

我国 Q 热立克次体裂解气相色谱法鉴定的初步研究

俞树荣 李芹阶

(第三军医大学微生物学教研室)

谭 立

(空军第四研究所)

用裂解气相色谱法 (PGC) 分析微生物国内已有不少报道^[1-4]。该法的重现性好, 有可能用于微生物的鉴定。1984 年周方直接用感染鸡胚卵黄囊作裂解气相色谱鉴定斑点热群立克次体取得了较满意的结果^[5]。为探讨 Q 热立克次体的 PGC 分析和在 Q 热临床标本、流行病学材料快速检出及鉴定中应用的可能性, 我们对国内不同来源分离的 6 株 Q 热立克次体和 2 株国外株的感染材料, 进行了裂解气相色谱分析。

材 料 和 方 法

(一) 菌 株

本试验共用 Q 热立克次体 8 株。各株的来源及在实验室传代如表 1。鸡胚传代用培养 6—7 天的鸡胚卵黄囊接种, 经 35—37℃ 培养, 死亡后解剖取出卵黄囊, 将镜检立克次体丰富者做成 10⁻¹ 稀释的悬液传代; 小鼠传代用 12—18g 左右鼠腹腔接种感染材料, 于接种后第 6 天杀死, 取镜检有

表 1 试验用 Q 热立克次体株

菌株	来 源	分离或本室保存年代	传代情况	相别
七医	自慢性 Q 热病人分离	1962	EP 19	I→II
雅安	自 Q 热病人分离	1964	EP 8	I→II
新桥	自铃头血蜱 (<i>Haemaphysalis campanulata</i>) 分离	1964	EP 13	I→II
YH-11	自 Q 热病人分离	1965	EP9MP1EP2	I
YS-8	自绵羊胎盘分离	1965	EP 13	I→II
YS-9	自绵羊胎盘分离	1965	EP 14	I→II
Grita	军事医学科学院	1961	原传代情况不明, 军事医学科学院 EP18, 本室 EP75	II
Henzerling	北京生物制品研究所	1961	原传代情况不明, 本室共传 EP44MP9*	I→II

* 鸡胚与小鼠交替传代, 鸡胚 3-6 代传小鼠 1 代, 试验时用 EP4。

丰富立克次体的脾脏制备 10⁻¹ 悬液传代。

(二) 样品制备

接种 Q 热立克次体的鸡胚培养后, 一般在 8—10 天死亡, 取含立克次体繁殖量达 +++ 的鸡胚卵黄囊制成干粉及匀浆供检。前者系将感染卵黄囊于 100℃ 烘干, 研磨成粉末, 储存于干燥器内备用; 后者系加适量含 0.5% 甲醛盐水于感染卵黄囊膜, 在 37℃ 下灭活后研磨制成匀浆。

用同样条件下培养的正常鸡胚卵黄囊 (共培养 15—17 天) 制备标本作为对照。

(三) 仪器和实验条件

岛津 GC-RIA 型气相色谱仪, 双气路, 双氢焰电离鉴定器, 配以 XP-12 型居里点裂解器 (上海分析仪器厂)。用裂解丝沾取样品, 吹干后进样裂

本文于 1985 年 11 月 14 日收到。

解,每份样品干重 150 μ g 左右。裂解温度 660 $^{\circ}$ C,裂解时间 12.5 秒。色谱柱长 1.5m,内径 3mm 环形不锈钢柱,内填充 porapak Q (80—100 目)。载气为高纯氮气,每分钟流量 40ml,氢气流量 35ml/分,空气流量 400ml/分。汽化室温度 230 $^{\circ}$ C。起始柱温为 80 $^{\circ}$ C,样品裂解后,维持 1 分钟,再以每分钟 6 $^{\circ}$ C 速率程序升温至 180 $^{\circ}$ C,持续 30 分钟。纸速 4mm/分,放大器 10¹,衰减 2¹,计算方法为 41 (面积规范化),以上参数编为程序,样品裂解后,按已编程序自动分析。每份样品重复分析三次。

