维普资讯 http://www.cqvip.com

幽门弯曲菌培养特性探讨

微生物学教研室 杨致邦 朱 旦 胡志琼 邹 政

第一医院消化科 唐承薇 皮新生

提 要 本文用多种培养基分别加入血清、脱纤维血、维生素、葡萄糖、活性炭和淀粉分离培养幽门弯曲菌，并与直接镜检、脲酶试验比较。该菌在心脑血琼脂平板上生长良好，在血清琼脂、普通血琼脂、空弯血琼脂上几乎不生长。加入活性炭和淀粉能提高检出率。加入维生素 K_1 和葡萄糖能显著提高检出率，菌落明显增多，与直接镜检基本一致

关键词 幽门弯曲菌；心脑血琼脂

1983年，Warren 等首先从人胃粘膜活检组织中分离出幽门弯曲菌（Campylobacter Pyloridis CP），现在多数学者认为该菌是B型胃炎的条件致病菌，并与其它胃部疾患有密切关系[1]。幽门弯曲菌的分离培养除微需氧环境、高湿度外，对培养基的营养成分也有特殊要求。国外资料表明该菌分离培养的阳性率高于直接革兰氏染色法和直接脲酶试验[2]，而国内资料报道均低于后两种试验[3]。为进一步探讨该菌的培养特性，本试验用多种培养基分离培养，以探讨血液、维生素 K_1、葡萄糖及附加剂（活性炭、淀粉）对该菌生长的影响，并将结果与直接涂片革兰氏染色镜检、直接脲酶试验比较。

材料和方法

1. 标本

经胃镜诊断为慢性胃炎、胃、十二指肠溃病患者102例，无长期使用抗生素史。在内窥镜下，用消毒活检钳钳取胃窦大弯距幽门3cm处组织三块，大小约0.1×0.15cm。一块置脲素基作直接脲酶试验，二块置20%葡萄糖转送液以备直接镜检和分离培养。

2. 菌种

从受检者分离幽门弯曲菌25株，经形态、脲酶、氧化酶、触酶、葡萄糖发酵、硝酸盐分解、需氧和厌氧培养等试验确定为幽门弯曲菌后作次代培养试验。

3. 培养基

牛心脑琼脂（自制）、普通肉汤琼脂（自制）、空肠弯曲菌琼脂（干粉、上海卫生防疫站制、未加抗菌增效剂）。在上述培养基中分别加入7%兔血清、7%脱纤维羊血、0.2%葡萄糖和0.1mg%维生素 K_1、附加剂（0.2%活性炭和1%可溶性淀粉）[4]。原代分离时加入二性霉素2mg/L、多粘菌素B2500 U/L、万古霉素3mg/L以抑制杂菌生长。

用不含琼脂的 Christensenis 脲素培养基作直接脲酶试验，以0.5ml分装小瓶，3h内转为红色者判为阳性。

4. 直接镜检

取转送液中组织一块，在载玻片上涂抹成约1.0×2.0cm薄膜，自然干燥，加热固定，革兰氏染色后油镜检查。为能大致反映出活检标本中菌量的多少差异，参照上海第二医学院张振华等[3]的标准制定粗略的定量标准如下：（1）"－"：全片未查到典型形态弯曲样细菌。（2）"＋"：全片查到典型形态弯曲样细菌少于20个。（3）"＋＋"：全片查到典型形态弯曲样细菌20—100个，密集处一个视野中不超过20个。（4）"＋＋＋"：密集处一个视野中典型形

维普资讯 http://www.cqvip.com

态弯曲样细菌在20—100个之间。(5)"卅"：密集处一个视野中超过100个。

5. 分离培养

原代分离按Goodwin的方法[5]。采用半定量接种，即先在研钵中加0.3ml无菌生理盐水，取转送液中组织一块，磨成匀浆。用标定的接种环取二环先在平板上涂抹原始区后连续划线接种，每类培养基同时接种一个平板。次代培养时先用生理盐水将血平板上的菌落洗下，用标定的接种环取一环按上述方法接种。接种后的平板置厌氧罐中，先抽去90%空气，然后充入75%氮气、8%氢气、7%二氧化碳，37℃培养3—4天后观察。原代分离的标本在3h内完成，次代培养在1h内完成。原代分离生长的菌落按前述方法鉴定，粗略计数，标准如下：(1)"—"：无幽门弯曲菌菌落生长。(2)"+"：生长的幽门弯曲菌菌落在20个以内。(3)"++"：菌落在20—100个之间。(4)"卅"：散在菌落在100—200个之间。(5)"艸"：原始区菌落密集难以数清，其余区有散在菌落。

