

致病性钩端螺旋体的三个新血清型

张方正 王俊杰 孟佩云 龙沛然 胡孟周

(昆明军区后勤部军事医学研究所)

自云南省分离出 3 株 (M48、A31、A82) 钩端螺旋体,经鉴定它们分别属于 3 个新血清型。M48 系 1960 年从耿马县猪肾分离, A31 与 A82 分别于 1962、1970 年自勐腊县病人血培养物中分离。拟分别命名为耿马型 (M48)、版纳型 (A31) 和勐捧型 (A82) 钩端螺旋体 [*Leptospira interrogans* serovars *gengma* (M48), *banna* (A31) 和 *mengpeng* (A82)]。其中耿马型应属于塔拉索夫血清群;版纳型和勐捧型的血清学性质介于塔拉索夫和歇尔曼二群之间,其血清学归属尚难肯定。

关键词 致病性钩端螺旋体;耿马型钩端螺旋体;版纳型钩端螺旋体;勐捧型钩端螺旋体

近年来,我们先后在云南省发现 3 株钩端螺旋体 (M48、A31 及 A82) 与现已公认和部分尚未公认的各型钩端螺旋体均不相同,应属于新的血清型。

材 料 和 方 法

(一) 菌株来源

M48 株系 1960 年由云南省自然疫源病调查组孟定工作组自耿马县孟定地区猪肾分离。1963 年我们即确定为塔拉索夫群 (原海欧斯群) 的一个血清型。

A31 株系 1962 年我们勐腊工作组自西双版纳勐腊县病人血培养物中分离。1963 年我所确定属于塔拉索夫群,与 M48 株各为此群的一个血清型。国内称为勐腊 A31 型^[1]。

A82 株系 1970 年由我所、成都生物制品研究所、思茅地区及西双版纳州卫生部门组成的“710 协作组”自勐腊县勐捧地区病人血培养物中分离。

各型标准参考株除曼耗群 L105 株是由我们分离、鉴定、保存外^[2],均由卫生部药品生物制品检定所提供。

(二) 方法

1. 菌株保存:采用加 0.001% 酚红的 Korthof 培养基保存,一般二个月传代一次。另按 Turner^[3] 的方法,备一套加胶塞封口的培养物,室温长期

保存,作为保存菌种的辅助手段。

2. 凝集试验 (包括抗原和免疫血清制备) 系按 Wolff 的方法^[4]。以正常菌体减少 50% 作为终点。

3. 凝集素吸收试验:抗原经 4,000 rpm 30—60 分钟离心,弃上清液,沉淀加原量 1/50—1/100 盐水混悬作为吸收用浓缩抗原。通常分 2 次吸收。第一次取未稀释的血清 2 份加浓缩抗原 3 份,置室温 4—6 小时,经 4,000rpm 离心后,取上清液,再加等量浓缩抗原,室温过液,再次离心,其上清液作为 1:5 的吸收血清。

吸收血清对吸收菌的残留抗体在原效价 1% 以下者为合格。如经 2 次吸收仍不合格,则将浓缩抗原再行离心,弃上清液,加经 2 次吸收的血清于沉淀中,再吸收一次或多次,直到合格。

4. 结果判定:依世界卫生组织颁布的标准判定^[5]。参考 Babudieri^[6] 和 Kmety^[7] 等人对钩端螺旋体分型标准化的工作,注意吸收抗原过量 and 残留效价差的问题,暂定“两菌株经多次交叉吸收试验,至少有一个血清对本型菌株的效价达原效价 10% 以上,对异型的残留效价为本型残留效价 1/30 以下时,判断为不同型”。

结 果

(一) 定群试验

按 Dikken 和 Kmety (1978) 的建议^[8]

本文于 1983 年 10 月 26 日收到。

表1 M48、A31、A82株与各群钩端螺旋体标准株间的交叉凝集试验
Table 1 Cross agglutination tests of leptospiral strains M48, A31 and A82 with standard strains

