

技术与方法

绿脓杆菌定值、定位、定性检测技术研究*

徐启旺 刘俊康 袁泽涛 邓国宏 丛延广

(第三军医大学生物波研究中心 重庆 400038)

摘要 为建立组织内细菌的定植、定位及定性检测方法,实验专用对绿脓杆菌定性、定量培养的 DPA 培养基,解决了同时定性、定量培养的难题,实验结果表明,同一标本有多个同种细菌生长可判定细菌定植,方法简单、可靠、重复性好,

关键词 绿脓杆菌、定值、细菌聚群

分类号 Q934 **文献标识码** B **文章编号** 0253-2654(1999)-04-0278-03

STUDY OF DETERMINATION TECHNIQUE FOR COLONIZATION AND QUALITY OF *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Xu Qiwang Liu Junkang Yuan Zetao Deng Guohong Gong Yanguang

(Research Center of Biological Wave, Third Military Medical University, Chongqing 400038)

Abstract The study is intended to establish an assaying technique of colonization, location and quality of bacteriu in tissue. Speacial DPA medium was used for quantitative and qualilative culture of *Pseudomonas aeruginosa*, and solved the difficult problem of quantitative and qualitative culture at the same time. The results suggest that a sample in which a lot of bacteria are growing may be regarded as a criterion of bacterial colonization. The technique is simple, reliable and repeat well.

Key words *Pseudomonas aeruginosa*, Colonization, Bacterial aggeragation

对细菌聚群(bacterial aggregation)的研究已有几十年的历史,早期多在加拿大微生物界,研究工作不断向外界推广。从 Callija^[1]到 Costerton^[2]均对细菌聚群研究作了大量工作。通过细菌聚群,细菌可在上呼吸道、肺部引起囊性纤维化^[3],也可在牙齿表面形成菌斑,证明聚群与致病有关,其机理是细菌通过聚群可牢固地定植在组织表面,可抵抗组织液冲刷,对不利因素如消毒剂、灭菌剂均有抵抗作用,我们早期研究提出聚群生长效应^[4]。Costerton^[2]对聚群与定植关系作出明确回答。将细菌定植分为3个步骤:(1)细菌与组织上受体特异结合联系,这种结合是不牢固的,很快易被组织液冲刷而排除体外;(2)细菌迅速繁殖增加与组织细胞结合面。(3)细菌产生多糖包被(glycocalyx)使聚群细菌形成糖包被的群体结构,对抗一切不利影响而牢固地

存在。对细菌定植的检测技术常用冲洗、锐匙刮取的办法,由于离开了原位,使应用受到了限制。随着现代医学的发展,人们知道了细菌定植与细菌感染致病的联系,由于技术方法限制影响了这方面工作发展,因此原位定植、定性检测是抗定植生理作用、抗定植物质分析实验研究的基本内容。在生物波实验研究中,需要对原位标本定植检测兼顾定位、定性并确定聚群。要解决这一问题首先需进行技术方法的探索。为此我们对绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa* PA)进行了定性培养技术研究,采用的培养基称为 DPA 培养基,在此基础上,

* 国家自然科学基金资助项目 (No.39370008)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No. 39370008)

1998-03-09收稿, 1998-09-21修回

建立了定性、定植的测定技术。

1 材料与方 法

1.1 材 料

菌种: PA 血清 8 型, 成都生物制品研究所提供。

培养基: DPA 培养基, 本室研制, 主要成分是蛋白胨、硫酸钾、氯化镁、可溶性淀粉等。

生物波调节因子 (Biological Wave Regulative Factor, 简称 BRF): 由本实验室分离制备。

1.2 方 法

粪便标本检查确证无 PA 存在后, 随机选取 25 只小鼠分为两个组, 对照组 5 只小鼠, 饮用无菌生理盐水并采用灭菌饲料喂养, 实验组小鼠正常喂养, 口服灌胃 PA 菌液菌量 3 亿/mL, 1d3 次, 每次 0.5mL, 灌胃 1d 后连续进行粪便检查, 直到 24h 仍有 PA 检出, 证明 PA 已经定植。查明全部小鼠都有 PA 定植后, 随机将 PA 定植小鼠分为 4 个组每组 5 只小鼠, 分别灌胃不同浓度的 BRF 剂量分别是: 10%、1%、0.1%、和生理盐水, 灌胃量均为 0.5mL, 连续灌胃 2d, 第 3d 将各组小鼠处死, 进行原位 PA 定植检查, 方法是: 先参照 costerton 法轻轻冲洗内容物, 将肠段沿径向剪开平铺固定在载玻片上, 待表面水份蒸发, 以特制接种针依一定次序连续蘸取粘膜表面, 并依相同次序点种 DPA 平板上, 需注意: 肠粘膜上接种针每蘸取一次, 连续在 DPA 平板上点种 5 点, 同法一直将待测部位标本取完。

