

一种新的人兽共患传染病——狐阴道 加德纳氏菌病的研究

V. 狐阴道加德纳氏菌菌株的血清分型研究*

闫新华 严忠诚 闫喜军 栾凤英 王长凤

(中国农业科学院特产研究所 吉林 132109)

摘 要 将我国 6 个省(区)、13 个主要狐场分离的 145 株狐阴道加德纳氏菌,进行抗原性、免疫原性测定,从每场分离菌中选出 1~3 个优良株进行血清型研究。凝集素交叉吸收试验证实,选出的 26 株菌可划分为 3 个血清型,以此 3 个血清型代表株制备因子血清,余下 119 株菌中,108 株在所划分的 3 个血清型内,11 株未能定型。在 3 个血清型中,Ⅰ型菌株数占定型菌数的 79.1%,因而确定,Ⅰ型菌是国内狐场狐阴道加德纳氏菌主要流行型。试验还明确了从貉分离的 5 株、水貂分离的 4 株、犬分离的 2 株阴道加德纳氏菌也属于血清Ⅰ型。将 3 个血清型代表菌株制成超声抗原,经免疫琼脂扩散试验证实,各型抗原与同型或异型免疫血清均可形成一条明显的融合沉淀线,表明各型菌间有共同抗原成分。同型菌免疫琼脂扩散试验表明,各株菌形成的沉淀线完全融合,从而证实了血清分型的可靠性。

关键词 狐,阴道加德纳氏菌,血清分型

阴道加德纳氏菌对狐的感染始见于 1987 年。此后,相继有感染人、貉、水貂及犬的报道^[1~3]。为研制有效的诊断液和疫苗,对分离株进行了血清分型,选用有流行病学意义、并具有优良抗原性和免疫原性的菌株制备诊断液和疫苗,以应用于对该病的预防。

人感染阴道加德纳氏菌,在本世纪 50 年代即有报道^[4],目前尚未建立起标准的血清分型系统。其原因主要是早期只侧重于对该菌的分类地位研究,试图从血清学关系找到与其相似菌属的相关性,如 Mary 等^[5]对分离的 14 株阴道加德纳氏菌与类白喉杆菌、乳酸杆菌及棒状杆菌属的成员用免疫扩散技术证实,抗原间无相关性,同时也证实,其 14 株菌与标准株之间至少有一个共同的抗原决定簇。Ison 等^[6]利用仅与自身抗原反应的 9 株阴道加德纳氏菌抗血清,对分离于临床的 91 株阴道加德纳氏菌进行试验分型。结果证实,79 株(占 87%)菌的抗原与上述血清有关,初步确定了 20 个血清型。Ison 的试验与 Mary 的试验结果截然不同,说明从人分离的阴道加德纳氏菌在血清学关系上是较复杂的。Donna 等^[7]的试验也证实了这一点,他通过血清学交叉试验证实,10 株阴道加德纳氏菌中有 8 株是同型,两株不是同型。因此,探讨狐阴道加德纳氏菌血清分型方法,确定流行株的血清型关系,对有效地控制该病流行,在理论和实践上都具有重要意义。

本文于 1995 年 5 月 17 日收到。

* 本课题为农业部“八五”拨经费专题。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株: 共 145 株, 分离自我国 6 个省(区) 13 个主要狐场流产胎儿及感染狐阴道。

1.1.2 培养基: 胰蛋白胨(oxoid, England) 25.0g, 葡萄糖 10.0g, 氯化钠 5.0g, 酵母粉 3.0g, 吐温 80 0.2ml, 加蒸馏水至 1000ml, pH 调至 7.6, 分装, 115.2℃ 30min 高压蒸气灭菌。

