

幽门螺旋杆菌的培养研究

吴运连 刘满霞 钟保良 冯雪儿

(广州市红十字会医院, 广州 510220)

摘要 本文比较了连二亚硫酸钠法、硼氢化钾法、烛缸法和绿脓杆菌法、枯草杆菌法对幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*) 的培养效果。结果发现绿脓杆菌法最佳, 枯草杆菌法和连二亚硫酸钠法次之, 硼氢化钾法和烛缸法较差。本试验用废血袋制作微需氧袋培养幽门螺旋杆菌, 也取得了满意的效果。

关键词 幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*); 绿脓杆菌法

材料和方法

(一) 材料

1. 供试菌标本及来源: 从 69 名作胃镜检查的胃病患者的溃疡病灶周围或炎症红肿处随机采取小块粘膜组织, 放入运送培养基待检。取标本前未服抗菌药物。

2. 运送培养基: 布氏肉汤^[1]。灭菌后加入多粘菌素 B 2500IU/L, 万古霉素 10mg/L, 克霉唑 2mg/L, TMP 5mg/L, 分装 100 瓶, 每瓶 2ml。

3. 分离培养基: 布氏血琼脂培养基。用上述无抗菌药物的布氏肉汤加入琼脂 15.0g/L, 即成布氏琼脂。临用前加热溶解, 待冷至 50℃ 左右加入与布氏肉汤相同的抗菌药物和脱纤维兔血 80ml/L。

4. 微需氧袋: 用装血塑料袋改装代用。

(二) 方法

1. 标本分离: 从运送培养基中取出胃粘膜活检标本, 每一个标本分别接种在五个布氏血平板上, 供五种方法培养。每个平板可接种四

个不同的胃粘膜标本。用接种环反复划线分离。每个平板再接种新分离的经过鉴定已确定为幽门螺旋杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 的菌种作阳性对照。每个标本直接涂片作革兰氏染色检查, 最后作尿素酶试验检查。

2. 培养方法:

(1) 绿脓杆菌法^[2]: 接种胃粘膜标本前 1 小时, 取一培养需氧或兼性厌氧菌用的无菌生长的血平板, 在 $\frac{1}{2}$ 面积上接种绿脓杆菌, 37℃ 孵育。在另一血平板接种胃粘膜标本。接种绿脓杆菌的平板与分离 Hp 的平板一起放在微需氧袋内, 夹住袋口使不漏气。

(2) 枯草杆菌法: 同绿脓杆菌法。

(3) 连二亚硫酸钠法^[2]: 将连二亚硫酸钠 0.4g, 碳酸氢钠 0.4g 和吸有 0.2ml 水的小滴管一起放入小塑料袋内, 然后将小袋和分离 Hp 的平板一起放入微需氧袋, 夹住袋口使不漏气。再将小滴管内的水滴入药粉 (连二亚硫

酸钠和碳酸氢钠的混合物)中,使发生化学反应,产生微需氧环境。

(4) 硼氢化钾法^[3]:将四粒有效的钯粒作为催化剂,放在小试管内,用棉塞塞住管口。将硼氢化钾 0.25g,碳酸氢钠 0.4g,小滴管内吸有 40% 枸橼酸 1ml,一同放入小塑料袋。小试管、小袋和分离 *Hp* 的平板一起放入微需氧袋。以下步骤同连二亚硫酸钠法。

(5) 烛缸法:分离 *Hp* 的平板放入玻璃干燥器,点燃蜡烛,封盖。五种方法均 37℃ 培养 72h 观察结果。

3. 鉴定试验:按照目前国内鉴定 *Hp* 的常规方法^[3]进行,包含培养特性、菌落特征、革兰氏染色阳性、阴性及菌体形态、触酶、氧化酶、尿素酶及硝酸盐还原^[1]试验等内容。

结 果

(一) 五种方法培养 *Hp* 结果比较

69 例胃病患者的胃粘膜活检标本中的 *Hp*,在五种方法的微需氧环境中的分离培养结果(表 1)。从表 1 结果看出,五种方法的检出情况经统计学处理, $X^2=2.16$, $p>0.05$,差异不显著。但绿脓杆菌法简便易行,效果较好。

