

L型细菌干燥培养基研制

附属儿童医院细菌室 朱方远 李建平

浙江省军区后勤部检验所 叶云凌 童贵忠 周正明

内容提要 本干燥培养基根据传统 Kagen 培养基改良而成,主要成份为动物肝、心水解蛋白、氧化钠、固醇类物质、维生素、氯化钠等,不需昂贵的马(人)血浆与新鲜牛肉浸汁,使用方便,且易保存和运送。L型细菌生长良好,菌落、菌态均具典型特征。经质量鉴定和临床试用均获满意效果。

关键词 培养基;L型菌/分离和提纯

细菌 L 型变异现象的发现与研究,已经历了半个多世纪。众多资料表明,它是造成某些感染性疾病迁延或复发的潜在致病因素,在临床上已引起广泛重视^[1,2]。国内对 L 型细菌的检测技术虽有较快的发展,但在广大基层医疗单位仍未普遍应用,究其原因,与国内市场无优质成品培养基供应有关。有鉴于此,我们收集、分析了国内外数十种处方^[3],设计并生产出一种新型的干燥培养基,经过3年多的临床使用、实验对照及质量考核,均获得了满意结果,现报告如下。

1 原材料筛选与试产

根据 L 型细菌在高蛋白、高渗、高能条件下繁殖较快,并能形成典型菌落与菌体的特性,本培养基选用动物肝、心等脏器作为主要材料,用胃蛋白酶、胰酶,分别对其进行双水解、提炼、脱水,再与国产原料如蛋白胨、牛肉膏粉、明胶、氯化钠、复合维生素、胆固醇、硫乙醇酸钠等配伍,制成干燥培养基。成品为淡黄色粉末,溶解度好,凝固强度适中,其理化、生物指标均符合固体培养基要求。液体剂型含总氮 0.3%,氨基氮 214mg%,蛋白质 1.88g%,氨基酸 18 种计 16.72mg/ml,并含

铜、锌、镁等多种细菌繁殖必需的微量元素。

2 样品对比试验与临床使用

2.1 用标准菌株对照试验

菌种:金黄色葡萄球菌 Cowen-1 L 型与丙型副伤寒沙门菌 L 型(分别由浙医大微生物教研室与杭州第六人民医院提供)。对照培养基:改良 Kagen 与 蚌埠 857。

方法:上述菌种经 35℃/24h 增菌后,用无菌盐水校正至含活菌约 1 亿/ml,再作 10^{-5} 稀释至 1000 个/ml。取此试验液 0.1ml,滴入 3 种培养基平板中,以 L 型玻棒均匀涂布,置普通大气环境 35℃/48h 后,观察与计数菌落,并作涂片染色。

结果:两种 L 型细菌在 3 种培养基上生长情况,见表 1。

上述 3 种培养基上菌数基本一致,但金葡菌在干燥培养基上的菌落数比蚌埠 857 培养基多,且出现快。根据 Poisson 分布原理作统计学处理: $U=2.0>1.96$ $P<0.05$,差别有显著意义。其余各组之间差别无显著意义($P>0.05$)。

3 种培养基上均见到典型 L 型菌落,金葡菌以大小油煎蛋型为主,颗粒型次之,偶见

表 1 3 种培养基对比试验菌落数

培养基	金黄色葡萄球菌(Cowan-1)					合计	丙型副伤寒沙门氏菌					合计
改良 Kagen	148	169	120	248	142	827	81	60	50	51	58	300
干燥粉	158	167	113	254	132	824	70	58	59	64	61	321
蚌埠 857	132	115	109	189	160	745	80	59	63	51	50	303

菊花瓣与双核型。涂片显示多形态,有大小球状体、巨形体、丝状体,及细如渣粒的原生小体。丙型副伤寒沙门氏菌以盘丝球样实心的卷曲放射状菌落占绝对优势,涂片主要为卷发状长丝体。

2.2 用国际标准菌株在本干燥培养基上进行 L 型变异诱导试验 用 WHO 的 5 种质控菌(铜绿色假单胞菌、伤寒沙门氏菌、宋内志贺氏菌、粪链球菌、大肠埃希氏菌)以青霉素 P₁₂ 40mg/片、羧苄青霉素 500mg/片,在干燥

培养基上进行诱导(挑取抑菌环边沿的受损菌,反复诱导 10 代以上),各菌皆先后出现 L 型菌落与多形性菌体。经鞣酸-龙胆紫染色,多呈部份缺壁。除粪链球菌外,其余 4 种皆有长短不等的丝状体。

2.3 临床使用 干燥培养基在附属儿童医院经 281 例感染儿各类标本试用,在作普通培养时,加作 L 型菌分离。结果普通培养阳性 113 例(占 40.21%),L 型阳性 28 例(占 9.96%)。总检出率为 50.17%,见表 2。

