠类分离的恙虫病立克次体抗原性。一般情况下,同株间血清效价及中和指数高于异株,有的患者血清中有两型甚至三型的抗体,因此补体结合试验宜用多价混合抗原。福建从家兔分离的一株恙虫立克次体即兔57株,作交叉中和试验,其免疫血清能中和本株和异株(魏株),中和指数为1.3~1.7,但与另一个异株(汤株)中和指数为0,

由此可知兔57株与魏株间有交叉中和保护能力,而汤株抗原与兔57株及魏株免疫血清无此作用^[66]。结果表明,同株之间出现一定程度的中和能力,但对异株的中和能力,表现很不一致或有或无。

组织培养:1959年福建试用Hela细胞培养恙虫病立克次体,将感染小白鼠腹水稀释液接种在Hela细胞株上,自第2代即可见到细胞内外有大量立克次体繁殖,传至第5代,将细胞培养液稀释至 10^{-1} ~ 10^{-4} 时,仍可致死小白鼠,并证明在Hela细胞发育后,放置37°C可活存20天,放置4°C 59天仍保存有对小白鼠的致病力,认为恙虫病立克次体在Hela细胞发育良好^[67]。1960年广州用改良的Zinsser-魏曦琼脂斜面鼠胚或鸡胚组织培养法,培养4株恙虫病立克次体(崔株、何株、49株及恙螨株),证明均能在组织培养中生长,培养8~9天可见细胞内外有成堆的立克次体,将此培养物接种小白鼠腹腔,能引起小白鼠发病并查到立克次体,传代44代仍可查到立克次体^[68]。恙虫病立克次体虽然能于琼脂斜面组织块中生长,但生长不规律,同一种培养管或同一管内不同组织块涂片结果,有时差异很大。1961年福建用传代羊膜细胞、大白鼠、家兔及猴睾丸、地鼠肾及睾丸、鸡纤维母细胞等7种单层细胞接种恙虫病立克次体(感染小白鼠腹水、血液和脾肾等材料)都能生长发育,9~12天细胞内外可检见大量立克次体,呈双球菌状,3周后立克次体形态变为颗粒状,细长杆状或丝状。30°C和37°C培养结果,未见明显差别^[69]。1963年广州亦用单层兔睾丸细胞培养法,接种感染的小白鼠腹腔液,28°C培养,立克次体逐日增多,于10~15天能经常获得丰富的立克次体,并偶见链状形成^[70]。1962年浙江用Ehrlich腹水癌细胞与恙虫病立克次体混合接种小白鼠腹腔,观察到恙虫病立克次体与此种癌细胞可各自感染小白鼠,但恙虫病立克次体不能在癌细胞内繁殖^[71]。

关于影响恙虫病立克次体在细胞内繁殖的因素,1966年浙江用家兔肾及睾丸、人胚肾、羊膜、小白鼠肾、豚鼠肾及睾丸等7种细胞,恙

虫病立克次体株用61105及62301株, 观察影响细胞内立克次体繁殖的因素, 试验结果表明:

(1) 用1:10稀释的立克次体感染细胞培养物(小白鼠LD₅₀10^{-5.0~6.2}/0.3毫升)0.15毫升感染, 7种细胞中除豚鼠肾及睾丸外, 其他细胞立克次体繁殖都很好, 在12天达到最丰富程度, 83%以上细胞受感染, 此时小白鼠LD₅₀在10^{-4~6.4}之间; (2) 立克次体与细胞感染作用时间以10分钟以上, 87%以上细胞被感染; (3) 营养成分以0.5%乳白蛋白水解物Hanks液加10~15%乳牛血清立克次体繁殖良好; (4) 感染细胞的立克次体量, 1:5~1:50稀释度能使90%以上细胞被感染; (5) 培养温度以37°C为宜, 低于37°C则繁殖缓慢[72]。