结 果

用目视法分析对照及各感染卵黄囊色谱图,同批样品三次裂解的结果,以卵黄囊匀浆进样重现性良好,干粉进样次之。曾用裂解丝直接沾取未作任何处理的新鲜卵黄囊进样,重现性很差。卵黄囊匀浆进样得到的指纹图,不仅在正常与感染卵黄囊标本之间有明显差异,而且在 Q 热立克次体各株间也可相互区别。

正常和感染卵黄囊的峰形、峰值比例均显著不同。正常卵黄囊色谱图保留时间 13.46—22 分钟出现 6 个色谱峰,在 15.13 和 16.39 分钟处呈

高大的双峰为其特征,后者为大型复合峰(图 1);而 Q 热立克次体感染卵黄囊在此相当的保留时间有 9 个色谱峰,如七医株感染卵黄囊在 15.27 和 15.9 分钟出现两个峰,14、17 分钟的峰又是正常卵黄囊所不显的。各株感染卵黄囊除个别外,多是 17 或 19 分钟处的峰最高大。此外,在正常卵黄囊色谱图中不仅 27、30、35 分钟处诸峰均比感染卵黄囊者低小,而且还缺少 23 分钟的峰。

Q 热立克次体各株在保留时间 14—19 分钟虽共有一组峰(峰 a—峰 f),但不同菌株的这组峰中的各峰峰值比例彼此间存在着差异,可以相互鉴别(图 2、表 2)。

从图 2 和表 2 中可以看出,除雅安株和 Henzerling 株色谱图十分相似外,其他多互有差别。但雅安株峰 f 高于峰 e 比 Henzerling 株明显,而且前者 31.98 分钟的峰高于 28.04 分钟峰,也不如后者 30.94 分钟峰高于 27.2 分钟峰明确。各株中最有独特之处的是 YH-11 株峰 b 低于峰 c, YS-9 株的峰 d 低于峰 c,以及 Grita 株的峰 d 高于峰 e。在峰 f 高于峰 e 中以 YS-8 及 YS-9 两株明显,分别近 3 倍及 2 倍。与其他株相比, Grita 株峰 a 低于峰 b,峰 b 高于峰 c,峰 c 低于峰 d 均较突出。

