

成人,因此未考虑外科医生接种乙肝疫苗后对防护能力的影响,而是将所有 HBV 传染源都处于监控之下。本资料显示,19.23% HBsAg 阳性携带者可经手术传播,其中 18.59% 在乙肝疫苗有效免疫者的防护范围之内,剩余 0.64% 超过了防护范围,超过者均为 HBeAg 阳性的 HBsAg 携带者。HBeAg 监控法对这些具有高度传染性的 HBeAg 阳性的 HBsAg 携带者采取加强防护措施后,剩余的 HBeAg 阴性的 HBsAg 携带者传染性就处于医护人员的 HBV 免疫防护范围之内,不能经手术传播。可见,HBeAg 监控法也属于零危险性的防护标准。

[参 考 文 献]

[1] 杨双旺,杨岁虎,孙佩,等.乙型肝炎 e 抗原作为乙型肝炎病毒围术期传播监控指标的可行性研究[J].中华医院感染学杂志,2000,10(4):244-246.

- [2] 杨岁虎,杨双旺,孙佩,等.套式 PCR 极量稀释法评价外科 HBsAg 携带者血液的传染性[J].中华医院感染学杂志,2000,10(5):396-399.
- [3] Gunson RN, Shouval D, Roggendorf M, et al. Hepatitis B virus (HBV) and hepatitis C virus (HCV) infections in health care workers (HCWS): guidelines for prevention of transmission of HBV and HCV from HCW to patients [J]. J Clin Virol, 2003, 27(3): 213-230.
- [4] Pavette PJ, Ma X, Weeratna RD, et al. Testing of CpG-optimized protein and DNA vaccines against the hepatitis B virus in chimpanzees for immunogenicity and protection from challenge [J]. Intervirology, 2006, 49(3): 144-151.
- [5] Jaffray CE, Flint LM. Blood-borne viral diseases and the surgeon [J]. Curr Probl Surg, 2003, 40(4): 195-251.

[文章编号] 1000-2200(2010)06-0629-02

· 检验医学 ·

银染法鉴定铜绿假单胞菌生物膜

姚慧琳,刘培明,陆士海,庄楠

[摘要]目的:观察银染法鉴定铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)生物膜的效果。方法:体外平板法制备 PA 生物膜模型,用银染法及扫描电镜进行观察鉴定。结果:银染后普通光学显微镜和扫描电镜对生物膜观察结果相符。结论:可以用银染法观察细菌生物膜,方法简单、可靠。

[关键词] 铜绿假单胞菌;生物膜;银染法

[中国图书资料分类法分类号] R 378 **[文献标识码]** A

细菌生物膜(biofilm, BF)是近年来引起国内外学者高度重视的一种细菌群体生物学特性,是指由附着于惰性或者活性实体表面的细菌细胞和包裹着细菌的水合性基质所组成的结构性细菌菌落^[1],也是细菌在生长过程中为了适应生存环境而形成的一种与游走细胞相对应的存在形式^[2]。据统计,80%以上的感染性疾病是由细菌生物膜引发的。由于细菌在生物膜状态抗药性比游走态大大增强,BF 在临床更易引发难治性慢性感染,严重威胁人类健康^[3]。因此,明确 BF 的存在对了解细菌耐药性有重要意义。目前一般使用扫描电镜(SEM)或激光共聚焦显微镜研究 BF,但以上方法均存在操作复杂,需要特殊设备,不易推广等缺点。本实验通过银染法观察 BF 简单、易行,易于在普通实验室推广使用,现作报道。

1 材料与方 法

1.1 材料 (1)载体:24 mm×24 mm 盖玻片,经浓硫酸浸泡过夜后,用蒸馏水反复冲洗,再浸入 75%乙醇。用前取出晾干,高压消毒后备用。(2)菌株:试验菌株为临床分离的黏液型铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*, PA)。(3)试剂和器材:5% AgNO₃、CaCl₂、对苯二酚、Na₂S₂O₃、2.0% 戊二醛、乙醇均为国产分析纯,MH 肉汤为杭州天和微生物有限公司产品,SEM (JSM-6700F),BX51 型 OLYMPAS 显微照相系统,普通光学显微镜(日本 OLYMPAS)。

1.2 方 法

1.2.1 制备 BF 在直径 9 mm 的玻璃培养皿内放入一块 24 mm×24 mm 的盖玻片,取过夜培养的含有 PA 肉汤,比浊仪调定为 0.5 麦氏浊度,用生理盐水稀释 50 倍后取 20 ml 加入培养皿中,37℃ 培养,2 天更换 1 次生理盐水,培养 7 天即得到 BF。每株样本同时做 2 份,分别进行银染法和 SEM 观察。

1.2.2 银染法 按文献[4]取培养物经灭菌生理盐水多次充分漂洗去掉浮游菌;在 2.0% 戊二醛

[收稿日期] 2009-04-30

[基金项目] 安徽省淮北市科技局自然科学研究资助项目(090160)

[作者单位] 淮北矿工总医院 检验科,安徽 淮北 235000

[作者简介] 姚慧琳(1969-),女,副主任检验师。

PBS 溶液中固定 1 h; 蒸馏水清洗 1 min; 饱和 CaCl_2 溶液结合 15 min; 蒸馏水清洗 1 min; 5% AgNO_3 溶液反应 15 min; 1% 对苯二酚溶液显色 2 min; 蒸馏水漂洗 1 min; 5% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶液固定 2 min; 蒸馏水漂洗 1 min。银染后进行普通光学显微镜观察。以空白盖玻片银染后普通光学显微镜观察结果作阴性对照; 另一培养物用 SEM 观察 BF 定性结果作阳性对照。

