

Karmali和Columbia培养基初次分离幽门螺杆菌效果的比较

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中

■背景资料

分离培养是 *H.pylori* 感染诊断的金标准之一, 也是获得 *H.pylori* 培养物的必须途径。但由于 *H.pylori* 体外生长条件苛刻, 营养要求高, 所以分离培养比较困难。目前世界范围内 *H.pylori* 的分离培养成功率为 50%-70%, 因此选用能够提高培养阳性率、缩短培养时间的培养基非常重要。

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中, 中国疾病预防控制中心传染病预防控制所传染病诊断室 北京市 102206 国家科技支撑计划基金资助项目, No. 2007BAI04B02
作者贡献分布: 张建中负责本课题的总体设计和实施; 何利华负责标本收集, 细菌培养和数据分析并起草论文; 张茂俊、刘国栋及乔博参与数据整理与文章撰写; 张慧芳参与细菌分离培养。
通讯作者: 张建中, 102206, 北京市昌平区流村路5号, 中国疾病预防控制中心传染病所。 helico99@sina.com
电话: 010-58900707 传真: 010-58900700
收稿日期: 2010-10-21 修回日期: 2010-12-02
接受日期: 2010-12-07 在线出版日期: 2011-01-08

Comparison of Karmali agar medium and Columbia agar medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens

Li-Hua He, Mao-Jun Zhang, Guo-Dong Liu, Hui-Fang Zhang, Bo Qiao, Jian-Zhong Zhang

Li-Hua He, Mao-Jun Zhang, Guo-Dong Liu, Hui-Fang Zhang, Bo Qiao, Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Supported by: the National Key Technology R&D Program during the 11th Five-Year Plan Period, No. 2007BAID4B02

Correspondence to: Jian-Zhong Zhang, National Institute for Communicable Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, 5 Liuzi, Changping District, Beijing 102206, China. zhangjianzhong@icdc.cn

Received: 2010-10-21 Revised: 2010-12-02

Accepted: 2010-12-07 Published online: 2011-01-08

Abstract

AIM: To compare the isolation rates of the *Helicobacter pylori* (*H.pylori*) from gastric biopsy specimens achieved using Karmali and Columbia agar media.

METHODS: Gastric biopsy specimens were collected from 168 *H.pylori*-positive patients and cultivated on Karmali and Columbia agar plates under microaerophilic conditions (5% O₂, 10% CO₂, and 85% N₂). Single colonies of *H.pylori* were identified by biochemical test and PCR. The isolation rates of *H.pylori* achieved using the two types of media at 24, 48, 72, and 96 h were

compared.

RESULTS: There was no significant difference in the isolation rate between Karmali and Columbia agar at 24 h ($P = 0.125$). In contrast, the isolation rates achieved using Karmali agar at 48, 72 and 96 h were significantly higher than those using Columbia agar (82.1% vs 45.8%, 94.6% vs 79.2%, 97.0% vs 88.7%, all $P < 0.05$).

CONCLUSION: Higher isolation rate of *H.pylori* from gastric biopsy specimens was achieved with Karmali agar than with Columbia agar. Karmali agar can be used as an effective medium for isolation of *H.pylori* from gastric biopsy specimens.

Key Words: *Helicobacter pylori*; Solid medium; Gastric biopsy; Isolation culture

He LH, Zhang MJ, Liu GD, Zhang HF, Qiao B, Zhang JZ. Comparison of Karmali agar medium and Columbia agar medium for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(1): 98-101

摘要

目的: 比较两种基础培养基对幽门螺杆菌 (*H.pylori*) 感染者的胃黏膜标本初次分离率的差异。

方法: 将168份¹³C呼气试验阳性患者的胃黏膜标本研磨后, 等量接种于Karmali和Columbia血琼脂培养基, 置于37℃微需氧环境(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂和850 mL/L N₂), 分别培养24、48、72、96 h, 观察细菌的生长情况、进行菌落鉴定并比较*H.pylori*阳性率的差异。

