

全沟硬蜱体内伯氏疏螺旋体的分离及特征

柴光军* 张习坦 孔惟惟 张启恩 曹军田

李豫川 吴晓明 张泮河 杜勇

(军事医学科学院微生物学流行病学研究所,北京)

本文报道从黑龙江省全沟硬蜱分离的伯氏疏螺旋体 H7 株的特征。H7 株细胞长 9.8—26.5 μm , 宽 0.13—0.35 μm , 有 1—11 个波, 波长 1.2—3.0 μm , 波幅 0.59—1.13 μm , 两端尖锐, 每端有 7 根鞭毛, 菌体左旋。体外培养最适温度为 31 $^{\circ}\text{C}$, 具有 21k、32k、34k 主要结构和抗原蛋白, 能与新疆及黑龙江莱姆病人血清反应。这些结果表明, 该菌株具备伯氏疏螺旋体的特征, 它是与其它地区或媒介分离株不同的“亚型”。

关键词 伯氏疏螺旋体; 分离

伯氏疏螺旋体 (*Borrelia burgdorferi*) 经蜱传播, 是莱姆病的病原体, 于 1982 年从美国达敏硬蜱 (*Ixodes dammini*) 第一次分离出^[1]。随后, 从莱姆病人的血液、皮肤以及一些动物宿主相继分离成功^[2,3]。我们于 1989 年 6 月从黑龙江省苇河林区采集的全沟硬蜱 (*I. persulcatus*) 体内分离出这种螺旋体, 并对其特征进行了分析, 现报道如下。

材料与方 法

(一) 蜱的采集与分离

在位于北纬 44 $^{\circ}57'$ 、东经 128 $^{\circ}22'$ 的黑龙江省苇河林区采集到 120 只全沟硬蜱和 20 只草原革蜱, 在暗视野显微镜下观察内脏螺旋体携带情况, 疑为阳性者则经酒精消毒后, 接种于 Bskii 培养基内, 31 $^{\circ}\text{C}$ 培养 1—2 周, 暗视野下观察螺旋体生长状况。

(二) 间接免疫荧光试验 (IFA)

采用从新疆和黑龙江疫区收集的 *B. burgdorferi* 抗体阳性人血清及美国达姆硬蜱分离株 B31 免疫的兔血清, 用 IFA 法^[4] 检查甲醇固定的螺旋体。

(三) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 和免疫印迹 (western blot)

将 31 $^{\circ}\text{C}$ 培养 5—7 天的螺旋体 12000g 离心 20 分钟, 用 1/15mol/L PBS 加 5mol/L MgCl_2 缓冲液洗涤 3 次, 悬浮于去离子水内, 使其最终蛋白含量为 1.25mg/ml。取 25 μl 悬液和等量样品缓冲液 (4% SDS、10% 甘油、10% 二巯基乙醇) 加入样品孔内。SDS-PAGE 和 western blot 按照 Towbin^[5] 和 Barbour^[6] 等人的方法进行。电泳条件为 10% 丙烯酰胺, 缓冲液 pH8.8。转移电泳条件为 192mmol/L 甘氨酸, 26mmol/L Tris 和 20% 甲醇, 200mA 恒流, 3 小时。用莱姆病人血清与 NC 膜上抗原反应, 洗涤后再用辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG (1:500 稀释) 与其反应, 洗涤后用二胺基联苯胺显色。

(四) 电镜观察

螺旋体培养至对数生长期 (约 3—5 天), 离心, 沉淀悬浮于 1/15mol/L PBS/ MgCl_2 内。(1) 将悬液滴于铜网上, 用 pH

本文于 1990 年 4 月 23 日收到。

* 现工作单位: 空军后勤部卫生防疫队。

6.5 的 1% 磷钨酸阴性染色; (2) 悬液加入 1% 温琼脂糖内, 戊二醛、锇酸固定, 环氧树脂包埋后, 切片用醋酸双氧铀和柠檬酸铅染色, H-600 透射电镜观察; (3) 将悬液涂于盖玻片上, 戊二醛及锇酸固定后丙酮脱水, 醋酸异戊脂置换, 干燥后喷金, S-450 扫描电镜观察。

