世界华人消化杂志®
wcjd@wjgnet.com

世界华人消化杂志 2007年6月8日; 15(16): 1855-1858
ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R

研究快报 RAPID COMMUNICATION

自创微需氧罐优选幽门螺杆菌培养与保存条件

周华, 徐帆, 李平, 楚更五, 王根春

周华, 昆明医学院第一附属医院放疗科 云南省昆明市650032
徐帆, 成都军区昆明总医院药剂科 云南省昆明市 650032
李平, 楚更五, 云南中医学院基础部 云南省昆明市 650200
王根春, 成都军区昆明总医院微生物室 云南省昆明市 650032
云南省自然科学基金资助项目, No. 2003C0089M
通讯作者: 李平, 650200, 云南省昆明市关上双桥路201号, 云南中医学院基础部. kmliping08@126.com
电话: 0871-7150987 传真: 0871-7150987
收稿日期: 2007-01-25 接受日期: 2007-03-06

Optimization of cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* using self-made microaerophilic pot

Hua Zhou, Fan Xu, Ping Li, Geng-Wu Chu, Gen-Chun Wang

Hua Zhou, Department of Radiotherapy, the First Affiliated Hospital of Kunming Medical College, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Fan Xu, Department of Pharmacy, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Ping Li, Geng-Wu Chu, Basic Department, Yunnan College of Chinese Traditional Medicine, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Gen-Chun Wang, Department of Microbiology, Kunming General Hospital of Chengdu Military Region, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Supported by The Natural Science Foundation of Yunnan Province, China, No. 2003C0089M
Correspondence to: Ping Li, Basic Department, Yunnan College of Chinese Traditional Medicine, 201 Shuangqiao Road, Guanshang, Kunming 650032, Yunnan Province, China. kmliping08@126.com
Received: 2007-01-25 Accepted: 2007-03-06

Abstract

AIM: To optimize the operation and condition of cultivation and preservation for *Helicobacter pylori*.

METHODS: Self-made microaerophilic pot was used to optimize the cultivation condition for *H pylori* with orthogonal designing, and the anabiosis of *H pylori* was observed and compared in two preservative fluids of different concentration under -20℃.

RESULTS: *H pylori* were cultivated successfully with self-made microaerophilic pot. Solid cultivation medium for *H pylori*: *H pylori* grew well as presented in the Colombian agar medium and brain heart infusion agar with 53 mL/L calf serum or sheep serum and 26 mL/L mixed antibiotics at pH 7.5. Under -20℃, the survival time of *H pylori* was 7 and 20 days when 300 mL/L glycerine/Bromfield medium and 200 mL/L glycerine/brain heart infusion were used, respectively.

CONCLUSION: The self-made microaerophilic pot is reliable and its operation is simple, by which the cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* were optimized.

Key Words: Microaerophilic pot; *Helicobacter pylori*; Cultivation; Preservation

Zhou H, Xu F, Li P, Chu GW, Wang GC. Optimization of cultivation and preservation of *Helicobacter pylori* using self-made microaerophilic pot. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2007;15(16):1855-1858

摘要

目的: 简化幽门螺杆菌(*H pylori*)培养操作, 优选*H pylori*培养与保存条件.

方法: 自创微需氧罐, 采用正交设计优选*H pylori*培养条件, 并对-20℃保存的不同浓度两种保存液*H pylori*复苏对照观察.

结果: 自创微需氧罐成功培养出*H pylori*; 哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛/绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值7.5时, *H pylori*生长良好; -20℃条件下: 300 mL/L甘油/布氏肉汤和200 mL/L甘油/脑心浸液菌种保存时间分别为7 d和20 d.

结论: 自创微需氧罐操作简便、效果可靠, *H pylori*培养与保存条件得到优化.

关键词: **微需氧罐; 幽门螺杆菌; 培养; 保存**

周华, 徐帆, 李平, 楚更五, 王根春. 自创微需氧罐优选幽门螺杆菌培养与保存条件. 世界华人消化杂志 2007;15(16):1855-1858
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1855.asp

■背景资料
*H pylori*培养是*H pylori*诊断的"金标准", 但*H pylori*体外生长条件非常苛刻, 所需设备特殊, 培养过程繁琐、困难. 作者首创了操作简便、价格低廉、效果可靠的微需氧培养罐, 简化了培养操作, 并以标准菌株SS1为研究对象, 选择出最佳的培养和保存方法, 有很好的应用价值.

