

支原体新培养基的效果观察

任桂珍 郭章溉 张佳杰 袁 林 曹玉璞

(首都儿科研究所, 北京)

摘要 既往常规使用的支原体培养基主要成份为盐酸消化猪胃豚, 牛肉浸液, 马血清及酵母浸液。近几年采用猪肺消化液代替猪胃豚和牛肉浸液, 卵黄液代替马血清组成新培养基。用上述两种培养基对四种支原体进行多次定性和定量的生长效果对照观察。结果表明新培养基的培养效果与常规培养基一致, 而且较常规培养基来源方便, 价格便宜。用新培养基制备的抗原质量更为理想。

关键词 支原体培养基

常规使用的支原体培养基主要成份是盐酸消化猪胃豚, 牛肉浸液, 马血清及酵母浸液^[1]。该培养基材料来源不便, 价格较贵。自 1985 年我们采用猪肺消化液代替猪胃豚和牛肉浸液, 卵黄液代替马血清组成新培养基, 并用人肺炎支原体、口腔型支原体、唾液型支原体及人型支原体四种支原体标准株和人肺炎支原体 82 地方株, 在上述新培养基中观察生长效果, 以常规培养基为对照, 经多次重复试验, 取得良好的效果。现将其方法和结果报告如下:

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 支原体标准株: 肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*) FH 株, 口腔型支原体 (*M. orale*), 唾液型支原体 (*M. salivarium*), 人型支原体 (*M. hominis*)。

2. 支原体地方株: 人肺炎支原体 82 (1979 年本室用常规培养基自一溶血性贫血患儿的咽拭子分离, 经鉴定为典型人肺炎支原体地方株)。

(二) 酵母浸液

鲜酵母 500g, 加蒸馏水 1500ml 充分搅拌溶解, 80—90℃ 水浴中浸提 20 分钟。冷却后 7000—8000r/min 离心 20 分钟, 取上清用 450nm 滤膜除菌过滤后分装, 放 -20℃ 保存。

(三) 猪肺消化液

鲜猪肺 250g, 加蒸馏水 1000ml, 浓 HCl 2ml, 胃蛋白酶 2g。56℃ 水浴中消化 15 小时, 沸水浴中 10 分钟终止消化。消化液用脱脂棉过滤。加蛋白胨 10g, Tris 1g, 以 40% NaOH 调至 pH7.8, 沸水浴 15 分钟, 冷却后滤纸过滤, 15 磅高压灭菌后 4℃ 保存。

(四) 卵黄液

鲜鸡蛋洗净, 75% 酒精浸泡 15 分钟, 无菌操作取出卵黄, 放入有玻璃珠的灭菌烧瓶中, 摇成匀浆。以 pH7.8 Tris 缓冲液配成 20% V/V 悬液。8000r/min 离心 1 小时, 取上清加青霉素 500u/ml, 经培养无菌生长, 分装 4℃ 保存。

(五) 培养基组成

1. 常规培养基: 盐酸消化猪胃豚和牛肉浸液添加 10% 马血清, 10% 酵母浸液, 1% 葡萄糖或 0.1% 精氨酸(人肺炎支原体加葡萄糖, 其他型支原体加精氨酸), 500u/ml 青霉素及 0.002% 酚红。

2. 新培养基: 猪肺消化液, 加 10% 卵黄液, 10% 酵母浸液, 1% 葡萄糖或 0.1% 精氨酸, 500u/ml 青霉素及 0.002% 酚红。

(六) 定性试验

每种培养基分别以 3ml/管装入小试管中, 每种菌液经反复传代, 生长稳定后测 ccu/ml (每

ml 支原体的颜色改变单位)用液体培养基配成 ccu/ml 为 10^{-5} /ml 的试验菌液,各取 0.3ml 分别接种在上述培养基中,于 37℃ 孵育 3—4 天,判断结果。由于支原体生长时,分解葡萄糖或精氨酸,使培养基 pH 改变,呈现不同颜色变化。按其颜色变化判断支原体生长情况。