结 果

(一) 分离结果

将 10 只疑为携带螺旋体的全沟硬蜱分别接种于 7ml Bskii 培养基。一周后两份样品内有大量螺旋体生长, 其余均为阴性。未发现草原革蜱携带螺旋体。本文描述其中一株 (H7) 的生物学特性。

(二) 培养特性

在 Bskii 培养基连续传代 10 次以上, H7 株生长稳定, 28—37℃ 均可大量生长, 最适生长温度为 31℃ (表 1)。培养液中含 10 μg/ml 的庆大霉素或卡那霉素, 以及 200—250 μg/ml 的 5-氟尿嘧啶, 其生长数量不变。但加入大量庆大霉素 (>20 μg/ml) 则生长受到抑制。

表 1 温度对 H7 株培养的影响

Table 1 Effect of temperature on the growth of strain H7

温度(°C) Temperature	接种量(×10 ⁷ /ml) Inoculating dose	接种后(×10 ⁸ /ml) After inoculating	
		5(d)	10(d)
28	0.1	2.0	2.3
31	0.1	3.7	5.1
34	0.1	3.0	4.4
37	0.1	1.9	2.1

(三) IFA 结果

以美国达敏硬蜱分离的 B31 株作为参考。B31 株及 H7 株与抗 B31 兔血清、莱姆病人血清的结果十分相似, 仅对两份病人血清的反应结果略有差异(表 2)。

(四) SDS-PAGE 和 western blot 结果

表 2 IFA 结果

Table 2 Indirect immunofluorescence results

血 清 Serum	菌株 Strain	
	B31	H7
兔抗 B31 Rabbit against B31	1:1024	1:1024
新疆病人 (XL5) Xinjiang patient	1:256	1:128
黑龙江病人 (HL3) Heilongjiang patient	1:128	1:256
正常人 Normal human	1:32	1:32

H7 株全细胞蛋白有 10 种 (图 1), 它们的分子量依次为 21k、27k、29k、32k、34k、40k、41k、60k、66k 和 105k 其中 21k、29k、32k、34k 和 41k 为主要蛋白。用新疆莱姆病人 (XL5) 血清与 H7 株全细胞抗原进行免疫印迹试验, 发现这一血清含有 27k、29k、34k、40k、41k 和 60k 几种主要成分的抗体, 而无 21k 和 32k 两种主要成分的抗体。

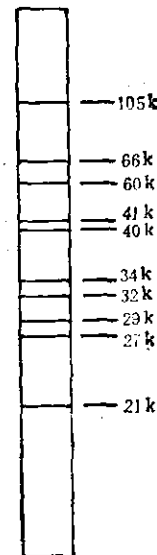


图 1 考马斯亮蓝染色的 H7 株全细胞蛋白 SDS-PAGE

Fig 1 SDS-PAGE of whole cell proteins of strain H7 stained with coomassie brilliant blue

表 3 H7 株的形态特征(单位: μm)

Table 3 Morphological characteristics of strain H7

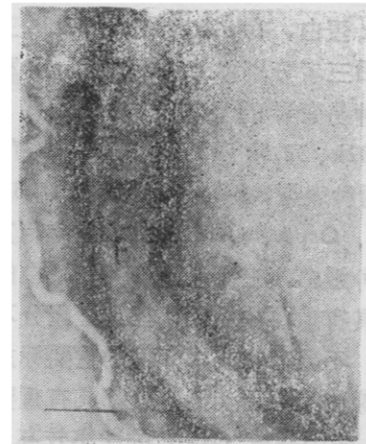
	测量数 n	均数 \bar{x}	范围 Range	标准差 SD
长 Length	12	15.40	10.0—26.5	5.61
宽 Width	16	0.19	0.13—0.35	0.06
波数 Wave number	10	5.1	1—11	2.5
波长 Wave length	16	2.35	1.2—3.0	0.43
波幅 Amplitude	15	0.84	0.59—1.13	0.19

