

恙虫病檢驗手冊

于恩庶 王敦清 編 著

人民衛生出版社



內 容 提 要

恙虫病在我国南方沿海各省流行很广，经过近年来的調查研究和防治工作，积累了很多資料。著者根据多年来在恙虫病防治实际工作中的經驗和有关文献写成此書，着重介紹了本病病原学的实验技术和恙虫收集与鑑定的方法，以供参加恙虫病防治工作者的参考。

恙虫病檢驗手册

开本：787×1092/32

印張：3

字數：66 千字

于恩庶 王敦清 編著

人 民 衛 生 出 版 社 出 版

(北京书刊出版业营业登记证出字第〇四六号)

• 北京崇文區鐵子胡同三十六号 •

北 京 西 四 印 刷 厂 印 刷

新华書店科技发行所发行·各地新华書店經售

統一書號：14048·0477

定 价：0.36 元

1954年6月第1版—第1次印刷

1960年2月第2版—第3次印刷

(北京版) 印數：6,101—7,100

前 言

恙虫病自从 1948 年在我國南方沿海各省陸續發現以來，初步了解其流行情况相当嚴重，並知已成為地方性流行病，每年夏秋兩季均有發生。但因本病在我國的發現為時較短，關於流行地區、流行季節、動物宿主和傳染媒介等流行病學方面的調查，病患的診斷、治療和各項預防措施等，都缺乏完整的資料與經驗足供今後全面展開防治工作的科學基礎。因此在今後的最短時間內做好調查研究工作，更顯得重要了。為了達到這一目的，首先就須掌握本病的檢驗技術。筆者根據實地工作經驗和手邊的文獻材料，綜合介紹有關本病的各種檢查方法，希望能供給實際工作同志一些參考，並祈指正。

于恩庶 王敦清 1954 年 6 月

修訂本序言

恙虫病檢驗手冊的出版已經兩年多了。在此期間國內在恙虫病的研究与实地防治方面，都獲得了很大的進展。關於恙虫許多新品种的發現、恙虫生态学的研究、恙虫热立克次氏体保存动物的發現、特效藥物治療的經驗以及有效預防措施的摸索等，都積累了一定的資料。這些資料對於今后恙虫病的研究和防治，具有很大的價值。今借本書再版印行的机会，除对初版內容有錯誤的和不必要的部分加以刪改外，並增加了一些新內容，例如野外游离恙虫幼虫及土中稚虫、成虫的收集方法，恙虫稚虫、成虫的形态，恙虫稚虫、成虫的人工培养方法，恙虫热立克次氏体的快速染色法和血清学反应等。此外，關於恙虫幼虫的分类，到目前为止各國还很不一；我們除从几本重要的著作中摘要地翻譯了一部分外，再参考陈心陶和徐秉鋁二氏对恙虫中文譯名的意見，結合昆虫学和寄生物学名詞，作了必要的修改和补充。

于恩庶 王敦清 1956年4月1日

目 次

恙虫病实验室的一般規則	1
恙虫的收集法	2
恙虫标本的制作	7
恙虫的培养	9
恙虫热立克次氏体的可檢材料	11
恙虫热立克次氏体的染色法	13
恙虫热立克次氏体的动物接种分离培养法	16
恙虫热立克次氏体的雞胚分离培养法	20
恙虫热立克次氏体的保存	22
应用于恙虫病的血清学檢驗	23
恙虫病的皮內反应試驗	29
各种立克次氏体的鑑別要点	30
恙虫的形态	33
恙虫品种的鑑定及檢索表	38
恙虫病檢驗操作的登記	88
参考文献	91

