



钩端螺旋体在自然疫源地变异的初步观察

浙江人民卫生实验院卫生学微生物研究所
(杭州)

钩端螺旋体(简称钩体)在实验条件下的变异已屡见不鲜^[1,2],但在自然条件下发生变异的现象却极为罕见。近年来我们在浙东非流行区的自然疫源地中,连续四年(1972—1975)定时定点进行动态观察,发现了一些钩体变异的现象。

四年来我们将观察点固定在一个生产大队约1平方公里的范围内,每年7—9月间用鼠夹捕鼠,取鼠肾组织进行培养及印片镜检。对镜检阳性者接种敏感动物。

观察结果

(一) 培养特性的变异

四年来共检鼠319只,野鼠的种群并无改变,均以黑线姬鼠为优势种(占90%以上),其捕获机会每年相似。用常规法及改进法难以分离的钩体菌株减少以至消失(但肾组织印片镜检可见),容易分离的钩体菌株出现,直至完全替代难以分离的菌株(表1)。变化极为显著($\chi^2=35.99, P<0.01$)说明这种现象并非检菌抽样上的机误,而是钩体在培养特性上的突变所致。易分离钩体经鉴定均属黄疸出血群沃尔登血清型菌株。

表1 四年来钩体培养特性的动态变化*

年 份	鼠肾印片 阳性数	难分离 钩体数	易分离 钩体数
1972	16	16	0
1973	18	8	10
1975	20	0	20

* 1972—1974年四年动态观察,共进行三次捕鼠检菌,1974年因故未能进行。

培养困难菌株分离过程:鼠肾组织印片用暗视野显微镜直接观察,可见菌体两端有钩,运动活泼的典型钩体。每高倍视野最多可见10—20条。取米粒样大小之肾组织平行接种4支卡托夫培养

基,28℃培养,每周检查一次,共观察一个月(部分为三个月)。将24份印片镜检阳性的鼠肾标本接种于96支培养管,在观察过程中,95.9%均未见有钩体。仅有少数(4.1%)在第一周可见0—1条钩体/400×,形态动力均可,立即传种第二代。第10天继续观察时,见钩体已部份溶解,运动迟缓。到一个月左右钩体即行消失。检查第二代培养时,均未发现钩体。另外将24份10%的鼠肾悬液,每份2毫升分别接种于2只金地鼠或幼龄豚鼠腹腔。于第4—5天抽血培养,均为阴性,至第18天全部存活,处死后取肾组织印片镜检部份可见钩体,将其再作培养分离和动物传代,最多传到第五代,结果如前。为此,又与有关单位分别作了各项分离措施的改进,仍无效果(见表2)。

表2 分离措施改进的内容

措 施	内 容
培 养 基	1. 加入多种氨基酸及生长刺激素。 2. 改变动物血清的种类及剂量。
野 育 条 件	3. 改变温度。 4. 高压氧环境。 5. 厌氧环境。
动 物 接 种	6. 用两种射线及考的松以增加动物敏感性。 7. 豚鼠—小白鼠交替试验 ^[3] 。

(二) 致病力的变异

四年来随着培养困难菌株被沃尔登型菌株的完全替代,自然疫源地中野鼠所带钩体的致病力变化也极为显著(表3)。

取印片镜检阳性的10%鼠肾悬液2毫升分别注入2只敏感动物之腹腔。结果60只接种含沃尔登型钩体鼠肾悬液之敏感动物,其中58只于5—11天死亡。剖检均见肺大出血等典型病变,在其肾

本文于1977年2月15日收到。

表 3 四年来钩体致病力的变化

年 份	鼠肾印片 阳性数	接种动物 死亡数*	动物死亡 率(%)
1972	16	0/32	0
1973	18	20/36	55.55
1975	20	38/40	95.00

* 分母为接种动物数,分子为动物死亡数。

组织内可检出钩体。而注入含有培养困难菌株的鼠肾悬液的 48 只敏感动物,直至 18—25 天后,仍然全部存活,处死剖检在肺脏见有少量出血点,多呈针尖样大小,取其肾组织印片镜检仅部份可见到钩体,其中 12 只动物按上述方法续传 3—5 代,仍未见有病死情况。

(三) 培养困难菌株与当地黄疸出血群沃尔登型菌株间免疫学的关系

试验组取幼龄豚鼠 4 只,逐只腹腔注入 2 毫升含有培养困难菌株的 10% 鼠肾悬液。第 18 天后取当地分得沃尔登型钩体 9 天培养物之稀释液 0.5 毫升(均含钩体 50 万条)进行腹腔攻击,每日观察,死亡时剖检。