1.1.3 动物: 大耳白兔, 体重 2~2.5kg, 购自吉林省生物制品厂。

1.1.4 微型混合器: 上海沪西仪器厂制造。

1.2 方法

1.2.1 代表菌株的筛选: 将 145 株菌按各狐场分离菌株的数量多少分成 30 个组, 每组 3~6 株菌。每株菌用胰肠汤增菌培养后, 80℃ 水浴灭活 30min, 离心, 用灭菌生理盐水反复洗两次, 最后将每株菌浓度比浊成 30 亿 / ml, 并按组别将各株菌等量混合。每组混合菌免疫两只家兔, 静脉递增注射, 每次间隔 4d, 剂量分别为 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5ml。最后一次注射 5d 后心脏采血, 分离血清。以每株菌的抗原与其本组的抗血清作凝集试验。从各场分离菌中选出凝集效价较高的 1~3 个代表株。每个代表株分别按上述方法免疫两只家兔, 制备单个菌株的免疫血清, 最后一次免疫 5d 后检测血清抗体, 当血清凝集效价达 1:512 出现“++”以上凝集时采血, 分离血清。

1.2.2 血清定型方法: 参照文献[8]介绍的方法并加以改进, 即采用凝集素交叉吸收试验方法, 用每两株平排的抗原和其免疫血清交互吸收血清中抗体, 然后计算残留效价。公式为: 残留效价 = 吸收后效价 / 吸收前效价 × 100%。如两份血清对本菌的残留效价小于 10% 为同型, 大于 10% 为不同型, 如一份血清对本菌的残留效价大于 10%, 而另一份小于 10% 称为亚型。吸收每株菌的浓缩抗原与血清之比为 8:1, 分 3 次吸收, 每次 37℃ 1.5h, 一次作用 30min 后用微量混合器振荡一次。

1.2.3 因子血清的制备: 从三个血清型中各选出一个代表株, 以每两株菌的浓缩抗原对另一株菌制备的抗血清反复多次吸收, 直至将交叉抗原部分全部吸收为止, 最后所得血清即为“因子”血清。

1.2.4 可溶性抗原的制备: 选取用凝集素吸收试验定型的各血清型的部分菌株, 增菌培养后, 反复洗菌 3 次, 最后一次离心后, 用灭菌生理盐水稀释菌块后, 用 JY88-II 型超声波细胞粉碎机破碎 45min, 8000r/min 离心 30min, 上清液经浓缩后, 即为琼脂扩散抗原。

1.2.5 免疫琼脂扩散试验: 以 pH8.6 的巴比妥钠-巴比妥缓冲液配制 1.5% 的琼脂, 于 10 × 9cm 的干净玻板上倾注 3mm 厚的琼脂, 冷却、打孔、加样, 于 37℃ 温盒中扩散 72h 观察记录结果。

2 结果

2.1 145 株菌筛选结果

30 组混合菌免疫家兔后, 经血清抗体滴度测试和比较, 从 13 个狐场分离株中选出 26 株抗原性和免疫原性优良菌株(表 1)。

表 1 筛选出的 26 株菌的来源

Table 1 The source of selected 26 strains

菌株	分离地点
Strains	The place of isolate
GVF44	吉林省敦化市林业局养殖场
GVF72	Dnuhua city forestry bureau culture farm, Jinlin province
GVF130	
GVF40	吉林省吉林市养殖场 Jilin city culture farm, Jilin province
GVF458	吉林省长春市养殖场 Changchun city culture farm, Jilin province
GVF52	山东省日照市种貂场
GVF26	Rizhao city mink breeding farm, Shandong province
GVF129	山东省荣城市石岛镇西岚村养殖场
GVF226	Rongcheng city, Shidao town, Xilan village culture farm, Shandong province
GVF294	辽宁省金州水貂场
GVF24	Jinzhou mink culture farm, Liaoning province
GVF232	辽宁省沈阳市兴农养殖场
	Shenyang city, Xingnong culture farm Liaoning province
GVF14	黑龙江省集贤县野生动物饲养场
GVF11	Jixian country wild animal culture farm, Heilongjiang province
GVF8	黑龙江省海林县横道河子野生动物饲养场
GVF43	Hailin country, Hengdaohezi wild animal culture farm, Heilongjiang province
GVF112	河北省怀安县珍稀动物养殖场
GVF28	Huaian country, rare animal culture farm, Hebei province
GVF264	
GVF218	宁夏长庆油田养殖场
GVF236	Changqing oil field culture farm, Ningxia
GVF214	宁夏雪龙公司养殖场
GVF406	Xuelong corporation culture farm, Ningxia
GVF107	黑龙江省储备局 525 库养殖场
GVF136	Reserve bureau, 525 depot culture farm, Heilongjiang province
GVF402	