表 2 临床标本检出各类细菌 L 型菌的分布

阳 性 菌	L 型菌检出份数								
	尿道 (35)	血液 (182)	骨髓 (14)	脓汁 (21)	胸水 (13)	粪便 (3)	眼分泌物 (5)	痰液 (8)	合计 (281)
大肠埃希氏菌	3	4	1	1	0	0	0	1	10
产气肠杆菌	2	1	0	0	0	0	0	0	3
金黄色葡萄球菌	1	6	1	2	1	0	0	0	11
醋酸钙不动杆菌	0	1	0	0	0	0	1	0	2
铜绿色假单胞菌	0	0	0	0	0	0	0	1	1
宋内氏志贺氏菌	0	0	0	0	0	1	0	0	1
总检出例数	6	12	2	3	1	1	1	2	28

分离得到的 28 例 L 型菌在普通培养基上均为阴性,凡普通培养阳性者而参杂着少数或部份 L 型变异菌的病例不计在内。临床上确认为感染,而普通培养基上未见细菌生长者,将其培养物通过 0.45 μ m 滤膜,从滤液中发现有圆球体、丝状体而肯定为 L 型者,与直接在干燥培养平板上分离的结果一致。

28 例 L 型菌落,主要为颗粒型、油煎蛋型次之,偶见放射型,菌体显示多形性。除 1 例不动杆菌(醋酸钙不动杆菌产碱生物型)传 18 代后才由原分离时的卷发样丝状体逐渐返祖为长短杆菌外;其余 27 例皆为不稳定型,经普通琼脂移种 1~2 代,或放置室温 3

~4 日,即返祖为细菌型。但在抗生素连续诱导下,或在置适量诱导物的高渗增菌液中、可较长时间保持 L 型的基本形态。于干燥培养基中去除高盐成份,使成等渗,亦能使 L 型存活繁殖。在含 10% CO₂ 的环境中或厌氧环境下,更易发现典型 L 型菌态。

3 与国内外同类产品(处方)比较

Kagen 原方系用牛肉浸汁与马血清为主料配制,国内林特夫等曾用人血浆代替马血获得同样效果^[5],但价格贵、制备麻烦,很难推广。后又研制出无血浆的半固体培养基(蚌埠 857)^[11],效果较好,但未能商品化,影响了

产品的推广使用^[4]。干燥培养基集各家之所长^[3],而且,是国内唯一正式商品化的产品。3。

表 3 3 种 L 型培养基优缺点比较

培养基	剂型	主要成份	成本	使用	商品化	保存期
Kagen 培养基	半固体	20%马(人)血清 80%新鲜牛肉汁	昂贵	麻烦	无	临时配用
蚌埠 857	半固体	80%新鲜牛肉汁 明胶蛋白胨等	贵	麻烦	内部交流品	<3 个月
本干燥培养基	干燥粉	动物肝心水解蛋白	低廉	方便	正式商品 送寄各地	>1 年

(本干燥培养基的研制,得到浙江省中华医学分会微生物免疫学会何浙生、李玲、顾克洲等老师的支持与帮助,特此深表谢意。)

参 考 文 献

1. 林特夫,等. 中华微生物学和免疫学杂志 1981; 1(5):

324

2. 周慧平,等. 中华医学检验杂志 1985; 8(1): 20
3. 何浙生,等. 浙江医学 1990; 12(3): 5
4. 王和. 贵阳医学院报 1988; 13(1): 42
5. 林特夫,等. 全国细菌 L 型与支原体学习班资料 1985; 15—25

(1992 年 5 月 7 日收稿,同年 12 月 21 日修回)

(上接第 134 页)

2.2 同心扫描,汽化瘤体 在瘤体有明确边界之后,需要缩短工作半径或加大功率以炭化或燃烧脂类病灶,炭化皮肤温度为 300℃~400℃,使组织成棕褐色炭化层浮起,用盐水棉球擦去,暴露出病灶下组织,对较深的瘤体可直接燃烧,使局部皮肤温度达 530℃以上,有明亮的火光。对年青患者尤宜精细地逐层汽化,提高美容效果。

2.3 注意护眼,以防伤害 眼睑皮肤是全身最薄的皮肤之一,游离度大,又靠近眼球,操作时要特别注意保护,可用湿盐水棉球覆盖睑裂保护内眼,也可以睑板固定器保护。

2.4 排除烟雾,保护术者 汽化过程中产生的烟雾主要由水蒸气组成,含有未燃尽的病

变组织碳化微粒,甚至活细胞。因此,术野内必须有良好的吸排烟雾装置以除尽有害气体。

由于直径在 1mm 以内的血管能自动在激光作用下封闭,术中几乎无出血,术野清晰,精确度高,操作方便,美容效果好,不失为治疗睑黄瘤的较好方法。

参 考 文 献

1. 北京医学院附属人民医院. 物理诊断学. 北京:人民卫生出版社,1980: 88
2. 徐国祥主编. 激光医学. 广州:广东高等教育出版社,1987:175

(1992 年 2 月 19 日收稿,同年 6 月 1 日修回)