

福建恙虫病立克次体的抗原型

于恩庶 关碧玮 黄桂森 何似 庄履平

(福建省流行病学研究所,福州)

范明远 毕德增 陈潮权 蔡虹

(中国医学科学院流行病学微生物学研究所,北京)

采用补体结合试验和免疫荧光试验的方法,检查了近 130 株从福建省各种材料分离的恙虫病立克次体,它们分属于 5 个抗原型。其中 3 个型与国际公认的 Karp、Gilliam 和 TA716 型相同,另外两个型(C41 和 M4 型)的国际型别尚待鉴定。这 5 个型在福建省的分布有一定的地区性差异,Karp 型在光泽县和龙溪地区为多见;Gilliam 型在平潭县多见;TA716 型、C41 和 M4 型分别在龙岩地区、长乐县和平潭县发现。

1980 年以来,我们从福建省各地分离的恙虫病立克次体中,筛选出 5 个不同的抗原型。当时因无国际参考株,无法确定抗原型别。最近,由日本和马来西亚分别引进国际参考株和国际公认的 8 个型的抗原片,对上述 5 个抗原型作了进一步鉴定。

材料和方法

(一) 恙虫病立克次体株

1. 福建地方株:从福建省各地恙虫病患者、鼠类和恙螨分离,经鉴定符合典型恙虫病立克次体的特征,用小白鼠长期传代保种。5 个抗原型立克次体代表株来源如下:

P3 株:将平潭县甲型地里纤恙螨幼虫在实验室饲养至成虫,从所产的卵中分离。

C41 株:从长乐县黄毛鼠肝脾中分离。

KX 株:从光泽县黑线姬鼠分离。

R25 株:从龙岩地区黄毛鼠分离。

M4 株:从平潭县巨螯齿恙螨分离。

2. 广东 B 株:系广东省从地里纤恙螨分离。

3. Karp 国际参考株:系日本国立预防医学研究所病毒学、立克次体学部大谷 明教授(Oya Akira, Department of Virology & Rickettsiology,

National Institute of Health, Tokyo, Japan) 赠送,经小白鼠和鸡胚传代。

(二) 免疫血清

1. 豚鼠免疫血清:用恙虫病立克次体腹腔感染的小白鼠腹水,加生理盐水制成 10% 悬液,腹腔注射成年豚鼠,每只 3—4ml,1 个月后采血,析出血清,低温冷冻保存。

2. 家兔免疫血清:用上述同样感染材料腹腔注射家兔 4 次,每周 1 次。末次免疫后 1 周采血,分离血清,冷冻保存。

(三) 间接免疫荧光试验

使用家兔免疫血清。抗原片有两种:一种为国际公认的 8 个型的抗原片,系马来西亚医学研究所立克次体学部(Department of Rickettsiology, United States Army Medical Research Unit, Institute for Medical Research, Kuala Lumpur, Malaysia) Shirai Akira 教授赠送;另一种为本实验室制备,即用各恙虫病立克次体株腹腔感染的小白鼠,濒死时解剖,取腹腔积液涂片,丙酮固定。羊抗兔荧光抗体体系上海生物制品所出品,批号 8101-1,有效期为 1983 年 6 月,工作浓度 1:25。按常规方法染色。

(四) 直接免疫荧光试验

本文于 1983 年 6 月 6 日收到。
承赖曦教授审阅本文,特此致谢。

从恙虫病立克次体家兔免疫血清提取球蛋白,用异硫氰酸荧光素标记,通过葡聚糖凝胶,除去游离荧光素,加叠氮钠防腐,测定效价,备用。本试验工作浓度为 1:15—1:20。抗原片制备同间接法。将株特异的免疫荧光抗体,直接加于抗原片上,染色 30—45 分钟。

(五) 补体结合试验

抗原制备:使用地鼠肾原代单层细胞,接种恙虫病立克次体,在 37℃ 培养 9—11 天,当立克次体繁殖量达到高峰时,将细胞从瓶壁冲落于培养液内,以 4,000 转/分离心 2 小时,取沉淀物加 0.25% 胰蛋白酶混悬,消化 60 分钟,释放出立克次体,再经 10,000 转/分离心 1 小时,沉淀物(立克次体和少量细胞残屑)再混悬于蔗糖缓冲液中,再加 3—4 倍乙醚提纯,置室温过夜。取下层液,乙醚蒸发后即成抗原。