关于恙虫病立克次体引起宿主细胞的组织化学改变, 1973年试以兔睾丸单层细胞, 待长出成片的单层纤维母细胞后, 用于感染恙虫病立克次体(何株、徐株、恙株、49株及63-1株), 28°C孵育一定时间, 取出小玻片固定染色。RNA染色, 染色前先用0.1%RNA酶水溶液37°C处理30分钟, 然后用甲绿-派若宁(Methyl Green-pyronin)染色; DNA Feulgen法染色, 标本用1N HCl水解前, 先以0.1%DNA酶37°C处理3.5小时, 以后再用盐酸水解及染色。结果用RNA染色, 能规律地发现感染恙虫病立克次体后的组织细胞, 于胞浆内核旁呈堆状排列的鲜红小颗粒, 其排列位置与细胞内恙虫病立克次体排列位置一致, 出现时间亦与立克次体的繁殖曲线平行, 同时感染后的细胞浆RNA染色往往也较对照深。此外, 感染后的细胞核及核仁有时亦可见到一些不规律的改变, 用DNA酶处理恙虫病立克次体时, 看不到明显的形态学改变, 可能因恙虫病立克次体内DNA含量少有关。恙虫病立克次体引起宿主细胞核酸染色改变的研究, 对今后进一步研究宿主细胞核酸量和质的改变, 特别是对宿主细胞出现那些主要代谢环节的改变, 将有利于阐明立克次体必需在宿主细胞内才能繁殖的原因, 以及致病原理等问题[73]。

上述试验证明, 多种传代细胞株(肿瘤细

胞, 恶性生长细胞及FL羊膜细胞等)及原代单层细胞(鸡胚及各种动物肾及睾丸等), 培养恙虫病立克次体效果都很好, 说明可供培养的组织细胞是广泛的, 选择性并不严格。恙虫病立克次体虽能于肿瘤细胞及恶性生长细胞内生长繁殖, 但不适用于制备疫苗。

立克次体的生活力: 恙虫病立克次体是在致病性立克次体中最脆弱的一种, 有自溶倾向不易保存, 在制备抗原和疫苗过程中, 易受破坏而影响其抗原性。1954年试验恙虫病立克次体感染小白鼠脾在-20°C能保存1周, 在5%甘油盐水中冷冻3周尚无毒力; 完整的鸡胚在4°C保存17天, 在-20°C保存6周, 证明感染脏器的冷冻保存不及卵黄囊[74]。1956年比较了多种稀释剂作真空冻干保存, 结果以蔗糖PG缓冲液最好, 在-20°C对小白鼠LD₅₀300天时为10⁻⁸, 观察到360天尚能使小鼠死亡, 同样条件感染卵黄囊膜冻干材料较小白鼠脾材料保存时间要长[75]。

外斐氏反应: 恙虫病立克次体与变形杆菌OXk的抗原关系, 由于两者之间含有碳水化合物共同抗原, 迄今外斐(Weil-Felix)反应对恙虫病的诊断, 仍不失为有价值的简便的血清学诊断方法。1978年报告152例临床患者统计OXk阳性者第1周为65.1%, 最高滴度为1:2560; 第2周为73.0%, 最高滴度为1:2560; 第3周为71.1%, 最高滴度为1:1280; 第4周为52.0%, 最高滴度为1:640[76]。根据临床实践, 认为外斐氏反应OX₁₀对斑疹伤寒诊断有参考意义的滴度为1:160以上, 恙虫病为1:80以上, 一般在病程中采取双份血清, 呈4倍以上升高者确立诊断比较可靠。感染恙虫病立克次体的豚鼠, 能否产生OXk凝集素问题, 福建的实验结果是肯定的, 浙江的结论却是否定的。一般情况下感染豚鼠是不产生对变形杆菌凝集素的。恙虫病疫区鼠类血清中OXk凝集素的存在状态与恙虫立克次体分离阳性率之间的关系, 因地区不同而异, 据1963~1964年浙江的调查资料指出, 在某些岛屿野外鼠类血清中OXk凝集素

阳性检出率为53.4%(222/412只鼠),但恙虫病立克次体的分离却为阴性;在浙南地区野外鼠OXk阳性者为63%(383/608),从中分离出13株恙虫病立克次体,分离率为27%;在OXk阴性的225只鼠中分离出9株,分离率为25%,故认为鼠类OXk凝集素阳性与否与恙虫病立克次体的分离似无直接关系[77]。

