

幽门螺杆菌菌株存活能力及常温传递方法

□ 张建中¹ 蒋秀高¹ 陈晶晶¹ 孙兆军¹ 盛涛¹ 李志芳²

△

R573

R378.2

Storage and transportation of *Helicobacter pylori* at room temperature

ZHANG Jian-Zhong¹, JIANG Xiu-Gao¹, CHEN Jing-Jing¹, SUN Zhao-Jun¹, SHENG Tao¹ and LI Zhi-Fang²

¹Diarrhea Disease Lab, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Beijing 102206, China

²Huashan Hospital, Shanghai Medical University, Shanghai 200040, China

Subject headings *Helicobacter pylori*; bacterial storage; bacterial transportation

Abstract

AIM To establish an easy and useful transporting method of *H. pylori* isolates.

METHODS Three newly cultured *H. pylori* strains (NCTC 11637, NCTC11639 and CAPMN62) were suspended with *H. pylori* storage solution (containing 100 g/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum) to 10¹¹ cfu/L, put into 1.5 mL bottles in half and full amount respectively and airtight. All bottles were placed under 37°C condition, and inoculated into culture media (Brucella agar with 100 mL/L sheep blood) after 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144 and 168 hours respectively. The *H. pylori* growth was observed 3 days after culture at microaerophilic environment (100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂ and 850 mL/L N₂). On the other hand, a bottle of *H. pylori* (NCTC 11637 strain, 10¹⁵ cfu/L) was transported by express mail service (EMS) from Beijing to Shanghai (room temperature 20°C - 34°C). The organism was subcultured immediately after arrival and at various interval.

RESULTS At 37°C, *H. pylori* can survive at least 72 hours, and addition of full amount of storage solution can prolong the survival of Hp significantly. At room temperature (20°C - 34°C), the *H. pylori* well survived after EMS transportation and in the period of 55 hours.

CONCLUSION With *H. pylori* storage solution (100 g/L sucrose and 500 mL/L new bovine serum), *H. pylori* isolates can be transported by EMS under room temperature successfully, and it is suitable for all hospitals and labs in our country.

主题词 螺杆菌, 幽门; 细菌保存; 细菌传递
中国图书资料分类号 R 573

摘要

目的 观察幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)在常温保存液中的存活能力及影响因素,通过实际菌株传递实验,为我国 Hp 菌株库建立中各地 Hp 的收集和供应,提供切实可行的菌株传递方案。

方法 取新鲜培养 3 d 的 Hp 3 株(NCTC 11637、NCTC11639 和 CAPMN62),用 Hp 保存液(含 10 g/L 蔗糖,500 mL/L 小牛血清)作成 10¹¹ cfu/L 浓度的菌悬液,分别以满管和半管形式装于 1.5 mL 灭菌小管中,经密封后放于 37°C 恒温箱中,于 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96, 120, 144, 和 168 h,按每种各取出一管,接种双份平皿(100 mL/L 羊血布氏琼脂)后,于微需氧环境培养 3 d 后观察细菌生长情况。另外,将一满管 10¹⁵ cfu/L 浓度的 Hp 用特快专递(EMS)自北京传送到上海,收到后马上进行接种,并连续观察传递管中菌株在不同时间内的存活情况。

结果 在 37°C 保存液中 Hp 至少可存活 72 h,保存管中通过加满保存液减少空气残留,能明显延长 Hp 的存活时间;在气温 20°C - 34°C 条件下,经 EMS 实际传递的菌株存活良好,且在传递到达后可继续存活至 55 h。

结论 使用含 10% 蔗糖的 50% 小牛血清细菌传递保护液,在常温下通过 EMS 进行国内 Hp 的菌株传递能满足我国各地菌株传递的需要,可被全国 Hp 菌株库采用。

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)感染与慢性胃炎、消化性溃疡和胃癌的关系日益受到国内外的关注,为深入开展 Hp 相关性研究工作,需建立一种简便易行的菌株传递方法。我们对多年来开展的菌株传递方法进行简单总结,并将一种比较满意的传递方法介绍给大家。

1 材料和方法

1.1 材料 菌株:实验采用 NCTC 11637, NCTC11639 和 CAPMN62 三株 Hp,其中 NCTC 11637 和 NCTC11639 为国际标准菌株,CAPMN62 为国内分离株,实验前均经系统鉴定。保存液配制:用蒸馏水配制 200 g/L 的蔗糖溶液,经 115°C,30min 灭菌后,将蔗糖溶液与经灭活的小牛血清按 1:1 比例混合即成为本实验所用菌株保存液,保存液平时可置普通

¹ 中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所腹泻病研究室 102206

² 上海医科大学华山医院消化内科 上海市 200040

张建中,男,1964-01-05 生,山东省东营市人,汉族。1984 年山东医科大学医学系毕业,1992 年中国预防医学科学院硕士,副主任,副研究员,主要从事幽门螺杆菌相关研究,承担全国幽门螺杆菌协作组菌株库的构建和管理工作。

通讯作者:张建中,102206,中国预防医学科学院流行病学微生物学研究所腹泻病研究室,北京市昌平区磁学 5 号 02 室

Correspondence to Dr. ZHANG Jian-Zhong, Institute of Epidemiology and Microbiology, Chinese Academy of Preventive Medicine, Changping, Beijing 102206, P. O. Box 5, China