结果: 培养24 h, Karmali和Columbia培养基上*H.pylori*阳性检出率分别为9.5%和7.1%, 两者之间没有显著差异($P = 0.125$); 培养48、72和96 h后, Karmali培养基的检出率显著高于Columbia培养基(82.1% vs 45.8%, 94.6% vs 79.2%, 97.0% vs 88.7%, $P < 0.05$)。

结论: Karmali培养基对*H.pylori*初次分离的效

■同行评议者

杜奕奇, 副教授, 中国人民解放军第二军医大学长海医院消化内科

果明显优于Columbia培养基. Karmali培养基是一种有效的*H.pylori*初次分离培养的培养基.

关键词: 幽门螺杆菌; 固体培养基; 胃黏膜标本; 分离培养

何利华, 张茂俊, 刘国栋, 张慧芳, 乔博, 张建中. Karmali和Columbia培养基初次分离幽门螺杆菌效果的比较. 世界华人消化杂志 2011; 19(1): 98-101

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/98.asp>

0 引言

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H.pylori*)是一种定居在人胃黏膜, 能引起慢性胃炎、消化性溃疡等疾病的革兰氏阴性菌, 1994年*H.pylori*被WHO列为I类致癌因子^[1,2]. 细菌的分离培养是*H.pylori*感染诊断的金标准之一. 获得*H.pylori*菌株是对其致病机制以及菌株的遗传特征分析具有重要意义. 随着抗生素的大量使用, 目前出现了越来越多的临床耐药菌株感染, 导致*H.pylori*的根治率明显下降, 因此从患者胃黏膜标本中分离培养*H.pylori*, 进行药物敏感性试验变得尤为重要.

目前常用*H.pylori*的培养基为Columbia血琼脂、脑心浸液血琼脂(brain heart infusion agar, BHIA)等. 应用Columbia和BHIA血平皿进行初次分离培养一般需要3-5 d才可以看到针尖状菌落^[3], 有的甚至需要10-20 d才可长出单菌落^[4], 且各地由于培养条件差异, 培养阳性率存在很大差异. 因此, 寻找一种更为快速高效的*H.pylori*分离培养基, 对于*H.pylori*感染研究及相关疾病的防治具有重要意义.

Karmali培养基是用于分离培养弯曲菌属细菌的基础培养基, 在实践中我们发现Karmali培养基对*H.pylori*的分离培养有较好效果, 为进一步验证Karmali培养基在*H.pylori*分离培养中的真实效果, 本研究拟采用相同的培养条件, 对于相同的标本分别应用Karmali和Columbia培养基对*H.pylori*的初次分离效果进行评价.

1 材料和方法

1.1 材料 168份¹³C尿素呼气试验阳性的胃黏膜标本, 来自上海、北京、江西、西安和广州合作医院胃镜室, 样品采集后保存于-80℃, 并经干冰快递运输到中国疾病预防控制中心传染病预防控制所进行分离培养实验. Karmali琼脂培养基(OXOID公司产品, No. CM0935); Columbia

琼脂培养基(OXOID公司产品, No. CM0331). 脱纤维绵羊血购自北京蓝博瑞生物科技有限公司. 混合抗生素: TMP(磺胺增效剂)、盐酸万古霉素、两性霉素B、多粘菌素B购自中国生物制品鉴定所. 3 mL研磨器(江苏海门产品); NUAIR三气培养箱(英国NUAIR公司产品); 一次性平皿、巴氏吸管、接种环等(BD公司产品).

1.2 方法

1.2.1 Karmali培养基的制备: 称取17.2 g Karmali琼脂置于400 mL蒸馏水中混匀, 121℃高压20 min备用. 将高压灭菌后的Karmali培养基冷却至50℃左右, 加入5%脱纤维羊血和1%的混合抗生素(终浓度分别为: TMP 150 mg/L、万古霉素125 mg/L、两性霉素B和多粘菌素B均为100 mg/L)充分混匀后倾注平皿, 经无菌检测后备用.

