

从莱姆病患者血液分离出螺旋体

温玉欣 艾承绪 张永国 李德荣 徐在海

(军事医学科学院微生物流行病学研究所,北京)

邱贵城 李得友

(牡丹江林业管理局卫生防疫站,牡丹江)

史志学 赵建华 陈忠权

(黑龙江省海林林业局卫生防疫站,海林)

从黑龙江省海林县林区的 18 例神经系统损害的莱姆病患者血液中分离出 3 株螺旋体。这 3 株螺旋体在形态学和免疫学上与伯氏包柔氏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 极相似。所分离的螺旋体实验感染金黄地鼠出现发病症状并死亡,从其肝、脾、肾和脑组织可找到大量螺旋体。将 21 例神经系统损害的莱姆病患者血清或血浆,用间接荧光试验检测莱姆病 IgG 抗体, 8 例阳性,阳性率为 38%。因此认为所分离的螺旋体是莱姆病的病原体。

关键词 莱姆病;伯氏包柔氏螺旋体

莱姆 (Lyme) 病是近年才认识的一种新的蜱媒螺旋体病,临床上具有各种各样的症状和体征。早期的症状是皮肤损害(慢性游走性红斑),数周至数月后,一些病人可出现神经、心脏损害或关节炎。

本病是由新鉴定的一种螺旋体——伯氏包柔氏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 所引起,通过几种近缘的硬蜱传播。

我国以往未见莱姆病的报道。1985 年,我们首次在黑龙江省海林县林区发现疑似莱姆病病例,包括慢性游走性红斑、面神经麻痹和皮肤良性淋巴细胞增生病。这些病例都有蜱咬史。1986 年进一步对临床、流行病学和病原学进行研究,证实了当地存在本病自然疫源地^[1]。本文首次报道,从莱姆病患者的血液中,分离出在血清学和形态学上与伯氏包柔氏螺旋体极相似的 3 株螺旋体。

材料和方法

(一) 标本来源

采集在黑龙江省海林县中医院治疗的面神经麻痹患者血浆 6 份,二十二林场慢性脑膜炎和面神经麻痹患者血浆 9 份,脑脊液 3 份,牡丹江市中心医院神经损害患者脑脊液 3 份。其中二十二林场患者有 3 例既采集了血浆,又采集了脑脊液,故实际采集标本的病例数为 18 例。这些患者均未经抗生素治疗。

(二) 血液标本的处理

从病人静脉以无菌操作采集血液 5ml 加 6% 灭菌柠檬酸钠 2ml,离心 1000r/min, 15 分钟,吸取血浆,再以 3000r/min 离心 20 分钟,去上清液,取底部沉渣作为接种材料。脑脊液不处理,直接接种培养液。

(三) 培养

用 Barbour^[2] 改良的 Kelly 培养液,即 BSK 培养液(此培养液系美国耶鲁大学医学院内科 Steere 教授惠赠)。取病人血浆或脑脊液 0.1—0.2 ml 接种于 8ml BSK 培养液或 3ml 培养液内,置于 33℃ 培养,每周取培养液在暗视野检查螺旋

本文于 1987 年 4 月 30 日收到。

本工作得到海林县中医院、牡丹江林管局中心医院神经科及海林县卫生防疫站大力支持,在此一并致谢。

体。每2—3周盲传一次。为防止污染,每管培养液加8μg/ml卡那霉素。

(四) 菌株的鉴定

将所分离的菌株和标准株 B-31 (奥地利维也纳大学卫生研究所 Stanek 教授惠赠) 接种于 BSK 培养液, 在 33℃ 培养 6—10 天后, 暗视野镜 (400×) 下见 3—5 条/视野螺旋体, 即离心 14500 r/min 30 分钟, 弃上清液, 用 0.01 mol/L pH 7.2 PBS 洗涤 3 次, 沉渣涂片, 晾干后冷丙酮固定, 放 -25℃ 保存。用标准血清 (Stanek 教授惠赠, 滴度 1:2048)、分离出螺旋体的患者血清、梅毒患者血清 (南京皮肤病研究所提供) 和正常人血清倍比稀释, 作交叉免疫荧光试验, 以鉴定菌株。另外, 对分离的菌株作电镜检查, 观察超微结构。