恙虫病实验室的一般規則

1. 注意个人預防: 恙虫病实验室内工作人員的感染例是常見的。过去不幸受到恙虫病材料感染的人, 死亡率相当高; 現在虽然有了特效藥物, 不致遭受牺牲, 但在工作上和精神上的影响也是大的。追究其感染的主要原因, 一方面是在捕鼠收集恙虫时遭受到帶有恙虫热立克次氏体的恙虫的叮咬, 其次是在动物接种时不慎触到有毒材料, 經過皮膚或粘膜侵入而感染。其防止办法在嚴格遵守实验室規則, 按照規定步驟細心操作, 防备恙虫的逃逸和有毒材料的溅出。万一不幸受染时, 应立即报告負責同志处理, 並用氯霉素預防和治療。

2. 恙虫病实验室应有完善的防鼠設備和充足的陽光。

3. 室内經常打扫, 保持整齐清潔, 並噴撒六六六。

4. 工作人員必須穿工作衣。檢菌和动物接种时, 应加戴口罩、头巾和手套。捕鼠和檢集恙虫人員更必須穿防虫衣袂, 並把袖口和褲脚口紮緊, 手和頸部塗上防蚊油。工作完畢后, 脫下工作衣在水中煮沸, 或投入來苏水內消毒。

5. 实验室内有关动物解剖、病原的分离及傳代和其他实验的一切操作过程, 都要求做到絕對無菌。

6. 接种动物要分开飼养, 特别是接种不同材料的动物, 絕不能同放在一个飼养瓶內。因为已經証明健康的小白鼠剝食恙虫病感染的病鼠尸体后, 可以獲致感染。这样, 很可能發生, 一个陰性材料的鼠, 由於剝食了同瓶內的陽性材料的鼠屍而得到陽性的結果, 这是值得注意的。此外應該給予小白鼠充分的食料和蔬菜。每天經常檢查其發病狀況, 遇有死亡, 尽可能立刻解剖, 不可拖延時間, 以免增加雜菌污染机会, 尤

其是在炎熱的夏天更應如此。

7. 恙蟲病感染動物實驗完了後，應加以焚燒，或先投入5%來蘇水內浸一夜後再行深埋。

8. 注射器吸取接種材料，如有氣泡，可以酒精棉花團包住針頭，向上打出氣泡，並注意針頭是否裝緊、有無堵塞，再行接種；如不暢通，切忌用力推注射器的內管。

9. 恙蟲病接種材料不能在尚有溫熱的乳鉢內研磨，也不能用尚未完全冷卻的注射器吸取，以免立克次氏體受熱死亡。

10. 檢驗恙蟲時，須光線充足，切忌風吹，以免恙蟲被風吹散各處，使工作人員受染。

恙蟲的收集法

恙蟲屬於節肢動物門 (Phylum Arthropoda) 蜘蛛綱 (Class Arachnida) 蟎目 (Order Acarina) 的恙蟲科 (Family Trombiculidae)。它的幼蟲是恙蟲病的傳染媒介，多半是寄生在脊椎動物的身體上。幼蟲體呈橢圓形或圓形，具三對足。稚蟲和成蟲體較幼蟲為大，均具四對足。

恙蟲成蟲產卵於陰濕多草地帶土壤的上層，在適宜的溫度下，幼蟲即破卵而出，停留在雜草上，待動物經過時，即附着在動物體上，尋找適宜部位叮咬，吮飽後又落地脫皮變為稚蟲。稚蟲棲息在雜草、落葉和野菜下面有腐爛植物的地方，性怕光、怕乾燥，經過吸食土中的有機物質、植物瓜果的汁或昆蟲的卵等之後，又脫皮變為成蟲。雌雄成蟲交配後就產卵在土中。根據其生活史，我們可以在不同的地區收集恙蟲的幼蟲、稚蟲和成蟲。

(一) 幼虫收集法 幼虫体極小，僅長 340—610 微米，肉眼不易窺見，操作上需用双目解剖鏡。幼虫的收集，主要可由下述兩方面着手。

1. 从动物体上收集法：各种脊椎动物如兩棲类、爬虫类、鳥类和哺乳类等都可成为恙虫幼虫的宿主，其中尤以齧齒目动物更为主要。茲將从各种动物体上收集幼虫的方法分述如下：