(五) 超微结构

H7 株细胞平均长度为 $15.4\mu\text{m}$, 中间宽 $0.19\mu\text{m}$, 两端渐细, 末端尖锐, 有数个不规则的波, 通常为 4—6 个波, 以中间波最长, 靠近两端渐小, 中间波平均长 $2.35\mu\text{m}$, 波幅 $0.84\mu\text{m}$ 。在负染照片上, 外套为一层清晰光滑的轮廓线, 与原生质柱之间的界线分明。两末端鞭毛均为 7 根(图 2), 根据其插入点可以准确计数, 插入点介于外套与原生质柱之间, 第一和第七根鞭毛的插入点距顶端分别为 $0.41—0.50\mu\text{m}$ 和 $1.45\mu\text{m}$ 。在扫描照片上可以观察到左旋方向的螺旋(图 3), 未见右旋螺旋。在螺旋体纵横切面上, 细胞内部结构致密, 有均匀分布的较高密度的颗粒, 无空泡。观察到分裂状态的螺旋体(图 4), 原生质柱

图 3 H7 株的螺旋($\times 10000$)

Fig. 3 The spire of strain H7

图 4 分裂状态的 H7 株细胞 (F 示鞭毛, $\times 40000$)Fig. 4 A dividing cell of strain H7
(F denotes flagella)图 2 H7 株细胞尖锐的末端和鞭毛
(箭头示鞭毛插入点, $\times 35000$)Fig. 2 The pointed end of cell H7 and flagella
(arrowheads denote insertion points)

一分为二, 但外套仍然相连。在观察的数百条螺旋体中, 只有个别呈现分裂状态。

讨 论

莱姆病是一种呈全球分布的蜱传自然

疫源性疾病。在不同地区,该病的临床表现有一定差异,在欧洲主要为慢性游走性红斑^[10],在美国则以多发性关节炎为主^[2]。其传播媒介在欧美分别为达敏硬蜱和蓖子硬蜱 (*I. ricinus*)^[3],我国以全沟硬蜱为主^[7]。从不同媒介和宿主分离的伯氏疏螺旋体虽有种的共性,但有一定差异^[5]。不同地区分离株的差异可能是引起各地莱姆病临床特征不同的原因^[8,11]。

近两年,我国已报告从传染媒介和病人分离出在血清学上与伯氏疏螺旋体相关的螺旋体^[2],但对其特征未进行全面描述。由于有些螺旋体之间有共同抗原存在^[6],仅有血清学反应尚难证实伯氏疏螺旋体。本文首次比较全面地描述了全沟硬蜱分离株H7的特征,证实其完全符合伯氏疏螺旋体的特征。

在培养特性和血清学反应方面,H7株与其它地区分离株无明显差别,但在抗原与结构蛋白的组成上则有明显不同。H7株无31k蛋白,有32k、34k和21k三种蛋白,后三者分别称为OspA、OspB和pC,是三种易变异的蛋白。OspA有30.5k、31k、32k、32.5k四种表型,OspB有34k、35k两种表型,pC有21k、22k、23k三种表型。OspA、OspB和pC是有相互联系的三种蛋白,三者以及与其它蛋白的构成模式具有重要的地理特征,是区分不同地理株、不同宿主或媒介株的重要标志,对于追踪传染源、传播媒介都具有重要的意义^[8]。美国株有OspA的比率较高,但常无pC。欧洲株常无OspA,多有22k或23k pC。32k OspA、34k OspB、21k pC可能是我国全沟硬蜱分离株的特征。

