

肺炎链球菌菌种保存方法

肖磊 袁曾麟 叶人邦 葛福清 丁绍卿

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

肺炎链球菌是肺炎、脑膜炎和中耳炎的重要病原菌^[1]。自 1982 年以来我们参加世界卫生组织 (WHO) 所组织的在全世界进行肺炎链球菌的菌型监测和流行菌型分布的调查, 一方面为 WHO 确定肺炎链球菌菌苗组分提供依据, 同时也为在我国防治肺炎链球菌感染创造条件, 填补我国肺炎链球菌菌型分布调查的空白。为完成此项国际协作任务, 我们在国内组成了由 20 多个省市, 30 多个医院参加的肺炎双球菌分型研究协作组, 在全国范围内收集菌种,

但因肺炎链球菌生长条件苛刻, 在含有血液或血清等培养基上才能生长, 但在这种培养基上不能长时间保存, 按本实验室的常规方法用脱脂牛乳作保护剂冷冻干燥保存也不够满意, 给研究工作带来了困难。为了解决保存和寄送菌种的条件问题, 本文进行了肺炎链球菌菌种保存方法的研究。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

本文所用肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 标准菌种 1 株, 菌号 31113 是由国家医学细菌中心提供。地方菌种 46 株, 菌号以“P0000—”表示, 是新从病人脑脊液, 血液, 中耳液及其它体液、浓汁中分离而得, 由肺炎球菌分型研究协作组提供。这些菌种血清学鉴定为 18 个群或型, 包括常见的 1, 2, 5, 6, 14, 19 和 23 型等。

(二) 培养基

实验用六种培养基为: 5% 血清琼脂半固体; 5% 血液琼脂半固体, 1:1 卵黄盐水液; 羊全血液; 5% 血液明胶和 5% 葡萄糖琼脂半固体。

(三) 菌种保存效果的观察

将培养基保存的菌种或冻干的菌种启开后分别接种在 10% 羊血琼脂斜面上及 2% 血清肉浸液培养基上, 置 37℃、二氧化碳培育箱中培养 20 小时后观察生长情况, 在 10% 羊血琼脂斜面培养基上长成菌苔者为“卅”; 密集单颗者为“卅”; 6—10 个菌落者为“++”; 1—5 个菌落者为“+”; 斜面上无菌落生长而底部凝固水生长者为±; 不生长者为“—”。在血清肉浸液培养基中生长者为“+”; 不生长者为“—”。

(四) 冻干菌种的保护剂

实验用保护剂有以下 7 种: 脱脂鲜牛乳; 10% 脱脂牛乳粉; 脱纤维羊血加肉浸液 (3:1); 6% 羊血肉浸液; 脱脂鲜牛乳加脱纤维羊血 (1:1); 健康兔血清和 1% 明胶加 5% 蔗糖。

用脱纤维羊血加肉浸液保护剂时, 将菌种直接接种在此保护剂中于 37℃、CO₂ 培育箱中培育 18 至 20 小时; 用 6% 羊血肉浸液保护剂时将菌种接种在此保护剂中 37℃、CO₂ 培育 8—14 小时, 然后 3000rpm 离心 10 分钟, 弃去 9/10 上清液, 再将剩下的 1/10 上清液和沉淀的菌体血球混匀、分装、冻干。用其它 5 种保护剂时需

将菌种先接种在 10% 羊血斜面上在 37℃、CO₂ 培育箱中培育 18—20 小时后将菌苔刮入保护剂中制成菌悬液, 分装冻干。

(五) 冷冻真空干燥

将含有各种保护剂的菌悬液分装于菌种安瓿, 每瓶 0.1 毫升, 置于一 45℃ 下预冻 1 小时, 立即转入冻干机的干燥室。抽真空至 50 微米, 连续冻干 7 小时左右。

结 果

(一) 不同培养基对肺炎链球菌保存时间的比较

6 种不同培养基保存肺炎链球菌的结果表明 (表 1), 5% 血清琼脂半固体和 0.5% 葡萄糖琼脂半固体的保存效果较差, 保存一周后菌基本死亡。1:1 卵黄盐水液能保存 3 周, 但在 2 周后仅在 2% 血清肉浸液培养基中生长。5% 羊血琼脂半固体可保存 4 周。羊全血保存效果最好, 其次是 5% 羊血明胶, 均能保存 12 周。这 6 种保存培养基在保存半年时菌种全部死亡。

(二) 冻干菌种保护剂的比较

不同保护剂对肺炎链球菌冻干菌种存活的影响的结果列于表 2 和表 3。表 2 表示 4 种不同保护剂对 11 株地方菌种冻干后一个月至半年保护效果的比较, 结果证实脱纤维羊血加肉浸液 (3:1) 效果最好, 冻干后一个月和半年启开菌种, 菌种存活情况很好, 斜面呈菌苔生长。6% 羊血肉浸液次之, 11 株菌种中有 7 株在冻干后及冻干后一个月及半年能在斜面上生长为菌苔或密集单颗, 另 4 株在斜面上的生长少于 10 个菌落。但脱脂鲜牛乳及 10% 脱脂牛乳粉为保护剂时冻干效果都很差, 仅 1 株菌株 (P00209) 冻干半年后存活较好, 其余 10 株菌于冻干后启开, 菌种都生长不良, 冻干后保存 1 个