1.2.2 Columbia培养基的制备: 称取15.6 g Columbia琼脂置于400 mL蒸馏水中混匀后, 121℃高压20 min备用. 将高压灭菌后的Columbia基础培养基冷却至50℃左右, 加入5%脱纤维羊血和1%的混合抗生素(同上)充分混匀后倾注平皿, 经无菌检测后备用.

1.2.3 标本接种与培养: 用巴氏吸管将带有约400 μL BHI保存液的胃黏膜组织吸到组织研磨器中, 充分研磨后, 分别等量接种于Karmali和Columbia血平板上并均匀涂开. 将接种好的平皿置于37℃混合气体培养箱中(50 mL/L O₂, 100 mL/L CO₂, 和850 mL/L N₂), 分别培养于24、48、72、96 h观察菌落的生长情况.

1.2.4 鉴定: 对两种培养基上长出的疑似菌落进行涂片镜检、三酶实验(尿素酶、氧化酶和过氧化氢酶试验)鉴定, 同时提取菌株核酸, 用*H.pylori*特异性基因ureA、cagA和vacA进行PCR扩增鉴定(引物序列为ureA: 上游5'-GCCAATGGTAAATTAGTTCC-3', 下游5'-CTCCTTAATTGTTTTTACAT-3'; cagA: 上游5'-ACCCTAGTCGGTAATGGG-3', 下游5'-GCAATTTTGTTAATCCGGTC-3'; vacA: 上游5'-ATGGAAATACAACAAACACAC-3', 下游5'-CTGCTTGAATGCGCCAAAC-3'). 标准菌株*H.pylori*26695为阳性对照.

统计学处理 两种培养基培养效果的比较采用配对 χ^2 检验, 以 $P<0.05$ 有组间统计学差异.

2 结果

2.1 部分菌株PCR鉴定结果 本实验中经过生化试验鉴定为*H.pylori*的菌株用PCR扩增鉴定结果

■ 相关报道

高瑞红等研究了
几种培养基对
*H.pylori*生长状态
及细菌数量的比较,
结果表明改良
卵黄布氏琼脂适合
*H.pylori*的生长.

■应用要点

*H. pylori*感染阳性患者的胃黏膜标本在Karmali培养基上初次分离培养96 h, 细菌培养阳性率可以达到97.0%, Karmali培养基可作为幽门螺杆菌初次分离培养的培养基。

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 M

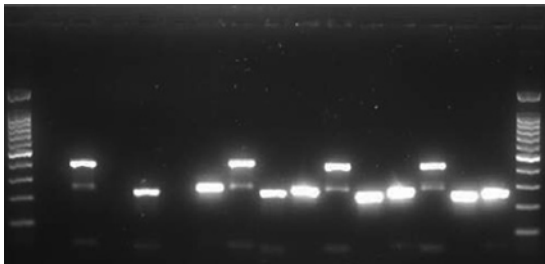


图1 部分*H. pylori*菌株PCR鉴定结果. M: Marker 100 bp; 1-15: ureA阴性对照, ureA *H. pylori*26695, cagA阴性对照, cagA *H. pylori*26695, vacA阴性对照, vacA *H. pylori*26695, ureA *H. pylori*03, cagA *H. pylori*03, vacA *H. pylori*03, ureA *H. pylori*07, cagA *H. pylori*07, vacA *H. pylori*07, ureA *H. pylori*09, cagA *H. pylori*09, vacA *H. pylori*09.