对照组取幼龄豚鼠 4 只,与试验组同时用同量之沃尔登型钩体进行腹腔攻击。

结果,在攻击后 6—11 天,对照组豚鼠 4 只全部死亡,肺部病变典型,证实系钩体病所致。试验组 4 只豚鼠一直观察到 25 天仍然全部存活。(P=0.014),经处死剖检,发现肺组织局部有陈旧性出血斑。以上事实提示培养困难菌株对沃尔登型钩体的攻击具有保护作用。

(四) 培养困难菌株与当地沃尔登型菌株抗原之间的关系

1973 年我们曾以含有培养困难菌株鼠肾悬液接种 13 只动物。第 18 天抽取心血,用 13 群 14 型标准菌株及当地沃尔登型菌株做血清学凝溶试验。大部份动物抗体滴度均在 1:5 以下,但在个别动物血清中发现对沃尔登型钩体(地方株)的滴度为 1:20⁺⁺。此种迹象提示培养困难钩体的个别菌株与当地沃尔登型钩体在抗原结构上有类似之处。

(五) 培养困难菌株与当地沃尔登型菌株在致病性方面的关系

1972—1973 年用 24 只含有培养困难钩体的鼠肾悬液攻击敏感动物,其致病作用均不明显。而 1975 年 19 只含有当地沃尔登型钩体鼠肾之悬液对敏感动物极大部份有明显的致病作用。但其中 75047 号黑线姬鼠,肾组织印片可见 3—5 条钩

体/400×。(已被分离培养证实为沃尔登型钩体)用 10% 肾悬液接种金地鼠进行 4 次传代,在 10 只动物中仅在第 3 代的 3 只动物中病死 1 只,其它动物剖检后仅见有轻微的肺部病变。而肾组织印片均为阳性。表明当地沃尔登型个别菌株的致病性与培养困难菌株较为相似。

讨 论

四年来的动态观察表明在约 1 平方公里面积的自然疫源地内,优势鼠种并无变化,但钩体菌株变化很大,培养困难钩体迅速被沃尔登型钩体完全替代,究其原因,不外乎有下列三种可能性。

(一) 沃尔登型钩体输入的可能性

作为当地传播钩体的主要动力因子——黑线姬鼠,其最远活动距离为 50.8 ± 2.4 公尺^[4]。而四年来当地生态条件并无显著改变,据我们调查,沃尔登型钩体自然疫源地距观察点约 10 公里。故应可排除黑线姬鼠将沃尔登型钩体长途移入观察点的可能。

(二) 观察点中捕鼠检菌抽样机误的可能性

1972—1975 年进行了三次捕鼠检菌,四年来野鼠中钩体的培养特性之变化具有统计学极显著之差异($\chi^2 = 35.99, P < 0.01$),故也应可排除捕鼠检菌抽样机误的可能。

(三) 培养困难钩体发生变异的可能性

排除了以上两种可能性,现在剩下唯一的可能就是培养困难钩体发生变异。对培养困难菌株与当地沃尔登型菌株在抗原性、免疫学及致病性三方面进行比较的结果可发现它们之间存在着一定程度的内在联系。如 1973 年培养困难钩体个别菌株的抗原具有向沃尔登型发生变异的趋向。培养困难菌株与当地沃尔登型菌株免疫学性状的类似性。1975 年分离的沃尔登型个别菌株的毒力较弱的事实,显示了以往培养困难钩体那种弱毒性的痕迹。

上述种种迹象表明培养困难菌株被沃尔登型钩体替代的过程,反映了自然条件下钩体变异的现象。

据报道钩体变异的机制可能由于钩体遗传物质发生突变所致。许多事实证明由于宿主的生物学原因可形成钩体的新种^[5],且认为钩体的变异极大部份只能在血清群的范围内进行^[1]。我们观察到培养困难菌株与沃尔登型菌株间免疫学上的关连及在抗原性和致病性方面的某些内在联系,

说明培养困难菌株可能是黄直出血群内的型间变异株。由于其致病力的变异迅速,提示钩体病的非流行区可能变成流行区。因而要引起今后防治工作上的充分重视。

参 考 资 料

[1] Sveshnikova, N. P. et al.: *J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol.*, **16**:346—351, 1972。

[2] 梁川良、高岛郁夫: 日本细菌学杂志, **29** (4): 721—722, 1974。

[3] Kobayoshi, Y. et al.: *The Amer. J. Trop. Med. and Hyg.*, **21**:3 (342—344), 1972。

[4] 夏武平、龙志: 湖北长阳黑线姬鼠种群与巢区的一些生态资料, 科学出版社, 1965。

[5] Pike, R. et al.: *J. Immunol.*, **18**:172, 1958。