1.2.3 SEM 观察 2.0% 戊二醛固定后, 50%、70%、无水乙醇梯度脱水, 送中国科技大学理化科学

实验中心进行 SEM 观察并摄片保留。

2 结果

空白盖玻片银染后光学显微镜照片只见散在的黑点或黑斑(见图 1)。PA 生长 7 天形成 BF 银染后光学显微镜照片, 黑染部分呈棉絮状的膜状物(见图 2)。图 3 为同一株 PA 培养 7 天后的 SEM 照片, 可见 BF 银染后通过普通光学显微镜观察和 SEM 观察对 BF 观察相符。

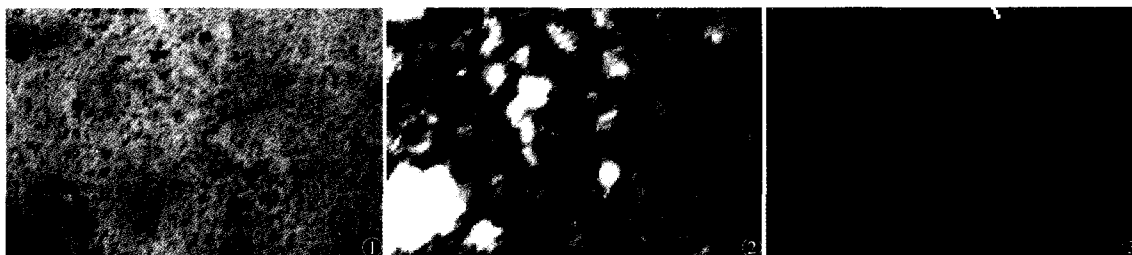


图 1 空白对照(银染法) 图 2 第 7 天生物膜(银染法) 图 3 第 7 天生物膜(电镜)

3 讨论

生物膜的形成是引起慢性难治性感染的重要因素之一, 生物膜相关感染广泛存在于临床, BF 导致的难治性感染的治疗是临床有待解决的一大难题, 美国疾病预防控制中心专家估计, 65% 以上的人类细菌感染与 BF 有关^[4]。PA 极易形成生物膜^[5]。由于生物膜的存在, 生物膜内的细菌常常造成疾病迁延不愈和急性发作, 给临床治疗带来很大困难, 因此, 寻找一种简单、可靠的鉴定方法有重要意义。生物膜检测有多种方法, 通常采用荧光法、激光共聚焦显微镜、电子显微镜、原子力显微镜^[2]等进行检测和观察, 但这些方法过程均较复杂或需要昂贵的特定设备, 无法在一般实验室开展。本实验采用文献^[4]报道的银染法对 PA 形成的生物膜进行观察, 与 SEM 的观察结果相符, 这种方法需要的试剂均为国产试剂, 价格低廉, 过程简单, 易于操作, 并且灵敏性好, 特异性强, 可作为普通实验室生物膜的常规鉴定。

银染法观察 BF 在国内文献中已有报道, 一般是采用硅胶或聚氯乙烯作为生物膜载体, 而本实验用玻片作为生物膜载体的优点是平整且透光性强, 染色后易于在普通光学显微镜下观察。其次, 我们用市售的 2.0% 戊二醛延长固定时间效果很好。同时在实验中我们发现菌液浓度很重要, 生理盐水稀释前的浓度不能超过 0.5 麦氏浊度, 否则细菌无间隙, 不易观察到生物膜, 特别是在扫描电镜下观察时。

[参 考 文 献]

- [1] Favre-Bonte S, Kohler T, Van Delden C. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*: role of the C4-HSL cell-to-cell signal and inhibition by azithromycin[J]. J Antimicrob Chemother, 2003, 52(4):598-604.
- [2] 李学如, 孟涛, 王艳. 铜绿假单胞菌耐药机理研究进展[J]. 国外医药: 抗生素分册, 2004, 25(3):105-108.
- [3] 李京宝, 韩峰, 于文功. 细菌生物膜研究技术[J]. 微生物学报, 2007, 47(3):558-561.
- [4] 孔晋亮, 刘晓岚, 陈一强, 等. 银染法观察铜绿假单胞菌生物被膜变化初探[J]. 济宁医学院学报, 2007, 30(1):27-28.
- [5] Green SL, Maddox JC, Huttenbach ED. Linezolid and reversible myelosuppression[J]. JAMA, 2001, 285(10):1291.

关于本刊启用稿件在线处理系统的通知

为了加快稿件处理速度, 缩短稿件出版周期, 方便广大作者投稿及查询稿件处理情况, 本刊已开通稿件在线处理系统, 请作者尽可能应用稿件在线处理系统进行投稿、查稿。本刊网址 <http://xuebao.bbmc.edu.cn>。本刊稿件在线处理系统的在线办公中心设有作者在线投稿、作者在线查稿、专家在线审稿、编委在线审稿、编辑远程办公和主编在线办公六部分。作者第一次通过该系统向本刊投稿请先注册, 并记住您的用户名和密码。注册登录后就可以向本刊投稿。也可以通过您已注册的用户名和密码登录作者在线查稿, 了解稿件处理状态。请不要重复注册, 否则可能导致您信息查询不完整。