

用 5'-氟尿嘧啶培养基分离培养钩端螺旋体

苏州医学院钩端螺旋体病科研组

钩端螺旋体生长缓慢,要求 pH 中性,营养丰富的培养基。因而钩端螺旋体的培养物,尤其是从尿中分离时,往往易被杂菌污染,以致影响获得阳性结果。

分离尿中钩端螺旋体一般采用动物(豚鼠或金黄色地鼠)接种法。但此法有一定缺点,如动物来源不普遍,携带不便,饲养管理麻烦,操作繁杂,观察时间长,常受生物因素干扰,并且动物敏感性不同,对于弱毒致病菌株的分离不易成功,基层单位使用很不方便。同时,在农村基层单位由于设备条件和无菌操作技术等问题,在病人血液直接培养中污染率较高,严重影响病原体分离的阳性率。因此从广大农村基层单位的实际需要出发,寻求一种有效易行的分离培养方法,对当前的防治工作有一定实际意义。本文报告用 5'-氟尿嘧啶培养基直接分离培养钩端螺旋体的方法。

材料及方法

一、5'-氟尿嘧啶 (5'-Fluorouracil, 以下简称 5'-Fu):西南制药三厂出品的 5'-氟尿嘧啶注射液,每安瓿 10 毫升,含 5'-氟尿嘧啶钠盐 250 毫克。

二、培养基: pH7.2—7.4 的 10% 磷酸盐缓冲液,灭菌后加入 8% 新鲜兔血清及 5'-Fu,浓度为 200 微克/毫升 (Johnson, 1964)。混合后用无菌手续分装,每管 5 毫升,56℃ 加热半小时,无菌试验后备用。

对照用培养基除不加 5'-Fu 注射液外,其他条件均相同。

三、猪尿直接培养:

1. 标本采集:用干净中试管接取中段猪尿,由社员接取后送实验室(绝大部分为社员自养猪)。先用暗视野显微镜直接检查,发现阳性可疑者,用不同稀释度的猪尿接种于上述培养基。

2. 稀释接种:按无菌操作法,用无菌毛细吸管吸取阳性可疑猪尿两滴(约 0.1 毫升),接种于第一管 5'-Fu 培养基中(尿液稀释度约为 1:50),混匀后再吸取两滴该培养液接种于第二管 5'-Fu 培

养基中(尿液稀释度约为 1:2500),混匀,依此类推,共接种 4 管。置 28℃ 恒温箱孵育 4 周。

3. 对照:从上述镜检阳性可疑的 63 份猪尿标本中随机取样 28 份,同时接种豚鼠(或金黄色地鼠)腹腔,接种尿量为 1—2.5 毫升。待体温升高 1℃ 时,采心血接种 8% 兔血清磷酸盐缓冲液培养基两管,置 28℃ 温箱孵育 4 周,每周镜检一次,4 周不生长者视为阴性。于濒死前或第 14 天解剖,取肾皮质小块分离病原体,同时检查内脏病变。

四、病人血液、动物肾脏及心血直接培养:

按常规方法每份标本同时接种 5'-Fu 培养基和 8% 兔血清磷酸盐缓冲液培养基各两管,对比其阳性率和污染率。

结果与讨论

一、猪尿直接培养:

从暗视野镜检阳性可疑的 63 份猪尿中用 5'-Fu 培养基分离到 50 株钩端螺旋体,阳性率为 79.36%。用北京药品生物制品检定所制备的钩端螺旋体型特异血清检定了 40 株,其中 38 株为波蒙那群波蒙那型,1 株为豕群豕亚型,1 株为犬热群犬热型。其他菌株正继续检定中。本实验表明,可以用 5'-Fu 培养基从猪尿中直接分离培养钩端螺旋体,至少波蒙那型、犬热型和豕亚型等钩端螺旋体能在 5'-Fu 培养基中正常地生长繁殖。5'-Fu 对许多细菌的生长有很强的抑制作用,因 5'-Fu 能扰乱其核酸的生物合成及细胞壁的形成。钩端螺旋体由外源性的嘌呤碱基组成菌体的核酸,而不能利用嘧啶碱基,因此 5'-Fu 没有改变钩端螺旋体的生长和形态 (Johnson, 1964)。

但 5'-Fu 抑制杂菌的作用有一定限度,严重污染的标本不能完全抑制其中杂菌生长。改进办法首先于采样时尽可能加强无菌操作,减少污染机会;其次采用稀释接种法对提高阳性率有一定作用。

本文 1973 年 1 月 6 日收到。

表 1 不同尿液稀释度培养阳性率和污染率的比较

接种管	尿液稀释度	接种数	阳性率		污染率	
			数	%	数	%
第一管	1:50	41	8	19.51	32	78.05
第二管	1:2,500	41	15	36.58	22	53.66
第三管	1:125,000	41	20	48.78	16	39.02
第四管	1:6,250,000	41	25	60.97	10	24.39

$\chi^2=15.88$ $p<0.01$ $\chi^2=25.77$ $p<0.01$

从表 1 可见不同稀释度尿液的培养管其阳性率有非常显著的差异,其中以第 3、4 管的阳性率较高。如用好的尿液标本,稀释至第 3 管即可能获得满意结果。尿液浓度高,培养阳性机会原应增多,但如污染杂菌多,钩端螺旋体被抑制,反使阳性率降低。

表 2 直接培养法与动物接种法阳性率对比

培养方法	接种数	阳性数	阳性率(%)
直接培养	28	23	82.1
动物接种	28	21	75.0

$$\chi^2=0.42 \quad p>0.05$$

从表 2 可见,直接培养法与动物接种法的阳性率无显著差异。其中两法皆为阳性者 17 份。直接培养阳性而动物接种阴性者 6 份,这些标本在动物接种后体温不升高,解剖时无典型病变,说明可能为弱毒菌株,因而动物接种不易分离成功。动物接种阳性而直接培养阴性者 4 份,原因为标本污染比较严重,虽经稀释 4 管尚未能完全抑制其中杂菌繁殖。

表 4 两种培养基阳性率和污染率的比较

培养基	检查数	阳性率		污染率	
		数	%	数	%
5'-Fu	160	54	33.8	1	0.62
兔血清	160	48	30.0	9	5.62

$\chi^2=0.52$ $p>0.05$ $\chi^2=6.61$ $0.01<p<0.02$

参 考 资 料

R. C. Johnson, et al.: *J. Bacteriol.* 87 (2): 422—426, 1964.

以两法皆为阳性的 17 份标本对比,其检出时间,结果见表 3。直接培养法有 1/3 于 72 小时内出现阳性,有 4/5 在两周内出现阳性,较动物接种法检出时间能提前一周左右。

表 3 两法阳性检出时间的对比

培养方法	接种数	一周	二周	三周	四周
直接培养	17	6	8	3	0
动物接种	17	0	10	3	4

初步实验证明用 5'-Fu 培养基直接分离培养猪尿中的钩端螺旋体,与动物接种法对比具有检出时间短,阳性率相近,经济,简便易行等优点。

二、5'-Fu 培养基与兔血清培养基的比较:

用 5'-Fu 培养基直接培养病人血液、动物肾脏及心血共 160 份标本,同时与兔血清培养基作对比。从表 4 可见,两种培养基的阳性率无明显差别。但 5'-Fu 培养基的污染率显著降低。因此对于解决分离培养工作中的污染问题有一定的实用价值。