

幽门螺杆菌的保藏

王同展 潘跃舜 崔树玉 杨剑影 金肇英

(山东省卫生防疫站, 济南 250014)

摘要 常规法、冻干法保存幽门螺杆菌极为困难。兔全血或 199 加 50% 胎牛血清, 于 -70℃ 条件下保存幽门螺杆菌新鲜培养物, 存活期可达 6—22 个月。

关键词 幽门螺杆菌, 保藏

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 是近年来认识的人类慢性活动性胃炎(B 型胃炎)及胃、十二指肠溃疡的致病菌^[1,2]。我们自 1986 年成功地分离、培养出幽门螺杆菌以来, 对其主要性状进行了研究, 并对其难以解决的保藏问题进行了探讨, 摸索出兔全血、199 加 50% 胎牛血清, 可作为幽门螺杆菌较长期、可靠的保藏方法。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

幽门螺杆菌标准菌株 NCTC11637 由英国国立菌种保藏中心欧文教授惠赠; 幽门螺杆菌 SD9、70、78、81 均由本实验室分离、鉴定、保存, 并经中国药品生物制品检定所复核。

1.2 分离、培养幽门螺杆菌 Skirrow 血平板

参照文献[3]的方法制备, 具体在 200ml 基础培养基 (蛋白胨 15g/L, 胰蛋白胨 2.5g/L, 酵母浸膏 5g/L, NaCl 5g/L, 琼脂 15g/L) 中, 加脱纤维羊血 20ml, TMP 1.0mg, 万古霉素 2.0mg, 多粘菌素 0.5mg, 摇匀后倾注平皿。

1.3 培养幽门螺杆菌微氧环境的制备

采用上海第一医科大学研制的微氧袋。

1.4 保藏培养基

1.4.1 兔全血培养基: 无菌抽取健康兔动脉血液, 肝素抗凝, 分装 1.5ml 无菌离心管中, 每管约 1.0ml 备用。

1.4.2 199 培养基: 称取用于细胞培养的基础

培养基 199 (日水制药株式会社) 干粉 1.0g, 溶解于 100ml 蒸馏水中, 121℃ 15min, 冷却至室温后, 加 50% (V/V) 胎牛血清, 混匀分装, 1.0ml/管备用。

1.4.3 布氏肉汤 (山东省卫生防疫站培养基室生产), 按使用说明制做, 高压消毒后分装备用。

1.5 方法

1.5.1 菌种保藏: 将各菌株均接种三种不同的保存培养基, 接菌时无菌操作取 48h 幽门螺杆菌新鲜培养物 2 菌环, 置 1.0ml 保存培养基中, 封口。各菌株每种培养基的保存管各分三组, 分别置 4℃、-30℃、-70℃ 条件下存放。

1.5.2 抽样: 将各菌三种培养基、三个温度条件下的保存管, 按 7d、15d、30d、90d 及以后每隔 3 个月随机抽样一次, 各取 4 管, 平行观察。

1.5.3 结果判定: 将抽取的保存管, 置 37℃ 水浴中融化, 无菌操作, 用棉棒沾取保藏菌液, 涂布于 Skirrow 平板上, 立即于微氧袋中, 37℃ 培养, 观察有无幽门螺杆菌生长。培养 7d 后仍无幽门螺杆菌生长的判定为阴性。

2 结果

实验表明, 保存温度越低, 保存幽门螺杆菌效果越好。实验的 3 个温度, 以 -70℃ 最好, 保存时间兔全血培养基保藏的 5 株幽门螺杆菌, 保存最长时间 22 个月 (2 株), 最短 8 个月 (1 株), 全部存活, 平均为 15 个月。199 培养基保

1994-06-03 收稿

藏的5株幽门螺杆菌,最长时间20个月(2株),最短6个月(1株),平均13个月(表1)。各保存管分离培养物的主要生物学特点:形态染色、

尿素酶试验、氧化酶试验、马尿酸盐水解试验等反应结果,均与原保存的幽门螺杆菌一致。

表1 幽门螺杆菌在不同条件下的保存时间

培养基	兔全血			199			布氏肉汤		
	4℃	-30℃	-70℃	4℃	-30℃	-70℃	4℃	-30℃	-70℃
平均保存时间(d)	30	390	450	20	270	390	4	22	60

3 讨论

R. J. Owen^[4]报道冻干法用于幽门螺杆菌的保藏极为困难,尽管对保藏培养基进行了改良,但冻干后幽门螺杆菌存活率仍然很低;布氏肉汤法4℃幽门螺杆菌存活时间平均为4天,-70℃保存2个月仍不理想。Drumm^[5]等对布氏肉汤法进行改进,将幽门螺杆菌在含有胎牛血清的布氏肉汤中培养24h后,再补加10%胎牛血清及10%甘油,-70℃存放可达6个月以上。但由于保藏前增殖,增加了污染

的可能性。兔全血、199保存法均取材方便、操作简便,保存期较长,适于基层实验室应用。

参 考 文 献

- [1] J R. Warren, B J Marshall. *Lancet*, 1983, 1:1273.
- [2] 潘跃舜,王同展,崔树玉,等. *中国公共卫生学报*, 1990, 3: 159.
- [3] 何晓青. *卫生防疫细菌检验*, 江西:新华出版社, 1989, 756.
- [4] R J Owen, SLW On, M Costas. *J Applied Bacteriol*, 1989, 66.
- [5] B Drumm, P Sherman. *J Clin Microbiol*, 1989, 27: 1655.