(1) 从鼠体上收集法：一般田野鼠类和家鼠的耳殼內常帶有很多的恙虫，其他如肛門附近、生殖器官附近、后腿、尾椎骨的上方及鼠的背部毛內亦常有發現。根据我們的經驗，家鼠体上的恙虫多寄生在耳殼內；褐家鼠体上的恙虫除以耳殼內为最多外，在肛門及生殖器附近亦常有發現；罗賽鼠(*Rattus losea exiguus*)除在耳殼內、耳殼邊緣上、耳殼的背面等处帶有恙虫外，在背部背毛內也能檢到恙虫；从田野捕來之臭鼩鼯(*Suncus murinus*)，在其后腿外側恙虫特別多，而耳殼內則很少見到。为了要从鼠体上收集恙虫，通常用鼠籠捕捉活鼠進行檢查最好。如果不需要活的恙虫，可把整个老鼠用藥物薰死，剪下双耳檢查。如果需要活的恙虫，可用乙醚或氯仿从鼠鼻腔內注入，麻醉致死，再自耳部深处剪下兩耳放在培养皿內。应將此皿置於鋪有浸沾防蚊油紗布的搪瓷盤內，以防恙虫爬走；然后用鑷子把鼠耳由內向外翻出，將耳連皿放在双目解剖鏡下檢查耳殼內部，即可見有成堆的恙虫幼虫群集，有的正在爬动，有的叮着不动。先在鏡下初步鑑定种屬和計數，並記在記錄表內；再制标本片作最后鑑定。

除檢查鼠耳外，也要在双目解剖鏡下注意檢查肛門、乳房、生殖器附近和后腿等处有無恙虫。至於鼠背部毛內恙虫的檢查法，可把老鼠四足固定在木板上，使背部朝上，用剪刀

把背部毛剪掉，放置 $\frac{1}{2}$ —1 小时，如有恙虫，即見其自行爬出。由於恙虫和剪去毛后的背部顏色不同，很容易看見。此外，可把鼠籠浸在水中 2 分鐘，將鼠淹死，或把鼠打死，再剪下兩耳檢查亦可。最近我們發現用氰化鈣(CaCN)薰死的老鼠，耳殼內的恙虫並未被薰死，經過一定時間后，恙虫又复活，开始爬动，亦可作为收集活恙虫之用。

(2) 从家兔体上收集法：从我們的实际工作探索中，發現在家兔耳殼內、乳房附近、生殖器附近及肛門附近等处亦帶有恙虫。从家兔体上收集恙虫的方法与鼠类不同，因為我們不能把家兔同鼠类一样全部殺死剪下兩耳來檢查，而必須設法在其活的条件下來收集。但是，因為家兔耳殼內的恙虫多在听道的深处接近鼓膜附近，光線不充足时，一般不易檢見，因此要用反光鏡投入充足光線后再做檢查。即先把家兔固定，用反光鏡檢查恙虫叮着的部位，用解剖針从耳內把恙虫挑出，放在玻片上制成标本，鑑定品种。但印度真棒恙虫体太小，易在檢驗时遺漏，宜把兩耳剪下翻轉后，在双目解剖鏡下檢查，才能全部發現。

(3) 从其他动物体上收集法：恙虫在各种宿主体上叮着部位各有不同。例如貓狗常在足趾間，鳥类常在翅下、腿上和肛門周圍，在檢查时应当注意这些部位。貓耳內亦有恙虫。

2. 从野外收集恙虫法：

(1) 动物野外誘集法：此法系用未帶有恙虫的动物如大白鼠、豚鼠及田野或屋內捕到的罗賽鼠、家鼠和褐家鼠等經過詳細反复檢查后，確認体上無恙虫者才可使用。把这些动物个别地放在普通的捕鼠籠或特制的鉄絲欄內，放在野外多草的地帶，如田埂边草地、長草的田埂溝、路旁兩边草地、山坡深草地区、樹林下雜草地等和其他需要調查的地区。最好在每