表 1 五种方法培养 *Hp* 的结果

方 法	例 数	阳性数	阳性率 (%)
绿 脓 杆 菌 法	69	46	66.6
枯 草 杆 菌 法	69	45	65.2
连二亚硫酸钠法	69	45	65.2
硼 氢 化 钾 法	69	40	58.0
烛 缸 法	69	40	58.0

(二) 绿脓杆菌法与直接检查法结果(表 2)

69 例胃病患者的胃粘膜活检标本中的 *Hp* 用绿脓杆菌法、直接涂片法和直接尿素酶法的培养结果(表 2)。从表 2 结果看出,三种方法的检出情况经统计学处理, $X^2=1.16$, $p>0.05$,差异不显著。然而两种直接检查法的结果未经鉴定,结果不可靠;绿脓杆菌法培养可靠,经过鉴定,结果可信。

表 2 绿脓杆菌法与直接检查法培养结果比较

方 法	例 数	阳性数	阳性率 (%)
直 接 涂 片 法	69	39	56.5
直 接 尿 素 酶 法	69	44	63.8
绿 脓 杆 菌 法	69	46	66.6

讨 论

1. 绿脓杆菌法培养到 *Hp* 的 46 例中,其他四种分离培养法有些菌株培养不到,培养基和培养温度都是相同的,显然是由于气体环境不能满足所有 *Hp* 的要求;其他四种分离培养法培养到的 *Hp* 菌株,绿脓杆菌法均能培养到。直接涂片法和直接尿素酶法 *Hp* 阳性的标本中,绿脓杆菌法均阳性,而其他四种分离培养法均有阴性。

2. 绿脓杆菌法培养到 *Hp* 的 46 例中,平板上不超过 10 个菌落的标本只有 2 例,直接涂片法和直接尿素酶法均阴性,说明直接法敏感性较低,弱阳性检测不到。烛缸法培养 *Hp*,以往报道阳性率较低。

3. 分离培养 *Hp* 的布氏血平板,有人报道需新鲜配制,并必须在 3 天内用完。我们的布氏血平板放在密闭的高湿度的容器内,置 4℃ 的冰箱中保存 3 个月,仍可使用,其效果不变。但是,如果将布氏血平板放置在 37℃,3 天后接种 *Hp*,则见 *Hp* 菌落较小。

4. 种置在布氏血平板上的 *Hp*,放置在 37℃ 培养,96 h 见其开始死亡,到第 240 h 则难于找到活菌,故观察菌落形态、G 氏染色和生化鉴定应在 72 h 进行,以免 *Hp* 死亡,产生假阴性结果。

5. *Hp* 硝酸盐还原试验阴性,相似的菌种大多数阳性^[1]。这一试验对种间鉴别很有价值。

6. 我们采用血库装过血的废弃的塑料血袋制成的微需氧袋,取得满意的效果。这种塑料袋较厚,有良好的弹性,不易穿孔漏气,可多次反复使用。大小适宜,使用方便,无毒,不影响细菌生长繁殖。

(下转第 250 页)

(上接第 225 页)

7. 采用接种过其他临床标本的, 经 48h 孵育无菌生长的废弃的血平板, 接种绿脓杆菌, 放在微需氧袋内吸收袋中的氧气, 可以节省材料。

8. *Hp* 与慢性胃炎和胃及十二指肠溃疡有密切关系, 已引起了人们的关注, 不少人进行了培养研究。培养 *Hp* 一般采用厌氧培养箱, 抽气换气法, 操作较复杂, 成本较大, 不易推广到基层实验室。烛缸法、化学法和直接检查法均不理想。我们采用废弃的血袋, 废弃的血平板作材料, 发现绿脓杆菌法分离培养 *Hp* 效果

非常好, 阳性率 66.6% (46/69), 解决了 *Hp* 生长所需要的微需氧环境问题。本法操作简单, 培养简便可靠, 适于推广使用。

参 考 文 献

1. Lennette, EH: Manual of Clinical Microbiology. 4th ed., Washington: American Society for Microbiology, p. 1056, 306, 1985.
2. 陈聪敏等: 厌氧菌及其感染, 上海医科大学出版社, 上海, p. 186—187, 1989.
3. 刘定祥等: 中华医学检验杂志, 11(3): 156—158, 1988.

(1992-02-09 收稿)