

45株幽门螺旋菌的生物性状研究*

孔繁林 朱江

(云南省医学微生态研究中心, 玉溪 653100)

摘要 本文对胃镜活检标本分离的45株幽门螺旋菌进行涂片染色、细菌培养、生化反应、药敏试验等方面的研究。表明用 TTC-WCG 培养基作 *Hp* 的微需氧 35℃ 培养可加快细菌的生长; 触酶 (Catalase)、氧化酶 (Oxidase)、脲酶 (Urease) 和水解胆汁七叶苷 (Bile-aesculin) 四联检在筛选 *Hp* 上有重要意义, 配合染色特性、培养条件等可作为初步鉴定 *Hp* 常规使用。报告时间由原来的 7—10 天缩短为 96 小时。药敏琼脂作 *Hp* 的药敏试验效果良好。

关键词 幽门螺旋菌 *Helicobacter pylori* (*Hp*)

幽门螺旋菌 (*Helicobacter pylori*, *Hp*) 于 1982 年首次由 Warren 和 Marshall 所分离, 原命名幽门弯曲菌 (*Campylobacter pylori*), 现国际会议及《Lancet》等杂志开始启用 *Hp* 名称^[1]。近年来国内报道了许多有关 *Hp* 与胃肠道疾病关系的研究, 因而引起了广泛重视^[2-4]; 但有关 *Hp* 生物性状的研究和报道较少。现将我院 1990 年以来由胃活检标本中分离的 45 株 *Hp* 进行生理生化方面的研究结果

报告如下。

材料和方 法

(一) 菌种

45 株 *Hp* 全部来源于我院胃镜室活体组织标本。胃粘膜取出后立即进行细菌接种。鉴定标准按文献报导^[5,6]。

* 云南省医学微生态研究中心主任黄宜雄主任医师审阅, 谨此致谢。

(二) 培养方法

分离培养采用我院改良简易培养法。即置接种培养基于塑料袋后迅速排空袋中气体, 月口哈满肺泡气, 封口, 再参照化学产气法造成微需氧环境^[5], 置气袋于 35℃ 中孵育并逐日观察; 25 及 42℃ 培养, 采用烛缸法。每份标本同时接种三种培养基: 改良 Skirrow 平板按文献[5]加 6.5g/L NaCl; WCG 购于中国药品生物制品检定所; TTC-WCG 在 WCG 基础上加入 0.35g/L TTC (2,3,5-氯化三苯四氮唑)。标本接种后同时作涂片革兰氏染色, 油镜观察。

(三) 生化试验

对 43 株 *Hp* 测 42 项生化试验, 逐日观察到第 10 天无阳性反应弃去。

1. 触酶、氧化酶试验: 按常规方法进行。
2. H₂S 试验: 用醋酸铅试纸法(自制)和微量生化管(购于浙江省军区防疫检验所)同时进行。
3. 耐受试验: 在未加入抗菌液的改良 Skirrow 培养基中分别加入 1% 甘氨酸、0.075% TTC、3.5% NaCl、8% 葡萄糖和 0.1% 亚硒酸, 作成斜面, 35℃ 微需氧培养。40% 胆汁和 6.5% NaCl 肉汤由浙江省军区防疫检验所购得。

4. 脲酶试验: 自制尿素培养基和外购微量生化管(浙江省军区防疫检验所)同时进行。

5. 其他糖、醇类发酵试验和生化反应: 用微量生化管(外购同 4.)按使用说明进行。

(四) 抗生素敏感试验

采用 K-B 纸片扩散法。培养基选择不加抗菌液的改良 Skirrow 平板(自制)和药敏琼脂(杭州微生物试剂厂)。13 种药敏纸片购于杭州微生物试剂厂。以大肠埃希氏菌 ATCC₂₅₉₂₂、金黄色葡萄球菌 ATCC₂₅₉₂₃、铜绿色假单胞菌 ATCC₂₇₈₅₃ 行药敏试验的质量控制。结果判断抑菌环小于 10mm 为耐药^[6]。

结 果

(一) 菌体形态与染色特性

全部标本均为革兰氏阴性弯曲菌和(或)杆菌, 典型形态呈弧形、S 形或海鸥状, 与空肠弯曲菌极相似。培养后标本常可见菌体变大, 呈不规则杆状。鞭毛染色为一端丛毛菌, 一般 2—5 根。

(二) 菌落特征

一般 35℃ 培养有生长, 而 42 和 25℃ 培养无生长。不同培养基有不同生长结果(表 1)。其中以 TTC-WCG 生长较快, 多呈 2—7mm

表 1 *Hp* 在三种培养基上的效果比较*

特 征	WCG	TTC-WCG	改良 Skirrow
培养生长次数	26/47(55.3)	31/49(63.3)	25/49(51.0)
生长时间(d)	2—4(2.4)	1—3(1.7)	2—4(3.4)
单个菌落直径(mm)	1.5—6.0(3.5)	2—7(4.3)	0.8—2.0(1.5)

