

# 采用改良的克氏双糖铁琼脂培养基从漱口液中 分离幽门螺杆菌的实验探索<sup>①</sup>

黄干荣, 陈玉礼, 韦红玉, 刘宁, 覃艳春, 唐华英, 黄衍强, 赵丽娟, 李晓华<sup>②</sup>

(右江民族医学院桂西微生物感染重点实验室培育基地, 广西 百色 533000)

E-mail: 1032212879@qq.com

**摘要:** **目的** 探索高效、简捷、方便、低廉的方法从人群漱口液中分离幽门螺杆菌。**方法** 被检者用生理盐水漱口, 回收漱口液, 离心, 弃上清液, 取沉淀物置脑心浸液培养基增菌培养。取菌液到改良的克氏双糖铁琼脂培养基中分离培养, 挑取变红的菌落进行纯培养。对纯培养物进行染色检查和生化鉴定。**结果** 漱口液中分离培养获得的纯培养物为幽门螺杆菌。**结论** 用改良的克氏双糖铁琼脂培养基能比较快速准确地分离出漱口液中的幽门螺杆菌。

**关键词:** 幽门螺杆菌; 漱口液; 分离培养; 鉴定

**中图分类号:** R377 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-5817(2017)01-0045-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-5817.2017.01.014

## Modified Kligler Iron Agar medium culture in isolation *Helicobacter pylori* from human mouth washing

Huang Ganrong, Chen Yuli, Wei Hongyu, Liu Ning, Qin Yanchun, Tang Huaying,  
Huang Yanqiang, Zhao Lijuan, Li Xiaohua

(Western Guangxi Key Laboratory of Microorganism Infection, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China E-mail: 1032212879@qq.com)

**Abstract:** **Objective** To explore an efficient, simple, convenient, inexpensive method for isolating *Helicobacter pylori* from human mouth washing. **Methods** The participants used normal saline to rinse mouth, then their washing solution was collected and centrifugated, and the supernatant was removed. Then the sedimentation was put into brain heart infusion broth for enrichment culture. The bacterial fluid was put into the modified Kligler Iron Agar medium culture for isolation and culture, and the red cell colonies were selected for pure culture. Staining examination and biochemical identification were performed for the pure cultures. **Results** The isolated pure cultures obtained from human mouth washing were *Helicobacter pylori*. **Conclusion**

*Helicobacter pylori* can be quickly and accurately isolated from the human mouth washing by the modified Kligler Iron Agar medium.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; mouth washing; isolated culture; identification

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是一种螺旋形、革兰氏(Gram)染色阴性、微需氧菌,研究表明Hp感染是胃癌、胃炎、消化性溃疡等疾病的主要病

因<sup>[1]</sup>。胃是Hp的最主要储存库,然而有一些研究表明,唾液、菌斑、义齿上也能够检测出Hp,并且与胃内的Hp具有相近的形态、生化及免疫学特征<sup>[2]</sup>。一些

① **基金项目:** 广西重点学科(病原生物学)[[2013]16]; 广西重点实验室培育基地[桂教科研[2014]6]; 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 1598025-33); 国家自然科学基金项目(31460023); 广西自然科学基金项目(2014GXNSFAA118206); 2013年广西高校科学技术研究项目(2013YB186); 2015年广西高校科学技术研究项目(KY2015ZD091)

② **通信作者:** E-mail: 2672985346@qq.com

学者认为口腔中的 Hp 是胃部 Hp 感染的重要储存库,可能引起胃内 Hp 的再次感染<sup>[3-4]</sup>。于是从口腔中分离 Hp 进行病因学研究是基本的研究思路,但是口腔中微生物种类多,而且很多细菌和 Hp 特征非常相似,如何能够快速排除其它微生物而获得 Hp 的方法值得探讨。本文介绍一种简便的 Hp 菌株分离培养的方法。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 人群选择:在桂西北长寿地区巴马、东兰人群居住较密集的三个自然村(甲篆村、坡月村、武篆镇)的人群,采集这些人群唾液测定 Hp 的感染情况。被检者 1 h 前未服用任何食物和药物。标本采集方法:被检者用 10 ml 生理盐水漱口,回收 2~5 ml 到无菌塑料试管中,3500 r/min 离心 5 min,弃上清液,备用。