天早晨放出，晚間收回，每隔一小時半轉換位置一次。這些動物需要給予充分的食料和水分，並設法防止被太陽晒死。動物收回後，可用第一法收集之。

(2) 光誘器：可用約 2 平方尺黑色硬紙一塊，中間開約 2 寸大小的一個小方洞，上面裝一個與它適合的玻璃管（圖 1）。或者在小洞處貼上透明膠片做一個小窗即成。光誘器放置在不太潮濕、地面平坦、滋生矮草的地点較為適宜，四周用泥

土壓住，以不使漏光為原則。一般可在放置 1 小時後檢查；如有恙蟲，可用濕毛筆黏取，放在帶蓋的玻璃皿內帶回實驗室內鑑定。

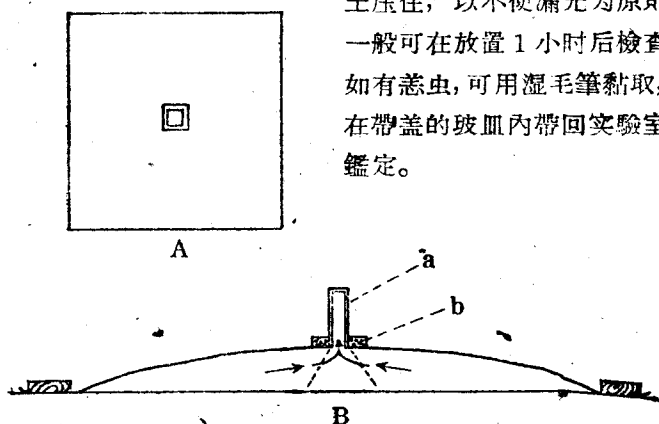


圖 1 光誘器（仿 B. M. Jones 氏）

A. 光誘器平面圖

B. 光誘器剖面圖：a. 玻璃管 b. 木栓薄片

註：當光誘器蓋在地面時，光線通過玻璃管透入地面（圖中二虛線的中央部表示有光線地區，虛線兩側為黑暗地區），恙蟲由於光線的引誘就爬進玻璃管內（圖中箭頭指恙蟲爬行方向）。

(3) 在田野叢草內放一塊白色絨布，在草內擺動，或在草上慢慢拖過，有時也可收集到恙蟲幼蟲。

(4) 橡膠靴法：用長統橡膠靴放在草中，有的恙蟲幼蟲喜歡爬到橡膠靴上，細心檢查，也可以發現。

(5) 用几个大型盤子或碟子，盤底或碟底应擦干淨。置此器於野外的叢草地区內，經過 1—2 小时后收回，在双目解剖鏡下(10×3 倍)尋找恙虫幼虫。曾有人报告用白盤法採集北美洲恙虫幼虫是很有效的，曾在黑莓樹下放置白盤，在 1 小时內捕得 500 多只幼虫。

(6) 由田野叢草地区回來，用軟毛刷在黑紙上刷鞋子和褲脚，細心觀察紙上有無恙虫。

(7) 採回野外叢草，浸在水中，細心檢查有無恙虫幼虫浮在水面。

以上介紹的 7 种幼虫收集法，並非对所有的恙虫都可適用，应按每种恙虫的不同生活習性分別使用。根据著者經驗，收集草中游离的德里恙虫(*Trombicula deliensis*)幼虫，以动物野外誘集法为最好。光誘器应用於欧洲的秋恙虫(*Trombicula autumnalis*)極為有效。