表 1 在不同培养基上肺炎链球菌保存时间的比较

培养基	5% 血清琼脂半固体	5% 血液琼脂半固体	1:1 卵黄盐水液	羊全血液	5% 血液明胶	0.5% 葡萄糖琼脂半固体
保 存 时 间	一周内	四周内	三周内	十二周	十二周	一周内

所试验的肺炎链球菌为 1 株标准菌株 (31113) 和 4 株地方菌株 (P00002, P00006, P00008, P00010)

表 2 四种不同保护剂对肺炎链球菌冻干效果的比较

菌号	保护剂 干后 检查	脱纤维羊血加肉 浸液			6% 羊血肉浸液			10%脱脂牛乳粉			脱脂鲜牛乳		
		干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年
P00108		++++	++++	++++	+++	+++	+++	++	—	—	++	+	—
P00139		++++	++++	++++	++++	++++	+++	±	—	—	±	±	±
P00152		++++	++++	++++	++++	++++	+++	+	+	—	+	+	—
P00162		++++	++++	++++	++	++++	+	+	+	+	+++	++	+
P00166		++++	++++	++++	++	++	+	+	+	+	+	+	—
P00167		++++	++++	++++	+++	+++	+++	±	±	±	±	—	—
P00206		++++	++++	+++	++++	+++	+++	±	±	—	±	—	—
P00207		++++	++++	+++	++	++	++	±	±	±	±	—	—
P00208		++++	++++	++++	++++	++++	++++	+	±	±	±	—	—
P00209		++++	++++	++++	++	++	++	+++	++	++	++++	+++	+++
P00211		++++	++++	++++	+++	+++	+++	±	±	±	+	+	+

++++, +++, ++, +, ±, —, 为启开菌种后,菌种在 10% 羊血琼脂斜面培养基上生长结果

表 3 五种不同保护剂对肺炎链球菌冻干效果的比较

菌号	保护剂 干后 检查	脱纤维羊血加肉 浸液			6% 羊血肉浸液			脱脂鲜牛乳加 脱纤维羊血			健康兔血清			1% 明胶 5% 蔗糖		
		干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年	干后	干后 1月	干后 半年
P00150		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
P00165		+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	++++	+++	+++	—	—	—
P00212		++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—

++++, +++, ++, +, ±, —, 含意同表 2

月及半年则大都死亡。

表 3 表示 5 种保护剂对 3 株地方菌种冻干后半效果比较。结果表明: 5 种保护剂中 4 种含血或血清者保护效果都较好, 冻干后半启开, 菌种接种在 10% 羊血琼脂斜面上都能呈菌苔生长, 而 1% 明胶 5% 蔗糖保护剂对肺炎链球菌无保护作用, 冻干后立即检查, 3 株菌全部死亡。

讨 论

肺炎球菌在普通培养基上不能生长, 只在含血液或血清等培养基上生长良好, 实验证明把肺炎链球菌直接接种在脱纤维羊血中, 不仅能够生长, 而且能在 4℃ 冰箱中保存 3 个月仍能存活, 并不影响其特性和抗原性。一般实验

室在三个月内保存菌种可采用新鲜脱纤维羊血, 既节省人力和培养基又能保证菌种的存活。用这种方法收集菌种可放在安瓿中邮寄。但由于肺炎链球菌能产生自身溶菌酶, 故在这类培养基上不宜更长期的保存菌种。目前更长期地保存菌种常采用深低温方法及冷冻干燥方法^[2,3]。冷冻干燥需要选择适宜的保护剂^[2], 这是冻干成功与否的重要环节。在冻干菌种中常用的保护剂有脱脂牛乳, 脱脂乳粉制剂及蔗糖明胶等, 而这些保护剂对冻干肺炎链球菌的效果较差。在选择保护剂的试验中发现, 凡含有血液者保护效果较好, 冻干后菌种的活菌数较高。用健康兔血清做保护剂外观较好, 并易溶解, 但需将菌种接种在血斜面培养基上, 培养后刮入保护剂, 制成菌悬液再冻干, 肺炎链球菌在

固体培养基上产量很低,因此需要大量培养基且操作烦琐易污染。6% 羊血加肉浸液做保护剂时,培养后需活菌离心,较烦琐。脱纤维羊血肉浸液是冻干肺炎链球菌理想的保护剂,能节省大量培养基,操作十分简便,且不易污染。迄今我们已用脱纤维羊血肉水保护剂冻干菌种200多株,干后启开全部呈菌苔生长。但该保

护剂的唯一缺点是溶解较差,有待进一步研究改进。

参 考 文 献

- [1] Mufsou, M. A.: *JAMA*, 246: 1942—1948, 1981.
- [2] 森地敏树,根井外喜男:冻结干燥和保护物质,东京大学出版社,1972.
- [3] 根井外喜男:微生物保存法,东京大学出版社,1977.