

# 应用安瓿内封存方法保存钩端螺旋体菌株的初步观察

曹维霖 张月清 胡瑞云  
(北京友谊医院热带病研究室)

应用不同条件和方法对一些钩端螺旋体菌株进行了保存试验。结果显示用柯氏培养基接种的液体培养物封存在安瓿内遮光保存于室温,效果最好。1964—1966年期间封存的133株钩端螺旋体,每一菌株分装10支安瓿。以后定期打开1至5支做暗视野镜检和接种培养。结果表明,封存半年后镜检和培养的阳性率分别为96.7%和98.6%;一年后为94.1%和96.7%;6至8年后为13.5%和49.4%。

保存菌种、传代在生产和实验研究工作中是非常重要的。目前保存钩端螺旋体采用液体培养基,定期通过试管传代方法不仅耗费较多人力、时间,而且有时还会发生错乱或污染。因此,如何改进保存方法,延长菌株存活时间,减少传代次数是迫切要解决的一个问题。过去,有人用液体石蜡或凡士林将液体培养物的表面覆盖,有人用石蜡将液体培养物的试管口封闭,也有人用半固体培养基传代,据称可以延长菌株存活时间。此外,还有人试用过干燥法和冷冻干燥法保存钩端螺旋体菌株<sup>[1-4]</sup>。但这些方法经试用效果均不理想。曾有人将钩端螺旋体封装在安瓿内,12年后仍存活<sup>[5]</sup>。这究竟是一种偶然现象还是合乎客观规律性呢?为了弄清这个问题,我室在钩端螺旋体保种传代工作中,于1964年至1966年,先后将不同血清型的钩端螺旋体100余株,封存于安瓿内保存,定期检查,进行对比观察。现将初步结果整理如下。

## 菌株来源、培养和检查方法

钩端螺旋体133株,对其中2株曾分别封存观察过3次,15株曾分别观察过2次,故实际观察152株次。其中67株为国

表1 国内分离的67株钩端螺旋体菌株的血清型和来源

血清型	来源和菌株数		总计
	病人	动物	
澳洲A型	1	4	5
澳洲B型	3	1	4
色若型	3		3
秋热型	8	6 <sup>A</sup>	14
流感伤寒型	2		2
牛型	4		4
黄疸出血型	3	5	8
波摩那396型		8	8
犬型	4	2	6
卡斯曼型	3	2	5
未定型	6	2	8
总计	37	30	67

<sup>A</sup> 包括田水一株。

内本病流行区分离获得(表1),1954年—1965年由人体血、尿、脑脊液、眼前房水、乳汁、胎盘、胎儿和尸检肾组织分出37株,由鼠、猪、狗、牛、羊等不同动物和田水分出30株。应用罗马尼亚12个血清型抗血清作凝溶试验(部分菌株曾用捷克菌株抗血清复查过),除8株血清型未定外,其余分别属于10个血清型。另有66株为1955年

本文于1975年7月7日收到。

至1957年期间分别由罗马尼亚、苏联和捷克引入, 我们没有进行血清型间的对比或核对工作(表2)。

表2 从国外引进的钩端螺旋体菌株的血清型和来源

血清型	来源和菌株数			总计
	罗马尼亚	苏联	捷克	
巴达维亚型	1		1	2
澳洲 A 型	2		4	6
澳洲 B 型	2			2
波摩那型	2		3	5
秋热型	1		1	2
流感伤寒型	2	2	1	5
牛型	1		1	2
七日热型	1	1	1	3
黄疸出血型	2	2	3	7
波摩那 396 型	2			2
犬型	2	1	2	5
加西曼型			2	2
新都型			2	2
沙敏型			2	2
其它血清型*	1	5	13	19
总计	19	11	36	66

\* 每血清型 1 株, 包括色若型、卡斯曼型等。

实验用液体培养基系柯氏(Korthof)培养基, 内含已灭活的兔血清约 4%。兔血清经试用合适时方采用。半固体培养基系用柯氏培养基改制, 每 100 毫升半固体培养基内含已灭活兔血清 2 毫升、蛋白胨 0.05 克、蛋白胨 0.05 克、琼脂 0.2 克和维生素 B<sub>6</sub> 60 毫克, 其他无机盐成分完全同于柯氏培养基。封存钩端螺旋体的安瓿为普通封装 2 毫升注射用药的玻璃安瓿, 使用前先经自来水充分清洗, 再用蒸馏水冲洗、包装、高压消毒后烘干备用。保存的菌株经转接柯氏培养基生长较好, 用注射器分装安瓿。每一菌株 10—40 支。每安瓿每次封装培养物 1 毫升后, 立即在酒精灯上封口, 标记直立放纸盒内再放壁橱中, 于室温下遮光保存。每支安瓿注入 1 毫升培养物后, 约占安瓿容积的 1/3, 约 2 毫升空间为封入的空