(二) 成虫和稚虫收集法 先選擇在野外作动物感染法收集恙虫幼虫很多的地点，如田埂草地、長草田埂溝及長草地帶，剷除地面上的雜草，細心檢查地面陰湿地方如落叶、野草下面的土表面，細心觀察是否有稚虫和成虫。日入宮島(Miyajima)氏(1916)曾报告在洪水退后地面的落叶和野菜下面找到很多的紅恙虫(*Trombicula akamushi*)稚虫，把它們翻出來后，又很快地藏到土里去。再取地面 10 厘米以內的泥土，輕輕搓碎后平鋪在白搪瓷盤或白面盆內，然后加水浸过土面，再用玻璃棍緩緩攪拌泥土。待水面平靜澄清后，細心觀察水面。如有成虫和稚虫，因其体上多絨毛，易浮在水面。發現后即用鑷子取出置於盛有 70% 酒精的小瓶內，並登記採集地区和時間。最后制片鑑定。

恙虫标本的制作

(一) 需要器材 双目解剖鏡 1 架, 顯微鏡 1 架, 昆虫鑷子 2 把, 解剖針 1 把, 玻片及盖玻片各若干, 幼虫制片液若干。

(二) 各種幼虫製片溶液的配製法

1. 比氏溶液(Puri medium):

水合氯醛	70 克
阿拉伯樹膠	8 克
蒸餾水	10 毫升
甘油	5 克
冰醋酸	3 毫升

2. Hoyer 氏改良的 Berlese 氏处方:

蒸餾水	50 毫升
阿拉伯樹膠	30 克
水合氯醛	200 克
甘油	20 克

3. 改良的幼虫制片液:

水合氯醛	35 克
阿拉伯樹膠	25 克
甘油	12 毫升
蒸餾水	35 毫升
50%葡萄糖漿	3 毫升

以上三种溶液中, 比氏溶液漂白力很強, 用於一般的恙虫幼虫制片有时感到过分透明, 對於華屬(Genus *Walchia*)恙虫幼虫比較適用。但是制片后又需用白漆固封盖玻片四周, 很

不方便。第二种溶液我們未曾採用，但知在潮湿的地区盖玻片的周圍还要用膠封閉。我們几年來在实际工作中使用，認為改良的幼虫制片液比較好，因其溶液較稠，不致有压破恙虫幼虫而使背毛腹毛分辨不清，並且制片后不需白漆或其他藥物封閉盖玻片四周，操作比較簡便。用这种溶液制成的标本保存3年余没有什么变化。

(三) 製片步驟 先在双目解剖鏡下檢查鼠耳殼內部，遇有爬动的恙虫幼虫时，即用解剖針蘸上些幼虫制片液，再用此蘸液的解剖針尖輕輕接触幼虫腹部背面的末端。这样恙虫幼虫就黏在針尖上，然后放在滴有一小滴幼虫制片液的玻璃片上。先在鏡下檢查幼虫是否背面朝上，如果背面朝上，即把盖片輕輕盖下，避免有气泡留在盖片下面。如果腹面朝上，可另取一玻璃片放在桌上，把帶有溶液和恙虫的玻璃片正面朝下，与桌上玻片成垂直角度輕輕接触。这样，溶液和恙虫就粘到另一玻片上而轉为背面朝上，便於檢查背板(Scutum)和背毛的形狀和排列。

片子制好后，須过2—3天后才能透明。若用的是比氏溶液，則須等5—6天后片子比較干的时候，再用白漆封閉盖片周圍。若用改良的幼虫制片液，就不需要加白漆封閉。

标本制好透明后，才能鑑定恙虫的品种。如欲即时鑑定，可把恙虫幼虫放在滴有一滴乳酸溶液的玻片上，加上盖玻片后在酒精灯上加热至溶液起小泡为止，此时标本即可透明。若無乳酸溶液，可用50%酒精來代替，並放在酒精灯上慢慢地加热。