* 括号内表示百分率或平均值; 三组检出率比较 $X^2 = 1.61$, $P > 0.05$ 。

圆形扁平深红色不透明菌落。

(三) 生化反应

生化反应结果(表 2)说明, 触酶、氧化酶和胆汁七叶苷水解试验全部阳性, 大部份菌株产 DNA ase 和精氨酸水解酶, 都不形成赖氨酸、鸟氨酸、精氨酸脱羧酶和苯丙氨酸脱氨酶。本试验产生脲酶菌株占 92.1%, 对 TTC、甘氨酸、氯化钠、亚硒酸和葡萄糖的耐受情况与文献报道并不完全一致^[5]。都不产生吲哚, 甲基红和

V-P 试验阴性。少数菌株可利用枸橼酸盐和还原硝酸盐。对 14 种糖和醇的反应除 ONPG 外几乎或完全不利用。

为了考核触酶、氧化酶、脲酶和水解胆汁七叶苷四联检(COUB-a)在筛选 *Hp* 上的意义, 我们对 32 种常见革兰氏阴性杆菌进行对比观察, 结果见表 3。

(四) 药敏结果

药敏结果(表 4)说明, 两种培养基有着不

表2 43株 Hp 生化特征*

试验	阳性(+)	%	时间(h)	试验	阳性(+)	%	时间(h)
触酶	43	100.0	立即	吲哚	0	0	
氧化酶	43	100.0	立即	甲基红	0	0	
H ₂ S 试管法	38	88.4	42	V-P 试验	0	0	
生化管	0	0		葡萄糖	5	11.6	163
1%甘氨酸	41	95.4	29	麦芽糖	0	0	
0.075%TTC 琼脂	42	97.7	24	乳糖	0	0	
8%GS 血琼脂	30	69.8	35	蔗糖	0	0	
3.5%NaCl 肉汤	3	7.0	72	棉子糖	0	0	
6.5%NaCl 肉汤	0	0		鼠李糖	0	0	
0.1%亚硒酸	0	0		阿拉伯糖	1	2.3	24
40%胆汁	0	0		木糖	0	0	
脲酶(生化管)	35	92.1	50	ONPG	27	62.8	60
胆汁七叶苷	43	100.0	30	肌醇	0	0	
七叶苷	23	53.5	78	甘露醇	8	18.6	168
DNAase	32	74.4	95	山梨醇	0	0	
明胶酶	4	9.3	30	卫矛醇	0	0	
枸橼酸盐	11	25.6	133	侧金盏花醇	0	0	
硝酸盐还原	6	13.9	64	赖氨酸脱羧	0	0	
丙二酸盐	21	48.8	78	鸟氨酸脱羧	0	0	
乙酰胺	4	9.3	78	精氨酸脱羧	0	0	
葡萄糖酸盐	0	0		精氨酸水解	28	65.1	81
苯丙氨酸	0	0					

* 表内阳性反应时间指平均值。

表3 32种革兰氏阴性杆菌 COUB-a 四联检结果

菌种	来源	COUB-a反应
幽门螺旋菌 <i>Helicobacter pylori</i>	○	++++
空肠弯曲菌 <i>Campylobacter jejuni</i>	○	++--
胎儿弯曲菌 <i>Campylobacter fetus</i>	○	++-+
唾液弯曲菌 <i>Campylobacter sputar</i>	○	-+--
大肠埃希氏菌 <i>Escherichia coli</i>	●	+--+
伤寒沙门氏菌 <i>Salmonella typhi</i>	○	+--/+-
痢疾志贺氏菌 <i>Shigella dysenteriae</i>	○	+--/+-
福氏志贺氏菌 <i>Shigella flexneri</i>	○	+---
宋氏志贺氏菌 <i>Shigella sonnei</i>	△	+---
鲍氏志贺氏菌 <i>Shigella boydii</i>	△	+--+
产气肠杆菌 <i>Enterobacter aerogenes</i>	○	+--±
聚团肠杆菌 <i>Enterobacter agglomerans</i>	△	+--+
阴沟肠杆菌 <i>Enterobacter cloacae</i>	△	+---
粘质沙雷氏菌 <i>Serratia marcescens</i>	△	+--+
液化沙雷氏菌 <i>Serratia liquefaciens</i>	○	+---
肺炎克雷白氏菌 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	○	+ - ± +
催产克雷白氏菌 <i>Klebsiella oxytoca</i>	○	+ - ± +
鼻硬结克雷白氏菌 <i>Klebsiella rhinoscleromatis</i>	○	+ - ± +
臭鼻克雷白氏菌 <i>Klebsiella ozonae</i>	○	+ - ± +
普通变形杆菌 <i>Proteus vulgaris</i>	△	+ - ± +
摩根摩根氏菌 <i>Morganella morganella</i>	△	+ - ± -
异型枸橼酸菌 <i>Citrobacter amalonaticus</i>	△	+ - ± +