用豚鼠制备免疫血清。补体结合试验总量为 0.6 ml,在 4℃ 结合过夜,按常规方法进行。

结 果

(一) 抗原型鉴定

补体结合试验结果表明,从分离的恙虫病立克次体株中筛选出的 KX、C41、P3、B 和 M4 等 5 株恙虫病立克次体,它们之间有明显的抗原差异,属于不同的抗原型(表 1)。

表 1 5 个恙虫病立克次体抗原株间的交叉补体结合试验

Table 1 Reactions between 5 antigenic strains of *Rickettsia tsutsugamushi* in cross complement fixation test

抗原效价 Antigen (titer)	抗血清 Antisera				
	KX	C41	P3	B	M4
KX (1:32)	1:40	—	—	—	—
C41 (1:16)	—	1:80	—	—	—
P3 (1:32)	1:20	—	1:80	—	—
B (1:16)	—	—	—	1:80	—
M4 (1:16)	—	—	—	—	1:40

用 KX、C41、P3 和 B 等 4 株立克次体抗血清制备特异性荧光抗体,与国际上公

认的 8 个型抗原片,进行直接免疫荧光染色。结果证明,KX 株与 Karp 株、P3 株与 Gilliam 株、B 株与 TA 716 株的抗原型相同。C41 株与 Karp、Gilliam 两株有交叉反应,尚不能确定属型(表 2)。

表 2 4 个地方株免疫血清与 8 个型恙虫病立克次体抗原的直接免疫荧光试验

Table 2 Reactions of 8 prototype strains of *R. tsutsugamushi* with 4 antisera of local strains in the direct immunofluorescent test

抗原 Antigens	抗血清 Antisera			
	KX	C41	P3	B
Karp	+	+	—	—
Kato	—	—	—	—
Gilliam	—	+	+	—
TA678	—	—	—	—
TA686	—	—	—	—
TA716	—	—	—	+
TA763	—	—	—	—
TH1817	—	—	—	—

+: 阳性反应 (positive reaction)。

—: 阴性反应 (negative reaction)。

表 3 地方株与 Karp 株的直接免疫荧光反应

Table 3 Reactions of Fujian strains of *R. tsutsugamushi* with Karp strain in direct immunofluorescent test

抗原 Antigens	抗血清 Antisera			
	KX	C41	P3	B
KX	+	—	—	—
C41	—	+	—	—
P3	—	—	+	—
B	—	—	—	+
Karp	+	—	—	—

从国外引进的 Karp 株与福建分离的恙虫病立克次体株,经直接免疫荧光试验进行比较,结果也证明 KX 株与 Karp 株抗原型相同(表 3)。试验中这两株有时与 C41 株抗血清呈阳性反应,故 C41 株不能定型。

从龙岩地区分离的恙虫病立克次体

表 4 R 25 株与 B 株的间接免疫荧光测定

Table 4 Antigenic typing of R25 and B strains by indirect immunofluorescent test

抗血清 Antisera	抗原 Antigens					
	R25	B	KX	C41	P3	Karp
R25	$\geq 1:800$	1:400	$< 1:100$	$< 1:100$	$< 1:100$	$< 1:100$
B	1:400	$\geq 1:800$	$< 1:100$	$< 1:100$	$< 1:100$	$< 1:100$

表 5 福建恙虫病立克次体的抗原型分布

Table 5 Geographical distribution of antigenic types of *R. tsutsugamushi* in Fujian

抗原型 Antigenic types	平潭县 Pintan	长乐县 Changle	光泽县 Guangze	龙岩地区 Longyan	晋江地区 Jinjiang	龙溪地区 Longxi
Karp	1		3		1	24
C41	3	4			1	2
Gilliam	11					1
TA716				1		
Karp-C41	3				5	17
Karp-Gilliam	7					8
C41-Gilliam	9					
Karp-C41-Gilliam	16				1	5
Other	2					1
总计(株) Total	52	4	3	1	8	58

R 25 株,与上述各株经间接免疫荧光试验比较,结果证明 R 25 株与 B 株的抗原性是一致的(表 4)。因 B 株与 TA 716 型抗原性相同,故 R 25 株应定为 TA 716 型。

将 KX 株和 R 25 株送给马来西亚医学研究所立克次体学部 Shirai 教授鉴定,分别确定为 Karp 型和 TA 716 型, C41 株尚未定型。

(二) 抗原型的地区分布

从平潭县、长乐县、光泽县和晋江地区两个县、龙溪地区 5 个县市的恙虫病患者、鼠类和恙螨分离的 126 株恙虫病立克次体,用补体结合试验进行了抗原分析。结果表明,抗原型的分布是有地区性的。例如,平潭县以 Gilliam 型为主,长乐县以 C41 型为主,光泽县和龙溪、晋江两地区以 Karp 型或 Karp 和 C41 混合型为主。此