补体结合试验:补体结合抗原分为可溶性抗原和颗粒性抗原两种,后者能分型,但提纯时损失大,滴度低。国内对可溶性抗原进行了试验,如用鸡胚卵黄囊膜乙醚处理制备抗原,抗原效价1:8,所检查的4株恙虫病立克次体免疫血清,无非特异性反应,血清效价最高滴度达1:128者仅1株(用1:8抗原)[78]。1976年用不同感染材料(鸡胚卵黄囊膜及鼠肺)进行浓缩纯化恙虫病立克次体试验,结果证明以0.25%胰蛋白酶消化感染卵黄囊膜,达到既消化了卵黄囊膜组织,又能保持立克次体完整性,用该法浓缩纯化的立克次体,数量多、杂质少、保持活性,仅形态呈圆形改变,用于补体结合试验滴度可达1:128,用30%蔗糖缓冲液稀释的浓缩纯化立克次体悬液,真空冻干保存,室温下可保存6个月,形态完整,补体结合试验抗原保持1:64的滴度[79]。卵黄囊膜用胰酶消化提纯的抗原,如不经乙醚处理,容易产生抗补体;不适应鸡胚卵黄囊培养的恙虫病立克次体株,不宜用鸡胚法。1979年用地鼠肾细胞培养并制备出恙虫病立克次体补体结合抗原,使用在地鼠肾细胞长期传代的C₄₁株(对小白鼠LD₅₀10⁻¹~10⁻²),感染的地鼠肾细胞在37°C培育9~11天,立克次体繁殖量最多,经高速离心收获的细胞和立克次体用0.25%胰蛋白酶在37°C水浴中消化60分钟,高速离心,沉淀物混悬于30%蔗糖缓冲液中,再加3~4倍乙醚室温作用16~20小时,下层液即为抗原;免疫血清系用福建C₄₁株和广西47株的小白鼠腹水,家兔腹腔注射3次(1、2、3毫升)间隔1周,1个月后放血测定效价。组织培养抗原与同株免疫血清的补体结合试验,证明对本株滴度高(1:320),对异株低(1:

80),与异源的免疫血清(Q热、斑疹伤寒、弓形体病及布氏杆菌病等)均为阴性,加1:5000硫柳汞或0.5%石碳酸盐水,补体结合抗原滴度保持在1:128的高滴度,浓缩纯化的立克次体,形态完整并有活性,用7.5%或30%蔗糖缓冲液作稀释液较好,补体结合试验抗原滴度分别为1:128和1:256,置4°C冰箱保存10个月滴度尚保持1:128。抗原的滴度主要取决于细胞内恙虫病立克次体繁殖程度。用含有丰富的立克次体的细胞培养物,可制成质量和产量较好的抗原,活性较高[80]。

间接血凝试验:用恙虫病立克次体感染鼠肺,制成1:125的悬液,经低高速离心,按每个鼠肺加1毫升(含0.3%福马林)pH7.4缓冲液稀释,制成恙虫病立克次体纯抗原。取9份纯抗原,加2份1N的NaOH,水浴中煮沸15~20分钟,俟立克次体溶解后,再用酸性无水磷酸盐溶液矫正pH为6.8~7.0(NaH₂PO₄ 8克,Na₂HPO₄ 1.4克,NaCl 7.0克,溶解于1,000毫升蒸馏水中)即成溶解性抗原。取5毫升抗原加入0.1毫升绵羊红细胞,37°C致敏1小时,加等量生理盐水即为血凝抗原(抗原滴定1:2),用试管法0.1毫升抗原加0.1毫升不同稀释度之被检血清,玻片微量法(试管的1/2量)比试管法更易观察结果。检查疑似恙虫病病人早期血清25份,非恙虫病病人血清31份,结果证实血凝反应有一定的特异性,其敏感性优于补体结合试验和OXk的外斐氏反应[81]。

血内病原体检查法:用恙虫病立克次体感染小白鼠及恒河猴,采血用蒸馏水溶解,4,000转/分,离心30分钟,取血细胞溶解物的沉淀表面,涂片Giemsa染色镜检,很容易检见恙虫病立克次体,认为本法可试用于发热期患者血液,以作诊断[82]。

Q 热

Q热是由贝氏柯克斯体(*Coxiella burnetii*)所引起的一种从动物到人的传染病。其病原体在野生动物和节肢动物之间循环;在家

畜中形成独立的经济疫源地。Q热是唯一可不经媒介昆虫传播的人、兽共患的立克次体病。我国1951年及57年在北京先后以血清学方法证实两例Q热病人^[83, 84]；1958年在内蒙的家畜中检出Q热补体结合抗体^[85]；1962~63年由病人分离出Q热立克次体^[86, 87]。