续表 3

菌 种	来 源	COUB-a 反应
雷极普罗威登斯菌 <i>Providencia rettgeri</i>	△	+ - - +
斯图普罗威登斯菌 <i>Providencia stuartii</i>	△	+ - - -
小肠炎耶尔森氏菌 <i>Yersinia enterocolitica</i>	▲	+ - + -
绿脓假单胞菌 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	●	+++ -
醋酸钙不动杆菌 <i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	△	+ - - -
粪产碱杆菌 <i>Alcaligenes faecalis</i>	○	+++ -
木糖氧化无色杆菌 <i>Achromobacter xylosoxidans</i>	△	+++ +
付溶血弧菌 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	○	+ + - +
嗜水气单胞菌 <i>Aeromonas hydrophila</i>	△	+ + - ±
类志贺邻单胞菌 <i>Plesiomonas shigelloides</i>	△	+ + - -

▲ 北京生物制品检定所购得参考菌株； △ 卫生部临床检验中心下发质控菌株； ○ 本室分离菌株 ● 北京生物制品检定所购得ATCC菌株。

表 4 45 株 Hp 在两种培养基上的药敏结果*

药 物	敏感株 (S)		耐药株 (R)		
	Skirrow	药敏琼脂	Skirrow	药敏琼脂	P
氯霉素	44	45	1(2.2)	0(0)	>0.05
SMZ	35	27	10(22.2)	18(40.0)	<0.01
红霉素	22	41	23(51.1)	4(8.9)	<0.01
链霉素	1	29	44(97.8)	16(35.6)	<0.01
丁胺卡那	5	28	40(88.9)	17(37.8)	<0.01
新霉素	9	33	36(80.0)	12(26.7)	<0.01
庆大霉素	3	32	12(93.3)	13(28.9)	<0.01
卡那霉素	2	20	43(95.6)	25(55.6)	<0.01
妥布霉素	2	7	43(97.7)	38(84.4)	<0.01
四环素	30	19	15(33.3)	26(57.8)	<0.01
先锋 V	0	4	45(100.0)	41(91.1)	<0.01
氮卞青霉素	3	3	42(93.3)	42(93.3)	
青霉素	0	0	45(100.0)	45(100.0)	

* 括号内为耐药率

完全相同的结果，作者在空肠弯曲菌的药敏试验中亦发现类似情况^[7]。改良 Skirrow 的药敏结果普遍耐药率相对较高，可能与该培养基含有一定量还原剂、羊血成份和琼脂的浓度、质量等因素有关。

本组药敏结果，青霉素、氮卞青霉素、先锋 V、妥布霉素、四环素和卡那霉素的耐药率均在 50% 以上。

讨 论

幽门螺旋菌在细菌分类学上的确切位置尚未完全定论。有关细菌鉴定和诊断方面的许多问题也有待研究。一般认为，由于该菌的培养

条件要求较高，生长较为缓慢，从标本接种到结果报告发出往往需要耗时 7—10 天或更长，因而给临床应用带来许多不便。

近年来，许多学者利用 Hp 具有产生大量尿素酶的特征建立了一些快速试验，为临床诊断提供了简便、实用、快速、灵敏的方法^[8]。但不可否认脲酶反应存有一定的假阴性和假阳性，本文试验结果亦证实脲酶阳性菌株仅占 92.1%，且不可行药敏试验，因而不可取代细菌培养。

我们对 43 株 Hp 42 项次生化反应的测定结果认为，选用触酶、氧化酶、脲酶和水解胆汁七叶苷四项生化反应联合检查（简称 COUB-

a), 加之该菌的染色特性、培养条件(包括专用培养基 35℃ 微需氧生长而 25 和 42℃ 不生长)等, 可将绝大部份的肠杆菌科细菌、临床较多见的非发酵菌、弧菌科细菌以及其他弯曲菌属细菌筛选除外, 且鉴定时间缩短在 48 小时左右完成, 是临床工作中一种可取的检验方法。

我们的研究表明, 选用 TTC-WCG 接种标本, 采用气袋一次性换气加化学产气造成微需氧环境后 35℃ 孵育, 可以较快地得到分离培养菌种, 加之生化鉴定试验的优选, 一般 96 小时可完成培养和药敏试验操作, 大大缩短了操

作周期, 方便临床工作需要。实践结果, 我们采用此培养法在 98 份胃疾患活检标本中共检出 68 株 *Hp*, 检出率 69.4%, 取得了良好效果。

参 考 文 献

1. Warren JR et al.: *Lancet*, 1:1273, 1983.
2. 朱均等: 中华消化杂志, 8: 55, 1988.
3. 桂炳东等: 实用医学杂志, 5(3): 48, 1989.
4. 俞爱琴等: 上海医学检验杂志, 5: 142, 1990.
5. 刘定祥等: 中华医学检验杂志, 11(3): 156, 1988.
6. 顾宜才等: 临床检验杂志, 6(1): 8, 1988.
7. 孔繁林等: 临床检验杂志, 8(3): 154, 1990.
8. 杨海涛等: 上海医学检验杂志, 5(3): 179, 1990.

(1992-3-15 收稿)