“-”培养基不变色,无支原体生长。

“+”培养基轻度变色,有支原体生长。

“++”培养基明显变色,支原体生长良好。

“+++”培养基显著变色,支原体生长旺盛。

(七) 定量试验

用肺炎支原体标准株和地方株 82,在常规培养基和新培养基中进行定量试验。具体作法是取两种培养基各以每管 3ml 的量分别装入小试管中,然后把支原体 FH 和 82 株菌液以 0.3 ml/管,分别接种两种培养基中,共 4 个组,每组 6 管,37℃ 孵育。在第 2、4、6、8、10、12 天时,每组各取出一管,置 -20℃ 冻存。待 12 天以后,将冻存 24 管菌液全部取出。每管取 0.1ml 转种到 0.9ml 液体培养基中,将此 10^{-1} 的菌液 10 倍系列稀释到相应培养基中至 10^{-8} ,37℃ 孵育。每天观察结果,在观察到第 14 天,培养基颜色改变“++”,说明支原体良好生长的最高菌液稀释度,作为该株支原体的颜色改变单位(ccu)。

结果和讨论

(一) 定性试验

以液体培养基将人肺炎支原体、口腔型支原体、唾液型支原体和人型支原体的菌液浓度分别配制为 10^{-5} /ml,接种在常规培养基和新培养基上,共进行了 47 次定性试验,在两种培养基上呈现“++”以上生长者为 45 次,占总试验次数的 95%,表明四种支原体在常规培养基和新培养基中生长良好(表 1)。

(二) 定量试验

用人肺炎支原体 FH 和 82 株,进行四次定量生长试验。将两种培养基接种两种菌液分为四个组,每组 6 管,培养不同天数,冻存后,统一测定 ccu,结果经统计学处理,两株支原体在两

表 1 四种支原体在常规培养基和新培养基中生长的定性试验结果

菌种	试验次数	常规培养基(次)				新培养基(次)			
		++	++	+	-	+++	++	+	-
人肺炎支原体	19	8	11			7	10	1	1
口腔型支原体	8	4	3	1		5	3		
唾液型支原体	10	5	4	1		4	6		
人型支原体	10	5	5			7	3		

表 2 肺炎支原体 FH 和 82 菌株的定量生长试验结果

培养 (天数)	FH 菌株 ccu (10^4 /ml)				82 菌株 ccu (10^4 /ml)			
	常规培养基		新培养基		常规培养基		新培养基	
	1	2	3	4	1	2	3	4
2	5	6	6	5	4	6	6	3
4	5	7	6	6	5	6	6	5
6	7	3	6	6	5	6	2	8
8	6	5	7	4	7	6	6	4
10	1	1	6		5	1	4	
12	1	1	1		4	1	1	

种培养基中生长效果无明显差异,差数秩和检验 $P > 0.10$ (表 2)。

支原体,特别是人肺炎支原体的营养要求较高,需要供给其不能自身合成的胆固醇和长链脂肪酸才能生长。国外培养支原体,一般采用 PPLO 肉汤添加马血清的培养基。我室使用猪胃脘和牛肉浸液添加酵母浸液和马血清作为常规培养基,效果良好。但随着支原体血清学工作的深入开展,需要制备大量支原体抗原。常规培养基中所需新鲜猪胃,质量不易保证,购买不方便,马血清来源又较困难,价格较贵。据国外报道卵黄液是代替马血清的理想材料^[2,3]。本室又以猪肺消化液加卵黄液为主要成份,组成了新培养基,代替常规培养基,反复进行了定性和定量的生长试验,结果表明,在定性和定量生长试验中新培养基和常规培养基均能使四种支原体良好生长。而且新培养基还具有很多优点:(1)价格便宜,卵黄液价格为马血清价格的 1/80;猪肺消化液比猪胃脘和牛肉浸液价格也

便宜。(2)材料来源方便,质量易保证。(3)卵黄液所含总胆固醇和游离胆固醇量均比马血清高,而蛋白质含量远低于马血清,因而新培养基还能改善由支原体吸附马血清中蛋白质产生的支原体抗原的非特异性。总之,我们认为新的支原体培养基可以代替常规培养基,用于分离支原体病原和实验室制备支原体抗原。

参 考 文 献

- [1] 曹玉璞等: 中华儿科杂志, 21(3): 150, 1983,
- [2] Tsuguo Sasaki, et al: *Microbiol. Immunol* 29 (6):499, 1985.
- [3] Tsuguo Sasaki, et al: *J. Clin. Microbiol* 18(5): 1167, 1983.