流行概况：Q热在我国各地区分布相当广泛，据不完全统计，已在北京、黑龙江、吉林、内蒙、甘肃、青海、新疆、西藏、四川、云南、广西、福建、安徽等十多个省、市、自治区证实有Q热。内蒙、四川、云南、新疆及西藏等地区曾发生Q热的爆发流行，这些爆发大多与接触家畜及畜产品有关。我国感染Q热的动物包括黄牛、水牛、牦牛、绵羊、山羊、马、骡、驴、骆驼、狗和猪等家畜，有的地区家畜以牛、羊感染为主，有的以马、骡感染率最高。野生动物中的喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)、藏鼠兔(*Ochotona thibetana*)、黄鼠(*Citellus dauricus*)；禽鸟中的鹊雀亦证明有Q热感染^[88]。

调查资料指出，我国Q热的传染源主要为感染家畜，特别是牛、羊。内蒙集宁市肉类联合加工厂直接与家畜接触的人群，Q热血清阳检率高于非直接接触者，不同车间的接触者的感染率亦有差异，以家畜饲养及内脏处理车间最高^[89]。人类感染Q热与家畜接触的频度和感染有关，据四川雅安106人的调查材料，经常接触家畜者占32.1%，偶而接触者占23.7%，未接触者占15%，表明接触家畜愈多者，阳性率愈高^[90]。内蒙锡盟阿巴嘎旗人群Q热血清学调查，证明凡参与接羔工作的牧民有较高的感染率^[91]。

Q热的爆发或散发与接触传染源的机会和方式不同，易感程度存在差异，感染发生的情况亦有所不同。有的有临床症状，有的则呈隐性感染，昆明市一次发生在食品加工厂及制革厂的Q热爆发，即来源于所屠宰的牛、羊及其生皮，其中食品厂职工发病率达25.3%，以屠宰及饲养工发病率最高，分别为37.5%及33.3%，而行政人员的发病率仅为7.6%，被

宰杀的绵羊及牛的感染率分别达6.27%及43.4%，并由绵羊的胎盘及脏器中分离出Q热立克次体^[92]。

Q热除了急性上呼吸道感染外，还有亚急性和慢性临床表现，此与感染途径和机体反应性有密切关系。成都一例慢性Q热病例，病程长达一年多，有明显腰骶骨骨质破坏及心肌损害，该患者为一汽车司机，经常拉运牛、羊，血清学病原学检查证实为Q热^[93]；通辽一例肝功异常患者，长期生活在牧区，接触牛羊并经常饮食生奶，血清学病原学结果确诊为Q热^[94]。

Q热与布病的混合感染：在牧区、半农半牧区，Q热与布鲁氏菌病有着共同的传染源和传播途径，因而常形成混合疫源地，并常致当地居民受到感染畜群中两病的双重感染。在内蒙哲盟三个旗县布病流行区的调查，结果表明除了布病之外，还有Q热以及Q热与布病的混合感染，而且Q热及混合感染的感染率往往高于布病^[87]，两病临床表现相似，不易鉴别，只有借助于特异的血清学或病原学的检查，才能得到证实^[95]。

毒株分离试验：从四川1例慢性Q热^[86]、从内蒙Q热及Q热与布病混合感染病例^[87]以及从内蒙的类似感冒和肝功异常患者^[94]分别分离出Q热立克次体；从福建的毒刺厉螨(*Laelaps echidninus*)^[96]，从四川的铃头血蜱(*Haemaphysalis Campanulata*)^[97]、从新疆的亚洲璃眼蜱(*Hyalomma asiatica*)^[98, 99]以及从云南绵羊脏器^[100]都分离出Q热立克次体。

毒株的毒力及变异：Q热立克次体对动物或人的感染性、致病性和致死性不同，可分为强毒力组、中等毒力组和弱毒力组。经对Q热立克次体国际标准株Henzerling, Grita, Nine Mile三株和国内分离株七医，流研-L(李株)和兰Q-6801三株在鸡胚、动物和组织培养上某些生物学特性的研究，结果表明6株基本上均属中等毒力株^[101]，兰州QM株(1968年分离)在实验室，经紫外线诱导变异已由强毒株变为

弱毒株,其繁殖力,对动物的适应性及致病性等方面均发生变异,且未发现返祖现象,经进一步研究,可望用于减毒活疫苗的试验^[102]。

毒株的致病力:“七医株”的豚鼠发热反应呈一般程度,死亡率低,脾呈中等程度肿大并有渗出物,但不能直接检见立克次体^[86];流研-L株的豚鼠发热反应较重,脾呈中等程度肿大并有渗出物,死亡率低,在脾印片中能检见少量立克次体,在鸡胚卵黄囊内发育繁殖达(++)^[103]。我国分离的毒株对豚鼠的致病力接近于澳大利亚和欧洲常用的毒株。