■同行评价
本文用自行改造的微需氧罐探讨幽门螺杆菌的最适培养与保存条件, 对于幽门螺杆菌的感染诊断有一定的应用价值, 可作为技术方法交流.

0 引言

幽门螺杆菌(*H pylori*)培养是*H pylori*诊断的"金标准", 特异性100%[1]. 但*H pylori*体外生长条件非常苛刻, 所需试验设备特殊, 培养过程繁琐、困难. 我们自行创新了操作简便、价格低廉、效果可靠的微需氧培养罐, 简化了*H pylori*培养操作. 以*H pylori*标准菌株SS1为研究对象, 比较了不同培养条件和保存方法的优缺点, 选择出最佳的培养和保存方法.

1 材料和方法

1.1 材料 *H pylori* SS1标准菌株由中国疾病预防控制中心传染病预防控制所馈赠. 哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂; 脱纤维绵羊血、绵羊血清、新生小牛血清; 选择性抗生素: 盐酸万古霉素、多黏菌素、可溶性两性霉素B、三甲氧苄氨嘧啶; 乳酸、触酶、氧化酶、快速尿素酶试纸; 主要设备: 自制微需氧培养罐(用市场易购的真空干燥器, 仅对其盖子活塞加以改造为气体进出口双通道即成, 图1)、特种混合气体(配比: 50 mL/L CO_2、100 mL/L CO_2、850 mL/L N_2)、温湿度计、超净工作台、37℃恒温培养箱、-20℃冰箱、高温高压消毒锅等.

1.2 方法

1.2.1 混合抗生素的配制 分析天平准确称取万古霉素0.0161 g, 两性霉素B 0.0163 g, 多黏菌素B 0.0007 g, 3种抗生素在紫外线下照射1 h, 均匀混合. 准确称取三甲氧苄胺嘧啶(TMP) 0.008 g, 溶于10 mL蒸馏水, 并加乳酸一滴, 煮沸10 min后无菌加入以上混合抗生素中, 用灭菌蒸馏水加至40 mL, 混匀, 4℃冰储备用.

1.2.2 优选*H pylori*最佳固体培养条件 称取哥伦比亚琼脂5 g, 溶于128 mL蒸馏水中, 脑心浸液琼脂5 g溶于100 mL蒸馏水中, 均匀混合, 121℃高压灭菌15 min. 待温度降至45-50℃时, 在9个小烧杯中分别倒入15 mL, 按正交设计, 在各烧杯中加入不同的血样、混合抗生素并调节不同pH值(表1-2), 混匀后趁热快速浇板, 数分钟冷却凝固后备用. 其中血样按53 mL/L浓度加入0.8 mL, 混合抗生素按26 mL/L浓度加入0.4 mL, 用HCl和NaOH调节pH值. 各固体培养基制备好后, 将-70℃冻存的*H pylori* SS1标准菌株室温解冻, 接种于不同固体培养基, 每板50 μL, L棒涂匀, 放入微需氧培养罐, 置入37℃恒温箱, 通入特种混合气体5 min, 湿度为95%条件下, 培养3 d.

1.2.3 *H pylori*鉴定 (1)菌落形态: 平板上的*H pylori*菌落呈针尖样, 透明湿润, 直径 0.2-2 mm; (2)涂片镜检: 滴1滴生理盐水于干净载玻片上, 用接种环刮取少许菌落在生理盐水中涂开. 将涂片烘干后进行常规革兰氏染色, 在显微镜下观察, 见紫色短杆状; (3)氧化酶试验: 刮取细菌放置在浸有氧化酶试剂的滤纸上, 出现深蓝/黑色反应者为阳性; (4)触酶试验: 在1张载玻片上滴加1滴触酶液(30 mL/L H_2O_2液), 刮取一环菌落置入后, 阳性可见到连续的氧气泡形成; (5)尿素酶试验: 刮取1环细菌放置到尿素酶试纸上, 约1 min后试纸变为紫红色为阳性.