表1 两种培养基在不同时间段*H. pylori*生长状况的比较

培养时间	<i>H. pylori</i> 生长状况	
	Karmali	Columbia
24 h	细小针尖状均>20个	细小针尖状均<10个
48 h	已融合生长为薄菌苔 (<i>n</i> = 138)	针尖状的单菌落 (<i>n</i> = 77)
72 h	厚菌苔(<i>n</i> = 156)	融合生长为薄菌苔 (<i>n</i> = 133)
96 h	厚菌苔(<i>n</i> = 163) ¹	厚菌苔(<i>n</i> = 149)
120 h	厚菌苔(<i>n</i> = 163) ¹	厚菌苔(<i>n</i> = 149)

两种培养基上均为*H. pylori*分离培养阳性的标本, 生长96 h后, 区别不明显, *H. pylori*菌落均生长为厚菌苔。

均为阳性(图1)。

2.2 两种培养基分离率的比较 Karmali培养基在24 h的阳性率为9.5%(16/168), Columbia培养基的阳性率为7.1%(12/168), 经 χ^2 分析, 两者阳性率差异无显著统计学意义($P = 0.125$)。但在Karmali琼脂上的单菌落数量多于Columbia琼脂培养基, 分别为 $>20 \pm 3$ 个克隆和 $<10 \pm 2$ 个克隆(表1)。在培养48、72、96 h时, Karmali培养基上的阳性检出率分别为82.1%(138/168)、94.7%(156/168)和97%(163/168), Columbia血琼脂培养基上的检出率为45.8%(77/168)、79.2%(133/168)和88.7%(149/168), 上述时间点两者之间差异有显著统计学意义(表2-4, $P < 0.05$)。从菌落的多少及菌苔厚度观察, Karmali培养基也明显优于Columbia培养基(表1)。Karmali培养基在48 h的检出率高于Columbia培养基72 h的检出率(82.1%, 138/168 vs 79.1%, 133/168), 并且Karmali培养基72 h的检出率高于Columbia培养基96 h的检出率(94.7%, 156/168 vs 88.7%, 149/168), 其96 h检出

表2 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本48 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	77	0	77
阴性	61	30	91
合计	138	30	168

$P < 0.05$ 。

表3 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本72 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	133	0	133
阴性	23	12	35
合计	156	12	168

$P < 0.05$ 。

表4 Columbia和Karmali培养基*H. pylori*组织标本96 h培养结果

Columbia	Karmali		合计
	阳性	阴性	
阳性	149	0	149
阴性	14	5	19
合计	163	5	168

$P < 0.05$ 。

率也高于后者(97%, 163/168 vs 88.7%, 149/168)。Columbia培养基分离阳性的标本, Karmali培养基分离也都为阳性(图2)。

3 讨论

分离培养是*H. pylori*感染诊断的金标准之一^[5,6], 也是评价新的诊断方法的重要参考。分离培养得到的*H. pylori*菌株是*H. pylori*药物根除效果分析、体外筛选抗菌药物敏感性实验、菌株致病性分析、流行病学分型等许多*H. pylori*相关研究的基础。因此, *H. pylori*分离培养技术对*H. pylori*的治疗和研究非常关键。但是, 由于*H. pylori*体外生长条件苛刻, 营养要求较高, 所以分离培养比较困难。目前常用培养基多为加5%-10%脱纤维羊血(兔血或者马血)的Columbia培养基, 需培养3-7 d甚至更长时间^[7]。随着我国*H. pylori*研究水平的整体提高, 分离培养作为*H. pylori*研究工作

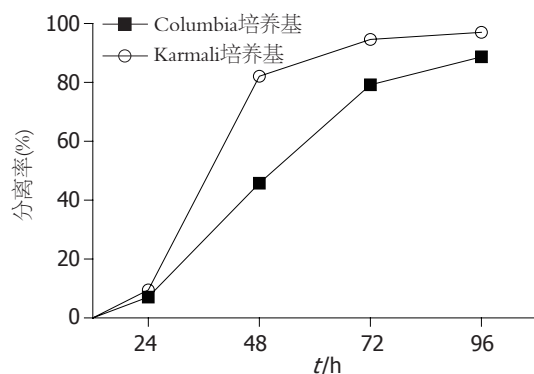


图 2 不同时间点Karmali和Columbia培养基上*H.pylori*的分离率比较.