结　果

直接镜检幽门弯曲菌形态典型，革兰氏染色阴性，呈逗点状、"C"或"S"形、海鸥展翅状，存在于粘液层。菌多时鱼群状排列，菌少时散在排列（图1）。分离培养3—4天后，生长的菌落直径约0.5—0.7mm，圆凸、无色透明似水滴。菌落涂片革兰氏染色油镜下观察，其形态与直接镜检极相似(图2)。

30份标本原代分离和直接镜检、脲酶结果（表1）。心脑血琼脂培养阳性率为53%，加附加剂后为57%，无显著性差异（x^2=0.072、P>0.05）。空弯血琼脂阳性率为3%，加附加剂后为20%，也无显著性差异（x^2=2.58、P>0.05）。心脑血清琼脂和普通血琼脂无生长，普通血琼脂加附加剂后阳性率为6%，无显著性差异（P=0.24）。心脑血琼脂加入附加剂后，生长的菌落较大，直径多为0.7mm，"卅"—"艸"生长增多，有显著性差异(x^2=5.21、0.05>P>0.01)。心脑血琼脂培养与直接镜检、脲酶比较，阳性率无显著差异（x^2=2.97、x^2=1.01、P>0.05）。

25株菌次代培养结果（表1）。心脑血琼脂和普通血琼脂加入附加剂后，阳性率分别从84%提高到92%、16%提高到36%，但无显著性差异（x^2=0.027、x^2=2.59、P>0.05）。空弯血琼脂加入附加剂后，阳性率从4%提高到36%，有高度显著性差异（x^2

表1　各种培养基原代分离、次代培养及镜检、脲酶结果

	数量分级	培养							直接镜检	直接脲酶
		心脑血琼脂	心脑血琼脂加附加剂	空弯血琼脂	空弯血琼脂加附加剂	普通血琼脂	普通血琼脂加附加剂	心脑血琼脂血清		
例数		30	30	30	30	30	30	30	30	30
原代分离	—	14	13	29	24	30	28	30	8	10
	+	7	1	1	4	0	2	0	2	20
	++	4	4	0	1	0	0	0	5	
	卅	3	5	0	1	0	0	0	8	
	艸	2	7	0	0	0	0	0	7	
阳性数(%)		16(53)	17(57)	1(3)	6(20)	0(0)	2(6)	0(0)	22(73)	20(67)
次代培养	例数	25	25	25	25	25	25			
	阳性数(%)	21(84)	23(92)	1(4)	9*(36)	3(10)	9(16)			

* P<0.01

维普资讯 http://www.cqvip.com

=8.67，P<0.01)。

72份标本用心脑血琼脂加维生素K_1和葡萄糖原代分离，阳性率为72.2%，直接镜检为73.6%，结果基本一致。与用心脑血琼脂原代分离的30份标本比较，有显著性差异(χ^2=3.86，0.05>P>0.01)。"卅"—"卌"生长明显增多，有高度显著性差异(χ^2=8.50，P<0.01)。(表2)

表2　原代分离与镜检结果比较

方法	例数	数量分级					阳性数	(%)
		—	+	卄	卅	卌		
镜检	72	19	5	10	14	24	53	73.6
心脑血琼脂加维生素，葡萄糖	72	20	8	9	10	25	52	72.2
心脑血琼脂	30	14	7	4	3	2	16	53.0*

* P<0.01

讨　论

幽门弯曲菌分离培养时对营养成分要求较高，原代分离在普通血琼脂平板上不能生长，在心脑血琼脂平板上生长良好。加入附加剂后有利于生长，但附加剂并非幽门弯曲菌生长的必需营养成分。心脑血琼脂中加入维生素K_1和葡萄糖后，幽门弯曲菌培养阳性率明显增高，几乎与直接镜检结果一致，且"卅"—"卌"生长明显增多，可能为幽门弯曲菌生长的必需营养成分，也可能维生素K_1和葡萄糖是还原剂，具有稳定培养基氧化还原电位的作用。空肠弯曲菌血琼脂营养成分丰富，为空肠弯曲菌生长的良好培养基。但幽门弯曲菌原代分离不生长，传代培养生长差，说明幽门弯曲菌的营养要求与空肠弯曲菌营养要求差异较大。加入附加剂后阳性率增高，可能空弯基中含有不利于幽门弯曲菌生长的成分，附加剂能中和其不利成分。幽门弯曲菌在心脑血清琼脂平板上不生长，在加入脱纤维血的平板上生长良好，说明红血球的某些成分为生长所必需。幽门弯曲菌传代培养的营养要求低于原代分离。

