

尿管软镜治疗青年嵌顿性输尿管上段结石效果观察[J]. 山东医药, 2016, 56(10): 80-81.

- [4] 韩志刚, 陈鑫, 刘晓东, 等. 微创经皮肾镜软镜激光碎石术治疗嵌顿性输尿管上段结石 68 例疗效分析[J]. 微创泌尿外科杂志, 2015, 4(5): 286-288.
- [5] 周先明, 疏仁义, 郭荣利, 等. 孤立肾输尿管结石急性梗阻伴感染的诊治策略[J]. 蚌埠医学院学报, 2016, 41(6): 757-759.
- [6] 史复, 侯垒, 崔功静, 等. 体外冲击波碎石治疗输尿管结石的影响因素分析[J]. 中国综合临床, 2016, 32(1): 76-79.
- [7] 徐章寿, 邵鹏, 李成, 等. 嵌顿性输尿管上段结石 3 种微创术式的疗效比较[J]. 现代中西医结合杂志, 2015, 24

(18): 1987-1989.

- [8] 兰海河, 夏勇, 魏秀丽, 等. 微通道经皮肾镜治疗输尿管上段结石与输尿管硬镜碎石效果比较[J]. 解放军医药杂志, 2016, 28(11): 76-79.
- [9] 林炜, 程曜杰, 奚雪滔, 等. 微创经皮肾镜取石术联合 II 期逆行输尿管软镜治疗复杂性肾结石的疗效观察[J]. 现代泌尿外科杂志, 2017, 22(8): 608-610.
- [10] 马子芳, 阳旭明, 资小龙, 等. 输尿管软镜在处理 Mini-PC-NL 术后残留结石的应用价值[J]. 中国内镜杂志, 2015, 21(7): 749-752.

(收稿日期: 2018-11-30 修回日期: 2019-01-22)

• 临床探讨 • DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 10. 029

幽门螺杆菌培养和鉴定方法探讨

毛德超¹, 王宁¹, 陶娅琳¹, 王峰², 包锐¹, 王星花¹, 冷丽¹, 钱龄蓉²

(曲靖市第二人民医院: 1. 医学检验科; 2. 内镜中心, 云南曲靖 655000)

摘要:目的 分析实验室培养和鉴定幽门螺杆菌(Hp)的效果。方法 按要求设置培养条件, 观察培养结果, 做 Hp 生化鉴定, 用 Hp 抗原检测试剂辅助鉴定。结果 Hp 在血琼脂平板、巧克力平板、哥伦比亚血琼脂平板上生长良好; 通过对 242 份 C¹⁴-尿素呼气试验(C¹⁴-UBT)阳性患者的胃黏膜标本进行培养, 分离出 101 株 Hp, 占 41. 74%; 男性患者分离出 41 株, 占男性患者的 45. 05%, 女性患者分离出 60 株, 占女性患者的 39. 74%, 男女性别比较, 差异无统计学意义(P>0. 05)。100~<500 dpm/mmol CO₂ 组与 500~<1 000 dpm/mmol CO₂ 组、1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 组、≥2 000 dpm/mmol CO₂ 组 HP 阳性结果比较, 差异均有统计学意义(χ²=25. 439、40. 992、39. 902, P=0. 000)。结论 Hp 在满足培养条件的情况下, 在血平板、巧克力平板、哥伦比亚血平板上生长良好, 可用抗原检测试剂辅助鉴定 Hp; 在培养阳性的患者中, 男女性别之间 Hp 的阳性率无明显差异。

关键词:幽门螺杆菌; C¹⁴-尿素呼气试验; 培养

中图法分类号:R446. 5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)10-1417-03

幽门螺杆菌(Hp)于 1983 年由澳大利亚病理学家从慢性活动性胃炎患者的胃黏膜中首次分离, 距今已快 40 年^[1]。但因其培养条件要求高, 培养过程繁琐, 培养时间长, 鉴定手段少等原因, 至今, 在我国各级医院还没有常规开展 Hp 培养。细菌培养作为诊断 Hp 感染的“金标准”^[2], 对 Hp 的耐药监测、流行病学调查及 Hp 感染的治疗等意义重大。本研究采用美国 Gene Science ANAERO MARK 多组分气体培养系统, 按照《全国临床检验操作规程》^[3]的要求进行 Hp 的培养, 对培养结果疑似为 Hp 的细菌用 Hp 抗原检测试剂进行辅助鉴定。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 4 月至 2018 年 1 月本院就诊的 C¹⁴-尿素呼气试验(C¹⁴-UBT)阳性(C¹⁴-UBT≥100 dpm/mmol CO₂)患者 242 例作为研究对象, 其中男 91 例, 年龄 13~69 岁; 女 151 例, 年龄 20~70 岁。经患者同意, 做胃镜时采集胃黏膜组织标本, 其中 C¹⁴-UBT 值为 100~<500 dpm/mmol CO₂ 者有 97 例, 13 例分离出 Hp; 500~<1 000 dpm/mmol CO₂ 者有 45