2.2 26 个代表株单个菌株免疫血清的制备

筛选出的 26 株代表菌分别免疫家兔后 21~30d, 经血清抗体测定, 其凝集价均在 1:512“++”以上, 即认为选出的菌株具备良好的抗原性和免疫原性。

2.3 血清定型结果

通过每两株菌间的凝集素交叉吸收试验, 根据其残留效价计算结果, 将此 26 株菌划分为 3 个血清型, 分别记作 I 型、II 型及 III 型。26 株定型菌中 I 型占 16 株; II 型占 7 株;

III型占3株(表2)。

表2 26株代表菌血清定型结果

Table 2 Definite serotype of the 26 representative strains

血清型别 Serotype		可定型的菌株 Typable strains							
I	GVF	44	72	130	40	52	26	107	214
		236	14	226	24	294	28	112	11
II	GVF	458	129	8	264	406	232	218	
III	GVF	402	136	43					

凝集素交叉吸收试验结果见表3和表4。

表3 同一血清型吸收结果

Table 3 Serum absorption results for homologous serotype of micro-organisms

抗原 Antigens	血清 Sera			
	S-44		S-52	
	未吸收(对照) Before absorption (control)	GVF52 吸收 Absorption with GVF52	未吸收(对照) Before absorption (control)	GVF44 吸收 Absorption with GVF44
GVF44	1 : 1024	1 : 16	1 : 512	1 : 8
GVF52	1 : 512	1 : 8	1 : 512	1 : 8

根据表3结果, S-44血清残留效价为 $16 / 1024 \times 100\%$ 小于10%; S-52血清残留效价为 $8 / 512 \times 100\%$ 小于10%。据此, GVF44与GVF52为同一血清型。

表4 不同血清型吸收结果

Table 4 Serum absorption results for different serotype micro-organisms

抗原 Antigens	血清 Sera			
	S-44		S-458	
	未吸收(对照) Before absorption (control)	GVF458 吸收 Absorption with GVF458	未吸收(对照) Before absorption (control)	GVF44 吸收 Absorption with GVF44
GVF44	1 : 1024	1 : 128	1 : 256	1 : 8
GVF458	1 : 512	1 : 16	1 : 512	1 : 64

根据表4结果, S-44血清残留效价为 $128 / 1024 \times 100\%$ 大于10%; S-458血清残留效价为 $64 / 512 \times 100\%$ 大于10%。据此, GVF44与GVF458为不同血清型。

2.4 单因子血清的制备及对余下的119株菌的定型结果

从确定的3个血清型中, 选出GVF44、GVF458、GVF402为各型代表株免疫血清, 经反复交互吸收后, 按仅与自身抗原起反应, 不与另两型抗原反应为血清吸收合格, 制备

3 个血清型的单因子血清。将未定型的 119 个菌株抗原分别与各型因子血清进行凝集试验,结果,108 株可定型(其中 I 型 90 株;II 型 11 株;III 型 7 株),11 株菌为未定型菌。

2.5 分离于貉、水貂及犬的阴道加德纳氏菌血清定型结果

以 3 个血清型的因子血清对从貉分离的 5 株、水貂 4 株和犬 2 株阴道加德纳氏菌抗原进行凝集试验,结果表明,5 株貉、4 株水貂及 2 株犬阴道加德纳氏菌与 I 型血清均呈阳性反应,而对 II、III 型血清均呈阴性反应,说明它们均属血清 I 型菌。

2.6 免疫琼脂扩散试验结果

从 3 个血清型选出 11 株菌制成超声抗原,进行交叉免疫琼脂扩散试验。结果表明,各型菌株除本身独特的沉淀线外,尚存在一条完全融合的清晰沉淀线,扩散后出现较早。为狐阴道加德纳氏菌共同抗原沉淀线,而同型菌间扩散后沉淀线完全融合。