的基础越来越多的在各省份开展^[8]. 目前世界范围内的阳性*H.pylori*标本的分离培养成功率为50%-70%^[9], 因此寻找能够提高培养阳性率、缩短培养时间的培养基非常重要.

Karmali培养基是Karmali等^[10]于1986年在弯曲菌分离培养中初次使用, 后被推荐用于弯曲菌的分离培养, 一直沿用至今. 其主要成分为在Columbia琼脂的基础上加入活性炭等其他成分. Karmali在弯曲菌选择培养中得到肯定. 我们在工作中发现, 用于弯曲菌属细菌培养的Karmali培养基对*H.pylori*的初代分离效果较好, 为进一步研究其在*H.pylori*分离培养中的效果, 本文对168份临床采集的¹³C尿素呼气试验阳性的胃黏膜标本同时采用Karmali和Columbia培养基进行了初代分离培养比较. 结果显示, 两种培养基在培养24-96 h后*H.pylori*的检出率逐渐增高, 但96 h后, 二者的检出率没有变化. 虽然24 h后, 两种培养基的检出率无明显差异(均<10%), 但Karmali培养基上可出现更多的菌落, 由于此时间点分离阳性率过低, 因此24 h培养不能作为*H.pylori*培养阳性的时间判断节点. 而经过48、72、96 h的培养, Karmali培养基无论在阳性率、

菌落数量及大小方面都明显优于Columbia培养基, 尤其在48 h时差异显著(82.1% vs 45.8%), 其96 h分离阳性率远大于Columbia培养基(97.0% vs 88.6%). 96 h后两种培养基的检出率不再有改变, 达到最高检出率, 同时Columbia培养基分离阳性的标本, Karmali培养基分离也都为阳性. Karmali培养基分离率高于Columbia培养基. 因此Karmali培养基不仅可以显著缩短*H.pylori*分离培养时间, 同时也提高了*H.pylori*的检出率.

同行评价

本文新颖性较好, 具有较好的学术价值. 能较好地反映我国或国际胃肠病学临床和基础研究的先进水平

参考文献

- 胡伏莲, 周殿元. 幽门螺杆菌感染的基础与临床(修订版). 北京: 中国科学技术出版社, 2002: 28-46
- IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Schistosomes, Liver flukes and *Helicobacter pylori*. Lyon, France. 1994: 177-241
- Chomvarin C, Kulsantiwong P, Chantarasuk Y, Chantrakooptungool S, Kanjanahareutai S. Comparison of media and antibiotic supplements for isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsies. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2006; 37: 1163-1169
- Yin Y, He LH, Zhang JZ. Successful isolation of *Helicobacter pylori* after prolonged incubation from a patient with failed eradication therapy. *World J Gastroenterol* 2009; 15: 1528-1529
- Jaup BH, Stenquist B, Brandberg A. *Helicobacter pylori* culture from a positive, liquid-based urease test for routine clinical use: a cost-effective approach. *Helicobacter* 2000; 5: 22-23
- 闫伟, 曹建彪. 幽门螺杆菌检测技术进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 1527-1533
- 陈忠余. 幽门螺杆菌分离培养研究现状. 国外医学·临床生物化学与检验学分册 1996; 17: 28-30
- 胡林, 刘苓, 谭庆华, 周力, 陈峥宏, 刘娅琳. 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养. 世界华人消化杂志 2009; 17: 2830-2834
- Hirschl AM, Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology. *Helicobacter* 2007; 12 Suppl 2: 6-11
- Karmali MA, Simor AE, Roscoe M, Fleming PC, Smith SS, Lane J. Evaluation of a blood-free, charcoal-based, selective medium for the isolation of *Campylobacter* organisms from feces. *J Clin Microbiol* 1986; 23: 456-459

编辑 李军亮 电编 何基才