H7株的超微结构与欧美两地分离株也不完全相同,但其具有二者的一些特征^[11,12]。与美国株相似之处为每端有7根鞭毛和一层轮廓线的外套,而欧洲株一般

为8根鞭毛。与欧洲株的长度和波长相似。H7株细胞的形态学特点是菌体中部宽度较窄,平均只有0.19 μm ,而其它分离株的平均宽度均在0.22 μm 以上。菌体螺旋的方向也是一重要的立体结构特征。Hayes等^[13]报道新分离的美洲达敏硬蜱株为左旋,与噬菌体相联系,但传代几次以后转为右旋,随之失去致病性。也有人认为,左旋为伯氏疏螺旋体的固有特征^[14]。H7株具有典型的左旋螺旋,且传代10次以上半年之久仍为左旋,并不转为右旋。故此可以认为左旋为我国全沟硬蜱分离株的固有特征。

根据生长特性、血清学、免疫学和形态学等特征,认为H7株是一株与其它地区株不同的“亚型”或“亚种”。Hovind-Hougen等^[11]把有8根鞭毛的瑞典病人株命名为*Borrelia ajzelius*或*B. burgdorferi ajzelius*变种。我们建议把这种细长的有7根鞭毛的全沟硬蜱分离株H7命名为*B. burgdorferi*全沟硬蜱变种。在进一步研究分析全沟硬蜱分离株的分类地位时,还应将其形态学、血清学和生物化学等特征与其对人或动物的致病作用结合起来考虑。

参 考 文 献

- [1] Burgdorfer, W. et al.: *Science*, 216: 1317-1319, 1982.
- [2] 温玉欣等: *微生物学报*, 28: 275-278, 1988.
- [3] Barbour, A. G. et al.: *Curr. Microbiol.*, 8: 123-126, 1983.
- [4] Stoenner, H. G. et al.: *J. Exp. Med.*, 156: 1297-1331, 1982.
- [5] Towbin, H. T. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 4350-4354, 1979.
- [6] Barbour, A. G. et al.: *J. Clin. Invest.*, 72: 504-512, 1983.
- [7] 艾承绪等: *军事医学科学院院刊*, 11: 37-42, 1987.
- [8] Barbour, A. G. et al.: *J. Infect. Dis.*, 152: 478-484, 1985.
- [9] Steere, A. C. et al.: *Arthritis Rheum.*, 29: 7-

- 17, 1977.
- [10] Afzelius, A.: *Acta Dermatovenereol.*, 2: 120—125, 1921.
- [11] Hovind-Hougen, K. et al.: *Zbl. Bakt. Hyg., A* 263: 103—111, 1986.
- [12] Hovind-Hougen, K. et al.: *Yale. J. Biol. Med.*, 57: 543—548, 1984.
- [13] Hayes, S. F. et al.: *J. Bacteriol.*, 154: 1436—1439, 1983.
- [14] Johnson, R. C. et al.: *Yale. J. Biol. Med.*, 57: 529—537, 1984.

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF *BORRELIA BURG-DORFERI* FROM *IXODES PERSULCATUS*

Chai Guangjun Zhang Xitan Kong Weiwei Zhang Qien Cao Juntian
Li Yuchuan Wu Xiaoming Zhang Banhe Dou Yong

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

We reported the detailed characteristics of Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*), strain H7, isolated from *Ixodes persulcatus* in Heilongjiang. Cells of strain H7 were 9.8—26.5 μm long and 0.13—0.35 μm wide. There were I—II waves with a wavelength of 1.2—3.0 μm and an amplitude of 0.59—1.13 μm . Direction of spires was left. Seven flagella were inserted subterminally at each end of the cell and ends were pointed. 31°C was the optimum cultural temperature in vitro. The major constitutional and an-

tigenic proteins were 21k, 32k and 34k proteins. H7 could react on the patient sera of Xinjiang and Heilongjiang with IFA and western blot. These findings demonstrated that strain H7 belonged to species *Borrelia burgdorferi*, but was a new "subtype" which differed from the strains isolated from other areas and vectors.

Key words

Borrelia burgdorferi; Isolation