血清群 Serogroup	血清型 Serovar	参 考 株 Reference strain	血清效价 Homologous titer	抗 原			免 疫 血 清 抗 原 血清		
				M48	A31	A82	M48	A31	A82
Icterohaemorrhagiae	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	RGA	3,000	—	—	—	—	—	—
Hebdomadis	<i>L. hebdomadis</i>	Hebdomadis	3,000	—	—	—	—	—	—
Autumnalis	<i>L. bangkinang</i>	Bangkinang I	3,000	—	—	—	—	—	—
Bataviae	<i>L. bataviae</i>	Van Tienen	10,000	—	—	—	3	3	0.3
Pyrogenes	<i>L. robinsoni</i>	Robinson	3,000	—	—	—	—	—	—
Grippityphosa	<i>L. valbuzei</i>	Valbuzei	3,000	—	—	—	—	—	—
Canicola	<i>L. schuettneri</i>	Vleermuis C90	3,000	—	—	—	—	—	—
Pomona	<i>L. pomona</i>	Pomona	3,000	—	—	—	—	—	—
Australis	<i>L. lora</i>	Lora	3,000	—	—	—	—	—	—
Javanica	<i>L. poi</i>	Poi	3,000	—	—	—	—	—	—
Sejroe	<i>L. hardjo</i>	Hardjo Prajitno	3,000	—	—	—	—	—	—
Djasiman	<i>L. djasiman</i>	Djasiman	1,000	—	—	—	—	—	—
Cynopteri	<i>L. cynopteri</i>	3522 C	1,000	—	—	—	—	—	—
Tarassovi	<i>L. hyos</i>	Mitis Johnson	3,000	30	10	10	100	10+	100
Mini	<i>L. mini</i>	Sari	10,000	—	—	—	—	—	—
Ballum	<i>L. ballum</i>	Mus 127	1,000	—	—	—	—	—	—
Celledoni	<i>L. whitcombi</i>	Whitcombi	3,000	—	—	—	—	—	—
Louisiana	<i>L. louisiana</i>	LSU 1945	3,000	—	—	—	—	—	—
Panama	<i>L. panama</i>	CZ 214	10,000	—	—	—	—	—	—
Shermani	<i>L. shermani</i>	Lt 821	1,000	10	30	30	10	30	30
Manhao	<i>L. manhao 2</i>	L 105	10,000	—	—	—	—	—	—

注：各表抗原或免疫血清的效价均以血清效价的百分比表示。10+表示有时比10%高一个滴度，例如10+ = 10-30%，3+ = 3-10%，依此类推。
Note: All the titers in the item of antigen or antiserum of the table are expressed as percentage of the homologous titers.
10+ denoted sometimes one step higher than 10% e. g. 10% = 10-30%, 3+ = 3-10% etc.

表 2 M48、A31、A82、Lt821 株构端螺旋体与塔拉索夫群各株间的交叉凝集试验

Table 2 Cross agglutination tests of leptospiral strains M48, A31, A82 and Lt821 with members of Tarassovi serogroup

血清型 Serovar	参考株 Reference strain	血清效价 Homologous titer	抗 原				免 疫 血 清 Antiserum			
			A 31			A 82	M 48	A 31	A 82	Lt 821
			M 48	A 31	A 82					
<i>L. tarassovi</i>	Mitis Johnson	3000	30	10	10			100	100	10
<i>L. bakeri</i>	Lt 79	10000	30	30	10			30	100	3
<i>L. atlantae</i>	Lt 81	10000	10	10	10			30	30	3
<i>L. guidae</i>	Rp 29	1000	30+	30+	30			10	10	1
<i>L. kisuba</i>	Kisuba	10000	3	3	1			10	30	1
<i>L. bravo</i>	Bravo	10000	1	-	-			-	1-	-
<i>L. atchafalaya</i>	LSU 1013	3000	30+	10	10			30+	100	3
<i>L. chagres</i>	Lt 24	3000	3	-	-			30	1-	10
<i>L. gatumi</i>	Lt 839	3000	30	30	30			10+	10	1
<i>L. ruma</i>	Lt 955	10000	1-	1	1-			3	10	1
<i>L. darwin</i>	Lt 739	1000	1	-	-			3+	3	1
<i>L. vughia</i>	Lt 8968	30000	10+	10	3+			100	30+	10
<i>L. tunis</i>	P 2	3000	30+	100	30			100	100	1
?	M 48	3000	100	30	10					
?	A 31	3000	30+	100	100					
?	A 82	3000	100	100	100					
<i>L. shermani</i>	Lt 821	1000	10	30	30			30+	100	1

注: 1-表示有时比 1% 低一个滴度。

Notes: 1-denoted sometimes one step lower than 1%.