例, 24 例分离出 Hp, C¹⁴-UBT 为 1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 者有 55 例, 35 例分离出 Hp; C¹⁴-UBT 为 ≥2 000 dpm/mmol CO₂ 者有 44 例, 29 例分离出 Hp。

1.2 仪器与试剂 Hp 培养采用美国生产的 Gene Science ANAERO MARK 厌氧/低氧/二氧化碳多组分培养系统及培养罐; 多功能高效球磨仪购自五洲鼎创(北京)科技有限公司; 比浊仪和氧化酶试剂购自法国梅里埃生物公司; 培养箱购自美国 Thermo 公司。血琼脂平板、哥伦比亚血琼脂平板、巧克力血琼脂平板购自郑州安图生物工程有限公司。Hp 抗原检测试剂(胶体金法)购自上海凯创生物技术有限公司。脲酶试剂购自上海信裕生物科技有限公司。过氧化氢酶试剂、标准菌株(大肠埃希菌 ATCC25922)由云南省检验中心提供, 用于 Hp 抗原检测时作对照。

1.3 Hp 培养

1.3.1 标本采集 对 C¹⁴-UBT 阳性的患者, 由消化内镜中心医生在胃镜下采集胃黏膜组织标本, 放置在装有 2 mL 无菌生理盐水的无菌一次性使用塑料离心

管(5 mL)中,封闭管口,并在 1 h 内送检。

1.3.2 标本前处理 在生物安全柜中,将胃黏膜组织标本转移到装有 1 mL 无菌生理盐水和含有无菌钢珠的无菌塑料离心管中,通过多功能高效球磨机,将胃黏膜组织标本磨碎,备用。

1.3.3 标本接种和培养 用移液器吸取 100 μ L 制备好的胃黏膜组织标本,分别接种在血琼脂平板、哥伦比亚血琼脂平板、巧克力血琼脂平板上,将接种好的平板放置在培养罐里。通过 Gene Science ANAERO MARK 厌氧/低氧/二氧化碳多组分培养系统灌注所需气体,气体含量按《全国临床检验操作规程》^[3]的要求设置:7%氧气、10%二氧化碳、83%氮气,底部放置无菌纸巾,在纸巾上加入 20 mL 无菌蒸馏水,以保证培养时密封的培养罐内有充足的水分,从而保证罐内相对湿度>95%。将准备好的标本置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱进行培养,于 48 h 后第一次观察结果,后每隔一天观察一次,观察后继续培养需重新灌注气体。

1.4 Hp 鉴定

1.4.1 菌落观察 81.18% Hp(82/101)培养至第 3 天可观察到有针尖样大小细菌生长,少部分于第 3 天后才开始生长,6.93% Hp(7/101)于第 7 天才开始生长。Hp 在血琼脂平板、巧克力平板、哥伦比亚血琼脂平板上生长良好,初期为针尖样大小菌落,继续培养,可见无色或灰色、光滑,半透明细小菌落生长,大部分 Hp 培养至第 4 天或第 5 天,继续培养,菌落大小不再明显变化,继续培养至第 9~10 天,大部分标本可出现 β 溶血环。

1.4.2 显微镜下观察 选取培养至第 4 天的可疑菌落培养皿,在生物安全柜中挑取少量细菌涂于载玻片上,并在火焰上固定,水洗,革兰染色观察。

1.4.3 Hp 生化试验 脲酶试验:强阳性;氧化酶试验:阳性;过氧化氢酶试验:阳性。

1.4.4 Hp 抗原检测 取疑似 Hp 的菌落用生理盐水制备细菌悬液,吸取 150 μ L 悬液加入 Hp 抗原检测(胶体金法)的测试板中,按试剂说明书放置 15 min 后观察结果。当细菌悬液浊度大于 0.1 麦氏标准单位,即可为阳性,盐水空白对照和大肠埃希菌 ATCC25922;0.5 麦氏标准单位对照为阴性。