1.2.4 *H pylori*菌株的不同保存方法及菌株复苏对照观察 (1)300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液的配制: 参照周殿元 *et al*[2]的经典配方, 称取0.6 g布氏肉汤培养基, 溶于14 mL蒸馏水, 加入6 mL甘油, 混匀, 121℃高压灭菌15 min, 300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液20 mL配制完毕, 4℃冰储备用. (2)200 mL/L甘油/脑心浸液保存液的配制: 称取3.7 g脑心浸液培养基, 溶于80 mL蒸馏水, 加入20 mL甘油, 混匀, 121℃高压灭菌15 min, 200 mL/L甘油/脑心浸液保存液100 mL配制完毕, 4℃冰储备用. 将上述的两种保存液1 mL分别装入1支试管, 用接种环刮取菌落加入不同保存液中, 迅速置于-20℃冰箱保存. 每隔两天同样方法各保存1支, 共保存到各10支, 1 mo同时复苏对照观察.

统计学处理 采用SPSS12.0统计软件的

图 1 自创微需氧罐.

表 1 优选*H pylori*最佳固体培养条件因素与水平

水平	A因素 琼 脂	B因素 血 样	C因素 混合抗生素	D因素 pH
1	哥伦比亚琼脂	新生小牛血清	加	6.5
2	脑心浸液琼脂	脱纤维绵羊血	不加	7.5
3		绵羊血清		8.5

表 2 优选*H pylori*最佳固体培养条件的正交试验方案和结果

试验号	固体培养基	因素 A	B	C	D	*H pylori*生长情况	杂菌生长情况
1	哥伦比亚琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL, pH为7.5	1	2	2	2	+	+++
2	哥伦比亚琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为8.5	1	3	1	3	+-	-
3	哥伦比亚琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL, pH为8.5	1	1	2	3	-	++++
4	脑心浸液琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为8.5	2	2	1	3	+	-
5	哥伦比亚琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为7.5	1	3	1	2	++++	-
6	哥伦比亚琼脂15 mL+脱纤维绵羊血0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为6.5	1	2	1	1	-	-
7	脑心浸液琼脂15 mL+绵羊血清0.8 mL, pH为6.5	2	3	2	1	-	+++
8	哥伦比亚琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为6.5	1	1	1	1	+	-
9	脑心浸液琼脂15 mL+新生小牛血清0.8 mL+混合抗生素0.4 mL, pH为7.5	2	1	1	2	++++	-

+: 细菌生长; -: 细菌不生长; +-: 细菌生长可疑.

Conjoint模块功能进行正交设计与数据处理.

2 结果

自行创新的微需氧培养罐成功培养出*H pylori*, 生长良好. *H pylori*在不同固体培养条件下的生长结果(表2). 哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛、绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值为7.5时, *H pylori*生长良好; pH值为6.5和8.5时*H pylori*几乎不生长, 且pH值在6.5时, 培养基呈半固体状; 不加混合抗生素易被杂菌(镜检为枯草杆菌)污染, 加混合抗生素后能有效控制杂菌的污染, 对细菌的生长没有影响. 菌落形态呈透明、湿润、针尖样, 直径0.5-2 mm. 显微镜下可见革兰氏染色阴性短杆状、弯曲状和海鸥状的细菌. 三酶试验均呈阳性. 在-20℃条件下, 300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液对菌种的保存时间为7 d, 200 mL/L甘油/脑心浸液保存液对菌种的保存时间为20 d, 成功复苏.

3 讨论

*H pylori*是一种生存、生长条件都非常苛刻的细菌, 对培养基及培养条件要求很高[3], 较一般细菌难以培养, 需特殊的试验设备. 目前, 由于各种条件的限制, 我国*H pylori*培养主要在大学附属医院和科研机构进行, 这使许多医院不能进行*H pylori*的药敏测试, 导致临床上治疗*H pylori*感染时, 多凭临床经验选择抗生素, 有较大的盲目性[4]. 其中最重要的微需氧培养罐, 进口及国内价格均较贵, 且因需求量少而难以购买, 我们自行创新的微需氧培养罐是市场易购的真空干燥器, 仅对其盖子活塞加以改造为气体进出口双通道即成, 价格低廉; 免除了抽真空的过程, 操作简便; 罐内放一装有蒸馏水的培养皿维持罐内的高湿度, 经温湿度计测量罐内温度37℃时, 湿度为95%, 完全满足*H pylori*生长所需的温湿度条件及气体环境, 成功培养出*H pylori*, 效果可靠. 此罐国内外未见报道, 可供借鉴应用.