Marshall B J.[2]，Arvind A S.[6]等报道幽门弯曲菌分离培养的阳性率均高于直接镜检和脲酶试验。但国内资料报道培养阳性率均低于后两种试验[7]。本试验培养阳性

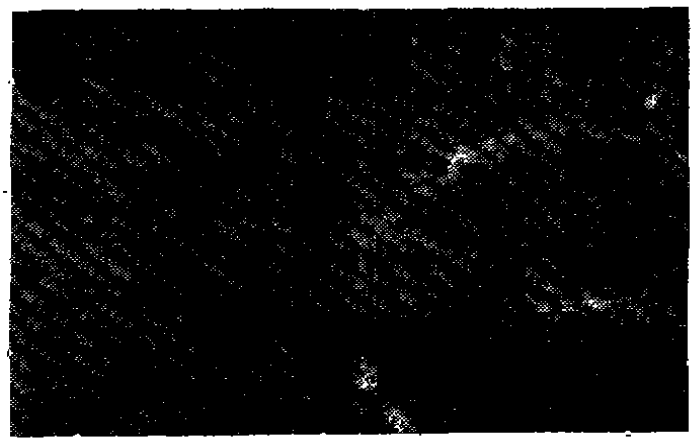


图1　直接涂片革兰氏染色镜检，幽门弯曲菌典型形态(油镜10×100)

维普资讯 http://www.cqvip.com

率与镜检基本一致。幽门弯曲菌分离培养影响因素较多。除气体、温度外，需在培养罐中放入盛有蒸馏水的试管，才能维持高湿度。琼脂平板需密封保存，才能避免空气的渗入。活检组织难免带有杂菌，虽加入适量的抗生素，仍不能完全防止杂菌的生长，因杂菌生长速度快而抑制幽门弯曲菌生长。部分病例患者自述无抗生素使用史，但镜检发现有许多失去典型形态的弯曲样细菌，有的为短弧形，有的为颗粒状。追问始知用过抗生素，以致培养阴性。

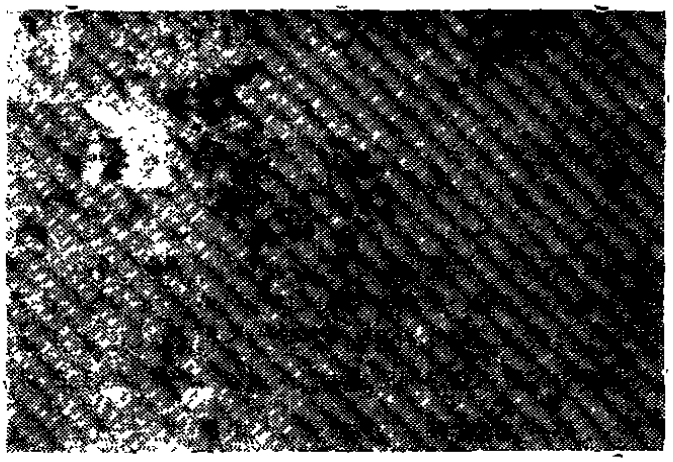


图 2　分离培养 3 天后涂片革兰氏染色，幽门弯曲菌形态(油镜10×100)

参 考 文 献

[1] 唐新华，等. 国外医学消化疾病分册1988; 4:217

[2] Marshall B J, et al. Am J Gastroenterol 1987; 82:200

[3] 张振华，等. 中华消化杂志 1985; 5 (4): 231

[4] George E B, et al. J. Clin Microbiology 1987; 25(4); 597

[5] Goodwin C S, et al. J Clin Pathol 1985; 38:1127

[6] Arvind A S, et al. The Lancet March 1988; 26:704

[7] 沈宝铨，等. 北京医学 1987; 9 (6):338

PRELIMINARY STUDY ON THE CULTURE CHARACTERISTICS OF CAMPYLOBACTER PYLORIDIS

Yang Zhibang, et al

(The Department of Microbiology)

In the experiments, various media were used to isolate Campylobacter Pyloridis. Onto every medium serum, blood, vitamin, glucose, charcoal and starch were added separately. The results were compared with direct Gram's stain method and urease test. Better growth was obtained on the brain-heart blood agar; almost no growth occured on the serum agar, normal blood agar and C. jejuni agar. The positive rate was increased after charcoal and starch were added. The positive rate was significantly increased after vitamin and glucose were added. The colonies were increased significantly. It was similar with the results of the direct Gram's stain method

KEY WORDS *Campylobacter Pyloridis; Brain-heart blood agar*