(五) 实验动物感染

用 BSK 培养液从患者血液分离的螺旋体, 经腹腔接种于断乳金黄地鼠, 每只鼠接种 0.2ml 培养液 (暗视野镜下 3—5 条 (400×)/视野, 接种后 7、14、21 和 28 天活杀或发病时解剖, 取肝、脾、肾及脑组织涂片, 晾干后冷丙酮固定, 以间接荧光和免疫酶方法染色, 在荧光显微镜和光学显微镜下检查螺旋体。

(六) 血清学试验

按 Wilkinson 的方法^[3], 用间接荧光试验检查病人的莱姆病抗体。采集 21 份神经系统损害的患者血清或血浆, 放低温冰箱保存 (-25℃) 待检。将 *B. burgdorferi* B-31 株接种于 BSK 培养液, 如上述制备抗原方法。用异氰酸荧光黄 (FITC) 标记羊抗人 IgG 作间接荧光试验。病人血浆或血清倍比稀释, 阳性标准为 1:128。

结 果

18 例神经系统损害患者的血浆和脑脊液 21 份, 分离出螺旋体 3 株, 其中 2 株系从面神经麻痹患者血液中分离, 另一株系从慢性脑膜炎患者血液分离所得。1 例患者血浆接种 BSK 培养液第一代即在暗视野找到螺旋体, 但数量很少, 活动性差, 经连续传代, 螺旋体数逐渐增多。另 2 例患者血浆, 接种培养液, 初代找不到螺旋

体, 经盲传至 4 代才找到了螺旋体。用标准抗原和血清鉴定菌株结果显示它与 *B. burgdorferi* B-31 在血清学上非常相似 (表 1)。梅毒患者血清有低滴度交叉反应 (1:32), 正常人血清 <1:8。

表 1 莱姆病患者血液分离出的螺旋体的鉴定*

Table 1 Identification of spirochetes isolated from the blood of patients with Lyme disease

血 清 Serum	螺旋体 Spirochetes		
	B-31	HL-86002	HL-86003
标准 Reference	1:1024	1:512	1:512
莱姆病患者 Lyme disease	1:512	1:1024	1:1024
梅毒患者 Syphilis	1:32	1:32	1:16
正常人 Normal human	<1:8	<1:8	<1:8

* 间接免疫荧光抗体法
Indirect fluorescent antibody technique

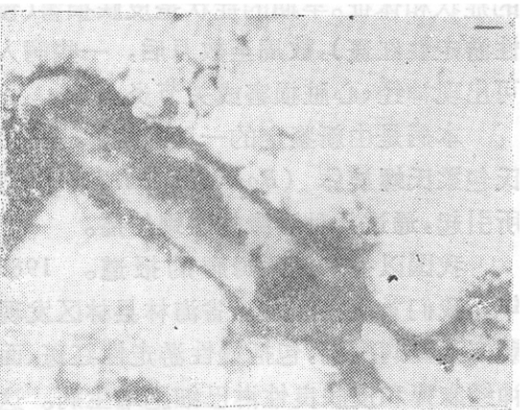


图 1 从慢性脑膜炎患者血液分离出的 HL-86003 株螺旋体在电镜下的形态 (阴性染色, 标尺=100nm)
Fig. 1 Electron photomicrograph of spirochete (HL-86003) isolated from the blood of patient with chronic meningitis

菌株 (HL-86003) 负染色, 电镜下观察, 在形态上与标准株 (B-31) 相似 (图 1)。纯培养形态如图 2。

菌株 (HL-86002, HL-86003) 接种

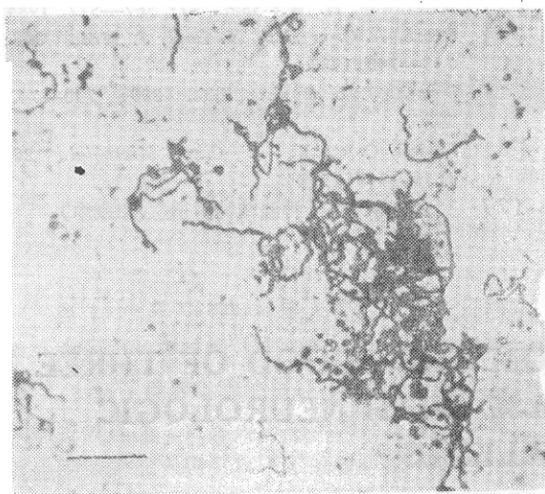


图2 BSK 培养基生长的 HL-86002 株螺旋体
(免疫酶染色, 标尺=10 μ m)