根据培养条件,培养出的菌落特点及生化反应结果判定 Hp:脲酶、氧化酶和过氧化氢酶试验阳性,革兰染色为阴性及 Hp 抗原检测阳性等,即可鉴定为 Hp。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 Hp 培养结果 242 例 C^{14} -UBT 阳性患者的标本,经培养鉴定检出 Hp 101 株,占 41.7%。其中,第

3 天开始生长 82 株,占 81.1%;第 7 天开始生长 7 株,占 6.9%;第 7 天后,剩余标本无 Hp 生长,培养至第 10 天,无 Hp 生长,发 Hp 未生长的阴性报告。Hp 在血平板上的菌落形态(第 4 天)见图 1, Hp 在巧克力平板上的菌落形态(第 4 天)见图 2。显微镜下观察 Hp 形态特征为革兰阴性杆菌,常见细长弯曲、逗点状、弧形、S 型等菌体形态,见图 3。

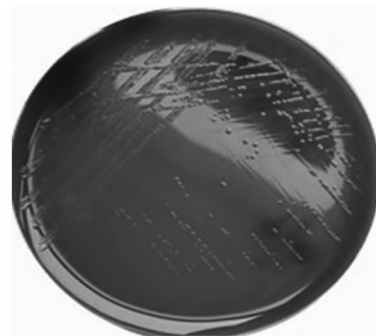


图 1 Hp 在血平板上的菌落形态(第 4 天)



图 2 Hp 在巧克力平板上的菌落形态(第 4 天)

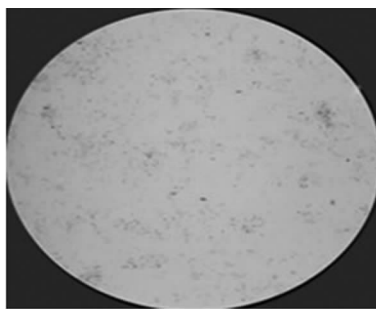


图 3 Hp 在显微镜下的形态特征(第 4 天,快速法革兰染色, $\times 1\ 000$)

2.2 不同性别患者 Hp 检出率比较 101 株 Hp,男性患者检出 41 株,占男性患者的 45.05%(41/91),女性患者检出 60 株,占女性患者的 39.74%(60/151),男女之间培养阳性率比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.47, P=0.518$),见表 1。

表 1 242 份 C^{14} -UBT 阳性标本 Hp 培养阳性结果比较[n(%)]

性别	n	Hp 培养阳性	Hp 培养阴性
男性	91	41(45.05)	50(54.95)
女性	151	60(39.74)	91(60.26)

2.3 242 份 C¹⁴-UBT 阳性标本不同阳性区间与 Hp 培养结果比较 将 242 份 C¹⁴-UBT 阳性标本分为 4 组: C¹⁴-UBT 100~<500 dpm/mmol CO₂, C¹⁴-UBT 500~<1 000 dpm/mmol CO₂, C¹⁴-UBT 1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂, C¹⁴-UBT ≥2 000 dpm/mmol CO₂ 组, 与 Hp 培养结果比较见表 2。经统计, 100~<500 dpm/mmol CO₂ 组与 500~<1 000 dpm/mmol CO₂ 组、1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 组、≥2 000 dpm/mmol CO₂ 组 HP 阳性结果比较, 差异均有统计学意义 ($\chi^2 = 25.439, 40.992, 39.902, P = 0.000$); 500~<1 000 dpm/mmol CO₂ 组与 1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 组、≥2 000 dpm/mmol CO₂ 组 HP 阳性结果比较, 差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 1.086, 1.461, P = 0.297, 0.227$); 1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 组与 ≥2 000 dpm/mmol CO₂ 组 HP 阳性结果比较, 差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.056, P = 0.814$)。

表 2 242 份 C¹⁴-UBT 阳性标本不同阳性区间与 Hp 培养结果比较[n(%)]

C ¹⁴ -UBT(dpm/mmol CO ₂)	Hp 培养阳性	Hp 培养阴性
100~<500	13(13.40)	84(86.60)
500~<1 000	24(53.33)	21(46.67)
1 000~<2 000	35(63.64)	20(36.36)
≥2 000	29(64.44)	16(35.56)