3 讨论和结论

用凝集素交叉吸收试验,将分离自我国 6 个省(区)13 个主要狐场的 145 株狐阴道加德纳氏菌划分为 3 个血清型,其中 I 型菌株数为 106 株,占定型菌的 79.1%(106/134);II 型菌株数 18 株,占定型菌的 13.4%(18/134);III 型菌株数 10 株,占定型菌的 7.5%(10/134)。11 株未定型,占总数的 7.6%(11/145)。可见,血清 I 型是国内目前狐阴道加德纳氏菌流行的主要血清型。11 株未定型菌有待进一步研究确定。

对分离于貉 5 株、水貂 4 株及犬 2 株阴道加德纳氏菌血清定型表明,均属于血清 I 型。因此,该型菌在流行病学上在我国具有重要意义,不仅为首选型,且为诊断液和疫苗的研制提供了依据。

目前,对阴道加德纳氏菌尚未建立统一的血清分型方法,因此,确定一个可靠而实用的血清分型方法无论在理论和实践上都具有重要意义。凝集素交叉吸收试验虽然较繁琐,但其结果可靠性强,这可能是因为,菌体的表面抗原在免疫过程中起主要作用,抗原与免疫血清充分作用后,其表面有效抗原均将参与反应,而抗原与免疫血清经交互吸收后,其血清残留效价则能反映出两菌株间的同源关系,吸收能力越充分,二者同源关系越近,反之越远。本试验确定的 3 个血清型,通过对其可溶性抗原的免疫琼脂扩散试验进一步得到证实,用凝集素交叉吸收试验对狐阴道加德纳氏菌进行的血清分型是成功的,为新分离株血清型的确定奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 严忠诚,闫新华,栾凤英,等.微生物学报,1995,35(1):28~32.
- [2] 蔡妙英,卫 军,严忠诚,等.微生物学报,1995,35(1):33~37.
- [3] 严忠诚,闫新华,栾凤英,等.微生物学报,1995,35(3):209~215.
- [4] Leopold S. *United States Armed Forces Medical Journal*, 1953, 4: 263~266.
- [5] Mary F, John L. *Applied Microbiology*, 1974, 5: 469~474.
- [6] Ison C A, Harvey D G, Tanna A *et al. Genitourin Med*, 1987, 63: 196~201.
- [7] Donna L, Kotcher E. *J Gen Microbiol*, 1963, 33: 77~87.
- [8] Philip L (林飞卿等译). 免疫学与血清学.上海:上海科学技术出版社,1959.141~152.

A NEW ZOONOSIS—INVESTIGATION OF *GARDNERELLA VAGINALIS* DISEASE OF FOX

V. STUDIES SEROTYPE OF *GARDNERELLA VAGINALIS* IN FOX

Yan Xinhua Yan Zhongcheng Yan Xijun

Luan Fengying Wang Changfeng

(Speciality Institute of CAAS, Jilin 132109)

Abstract 145 strains *Gardnerella vaginalis* isolated in foxes were isolated from 13 main farms raising foxes in six provinces (regions), China, after antigenicity and immunogenicity of the strains were measured, 1~3 appropriate strains were selected from each farm raising foxes for serotype studies. Cross agglutinin absorption test confirmed that selected 26 strains *Gardnerella vaginalis* were divided into three serotypes and then the representing strains were used to produce typing serum. Among remaining 119 strains, 108 strains were typable with the typing sera, and 11 strains can't be set. Among three serotypes, serotype I made up 79.1% of the strains. It was shown that serotype I was the principal serotype of *Gardnerella vaginalis* of fox in China. The test also confirmed that 5 strains of *Gardnerella vaginalis* isolated from racoon dog, 4 strains *Gardnerella vaginalis* from mink and 2 strains *Gardnerella vaginalis* from canine also belonged to serotype I. Supersonic antigen was produced with three serotypes, representative strains. By agar immuno-diffusion test, it confirmed that the antigens of three serotypes formed a obvious blending precipitating line with the homologous or heterologous serotype antiserum. It indicated common antigen existed among all serotypes. The agar immuno-diffusion test results revealed that the precipitating line of the homologous serotype completely blended. It is our opinion that the method of serotyping is reliable.

Key words Fox, *Gardnerella vaginalis*, Serotyping