Tel: +86-10-61739456, Fax: +86-10-61739450

E-mail: Helico@public.bta.net.cn

收稿日期:1998-07-06

冰箱冷冻备用。

1.2 方法 将三株实验用菌分别接种含100 mL/L羊血的布氏琼脂平板后,置37℃混合气体(100 mL/L CO₂, 50 mL/L O₂ 和850 mL/L N₂)环境培养。取新鲜培养3 d的 Hp,用保存液(含100 g/L蔗糖,500 mL/L小牛血清)作成10¹³ cfu/L的菌悬液,分别用满管和半管保存液量装于1.5 mL灭菌小管中,经密封后放于37℃恒温箱中,于12,24,36,48,60,72,96,120,144和168 h,按每种保存量各取出一管,接种双份平皿(100 mL/L羊血布氏琼脂)后,于微需氧环境培养3 d后观察细菌生长情况。另外,将一满管10¹³ cfu/L浓度的 Hp用特快专递(EMS)自北京传送到上海(上海医科大学华山医院),收到后马上进行接种,并连续观察传递管中菌株在不同时间内的存活情况。

2 结果

在气温20℃~34℃条件下,经邮政特快专递(express mail service, EMS)传递的菌株存活良好,且在传递到达后可继续存活至55 h。在37℃保存液中不同条件下的存活情况见表1。

表1 Hp在37℃保存液中的存活能力

菌株号	保存液满度	不同时间(h)存活情况										
		12	24	36	48	60	72	96	120	144	168	
NCTC11637	满管	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	
NCTC11637	半管	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	
NCTC11639	满管	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
NCTC11639	半管	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	
CAPM N62	满管	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	
CAPM N62	半管	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	

+ 细菌存活, - 无活菌存在

3 讨论

目前进行菌株传递的方法主要有冻干菌株传递、冷冻菌株传递和培养平皿(或培养小瓶)传递等几种方案¹⁻³¹。冻干菌株传递常被用来进行国际菌株传递,因冻干菌株可在室温条件下存活若干年,已被各国科

研机构广泛采用,但菌株冻干(特别是 Hp 菌株的冻干)程序较繁琐,要求技术较高,要对国内大量用户采用冻干菌株供应存在一定困难,同时,因需冻干设备,此方案不适合各地向菌株库传送菌株。鉴于以上情况,在近5 a内,我们更多地采用了冷冻菌株传递方法,这种方法对菌株库的压力较小,已有几十家医院、大学和科研机构从菌株库成功获得菌株,但此方法一般需专人传递,而且在传递中要保持菌株一直处于冷冻状态,因而时有传递失败的情况发生。

我们在进行耗时较长的药敏实验中发现, Hp 在布氏肉汤中能存活较长时间,但有研究资料表明, Hp 在盐水、Stuart 传送培养基、含200 mL/L甘油的布氏汤、含170 mL/L甘油的脱脂牛奶中,室温6 h后活菌数即明显下降。一般认为在最适保存液中,4℃至室温环境只能存活5 h~48 h⁴⁻⁸。我们在实验中对 Hp 在以小牛血清蔗糖为主的保存液中的存活能力进行了观察,发现至少3 d的存活能力已能利用遍布各地特快专递系统(EMS)进行有效传递;对此,我们在北京-上海间进行的实地传递实验也获得了成功。本实验表明,使用液体保护液,在常温下通过 EMS 进行国内 Hp 的菌株传递能满足我国各地菌株传递的需要,此方法简单、实用,可被全国 Hp 菌株库及各临床、科研单位采用。

4 参考文献

- Xia HX, Keane CT, Chen JJ, Zhang JZ, Walsh EJ, Moran AP *et al*. Transportation of *Helicobacter pylori* culture by optical system. *J Clin Microbiol*, 1994;32(12):3075-3077
- Xia HX, Keane CT, O'Moran CA. Determination of the optimal transport system for *Helicobacter pylori* culture. *J Med Microbiol*, 1993;34(2):334-337
- Har SW, Flanzy R, Hachem CY, Kim HY, Claridge JE, Evans DG *et al*. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. *Fun J Clin Microbiol Infect Dis*, 1995;14(4):349-352
- Goodman CS, Blumow ED, Warren JR, Waters TE, Sanders CR, Easton L. Evaluation of cultural techniques for isolating *Campylobacter pyloridis* from endoscopic biopsies of gastric mucosa. *J Clin Pathol*, 1985;38(10):1127-1131
- Humphreys H, Bourke S, Dooley C, McKenna D, Power B, Keane CT *et al*. Effect of treatment on *Campylobacter pylori* in peptic disease: a randomized prospective trial. *Lancet*, 1988;29(3):279-283
- Megraud F, Bennet F, Garnier M, Lamoultie H. Characterization of "*Campylobacter pyloridis*" by culture, enzymatic profiles, and protein content. *J Clin Microbiol*, 1985;22(6):1007-1010
- Quattrone DMM, Mendes EN, Rocha GA. Indicator medium for isolation of *Campylobacter pylori*. *J Clin Microbiol*, 1987;25(12):2378-2379
- Soltes V, Zeeberg B, Wadstrom T. Optimal survival of *Helicobacter pylori* under various transport conditions. *J Clin Microbiol*, 1992;30(6):1453-1456