(四) 稚虫和成虫的製片法 在幼虫制片液中，適当地加入些水合氯醛以增加漂白力，即可供稚虫和成虫制片之用。其他步驟同上。

(五) 稚虫和成虫的保存 恙虫除了制玻片标本外, 不論幼虫、稚虫或成虫标本都可以保存於 70% 的酒精溶液內, 必要时可略加一些甘油。

恙虫的培养

目前, 各种恙虫的整个生活史中各个时期的形态及品种鑑定方面, 除幼虫之外, 其他如稚虫和成虫的参考文献, 还很稀少, 这对研究及調查國內几种主要恙虫的稚虫和成虫的品种鑑定上, 存在了一定的困难。因此着手稚虫和成虫的培养工作时, 不但對於了解恙虫的整个生活史有所助益, 而且對於已知种类的幼虫, 在其成虫和稚虫的品种鑑定上, 更可提供直接的参考。現將稚虫及成虫的培养法分述於后。

(一) 稚虫的培养 Blake 及 B. M. Jones 等氏曾經报告關於稚虫的培养法。國內梁柏齡氏(1952)也設計了一种簡便的培养法。著者等在实际工作中也做了几种培育的設計, 現略述如下:

1. 个别培养法: 此法大致是按梁柏齡氏法設計的。用粗濾紙剪成直徑 1.5—2.0 厘米的圓片, 將此圓片的邊緣向上微折使成碟形。用解剖針挑选鼠耳上飽食的恙虫幼虫置於此紙碟內, 把紙碟复在培养皿的盖的內面, 並用膠布把它周圍黏着在皿盖。在皿內盛水 10 毫升。將此裝置放在 30° — 35°C 的孵卵箱內, 並經常保持皿內的水量。这样經過 8—19 天之后, 恙虫稚虫就脫皮而出。培养的裝置如圖 2 所示。

2. 集体培养法: 用 7—8 厘米高, 直徑 5—7 厘米的玻璃筒放在培养皿的底碟上, 筒內裝普通無雜物的黃土, 高約 2 厘米。碟底与筒之間亦裝土高約 1.5 厘米, 以便固定筒的位

置及保持筒內土壤的湿度。然后把水由碟底与筒之間慢慢地

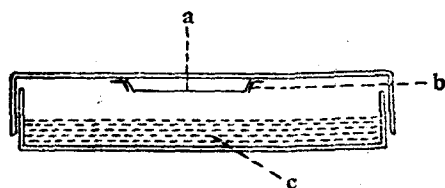


圖 2 个别培养的裝置

a. 濾紙碟 b. 膠布 c. 水

傾入，直至筒內黃土表面微濕為止。筒的內面或外面塗以凡士林，以防恙蟲幼蟲逸出。然后把大量飽食的恙蟲幼蟲挑放在黃土上；把這個裝置放在 $27^{\circ}-30^{\circ}\text{C}$ 的孵卵箱內。孵卵箱內的濕度要掌握在 85—100% 之間，這樣就可以把大量的稚蟲培養出來。培養的裝置如圖 3。

如果把黃土改為 90% 的石膏粉和 10% 的炭屑加水的混合物，上面加上消毒細砂，再加些水，也可以培養出稚蟲來。

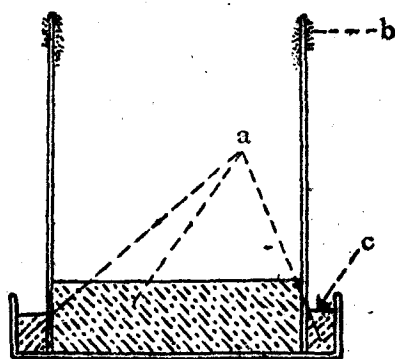


圖 3 集体培养的裝置

a. 黃土 b. 筒內或外塗以凡士林
c. 水傾入處

我們也曾試行水上培養法，把大量飽食的印度真棒恙蟲幼蟲放在盛有清水（井水）的培養皿內，加上蓋。在經過 8 天以後，都變成稚蟲。由此可見，由幼蟲變為稚蟲需要很大的濕度。