*H pylori*的培养多以哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂作为培养基础, 因此我们以这两种培养基作为试验因素, 观察他们对*H pylori*培养情况的差异. 实验发现: 两种琼脂的培养效果无差异, 两者可任选. 添加53 mL/L的动物血清培养效果较好, 与熊杰 *et al*[5]提出的*H pylori*培养营养要求较高, 一般加入50-100 mL/L的动物(马、羊、兔、牛等)血或血清相符. 26 mL/L浓度混合抗生素能有效减少枯草杆菌等杂菌的污染, 对细菌生长无影响. 其中TMP既可作为抗生素, 又能提供*H pylori*生长所需的胸腺嘧啶脱氧核苷[6], 故加入一定量的混合抗生素是有必要的. 熊杰 *et al*[5]指出*H pylori*耐受pH值为4-10, 曾浩 *et al*[7]指出*H pylori*最适pH值为7.5, 我们观察了pH为6.5, 7.5, 8.5时*H pylori*生长情况, 结果与曾浩 *et al*得出的

结果一致. 我们的研究表明哥伦比亚琼脂和脑心浸液琼脂中分别添加53 mL/L浓度小牛/绵羊血清和26 mL/L浓度混合抗生素, pH值为7.5时, 为培养幽门螺旋杆菌的最佳固体培养条件.

总之, *H pylori*的保存对于深入开展该菌的研究有重要意义, 而菌种的保存较为困难, 目前常用的保存方法均欠理想, 国外均为保存于-193℃或-70℃, 且认为-70℃保存优于-193℃[8-9]. 尽管-70℃保存菌种较为理想, 但国内大部分单位无此条件,而-20℃冰箱却易具备. 本试验对-20℃下不同浓度两种常用保存液保存的*H pylori*复苏情况进行了对照观察, 300 mL/L甘油/布氏肉汤保存液对菌种的保存时间为7 d, 与周殿元 *et al*[6]报道结果相符. 200 mL/L甘油/脑心浸液保存液对菌种的保存时间可长达20 d, 表明在-20℃条件下, 通过增加培养基浓度, 适当降低甘油含量, 可延长*H pylori*的保存时间. 在无低温冰箱的情况下, 为*H pylori*的保存提供了一条新思路和简便易行可资借鉴的方法.

4 参考文献

1 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 林三仁, 胡品津, 刘文忠, 王继德, 徐智民, 成虹. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见. 世界华人消化杂志 2004; 12: 2457-2458
2 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 247
3 Hunt RH, Malfertheiner P, Yeomans ND, Hawkey CJ, Howden CW. Critical issues in the pathopHysiology and management of peptic ulcer disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1995; 7: 685-699
4 范学工, 李铁刚, Harry HX Xia. 人血清对幽门螺杆菌生长的影响. 湖南医科大学学报 2000; 25: 371-372
5 熊杰, 白生平. 幽门螺旋杆菌的研究现状. 微生物学免疫学进展 2002; 30: 71-74
6 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床. 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 241
7 曾浩, 邹全明, 张卫军. 培养幽门螺旋杆菌的发酵工艺研究. 微生物学报 2002; 42: 607-610
8 Drumm B, Sherman P. Long-term storage of Campylobacter pylori. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1655-1656
9 Ansorg R, Von Recklinghausen G, Pomarius R, Schmid EN. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of Helicobacter pylori. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 51-53

电编 何基才 编辑 王晓瑜

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

世界华人消化杂志关于作者署名的声明

本刊讯 世界华人消化杂志要求所有署名人写清楚自己对文章的贡献. 第一方面是直接参与, 包括: (1)酝酿和设计实验; (2)采集数据; (3)分析/解释数据. 第二方面是文章撰写, 包括: (1)起草文章; (2)对文章的知识性内容作批评性审阅. 第三方面是工作支持, 包括: (1)统计分析; (2)获取研究经费; (3)行政、技术或材料支持; (4)指导; (5)支持性贡献. 每个人必须在第一至第三方面至少具备一条, 才能成为文章的署名作者. 世界华人消化杂志不设置共同第一作者和共同通信作者.