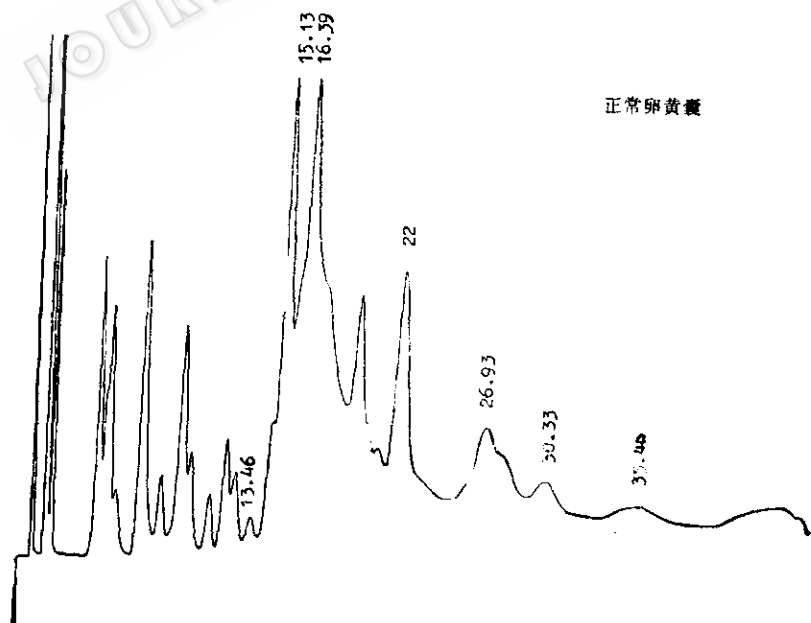
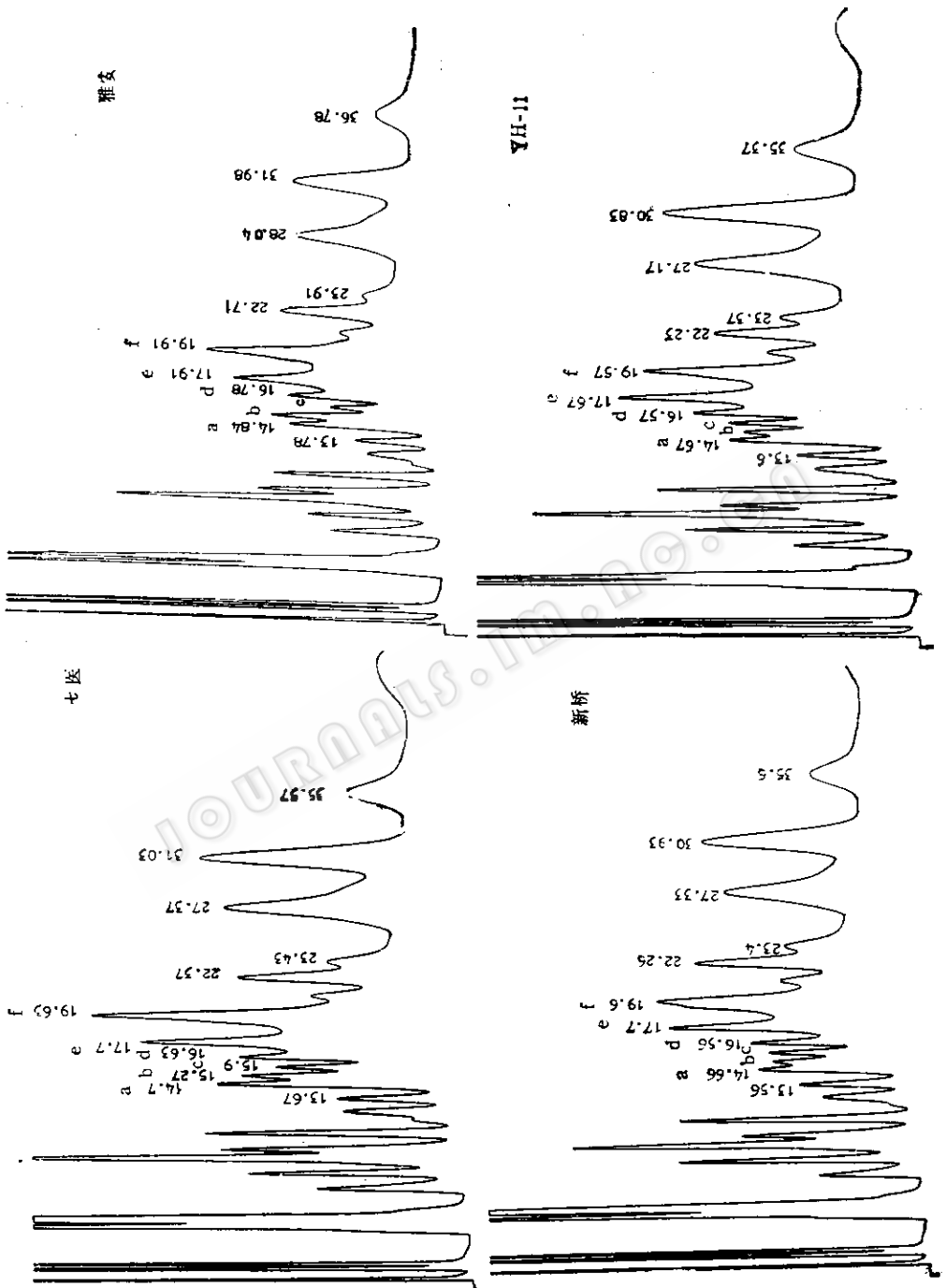