(二) 成虫的培養 培養的方法可採用稚虫的集體培養法。由集體培養法培養出來的稚虫，飼以蚊的卵，或者用雞糞、酵母、麥芽糖和瓊脂的混合物，在 $27^{\circ}-30^{\circ}\text{C}$ 的溫度和 85% 的濕度下，28—36 天后即變為成虫。

恙虫熱立克次氏體的可檢材料

(一) 病人 病人血液為分離立克次氏體的最好材料，如為初期恙虫病患者，即病程在 7 天以內者，自肘靜脈採血 5—10 毫升，將其半量注入消毒空試管內，析出血清，留作血清反應外，余血注入盛有玻璃珠的消毒試管內，用力搖震，使之完全脫纖維，備作動物接種之用。或者採血後直接注射動物亦可。

如為后期病人，有做分離培養的必要時，多用血塊。採血後放在消毒試管內，使之凝固，吸出血清，所余血塊用消毒鹽水洗滌一次後，置入盛有消毒細砂的乳鉢內，先以剪刀剪碎血塊，再細心研磨，注加一倍鹽水，制成乳劑，作為接種材料。根據著者經驗，對第十至第十四病日的晚期患者，用全血為接種材料，在 7 例中亦有 5 例分離恙虫熱立克次氏體獲得成功。此外從已經服用氯霉素的患者血液中也分離成功。

除血液外，發熱期病人的尿，雖亦有分離出立克次氏體的報告，但因含立克次氏體不多，其陽性檢出率很低。我們也曾用尿分離，未獲成功。

(二) 屍體 恙虫病患者屍體的脾、腦、肝、心血、腎和腫大的淋巴結，都是很好的檢查材料。血液可不加稀釋，用原液注射。其他如脾、腦、肝、腎、淋巴結和血塊研細後，酌加少量鹽水或肉湯，制成乳劑，裝入試管內，用低速度離心沉澱 1—2

分鐘，取其上清液作接種材料。如果客觀上不允許作全面屍體解剖，可在脾部位的腹部開一小口，剪取1—2克重的脾組織作接種材料。此外，用延髓穿刺術取腦行動物分離培養，亦能得良好的結果。

(三) 鼠類、家兔及其他動物 用鼠籠捕獲的家鼠和田鼠，用乙醚麻醉剪下兩耳後，立即放在解剖盤上，將其背側朝下，腹部朝上，用5根鉄錐固定四足和口腔，以碘酒或來蘇水消毒胸腹部。再用消毒剪子由腹部正中線行縱切開，上至下顎骨緣，下至恥骨縫。然後改用消毒刀把皮向兩側剝離，觀察皮下組織的變化和淋巴結的腫大充血情形。繼之，先剖開胸腔壁，露出心臟，採血1—5毫升留作血清反應。其次打開腹腔壁，查看各臟器，特別是脾的腫大充血情形；如果發現淋巴結和脾有腫大充血，或者雖無此等變化而有檢查必要時，都應該以無菌手續剪下脾、腎和腦，分開或混和在一起，加5倍鹽水製成乳劑，以低速度離心沉淀數分鐘，將上層清液作動物分離培養的材料。家兔亦為動物宿主之一，根據著者在某地的調查，也從家兔體上收集到多種恙蟲幼蟲，並從家兔各臟器中分離出恙蟲熱立克次氏體。同時也証實了從腎分離恙蟲熱立克次氏體的陽性率很高，故在選擇檢驗材料時，應當包括腎在內。

除鼠、兔外，其他動物的調查也很重要，其可檢材料的選擇同上。

(四) 恙蟲 收集的恙蟲，首先鑑別其種類，按恙蟲種類分別計數在100只以上時，即足敷動物分離培養之用。操作方法可先取經過消毒的凹玻片，預先滴以400單位青霉素、200單位鏈霉素各一滴，把恙蟲放在凹處，於4°C冰箱內放置2—4小時，再用無鈎鑷子或小刀細細地將每個恙蟲研碎，緩