

# 培养莱姆病螺旋体的一种新培养基

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所 张哲夫 张金声 朱桂凤 张知德

莱姆病是近年来被认识的一种自然疫源性疾病。本病最初由Steere于1975年在美国康涅狄格州的莱姆镇发现临床病例。1982年Burgdorfer首次从莱姆病疫区的硬蜱中分离出一种螺旋体，并证明该螺旋体为莱姆病的病原体。1983年Steere和Benach从病人的血液、皮肤和脑脊液分离出类似的螺旋体。他们用的培养基是改进的Kelly's和BSK培养基。这两种培养基营养丰富，成分复杂，而且重要成分必须从国外进口。为了在我国顺利开展对莱姆病的调查研究，根据我国情况，我们研制了一种新的培养基。

## 材料和方法

### 一、培养基：

1. BSK培养基，由美国CDC的Linnan博士惠赠。

2. 新培养基的成分及配制方法：辅羧基酶1.0毫克 脱氧腺苷10毫克 脱氧胞苷10毫克 脱氧鸟苷10毫克 辅酶I 7毫克 辅酶II 1毫克 脱氧胸腺核苷10毫克 尿苷三磷酸1毫克 199 9.8克 豚蛋白胨5克 胰蛋白胨1克 海培斯6克 葡萄糖3克 枸橼酸钠0.7克 丙酮酸钠0.8克 重碳酸钠2.2克 N-乙酰葡萄糖胺0.4克 氯化镁0.3克 牛血清白蛋白50克

将上述成分溶于1000毫升双蒸水中，用1N NaOH调整pH为7.6，加入200毫升7%明胶，然后再加入60~70毫升灭能兔血清。用孔径0.22 $\mu$ m的滤膜过滤，分装于带螺帽的试管中。在此培养基中加入每毫升含250微克5氟尿嘧啶即成为选择性培养基。

二、菌种：伯格多弗里疏螺旋体标准菌株B31，由美国CDC的Linnan博士惠赠。

三、硬蜱：在牡丹江林区黑牛背林场用动物诱捕法收集全沟硬蜱 (*Ixodes persulcatus*)，把蜱浸泡在异丙醇中，取出晾干后，分为2个1组，加入少量培养基将蜱碾碎制成悬液，取0.05毫升接种于含5氟尿嘧啶自制的新培养基中，放33 $^{\circ}$ C孵箱，每隔7天检查1次。

## 结果和讨论

一、新培养基和BSK培养基培养标准菌株B31的比较：将B31菌株于BSK培养基培养7天左右，用暗视

野40X接物镜检查，每视野20条，取0.1毫升分别接种于每管7毫升的BSK培养基和新培养基。每隔5天用暗视野40X接物镜检查1次，计算每视野平均条数以此比较两种培养基。在培养第5天检查时，两种培养基的菌数有差异，10天时，菌数基本相同(附表)。重复试验的结果类似。新培养基已经用于菌种的保存和传代。

附表 标准菌株 B31 在两种培养基上生长情况比较

培养时间			
第5天		第10天	
新培养基	BSK	新培养基	BSK
10 <sup>Δ</sup>	15	20	25
12	15	20	23
10	16	23	25

Δ 在暗视野40X接物镜下，每视野条数

二、用新培养基从硬蜱体内分离螺旋体：1987年6月从牡丹江林区黑牛背林场采集的34只全沟硬蜱，每2只为1组，制成悬液，接种于每毫升含250微克5氟尿嘧啶的新培养基中，放33 $^{\circ}$ C孵箱培养，每隔7天检查1次，在培养第21天时，发现第11组和第20组的接种管内有螺旋体生长。将生长的螺旋体接种到BSK培养基，同样可生长。在暗视野和相差显微镜下，这二株螺旋体的形态和运动等特征都与伯氏疏螺旋体B31株相同，用B31株的免疫血清做间接免疫荧光试验，证明这两个分离物与B31株有共同抗原。血清滴度分别达到1:1024。

一般情况下，致病性螺旋体的培养比较困难。钩端螺旋体是可以人工培养的，在含有兔血清的柯氏培养基中生长良好。1971年Kelly研制出一种培养基，可以使一部分回归热螺旋体人工培养。Barbour在研究从丹敏硬蜱分离莱姆病螺旋体时，在Kelly's培养基中加入含有氨基酸、维生素、核苷酸和其它生长因子的浓缩的组织培养液，称Kelly's营养培养基。在此基础上，又研制成BSK培养基。我们在研究莱姆病螺旋体的培养时，用199代替1066组织培养液，用国产牛血清白蛋白代替进口的牛血清白蛋白第5成分，再补充必要的核苷酸和辅酶，组成新培养基。可以使标准菌株B31生长，也可以用来从蜱和其它标本分离伯氏疏螺旋体。将有助于对我国莱姆病的调查研究。