图 1 正常卵黄囊裂解色谱图



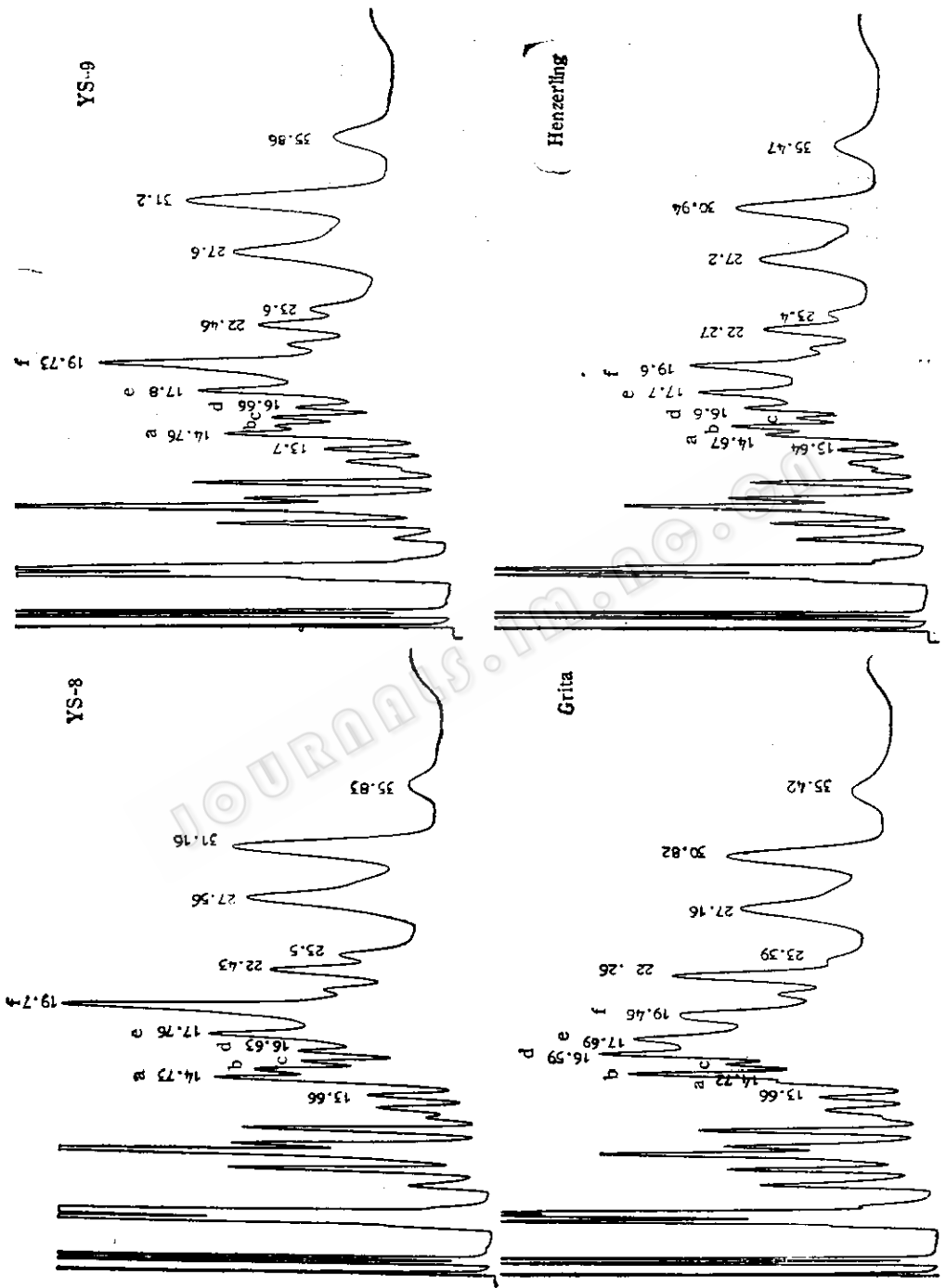


图 2 各株 Q 热立克次体感染卵黄囊裂解气相色谱图

表2 各株 Q 热立克次体裂解色谱图特征

菌 株	色 谱 图 特 征				
	a > b	b > c	d > c	e > d	f > e
七医	a > b	b > c	d > c	e > d	f > e
雅安	a < b	b > c	d > c	e > d	f > e
新桥	a > b	b ≈ c	d > c	e > d	f > e
YH-11	a > b	b < c	d > c	e > d	f < e
YS-8	a > b	b > c	d ≈ c	e > d	f > e
YS-9	a > b	b ≈ c	d < c	e > d	f > e
Grita	a < b	b > c	d > c	e < d	f < e
Henzerling	a < b	b > c	d > c	e > d	f > e