气。定期检查, 每次打开安瓿 1 至 5 支(有阳性结果时少开, 无阳性结果时多开)同时做暗视野镜检和培养(1972 年前为每安瓿接种 1 至 2 支培养管, 1972 年后多为 2 至 5 支安瓿合种 2 至 6 支培养管)。凡暗视野镜检见有活动的钩端螺旋体或培养有钩端螺旋体生长的即为阳性结果。同一菌株同时打开的几支安瓿中, 只要有一支查见活动的钩端螺旋体或接种的几支培养管中有一支有螺旋体生长即分别作为阳性计。

## 保存方法和结果

### (一) 几种不同保存方法效果的比较

用上述液体和半固体两种培养基, 安瓿内封存和试管内保存两种方法, 分别放置 4℃ 冰箱和室温不同条件, 对 6 个钩端螺旋体菌株, 包括 5 个血清型, 进行了保存时间的对比。试验前每一菌株均先接种于同批制备的含有同一兔血清的培养基, 30℃ 培养。待螺旋体长好后, 分装安瓿, 每菌株 30—40 支。封口标记后分别置室温(壁橱内, 四季温度变化范围 12℃ 至 34℃)及 4℃ 冰箱保存。同时选取同批接种的培养物 2 试管(棉花塞口), 也放室温保存。定期检查, 结果列入表 3, 以柯氏液体培养封存在安瓿内保存于室温的效果最好。应指出的是, 我们所采用的半固体培养基只含 2% 兔血清而液体培养基含 4% 兔血清, 这可能是影响半固体培养效果的因素。

我们又用另外 10 个菌株, 包括 9 个血清型, 用液体培养基、安瓿、室温和液体培养基、试管用石蜡封口、室温保存的方法进行了对比试验。接种前菌株培养如前所述。同时另选取生长良好的试管培养物 2 支用熔化的石蜡滴加棉塞上, 将管口封固, 同放室温(壁橱)保存。结果列为表 4, 仍以液体培养基封存安瓿保存于室温的效果较好。试管用石蜡封口保存法还容易污染。

表 3 6 种不同方法保存 6 株钩端螺旋体效果的比较

封存 时间	结 果	液 体 培 养 基						固 体 培 养 基					
		安瓿		安瓿		试管		安瓿		安瓿		试管	
		室温		4℃		室温		室温		4℃		室温	
		镜检	培养	镜检	培养	镜检	培养	镜检	培养	镜检	培养	镜检	培养
4 月		6/6*	6/6	1/6	1/6	6/6	1/1	1/6	1/6	0/6	1/6	0/6	1/6
8 月		4/6	6/6	1/6	1/6	2/6	5/6	0/6	1/6	0/6	0/6	已干	已干
1 年		5/6	6/6	1/6	1/6	已干	已干	0/6	1/6	0/6	0/6		
2 年		4/6	5/6										
8 年		0/5	1/5					0/1	0/1				

\* 分子表示阳性株数,分母表示观察株数。下表同。

表 4 应用安瓿内封存和试管用石蜡封口两种方法保存 10 株钩端螺旋体效果的比较

封存 时间	结 果	保存方法		液体培养基、安瓿、室温		液体培养基、试管石蜡封口、室温	
		镜 检	培 养	镜 检	培 养	镜 检	培 养
6 月		10/10		10/10		4/10 7 株污染	3/10 <sup>A</sup> 7 株污染
12 月		9/10		9/10		1/10 7 株污染	2/5* 2 株污染

<sup>A</sup> 内一株镜检有螺旋体但有污染,接种培养后无螺旋体生长。

\* 另 5 株镜检有污染者未接种培养。

(二)液体培养物封存安瓿保存于室温的效果

1964 年至 1966 年将 133 株钩端螺旋体的液体培养物分批封存于安瓿内,每一菌株 10 支,保存于室温,定期观察。对阳性结果菌株定期继续观察,对阴性结果菌株除个别菌株外,一般不再继续观察。结果分述如下:

1. 封存后不同时期的存活率

结果见表 5。封存半年后暗视野镜检和培养的阳性率分别为 96.7% 和 98.6%,

一年后为 94.1% 和 96.7%,6—8 年后仍为 13.5% 和 49.4%。要指出的是,我们所用的柯氏培养基含兔血清 4%,浓度较低。据我们过去观察,兔血清浓度低于 5% 时,接种生长时间较长后,效果不好<sup>[6]</sup>。对保存 6 至 8 年后复查的菌株,未能对过去阴性结果的菌株一概进行复查(事实上,有首次检查结果阴性,而再次检查又为阳性的菌株)。如当初能改用较高的兔血清浓度,并在复查时将所有观察菌株一律复查,则 6 至 8 年后的活存率可能要较为高些,并更

表 5 安瓿封存方法钩端螺旋体活存情况

封存 时间	项 目 结 果	国 外 株		国 内 株		“校正后”总阳性率*	
		镜 检	培 养	镜 检	培 养	镜 检 (%)	培 养 (%)
半 年		70/71	70/71	77/80	79/80	96.7	98.6
1 年		66/70	68/70	77/80	79/80	94.1	96.7
2 年		1/1	1/1	3/5	4/5		
6 至 8 年		5/26	14/26	8/57	30/57	13.5	49.4