表 3 M48、A31、A82 株与塔拉斯夫群、歇尔曼群各型参考株间的交叉凝集素吸收试验

Table 3 Cross agglutinin absorption tests of leptospiral strains M48, A31 and A82 with reference strains of Tarassovi and Shermani serogroups

免疫血清 Antiserum	吸收菌株 Absorbed with strain	抗原 Antigen					
		RS 与 M48 组 Group RS & M48		RS 与 A31 组 Group RS & A31		RS 与 A82 组 Group RS & A82	
		RS	M48	RS	A31	RS	A82
Mitis Johnson YS	YS Mitis Johnson	3 0	0 30	100 0	0 30	100 0	0 100
Lt 79 YS	YS Lt 79	3+ 0	0 100	10+ 0	0 30	10+ 0	0 100
Lt 81 YS	YS Lt 81	30 0	0 100	30+ 0	0 100	30 0	0 30+
Rp 29 YS	YS Rp 29	3+ 0	0 100	100 0	0 100	100 0	0 30+
Kisuba YS	YS Kisuba	100 0	1 100	100 0	0 100	30 0	0 30
Bravo YS	YS Bravo	30 0	0 100				
LSU 1013 YS	YS LSU 1013	10 0	0 100	30 0	0 30+	30+ 0	0 30+
Lt 24 YS	YS Lt 24	100 0	0 100				
Lt 839 YS	YS Lt 839	30 0	0 100	30+ 0	0 100	30 0	0 100
Lt 955 YS	YS Lt 955			30 0	0 30	30+ 0	0 100
P 2 YS	YS P2	0 0	0 30	30 0	0 30	30 0	0 30
Lt 8968 YS	YS Lt 8968	3 0	1 10	30 0	0 30	30+ 0	0 100
Lt 821 YS	YS Lt 821	100 0	0 100	100 0	0 30	100 0	0 30
M 48 A 31	A 31 M 48		100 0		0 100		
M 48 A 82	A 82 M 48		30 0				0 30+
A 31 A 82	A 82 A 31				30 0		0 30+

注: YS 分别为抗原栏内的各云南株。

RS 分别为免疫血清栏内的各参考株。

Note: YS is the Yunnan strains in the item of antigen, respectively.

RS is the reference strains in the item of antiserum, respectively.

(略有改变),将上述各株与包括各群的 21 型参考株钩端螺旋体进行交叉凝集试验初步定群。结果(表 1)表明,3 个云南株均与 *L. tarassovi* 和 *L. shermani* 有关,并与 *L. bataviae* 有较低的单向反应。M48 株与 *L. tarassovi* 较接近,A31、A82 株则与 *L. shermani* 的关系较密切(交叉凝集效价在 30% 或 30% 以上,表 1)。

(二) 群内交叉凝集试验

进一步试验结果说明 3 个云南株与歇尔曼群 Lt821 株与塔拉索夫群各型参考株间的关系(表 2)。Lt821 株与塔拉索夫群各株均有关系,但较疏远。云南株相互间以及和二群间均有密切的抗原关系。其中 M48 株与 Lt821 株的关系稍疏,但与塔拉索夫群一些菌株关系密切。A31、A82 二株则与 Lt821 株关系密切,但也与少数塔拉索夫群菌株关系密切(表 2)。显示出云南株,特别是 A31、A82 二株具有二群间中间菌型的性质。