1.2 药品与试剂 脑心浸液培养基,克氏双糖铁培养基(杭州天和微生物试剂有限公司,生产批号:140508),幽门螺杆菌选择性添加剂,马血清,幽门螺杆菌检测试剂盒(三明市贝真生物科技有限公司,生产批号:20160401),氧化酶试纸(杭州滨和微生物有限公司),琼脂粉(杭州天和微生物试剂有限公司,生产批号:140508)革兰氏染色试剂盒(珠海贝索生物技术有限公司,生产批号:414081)。

### 1.3 培养基配制

1.3.1 脑心浸液培养基按照说明书配制。

1.3.2 改良的克氏双糖铁琼脂培养基的配制 称取 19.75 g 克氏双糖铁和 1.2 g 琼脂粉,在 500 ml 蒸馏水中,煮沸至完全溶解,121 ℃ 高压灭菌 15 min,取出自然冷却至 50 ℃,加入 4 ml 幽门螺杆菌选择添加剂(两性霉素 B 10 mg/L,万古霉素 10 mg/L,甲氧苄啶(TMP) 5 mg/L,多黏菌素 B 0.38 mg/L),再加入 35 ml 马血清,混匀后浇平板。

### 1.4 分离培养

1.4.1 选择性增菌培养 取漱口液离心沉淀物 50 μl 放置加有选择性添加剂的脑心浸液培养基培养 2~4 d。

1.4.2 克氏双糖铁琼脂培养基分离培养 从脑心浸液培养基中取 20 μl 滴到克氏双糖铁琼脂培养基中用接种环连续划线,将接种好的平板置 37 ℃ 微需氧环境(85% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>)培养 3~5 d,用接种环取变红的部分进行分区划线,然后培养 3~5 d,再挑变红的菌落进行纯培养 3~5 d。

1.5 纯培养物鉴定 革兰氏染色法:取纯培养物,涂于载玻片上,并在火焰上固定,水洗,用龙胆紫染色液染色 1 min,水洗;滴加革兰碘液作用 1 min,水洗;滴加脱色酒精 30 s,水洗;滴加沙黄复染液,复染 1 min,待

干,镜检。观察被染菌株的颜色:紫色为革兰氏阳性菌,红色为革兰氏阴性菌。幽门螺杆菌快速检测法(尿素酶法):取出微孔药条,滴加 1~2 滴反应液至药膜完全溶解(呈黄或亮黄色),用已灭菌的牙签挑取胃镜取出培养的菌株置于药液中,在 25 ℃ 条件下孵育,5 min 后观察结果:红色或紫色为阳性;黄色或亮黄色为阴性。氧化酶试纸法:用牙签挑取少量培养的细菌于载玻片上,滴 1 滴纯化水并用接种环搅拌使其均匀散开,然后用牙签蘸取菌液涂于氧化酶试纸表面,3 min 内观察试纸颜色变化:红色为阳性;不变色为阴性。过氧化氢酶法:用牙签挑取少量细菌于载玻片上,滴加 3% 过氧化氢溶液 1 滴,30 s 内观察是否产生气泡:产生气泡为阳性,不产生气泡为阴性。

## 2 实验结果

2.1 分离培养结果 ①经改良的克氏双糖铁琼脂培养基培养:第一次在改良的克氏双糖铁琼脂培养基培养见图 1,有完全变红的培养基、黑和红混合的培养基、完全变黄的培养基。②第二次分离培养:挑选第一次培养培养基变红的部分的菌进行三区划线分离培养,结果见图 2,克氏双糖培养基出现一些变红的菌落。③纯培养结果:挑选分离培养后这些变红的菌落进行纯培养,结果见图 3,培养基变红,出现无色透明露滴状的菌落。④标准菌株用克氏双糖铁培养基培养:用改良的 KIA 培养基培养 26695 标准菌见图 4。

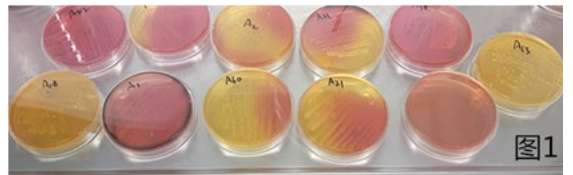


图 1 第一次在改良的克氏双糖铁琼脂培养基培养的菌落生长情况



图 2 第二次在改良的克氏双糖铁琼脂培养基培养的菌落生长情况



图 3 在改良的克氏双糖铁琼脂培养基纯培养的菌落生长情况



图 4 标准菌在改良的克氏双糖铁琼脂培养基生长情况

2.2 鉴定结果 将克氏双糖铁培养筛选的变红的菌和标准菌用快速革兰氏染色液染色,在油镜下放大 1000 倍下观察,都是革兰氏阴性,弯曲的弧状杆菌。克氏双糖铁培养筛选的变红的菌氧化酶试纸实验和尿素酶实验都变红色,筛选的变黄的菌均不变色。而在过氧化氢酶实验筛选出的变黄和变红的菌均是阳性,见图 5、图 6、图 7、图 8。