\* 凡观察结果阴性的菌株一般以后就不再进行观察,但在计算以后各次观察菌株的阳性率时,仍将这些菌株作为阴性结果累积进去。

接近实际情况。

2. 长期封存对钩端螺旋体形态、培养习性和血清学的影响。

经安瓿长期(6—8年)封存后的钩端螺旋体在形态和培养习性方面并无可以察觉出的改变。对有一部分经安瓿长期保存的菌株,我们还同时一直用试管传代保存。为能观察二者在血清学上有无改变,曾用罗马尼亚12血清型抗血清对4个菌株(分别为4个血清型)的上述“两种”培养物同时做凝溶试验。结果表明,这4个菌株“两种”培养物的血清型完全符合,凝集效价基本一致。对于经过安瓿内长期封存后菌株的抗原性、免疫力等的观察,还待进行。

## 对结果的分析和讨论

将钩端螺旋体培养物封存在安瓿内,室温遮光保存,可以明显延长钩端螺旋

体的存活时间。因为封存在安瓿内的培养物虽已和外界隔绝,但保存有一定量的营养物质。在这种情况下,钩端螺旋体的新陈代谢和繁殖减低、变慢,因而能存活较长时间。另外,封存在安瓿内的培养物没有蒸发损失,长期保持一定量的水分,酸碱度的改变可能也较小、较慢,这些对钩端螺旋体的活存也是极为重要的条件。Myers氏等报道关于应用活性炭双层培养基保存钩端螺旋体<sup>[7]</sup>,保存28株钩端螺旋体,2年后转种有25株生长,不过观察的菌株数较少,时间也较短。

从本文结果来看,安瓿封存钩端螺旋体的方法还有许多问题值得深入研究。

### 1. 存活时间与血清型的关系

表6结果指出,保存半年到一年的10个血清型存活无明显差别,6—8年后波摩那396型存活比例较大,其次是犬型和秋热型,黄疸出血型较差。卡方测验,

表6 钩端螺旋体10个血清型(109株)经安瓿封存后活存情况的比较

血清型 \ 封存时间	半年	1年	2年	6至8年
澳洲A型	12/12	12/12		2/7
澳洲B型	6/6	6/6		2/4
色若型	5/5	4/5		2/3
秋热型	19/19	19/19	1/1	7/12
流感伤寒型	7/7	7/7		3/5
牛型	7/7	7/7		2/5
黄疸出血型	18/19	18/19	1/2	2/10
波摩那396型	13/13	13/13	1/1	7/9
犬型	13/13	13/13	1/1	4/7
卡斯曼型	8/8	7/8		2/6

$p < 0.025$ , 有显著性。

### 2. 封存观察过两次菌株的分析

封存两次的菌株有17株,存活观察结果有14株先后结果一致,3株不一致。考查封存日期,封存前培养时间和生长情况,未发现明显差异。

### 3. 封存半年、一年后死亡菌株的分析

观察的152株次钩端螺旋体,有2株封存半年,有3株封存一年后死亡。这5株有4个血清型,其中2株为黄疸出血型。其它情况与存活6—8年的菌株相比,并无明显差别。

以上观察结果反映着一定的客观规律性,进一步弄清这些问题,将会使这种保存钩端螺旋体的方法更为完善。

### 参 考 资 料

- [1] Синая, Г. Я. и Биргера, О. Г. (景冠华等译): 各种传染病微生物学检查法, 382 页, 人民卫生出版社, 北京 1958。
- [2] Barrow's, W.: *Textbook of Microbiology*. 18th ed., p. 851, Saunder, Philadelphia, 1963.

- [3] Cruickshank, R.: *Macke and McCartney's Handbook of Bacteriology* 10th ed., p. 717, Livingstone, Great Britian, 1960.
- [4] Wilson, G. S. and Miles, A. A.: *Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity*, 5th ed., p. 1123, Edward & Arnold, London, 1964.
- [5] Wolff, J. W.: *The Laboratory Diagnosis of Leptospirosis*, p. 32, Thomas, U.S.A., 1954.
- [6] 张乃峰等: 临床检验杂志, 1: 2, 1957.
- [7] Myers, D. M. et al.: *Appl. Microbiol.* 25: 514, 1973.

## PRELIMINARY OBSERVATION ON THE EFFICACY OF PRESERVATION OF *LEPTOSPIRA* STRAINS IN CLOSED AMPOULES

Cao Weiji, Zhang Yueqing, Hu Ruiyun

(Tropical Medicine Research Laboratory, Beijing Friendship Hospital, Beijing)

Different conditions and methods for the preservation of *leptospira* strains were examined. It was found that the liquid cultures of *leptospira* grown in Korthof's medium, kept in sealed glass (fused) ampoules and stored at room-temperature in the dark exhibited the best result. During the period of 1964—1966, 133 *leptospira* strains of different serotypes were preserved by the above-mentioned method. The liquid culture of

each strain was distributed into 10 ampoules (1 c.c. to each). Afterwards, 1—5 ampoules were opened and examined for viable leptospirae by both darkfield microscopy and cultivation after different intervals. It was found that the positive rates of darkfield examination and culture growth were 96.7% and 98.6% after 1/2 year; 94.1% and 96.7% after 1 year; 13.5% and 49.4% after 6—8 years respectively.