

清除莱姆病螺旋体培养物中杂菌的方法研究

中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所* 万康林 张金声 张哲夫

提要 应用抗血清法、药物法、稀释法、微孔滤膜自动过滤法和动物接种法对从蜱分离的伴有较多杂菌的H₁₁和H₂₀莱姆病螺旋体培养物和从病人分离的伴有少量杂菌的R₀莱姆病螺旋体培养物进行了纯化。抗血清法对污染严重的培养物可除去大部分杂菌,达到初步纯化。初步纯化的莱姆病螺旋体培养物和伴有少量杂菌的莱姆病螺旋体培养物,用滤膜过滤法或药物法或稀释法或动物接种法均可达到纯化目的。但过滤法最简便、效果最好。

关键词 莱姆病螺旋体 污染 纯化

现场进行莱姆病调查,从蜱、动物和病人分离莱姆病螺旋体时,常会发生培养物污染问题,特别是从蜱分离时,更易污染。因而从莱姆病螺旋体培养物中清除杂菌的方法(即纯化方法)是莱姆病调查研究中需要解决的重要问题。我们利用3株分别从蜱和病人分离、伴有杂菌生长的莱姆病螺旋体培养物进行了纯化方法〔1~3〕的研究。

材料与方 法

一、材料:BSK培养基;从全沟硬蜱分离伴有较多杂菌的H₁₁和H₂₀莱姆病螺旋体培养物;从脑膜炎病人分离伴有少量杂菌的R₀莱姆病螺旋体培养物。

二、抗血清法:取H₁₁和H₂₀原培养物少许接种BSK固体培养基〔4〕,37℃培养48小时后刮下杂菌菌落,用pH7.2 0.01M PBS将菌液浓度调整为10¹¹/ml。超声波(MODEL UR-200P,日本,180W,30分钟)处理后,4000转/分离心沉淀10分钟,取上清即为杂菌抗原液。常规免疫新西兰家兔(本所动物室提供),用琼脂扩散法测兔血清效价达1:32以上,放血分离血清。56℃30分钟灭活。用抗血清与H₁₁和H₂₀原培养物等量混合,33℃作用2小时,4000转/分离心沉淀15分钟,取上清0.2ml接种于含10%抗血清的BSK培养基,33℃培养。

三、药物法:5-氟尿嘧啶250μg/ml,卡那霉素8μg/ml,增效磺胺200μg/ml,放线菌酮10μg/ml,分别加入BSK培养基中,取伴有杂菌生长的H₁₁和H₂₀培养物0.1ml分别接种于含上述药物的BSK培养基中,33℃培养。

四、稀释法:将含有杂菌的H₁₁和H₂₀培养物用BSK培养基以10倍法稀释,取10⁵、10⁶、10⁷等稀释度各0.1ml接种于BSK培养基,33℃培养。

五、过滤法:在塑料小滤器内装上0.3μm孔径微孔滤膜,用橡皮塞将滤器与培养管密封相连,高压灭菌后,在无菌条件下,滤入6~7ml BSK培养基于培养管中,再加入含杂菌的H₁₁和H₂₀培养物滤满,使滤器内滤膜上下培养液相连通。33℃培养5天后取下滤器检查。

六、动物接种法:用健康金黄地鼠(本所动物室提供),每只体重50g,雌雄皆可,每组5只,先用环磷酰胺300mg/kg皮下注射。48小时后,接种含有杂菌的H₂₀和R₀培养物。每只腹部皮下注射2ml。5天后发病接近死亡或第14~21天未发病的动物解剖,取肾、脾、肝等脏器之米粒大小块接种于BSK培养基,33℃培养。

结 果

一、抗血清法: H₁₁和H₂₀原培养物经加

抗血清处理后培养，第一代培养物在暗视野显微镜下（10×20）较难发现杂菌，莱姆病螺旋体生长良好。但在试管中传至第二代以后，又出现少量杂菌。这是由于抗血清中含有大量抗杂菌抗体，能有效地抑制、杀灭相应杂菌。但因有些杂菌生长极为缓慢或受其他杂菌抑制，使得收集的抗原中含这类杂菌的抗原量极少，以致抗血清中抗这类杂菌的抗体极少。因此难以完全除去杂菌达到纯化。但为应用其他方法进一步纯化打下了基础。

二、药物法：H₁₁和H₂₀原培养物分别接种于含上述药物的BSK培养基中培养后，杂菌大量减少，但不能达到纯化。在先用抗杂菌免疫血清处理后，再按5-氟尿嘧啶→增效磺胺→放线菌酮的顺序在含药BSK培养基中转种，传2代后获得H₁₁莱姆病螺旋体纯培养。

三、稀释法：只有经抗杂菌免疫血清处理后的H₁₁培养物稀释到10⁶时，获得了莱姆病螺旋体纯培养。

四、过滤法：含杂菌多的H₁₁和H₂₀原培养物经0.3μm孔径滤膜自动滤过，没有获得莱姆病螺旋体纯培养。而经抗血清处理后的H₁₁和H₂₀培养物滤过，比较容易获得纯培养。因为莱姆病螺旋体的直径为0.18~0.25 μm，具有活泼的前后、屈曲和旋转运动，有一定的穿透能力，可主动通过孔径0.3 μm的滤膜，但当培养物污染严重，过滤时，杂菌大量沉积，堵塞了滤膜孔，螺旋体也较难通过滤膜。