3 讨 论

Hp 为微需氧菌, 在 7% 氧气、10% 二氧化碳、83% 氮气的环境中生长良好, 按要求设置相关气体的浓度和湿度, 在此基础上, 用血琼脂平板、巧克力血平板、哥伦比亚血琼脂平板培养 Hp, 能获得良好的培养效果。Hp 生长缓慢, 分离培养基需经 72 h、传代培养需经 3~5 d 才能长出菌落, 不同的 Hp 菌株, 生长时间差异较大, 究其原因, 可能与 Hp 的菌株变异, 外界因素影响等有关, 但观察到该现象的文献报道不多, 有待进一步研究。大部分 Hp 在第 3 天开始生长, 少部分细菌于第 7 天才开始生长, 继续培养至第 9~10 天, 大部分 Hp 在血平板上会形成 β 溶血的现象。Hp 的鉴定常需要和其他螺旋菌和弯曲菌进行区别^[4], 常规方法有菌落观察、菌体形态观察、生化反应等。经试验, 用 Hp 抗原检测试剂, 直接检测培养后的 Hp, 在含有少量 Hp 菌悬液的情况下, 即可为阳性。该试剂直接检测 Hp 抗原, 特异度高, 成本低廉, 可用于培养后 Hp 的辅助鉴定。

从胃黏膜活检标本分离培养获得纯菌, 再用形态学和生化学方法鉴定, 是 Hp 检测的一种方式, Hp 培养灵敏度为 70%~92%^[5]。本实验室检测的 242 份标本, 培养阳性 101 份, 阳性率 41.7%。国内有报道 Hp 培养阳性率为 92.47%^[6]; 也有报道阳性率为

38.83% 的情况^[7]。国内报道的 Hp 培养的阳性率, 差异很大, 还需要进一步深入探讨。

C¹⁴-UBT 是目前检测 Hp 的主要试验之一。经试验, 242 份 C¹⁴-UBT 阳性标本, 培养分离到 101 株 Hp, 阳性率为 41.7%。其中 C¹⁴-UBT: 100~<500 dpm/mmol CO₂ 的阳性率为 13.40%, 500~<1 000 dpm/mmol CO₂ 的阳性率为 53.33%; 1 000~<2 000 dpm/mmol CO₂ 的阳性率为 63.64%, ≥2 000 dpm/mmol CO₂ 的阳性率为 64.44%。C¹⁴-UBT 100~<500 dpm/mmol CO₂ 与其他几组数据比较, HP 阳性率差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 另外 3 组数据比较, HP 阳性率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 说明 C¹⁴-UBT 阳性标本, 在做 Hp 培养时, 培养的阳性率与 C¹⁴-UBT 阳性率呈正相关。

Hp 是引起胃部疾病的主要致病菌^[8]。据报道, 中国各地人群中的感染率达到 40%~70%^[9]。现检测 Hp 的方法有很多种^[10], 其中 Hp 的培养对 Hp 的耐药监测、流行病学调查、疾病根治等方面非常重要。随着各种厌氧/微需氧培养系统越来越多地应用于临床, 各级医院, 可根据自身情况, 加强 Hp 相关知识学习, 与内镜中心合作, 适时将 Hp 的培养作为常规项目逐步开展起来。

参考文献

- [1] WARREN J R, MARSHALL B. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis[J]. Lancet, 1983, 83(4): 1273-1275.
- [2] 张万岱, 萧树东, 胡伏莲, 等. 对幽门螺杆菌若干问题共识意见[J]. 世界华人消化杂志, 2004, 12(10): 2457.
- [3] 尚红, 王毓三, 申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 766-768.
- [4] 陈东科, 孙长贵. 临床微生物检验与图谱[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 545-548.
- [5] 中华医学会消化分会. 幽门螺杆菌共识意见(2003. 安徽桐城)[J]. 中华消化杂志, 2004, 24(1): 126-127.
- [6] 郗颖. 幽门螺杆菌检测采用细菌培养与尿素酶实验的临床分析[J]. 临床医学研究与实践, 2016, 1(15): 53.
- [7] 钮萍萍, 张军, 戴利成, 等. 2015 年浙江省湖州地区幽门螺杆菌常用抗生素耐药监测分析[J]. 生物技术通讯, 2016, 27(3): 441-443.
- [8] 刘文忠, 萧树东. 纪念幽门螺杆菌培养成功 30 周年: 重要发展的历史回顾[J]. 中华消化杂志, 2012, 32(10): 649-654.
- [9] 冉亮, 邓学洁, 屈小英, 等. 职业人群幽门螺杆菌感染情况调查[J]. 中国全科医学, 2011, 14(6): 589-591.
- [10] 邵军丽, 吴丰. 幽门螺杆菌检测方法研究新进展[J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2012, 21(8): 691-693.