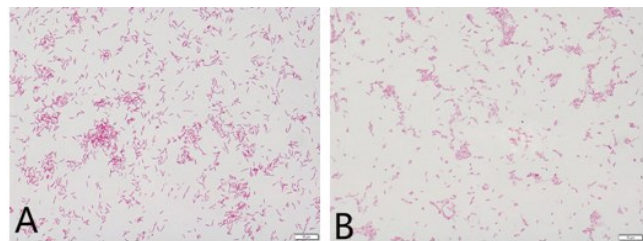


图 5 纯培养物革兰氏染色图

注:A 是标准菌株的染色;B 是克氏双糖铁琼脂变红的菌染色,放大倍数为 1000 倍



图 6 氧化酶鉴定

注:A 是标准菌株变红(+);B 是在克氏双糖铁琼脂培养基中变红的菌落(+);C 是在克氏双糖铁琼脂培养基中变黄的菌落(-)

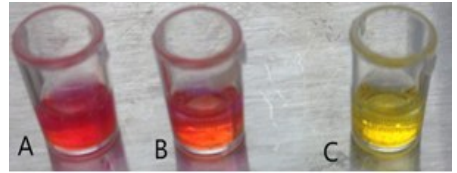


图 7 尿素酶结果

注:A 是标准菌株(+);B 是克氏双糖铁琼脂培养基变红的菌落(+);C 是克氏双糖铁琼脂培养基变黄的菌落(-)



图 8 过氧化氢酶实验结果

注:A 是标准菌株(+);B 是在克氏双糖铁琼脂培养基中变红的菌落(+);C 是在克氏双糖铁琼脂培养基中变黄的菌落(+)

以上鉴定中需同时符合尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶试验阳性,革兰氏染色为阴性,方可认定为 Hp,在克氏双糖铁培养基中培养变红的菌落尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶试验阳性,革兰氏染色为阴性符合 Hp 的鉴定标准,因此判定为 Hp,而在克氏双糖铁琼脂培养基中培养变黄的菌落不符合 Hp 的鉴定标准,故不是 Hp。

### 3 讨论

由于口腔中含有大量的各种微生物,要分离 Hp 非常困难,程序非常繁琐,周期很长。因此寻找一种高效、简捷、方便、低廉的方法从人群漱口液中分离 Hp 非常有必要。克氏双糖铁培养基含乳糖、葡萄糖、硫酸亚铁铵、硫代硫酸钠和酚红指示剂,并且乳糖的浓度是葡萄糖的 10 倍,细菌分解糖可产酸,使酚红指示剂变色,硫代硫酸钠可供给细菌产生硫化氢所需要的硫,铁盐可与硫化氢反应,生成黑色沉淀。Hp 只分解葡萄糖不分解乳糖,也不分解硫代硫酸钠,只产生少量的酸被氧化产生氨呈弱碱性,使培养基变成红色。故可以根据培养基的颜色看出是否含有 Hp,完成初筛,然后再分离培养,在挑菌落纯培养时,能根据培养基的颜色快速地分辨出是不是 Hp。这样大大的提高了分离培养的阳性率和准确率。

Hp 是一种对生长条件要求非常苛刻的细菌,比

一般的细菌难培养很多<sup>[5-6]</sup>，用改良的克氏双糖铁琼脂培养基培养从漱口液中分离培养 Hp 有以下优势：标本来源简便，不会给被检者带来痛苦；方法简单有效，成本低廉；能够通过颜色的变化快速完成筛选，为实验节省了时间。但是该实验也存在一些缺陷，如果唾液中含有较多的量菌，而添加剂并不能起到很好的抑制杂菌的作用，这会增加分离培养 Hp 的困难；另外，在初筛时，如果挑选的菌中没有 Hp，那么就不能分离培养出 Hp，出现假阴性，因此一定要多挑取几个红色位置的菌进行分离培养，避免假阴性结果。对比利弊，该方法值得应用推广，若能有针对性对唾液中一些杂菌做出耐药分析，这样添加敏感的抗生素，会大大地提高 Hp 分离培养的阳性率。