鸡胚卵黄囊培养:I相Q热立克次体,两种不同感染剂量接种7龄胚,大剂量($1.32 \times 10^4 \sim 1.32 \times 10^6$)致大部分鸡胚在感染10天前死亡,卵黄囊膜收获量少,补体结合抗原效价低(1:100);小剂量($0.66 \times 10^4 \sim 0.66 \times 10^5$),使大部分感染鸡胚在10天后死亡,收获量大,抗原效价高(1:160);由此制备的I相抗原及抗血清适于作补体结合试验之用,产量高、特异性好,用灭活疫苗免疫豚鼠获得高效价抗血清^[104]。

组织培养:用Q热立克次体Grita I相株感染鸡胚、鼠胚及豚鼠肾上皮等3种原代单层细胞,人羊膜FL及Detroit-6等2种传代细胞,结果Q热立克次体主要在原代细胞胞浆空泡里繁殖。与原代细胞不同,在传代细胞中以在胞浆中分散繁殖为主,Q热立克次体可随传代细胞代代相传^[105]。观察Henzerlin株I及II两相立克次体在鸡胚细胞中生长繁殖特点,结果II相比I相发育快,繁殖力强^[106]。国内分离的流研-L株在鼠胚和人羊膜FL细胞以及YS-8株在鸡胚成纤维细胞内生长良好。

婢实验感染:用非洲钝缘婢(Ornithodoros Moubata)直接叮刺感染Henzerling株的豚鼠血液,以吸血后不同变态期及成婢进行立克次体分离,证明各龄期的婢均能感染,感染时间越长,在接种小白鼠后,于其婢内愈易查见立克次体;甚至在婢感染后一年以上仍可分离出立克次体;已感染的婢,使之叮刺健康豚鼠,或将感染婢第2代稚虫制成悬液接种小

白鼠及豚鼠,均获得阳性结果^[107]。

毒株的抗原性:比较研究国外苏联株、九里株、Henzerlin株、Grita株以及国内的七医株。雅安株和新桥株的抗原性,从它们与感染豚鼠及家兔不同时期血清学反应情况,抗体吸收试验结果以及KIO₄处理后抗原性的改变,证明三个国内株和两个国外株(Henzerling、Grita株)为第I相株,苏联及九里株为第II相株;国内株感染豚鼠后第3天的血清,第II相抗体的阳性率即达14.3%,第2周达100%;第I相抗体于感染后6周才只有68%的阳性^[108]。关于不同株抗原反应性的比较,在人、畜Q热血清学调查及临床血清学诊断时的反应性,以用苏联株抗原所获得的阳性率最高,九里株次之;而以Henzerling、七医株最低,由此证明Q热立克次体除了有相的变异外,各株抗原反应性也有差异^[109]。

免疫学检查法:Q热立克次体的免疫学检查法,即将被检材料先接种小白鼠,使其产生免疫后,再用已知的Q热毒株活毒材料攻击,在适当时机剖杀检查试验动物脾内立克次体的有无,即可做出判定。其敏感性和特异性都很高,检查时间于11~12天即可完成^[110]。

荧光抗体检查法:为Henzerling株家兔免疫血清结合异硫氰酸荧光黄,应用荧光抗体直接法检查感染动物脏器印片标本,可见极多呈黄绿色荧光,体积膨大的杆状及球状小体,亦有互相聚集而成团者,用被检的豚鼠及家兔恢复期血清作抑制试验时,证明能抑制Q热荧光血清对Henzerling株及分离株动物脏器印片的染色,说明该检查法的结果是特异的^[111]。应用胶体沉淀法浓缩被检水样及土壤中少量Q热立克次体,以及用离心法浓缩牛奶中少量Q热立克次体,以荧光抗体直接法检查可以缩短检出时间^[112]。用该法检验实验室感染Q热立克次体之非洲钝缘婢,其阳性率为92.5%与应有结果之符合率也在90%以上,此法简便快速,可用于初筛^[113]。