五、动物接种法：含杂菌少的R₀培养物接种的5只地鼠，有4只在第3天发病死亡，未做培养。1只在第10天发病，从肾培养物中获得R₀莱姆病螺旋体纯培养。用抗血清处理后的H₂₀培养物接种的5只地鼠，2只在第2天发病死亡，未做培养，1只在第5天发病，从肾培养物中获得H₂₀莱姆病螺旋体纯培养。余下2只在第14天解剖培养，未获得螺旋体。由于目前尚未发现对莱姆病螺旋体敏感的动物，此法具有一定的难度，对稍敏感的金黄地鼠和沙土鼠采用环磷酰胺可抑制免疫，提高敏感性和阳性

分离率，但又降低了动物的抗感染力，尤其杂菌多、毒力强时易致动物死亡。

讨 论

莱姆病是一种蝉传的自然疫源性传染病。在调查研究中，由于BSK培养基营养丰富，分离螺旋体时，容易受杂菌污染，尤其从蝉的中肠分离螺旋体时，受杂菌污染几乎不可避免。这给莱姆病调查研究工作带来很大困难。1984年Johnson^[5]曾在BSK培养基中加入卡那霉素和5-氟尿嘧啶后，对杂菌有抑制作用，但没有根本解决问题。在实践中加药物的培养物仍有较多的污染。经反复试验，我们采用抗杂菌免疫血清处理污染严重的培养物，可达到杀灭绝大部分杂菌的效果。上述抗菌药物具有较强的抗菌作用，可作为现场分离莱姆病螺旋体防止污染时常规加入BSK培养基中，但用于已污染的培养物纯化时，较难去除杂菌。动物接种法只能用于含杂菌少的莱姆病螺旋体培养物的纯化，但费时，把握不大。稀释法只能在杂菌较少、莱姆病螺旋体生长良好时才有作用。而利用莱姆病螺旋体直径小（0.18~0.25μm）、能自动穿过滤膜的特点设计的微孔滤膜自动过滤法，较好地解决了这一问题。在污染严重时，先用抗杂菌免疫血清处理，再用过滤法，几乎可使伴有杂菌的莱姆病螺旋体培养物全部达到纯化。

Study on the Elimination of Bacteria from the Cultures of Lyme Disease Spirochetes (*Borrelia burgdorferi*) Wan Kanglin, et al., Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine

Contaminated cultures of strains H₁₁, H₂₀ from ticks, and strain R₀ from patient were purified by antisera for bacteria, chemicals, filtration dilution and animal inoculation. Most of bacteria were eliminated after adding antisera into contaminated strains H₁₁, H₂₀.

The preliminarily decontaminated cultures of strains H₁₁, H₂₀ or those with a few bacteria such as strain R₉ could be completely purified by filtration, chemicals, dilution, or animal inoculation, but filtration is the simplest and the most effective purification method.

Key words Lyme disease spirochetes Contamination Purification

参 考 文 献

1. Johnson RC. The Biology of Parasitic Spirochetes. New York San Francisco London: Academic Press, 1976: 214~215.

2. Barbour AC. Isolation and Cultivation of Lyme Disease spirochetes. The Yale J of Biology and Medicine 1984; 57: 521.
3. 魏曦主编. 钩端螺旋体病学. 第1版. 北京: 人民卫生出版社, 1982: 186~188.
4. Kurtti TJ, et al. Colony Formation and Morphology in *Borrelia burgdorferi*. J of Clinical Microbiology 1987; 25: 2054.
5. Johnson SE, et al. Lyme Disease a Selective Medium for Isolation of the Suspected Etiological Agent, a Spirochete. J of Clinical Microbiology 1984; 19: 81.

(1990年6月23日收稿, 1990年11月27日修回)

89月

一起波茨坦沙门氏菌引起新生儿腹泻医院内爆发流行病学调查

湖南省湘潭市卫生防疫站* 言昌言 周正亮 杨桂文 王素秋

1989年9月22日~10月15日, 我市某市级医院婴儿室突然发生一起新生儿腹泻, 经流行病学调查和病原学检查证实, 系医院内交叉感染引起的波茨坦沙门氏菌感染爆发, 报道如下。

9月16日, 产妇田某平产一女婴, 22日晚11时许, 突然高热伴腹泻。尔后20余日, 所出生的婴儿全部发生腹泻, 共发病16例, 10月17日经采取严格的隔离消毒措施, 传播方被阻断。患儿症状、体征基本相似, 主要为腹泻, 每日数次至十数次, 呈黄绿色、粘液、水样便, 镜检有PC、WBC、RBC; 低热, 38℃左右; 个别病例出现高热、脱水、酸中毒等症状。病程多数在一周以内, 个别延至十余日, 一般抗生素疗效不显著, 经药敏试验后改用丁胺卡那霉素疗效显著。

对部分患儿作大便培养, 从9份标本中检出两株波茨坦沙门氏菌, 抗原式为6, 7: 1: e, n, Z15。对

9名患儿采恢复期血, 与本菌应答反应的结果全部为强阳性, 滴度高达1: 128。正常人血清学检测均为阴性。流行病学调查证实: 首例患儿之母田某临产前曾有腹泻史, 未治而愈; 血清学检查抗体滴度为1: 256。该婴儿室无严格的隔离消毒措施, 护理人员兼作换尿布和喂养工作, 换尿布后和喂养前不洗手, 且喂养时共用乳嘴和毛巾。

波茨坦沙门氏菌多见于鸡、鸭等动物, 而由该菌引起的新生儿腹泻却较少, 经病原学和血清学调查证实该菌为本次腹泻爆发的病原菌。产妇田某为本次流行的传染源。造成流行的原因则是该院婴儿室无严格的隔离消毒措施, 病原菌通过护理人员之手和乳嘴、毛巾等传播, 此种情况在医院婴儿室中较为普遍, 故应引起高度重视。

* 邮政编码 411100