Fig. 2 Spirochetes (HL-86002) in BSK
medium



图3 金黄地鼠感染 HL-86003 株螺旋体
肝脏切片(标尺=11 μ m)

Fig. 3 Spirochetes in the section of liver
of gold hamster infected with strain HL-
86003

金黄地鼠感染后第4—5天, 动物不活泼, 耸毛, 第6—7天死亡。用死亡动物的肝、脾和肾涂片, 间接荧光抗体染色, 找到了大量的螺旋体, 用免疫酶染色也同样检测到大量的螺旋体(图3)。受感染动物发病与

死亡还不规律, 可能与传代的次数不够有关。关于感染动物病理变化正在观察, 将另文报道。

21 例神经系统损害患者的血清和血浆, 用间接荧光试验检测莱姆病抗体, 阳性 8 份, 阳性率 38% 最高抗体滴度达 1:2048。

讨 论

莱姆病是由蜱媒螺旋体所引起的多个系统的疾患。从本病患者血液分离出螺旋体, 近年虽有一些报道, 但分离成功的机率甚低。Steere 等^[4]将 80 份本病患者血液和血浆标本, 接种 BSK 培养液仅分离出一株螺旋体。Benach 等^[3]从 36 例本病患者血液中也仅分离出 2 株螺旋体。这表明从患者分离螺旋体是相当困难的。我们把 15 份神经系统损害的莱姆病患者血浆, 接种于 BSK 培养液, 成功地分离出 3 株螺旋体, 分离率较国外报告的要高。这可能是我们采集的标本均为神经系统损害的莱姆病患者的血液, 也许在此期螺旋体已从皮肤病灶进入血液引起螺旋体血症, 因而螺旋体数量较多, 分离成功的机会也多。

所分离的螺旋体经用抗莱姆病标准血清鉴定, 在免疫学上与伯氏包柔氏螺旋体相似。但是, 实验感染金黄地鼠可引起显性感染。而 Russell 等^[6]报道金黄地鼠感染伯氏包柔氏螺旋体, 呈隐性感染过程, 从其肝、脾、肾、眼、睾丸及脑组织接种 BSK 培养液可分离出螺旋体。此种情况可能是: ①也许我国分离的螺旋体毒力高; ②我国分离的菌株在人工培养液传代次数少, 保持其原有的毒力。

从临床上我们所观察的面神经麻痹患者的恢复率较国外为低^[7]。

上述结果表明, 从神经系统损害患者血液中分离的螺旋体是我国莱姆病的病原

体。

参 考 文 献

- [1] 艾承绪等: 军事医学科学院院刊, 11: 37—42, 1987。
[2] Barbour, A. C.: *Yale J. Biol. Med.*, 57: 521—525, 1984。

- [3] Wilkinwon, H. W.: *ibid.*, 57: 567—572, 1984。
[4] Steere, A. C. et al.: *N. Engl. J. Med.*, 308: 733—740, 1983。
[5] Benach, J. L. et al.: *ibid.*, 308: 740—742, 1983。
[6] Russell, C. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, 20: 1099—1101, 1984。
[7] 艾承绪等: 中华神经精神科杂志(印刷中)。

SPIROCHETES ISOLATED FROM THE BLOOD OF THREE CASES OF LYME DISEASE WITH NEUROLOGIC ABNORMALITIES

Wen Yuxin Ai Chengxu Zhang Yongguo Li Derong Xu Zaihai

(*Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing*)

Qiu Guicheng Li Deyou

(*Sanitary and Anti-Epidemic Station of Mudanjiang Forest Administration, Mudanjiang*)

Shi Zhixue Zhao Jianhua Cheng Zhongquan

(*Sanitary and Anti-Epidemic Station of Hailin Forest Bureau, Heilongjiang Province, Hailin*)

Three strains of spirochete were isolated from the blood of eighteen patients with neurologic abnormalities of Lyme disease in Hailin forest district, Heilongjiang Province. These spirochetes were immunologically and morphologically closely related to *Borrelia burgdorferi*. The isolates caused the overt infection and death in gold hamsters in experimental infection. Numerous spirochetes were found in liver, spleen, kidney and brain

tissues of infected animals. Of twenty-one patients with neurologic abnormalities 38% had increased IgG antibody titer (1:128 to 1:1024) against the *B. burgdorferi*. It is concluded that the isolated spirochete is the etiological agent of Lyme disease with neurologic abnormalities.

Key words

Lyme disease; *Borrelia burgdorferi*