立克次体凝集试验:1953年报告Q热玻片凝集反应,用感染小白鼠脾及卵黄囊膜,经乙

醚处理、制备Q热立克次体凝集抗原、并试用0.4%石碳酸生理盐水处理消除卵黄囊膜抗原的非特异性,用上述两种凝集抗原玻片凝集反应法检查40份Q热既往患者血清,与补体结合试验对比,结果大致相同,特异性敏感性均很好[114]。Q热毛细管凝集试验,将感染鸡胚黄囊膜先制备抗原,按抗原10份加入1% Harris氏苏木精染液1份混合,37°C染色3天;用染色抗原作毛细管(长9 cm,内径0.4~1.0 mm)凝集试验和补体结合试验对比检查,结果毛细管凝集试验敏感性优于补体结合试验[115]。立克次体凝集混悬试验,将不同稀释度的被检血清和抗原各0.2毫升,加入康氏管内,置37°C水浴作用30分钟,再离心(3,000转/分)10分钟,观察液体如混浊没沉淀则为阴性,如透明又有沉淀即为凝集阳性。用凝集混悬试验与补体结合试验对照,检查家兔抗血清,两结果基本一致,检查豚鼠及小白鼠抗血清,凝集混悬试验结果早于感染后1~2周即出现阳性,方法简便,报告结果快(1小时内)[116]。

蜱血淋巴试验:本试验用于蜱标本中的病原体的检查,将实验感染蜱(非洲钝缘蜱)先水洗,剪断蜱1只腿的末端,血淋巴从伤口溢出,滴在玻片上涂片,Giménez法染色及免疫荧光技术检查,Q热Ys-8株及Henzerling株分别感染蜱,Ys-8株感染后3天即查见血淋巴中有立克次体,多在吞噬细胞浆内,第8天全部蜱血细胞胞浆内外均有立克次体,第13天直至278天则主要为细胞外散在,常不易检见完整细胞。Henzerling株立克次体迟于第7天才能查到,检查绵羊、山羊及牛寄生蜱(血蜱、硬蜱及微小牛蜱)473只,其中Giménez染色有39只,Q热免疫荧光有8只阳性[117]。

补体结合试验:通常用热结合法(37°C30分钟)与冷结合法(4°C过夜)两种,前者特异性强,敏感性差,后者敏感性强,特异性差,实践证明,室温结合法(18°~22°C4小时)、抗原、血清、补体各0.2毫升混合后置18°~22°C结合4小时(温度低于18°C或超过22°C时可适当延长或缩短时间)然后于37°C水浴作

用30分钟,加溶血系0.4毫升,再置37°C水浴30分钟,即可判断结果,大量血清标本当天即可检查完毕,弥补了冷、热结合法的缺点,并可在农村基层单位应用[87]。

酶标记检测技术:用酶标记抗体染色法与Giménez法对Q热立克次体Henzerling株小白鼠脾脏标本进行检查,前者于感染后48小时即可检出,后者要72小时方能检出。对两种染色法的敏感性进行了比较,酶标记抗体染色法MID₅₀为4.5,Giménez法MID₅₀为6.0以上,酶染法比Giménez法敏感一个对数以上[118]。

免疫电泳技术:用已知抗体作免疫电泳检出标本内的抗原,使用2~4个免疫电泳凝集单位之抗体,与抗原的凝集效价达1:128,若抗体太多,形成的免疫复合物则愈小。免疫电泳法检出Q热立克次体的敏感性与补体结合相差无几。用100个MID剂量的Q热立克次体感染小白鼠,逐日将其脾脏标本与4个免疫电泳凝集单位之抗体作用后,在电泳下观察免疫复合物的形成,第3天以后全部动物均能检出,立克次体数量随着感染时间的延长而增多,一般在感染后第5~6天,立克次体繁殖达到高峰,在电泳下观察到形成的免疫复合物很大,有时多到铺满整个网格。若用免疫电泳技术检查乳、水、尿中的Q热立克次体,可能是更简便和适用的一个方法[119]。

蜱传斑点热及立克次体痘

蜱传斑点热属的北亚热及革螨传的立克次体痘的病原体,前者为北亚立克次体(*Rickettsia sibiricus*);后者为小蛛立克次体(*Rickettsia akari*)。1958年在内蒙从血清学上首次证实了我国北亚热和立克次体痘的存在[85]。1962年从黑龙江啮齿动物和节肢动物中分离出北亚立克次体[120];近年又从新疆立克次体痘患者的疱疹中分离出小蛛立克次体,最终从病原学上肯定了上述两病的存在。

血清流行病学调查:在内蒙检查健康人北亚热补体结合抗体,阳性率为11%(17/154),从牛和羊中亦查出该病的抗体,健康人立克次