#### 参考文献：

- [1] DE BERNARD M, JOSEPHANS C. Pathogenesis of Helicobacter pylori infection [J]. Helicobacter, 2014, 19 (Suppl 1): 11-18.
- [2] 郭瑞. 口腔幽门螺杆菌的感染状况分析及检测方法比较 [D]. 兰州: 兰州大学, 2014.
- [3] 华江, 郑家驹, 王毓明, 等. PCR 检测胃黏膜和唾液中的幽门螺杆菌 [J]. 苏州大学学报: 医学版, 2005, 25(1): 88-89.
- [4] 王艳斌. 唾液及胃液中幽门螺杆菌 IgG 含量与胃癌及癌前病变关系的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2009.
- [5] 万学勤, 周鹏志, 马峰, 等. 烛缸法分离培养及冷冻法保存幽门螺杆菌 [J]. 佛山科学技术学院学报 (自然科学版), 2011, 29(5): 82-85.
- [6] 刘琳娜, 丁士刚, 张静, 等. 几种培养幽门螺杆菌方法的比较 [J]. 胃肠病学, 2012, 17(4): 240-241.

收稿日期: 2016-11-29; 修回日期: 2017-02-20

(上接第 44 页)

药共奏调和之效。方中诸药调和，体现“补肾不忘祛瘀，补泻兼施”的特点，从而标本兼治、扶正祛邪，有效治疗骨质疏松症。

本项目研究结果表明，督灸和补肾活血中药均能有效改善患者疼痛症状，证实了上述中医内、外治法的有效性。且相对督灸，中药组在改善疼痛方面表现更为突出，笔者分析，可能是因为在 1 个月的疗程中，每日一剂的中药内服相对数日一行的督灸外治更接近于饱和治疗。兼具两法优势的综合治疗表现出了更为优异的缓解疼痛效应，表明了内外共施的协同效应，且发挥出了单一疗法都没有的效果——改善生存质量。总之，本项目综合疗法以督灸为外部干预，直接靶向督脉和脊柱，综合补肾活血汤方的内部调理，内外兼治，共奏温肾壮阳、散寒通络之功，实现阴阳调和的整体效果。将该项目进一步规范、推广，有望为 PMOP 的治疗提供疗效确切、易于操作、风险可控、患者接受的方法，借此提高患者的生存质量。

#### 参考文献：

- [1] 杨霏, 秦开蓉, 范绮平, 等. 健康教育对绝经后骨质疏松症患者的影响 [J]. 中国康复, 2012, 27(4): 308-309.
- [2] 冯歆, 葛继荣. 中医从脾论治原发性骨质疏松症的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(8): 968-972.

- [3] 李金艳, 陈颖, 唐艳丽, 等. 针灸治疗骨质疏松症效应机制研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(3): 315-321.
- [4] 马伟, 牟慧琴, 马占洋. 绝经后骨质疏松症中医病因病机研究概况 [J]. 中医杂志, 2012, 53(13): 1152-1154.
- [5] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊治指南 (2011 年) [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2011, 4(1): 2-17.
- [6] 林海波, 李爱青, 刘春梅, 等. 督灸治疗脾肾阳虚型绝经后骨质疏松症患者腰背痛的临床观察 [J]. 中医临床研究, 2013, 5(13): 49-51.
- [7] 司长海, 张致得, 陈文君, 等. 绝经后骨质疏松症早期规范化治疗的研究 [J]. 中国医药科学, 2015, 5(12): 178-180.
- [8] 黄立莉, 洪文, 王立源, 等. 绝经后骨质疏松症的临床治疗进展 [J]. 中国医药导报, 2011, 8(18): 7-10.
- [9] 刘玉妮, 韦文合. 抗骨质疏松药物致肝损害 1 例 [J]. 右江民族医学院学报, 2014, 36(2): 164.
- [10] 唐开奖, 韦阳妙. 治疗骨质疏松症新药研究现状 [J]. 右江民族医学院学报, 2015, 37(4): 640-642.
- [11] 朱辉, 郑洪新. 读《千金要方》谈骨质疏松症中医病名 [J]. 吉林中医药, 2009, 29(10): 910-911.
- [12] 陈颖, 李金艳, 肖兵, 等. 骨质疏松症的针灸临床研究特点概述 [J]. 上海针灸杂志, 2014, 33(3): 274-277.
- [13] 余伯亮, 陈秋明, 李忠平, 等. 抗骨质疏松口服液治疗骨质疏松症疗效观察 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(6): 1334-1335.

收稿日期: 2016-12-15; 修回日期: 2017-02-01