外,在龙岩地区发现 TA716 型(表 5)。

讨 论

恙虫病立克次体株间的抗原差异性,已为许多学者所证实^[1-7]。最初,在日本发现 Karp、Kato 和 Gilliam 3 个抗原型,以后在泰国又发现另外 5 个抗原型,即 TA 678、TA 686、TA 716、TA 763 和 TH 1817^[8],这 8 个型已为目前国际上所采用。Shishido 等(1964)报告从日本古典疫区的患者、鼠类和红纤恙螨分离的立克次体株,主要为 Kato 型;从新疫区分离的立克次体株主要为 Karp 型和 Gilliam 型^[2]。Shirai 等证实巴基斯坦的立克次体株主要为 Karp 型^[9]。Dohang 等报告马来西亚的立克次体株,主要为 TA 763、TA 716 和 Karp 型^[9]。Huxsoll 等报告,从泰国和马来西亚分离的

立克次体株, 主要为 Karp 型; 从澳大利亚、菲律宾分离的立克次体株, 主要为 TA 716 型。同样根据本文所报道的结果还可以看出恙虫病立克次体抗原型分布是有地区性差异的。但也有报告认为没有差异, 这可能因为调查的范围小, 或者是在相同抗原型流行区调查的结果。

抗原型鉴定的方法有多种: 补体结合试验^[1-3]、血清中和试验^[4,5]、毒素中和试验^[3,8]、交叉免疫试验^[7]和免疫荧光试验^[3,8]。目前主要采用补体结合试验和免疫荧光试验^[10]。补体结合试验的关键, 是制备特异性高的抗原。

我们用地鼠肾单层细胞培养立克次体, 经胰蛋白酶消化提纯, 再经乙醚处理, 获得没有抗补体和特异性很高的抗原, 用于抗原型鉴定, 与免疫荧光试验结果相符, 但制备手续较繁。免疫荧光试验间接法和直接法均可用于抗原型的鉴定, 方法简便, 特别是直接法特异性较高, 但需制备型特异的免疫荧光抗体。

根据国外对志愿者进行试验的结果表明, 恙虫病立克次体株不同抗原型间的交叉免疫力有差别。Smadel 等报道, 对同型株感染的免疫力至少可保持一年, 而对异

型株感染的免疫力却很快消失。此外, 每个地区抗原型不尽相同, 还有在同一个地区, 甚至一个范围很小的地区往往有多型立克次体株的存在。因此, 各种血清学诊断试验和制备疫苗所采用的立克次体株, 必须包括当地流行的多型抗原株, 特别是主要抗原型株。因此, 抗原型的研究不仅具有理论意义, 而且更有实际应用价值。

参 考 文 献

- [1] Bengtson, I. A.: *Public Health Reports*, 60: 1483—1488, 1945; 61: 887—894, 1946.
- [2] Shishido, A.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 17: 59—72, 1964.
- [3] Shirai, A. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 24: 145—153, 1975.
- [4] Bell, E. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 62: 134—137, 1946.
- [5] Bennett, B. L. et al.: *J. Bact.*, 54: 93, 1947.
- [6] Smadel, J. E. et al.: *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, 62: 138—140, 1945.
- [7] Rights, F. L. et al.: *J. Exptl. Med.*, 87: 339—351, 1948.
- [8] Iida, T. et al.: *J. Immunol.*, 95: 1129—1133, 1965.
- [9] Dohang, A. L. et al.: *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 27(6): 1261—1264, 1978.
- [10] Elisberg, B. L. et al.: *J. Hyg. Epid. Microbiol. and Immunol.*, 12: 18—25, 1968

ANTIGENIC ANALYSIS OF ISOLATES OF *RICKETTSIA TSUTSUGAMUSHI* RECOVERED FROM FUJIAN PROVINCE, CHINA

Yu Enshu Guan Biwei Huang Guisen He Si Zhuang Lüping
(*Fujian Research Institute Epidemic Diseases, Fuzhou*)

Fan Mingyuan Bi Dezeng Chen Chaoquan Cai Hong
(*Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing*)

One hundred and twenty six isolates of *Rickettsia tsutsugamushi* from Fujian province, recovered from patients, rodents and chiggers were antigenically analyzed by complement fixation test and immunofluorescence techniques. Five antigenic prototypes

were detected. The geographical distribution of these three antigenic types in different regions were distinctive, for example, Gilliam type in Pingtan, TA716 type in Longyan and Karp type in Guangze districts were the most common one, respectively.