(三) 菌型鉴定

将交叉凝集试验单向效价达原效价 10% 的二个菌株进行交叉凝集素吸收试验,见表 3。

M48 株在塔拉索夫群内的交叉凝集反应较广泛,并且凝集效价也较高。交叉凝集素吸收试验结果表明,它与尚未被公认的 *L. vughia* (Lt8968 株)的关系最密切。经 M48 株吸收后的 Lt8968 株免疫血清对 Lt8968 株的残留效价在 10% 以下,而经 Lt8968 株吸收后的 M48 株免疫血清对 M48 株的残留效价多次试验均在 10% 或 10% 以上。所以两株菌株虽关系密切但仍应属不同的血清型。M48 株与塔拉索夫、歇尔曼群的其他各型均明显不同(表 3)。由表 3 还可以看出 A31、A82 二株既非同型也与其他各型明显不同。因此 M48、A31、A82 株均应属于新血清型。建议将 M48 株命

名为耿马型钩端螺旋体(*L. gengma*),A31 株为版纳型钩端螺旋体(*L. banna*),A82 株为勐捧型钩端螺旋体(*L. mengpeng*)。

讨 论

据报道,塔拉索夫群与歇尔曼群虽列为二个血清群,但血清学上是有关联的。塔拉索夫群各型抗原与 Mitis Johnson 株血清反应均较 Lt821 株血清强。而 Lt821 株与 Mitis Johnson 株仅呈微弱的单向反应,效价也较低(表 2),易于区分。

本文报道的 M48、A31、A82 三个云南株均属钩端螺旋体新血清型,这三个型反应的特点是:1. 相互间有较高的交叉反应。2. 与塔拉索夫群及歇尔曼群各株也有较高的交叉反应。颇难确定其血清群的归属。这三个菌型依血清反应可分为两个类型。M48 株较接近于 *L. tarassovi*,A31 和 A82 株较接近于 *L. shermani*,但相互间只差一个滴度。一般说来 M48 株与塔拉索夫群各型菌株的交叉关系较 A31、A82 株更为密切。因此,将 M48 株列入塔拉索夫群较合适,但将 A31 株、A82 株列入歇尔曼群似乎十分勉强。因后二者与两群菌型均有同样密切的抗原关系,交叉凝集素吸收试验的结果也难以判定其关系的远近。这种群间的交叉反应关系,虽然可以认为是由于新菌株各自固有的抗原特性所决定的,但是其稳定性尚需进一步试验。因此,版纳型和勐捧型究竟应属塔拉索夫群还是歇尔曼群有待进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] 魏曦等:《钩端螺旋体病学》,人民卫生出版社,北京,第 73 页,1982 年。
- [2] 昆明军区后勤部军事医学研究所等:微生物学报,19: 230,1979。
- [3] Turner, L. H.: *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 64: 635, 1970。
- [4] Wolff, J. W.: *The Laboratory Diagnosis of*

- Leptospirosis, Spring Field, Illinois, U. S. A., 1954.
- [5] WHO Tech. Rep. Series No. 380. 1967.
- [6] Babudieri, B.: *Bull WHO*, **44**: 719, 1971.
- [7] Kmety, E.: *Bull WHO*, **42**: 733, 1970.
- [8] Bergan, T. and J. R. Norris: *Methods in Microbiology Vol. 11*, Acad. Press. Inc. LID, London, pp. 259—307, 1978.

THREE NEW SEROVARS IN *LEPTOSPIRA INTERROGANS*

Zhang Fangzheng Wang Junjie Meng Peiyun

Long Peiran Hu Mengzhou

(Kunming Military Medical Institute)

Three leptospiral strains (M48, A31 and A82) isolate in Yunnan province belonging to different new serovars were reported in this paper. Strain M48 was isolated in Gengma count in 1960 from the kidney of a pig. Both strains A31 and A82 were isolated from the blood samples of patients in Mengla count in 1962 and 1970, respectively. It was proposed provisionally to design *L. gengma*, *L. banna* and *L. mengpeng* for strains M48, A31 and A82, respectively. Among these serovars, *L. gengma* appears to be a new

serovar in Tarassovi serogroup, but the serological behavior's of *L. banna* and *L. mengpeng* were found to be intermediate between Tarassovi and Shermani serogroups. Whether these serovars belong to Shermani or Tarassovi serogroup could not be determined and further study is necessary.

Key words

Leptospira interrogans; *Leptospira gengma*; *Leptospira banna*; *Leptospira mengpeng*