讨 论

从本试验的初步结果说明,应用 PGC 直接鉴定感染卵黄囊中的 Q 热立克次体是可行的。PGC 适用于微生物鉴定的关键是要能提供重现性好的裂解指纹图,这除了有一套性能良好的仪器系统外,合适的微生物生长条件和生长周期,适当的样品制备方法,以及熟练地掌握仪器操作技术等均是能获得理想鉴定结果的重要因素。在同样仪器和实验条件下,各株立克次体标本分析的重现性取决于样品的制备。可能由于卵黄囊匀浆比干燥粉末容易在裂解丝表面形成均匀薄层,所以重现性好;干粉研磨不细也会造成重现性差。至于直接自新鲜卵黄囊取样,往往难以接触同样感染部位,取材不匀而不能重复。

Q 热立克次体存在相变异现象。新分离菌株或在动物、蜱体内传代者为 I 相,经鸡胚卵黄囊连续传代后, I 相逐渐变为 II 相,其程度与菌株适应于鸡胚的程度成正比。鸡胚适应株(特别是过渡相)若再通过一代或几代动物或蜱后,仍可变回到 I 相。在相变异过程中,伴随立克次体化学组成的变化,特别与脂多糖中的蛋白质、中性糖及脂肪酸含量改变或得失有密切关系^[4-8]。我们试验的 8 株 Q 热立克次体,由于在实验室传代历史不同而处于不同相或过渡相。虽然各株裂解指纹图有其共相特征,但 Grita 株(II 相)呈独特的峰 d 高于峰 e; YH-11 株(I 相)峰 b 低于峰 c, 峰 e 最高;处于过渡相的其他各株以峰 f 最高,特别是同由绵羊胎盘分离的 YS-8 株和 YS-9 株更为明显,是否反映各株立克次体相变异后的化学组成不

同,或也与其来源于不同宿主有关,尚待进一步探讨。雅安株和国外 Henzerling 株传代情况并不相同,前者在鸡胚传 8 代,而后者在本室用鸡胚与小鼠交替传鸡胚 44 代,小鼠 9 代,是否因它们的相变异程度大致相当,化学组成相近,从而出现十分相似的裂解色谱图,也需进一步采用纯化立克次体或其分子组分试验,才有可能作出判断。

用 PGC 可以由感染 Q 热立克次体鸡胚卵黄囊得到特征性色谱图,有可能进一步应用该法直接分析 Q 热检验材料中的病原菌,或作分离菌株的快速鉴定。但是,要使本法能达到实际应用阶段,尚待研究最佳的仪器及实验条件,提供 Q 热立克次体重现性良好的标准色谱图,并深入探讨各株色谱图间差异与立克次体化学成分变化的关系。

参 考 文 献

- [1] 周 方: 微生物学通报, 7(3): 136, 1980.
- [2] 周 方等: 中华微生物学和免疫学杂志, 2(1): 16, 1982.
- [3] 谭 立等: 分析仪器, 5: 37, 1983.
- [4] 金天如等: 中华微生物学和免疫学杂志, 4(3): 177, 1984.
- [5] Zhou Fang and Lu Zhengwen: *Kexue Tongbao*, 29(5): 688, 1984.
- [6] Baca, O. G. et al.: *Can. J. Microbiol.*, 26(7): 819, 1980.
- [7] Schramek, S. and H. Mayer: *Infect. Immun.*, 38(1): 53, 1982.
- [8] Amano, K. I. and J. C. Williams: *J. Bacteriol.*, 152(3): 944, 1984.