2 结 果

2.1 实验动物定植结果检测

2.1.1 实验组中生理盐水灌胃组细菌定植检查结果可见大量绿脓杆菌在检测培养基生长并且常见一次蘸取肠粘膜点种的 5 点中同时生长 PA 菌落。

2.1.2 BRF 抗定植结果观察: 采用低中高不同浓度的

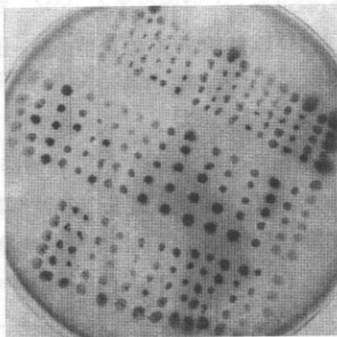


图1 低剂量BRF抗PA定植结果

BRF, 口服对抗 PA 定植的结果参见图 1、图 2、图 3, 高剂量组检查培养基上未见 PA 菌落生长, 中剂量有少量 PA 菌落生长, 低剂量组可见较大量 PA 生长。

黄色菌落代表肠道中正常菌群, 黑绿色菌落代表 PA 菌落。其中每一行中有 5 个细菌菌落, 是以特制接种针在肠粘膜测定部位蘸取一次, 在培养基上行成点种 5 点后由其中细菌生长形成。图 2、图 3 中结果判断与此相同。低剂量 BRF 抗 PA 定植能力弱, 由图可见, DPA 平板上检测到较多 PA 菌落。

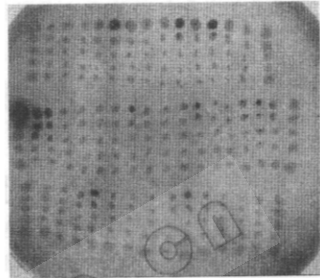


图2 中剂量BRF抗PA定植结果

由图可见, 该剂量 BRF 抗 PA 定植能力较强, DPA 平板上仅见少量 PA 菌落。

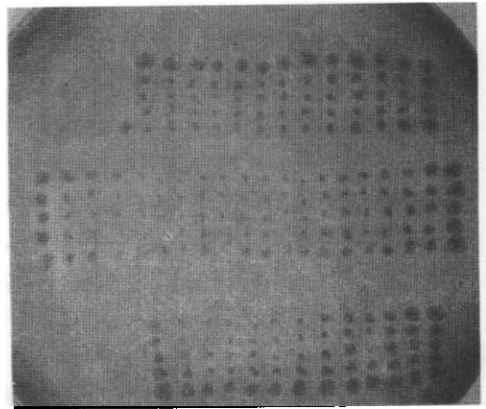


图3 高剂量BRF抗PA定植结果

由图可见, 在该剂量 BRF 作用下在 DPA 平板上未检测到 PA 菌落, 表明其抗定植能力更强。

2.1.3 采用该方法对正常对照组 5 只小鼠进行 PA 定植检查 DPA 皆同生理盐水对照组有明显差异, 未见 PA 菌落生长。

3 讨 论

从方法本身来看, 接种针在肠粘膜上蘸取一点, 接种的是一个微菌落, 在接种针上不可能是单个细菌, 由

于在本方法中采用 DPA 平板鉴别培养基, PA 在该培养基上生长形成绿色菌落, 所以点种后, DPA 上出现黑绿色菌落说明是 PA, 而黄色菌落由肠道其它正常菌群形成。

从盐水灌喂的实验组结果来看, 其中存在 PA 定植, 实验检测 5 只小鼠全部检出 PA 定植, 说明方法特异性强, 并有一定的灵敏度, 对照组无定植 PA 检出, 说明无假阳性检测结果, 可见方法可靠性较强。由于采用接种针蘸取检查, 影响了检测的敏感性, 采用大范围肠粘

膜定植检测可以对此加以弥补。

参 考 文 献

- [1] Calleja G B. Microbiol Aggregation CRC press, Inc. Boca Raton, Florida: 1984, 1~149.
- [2] Costerton J, Cheng, J, Geesey G *et al.* Ann Rev Microbiol, 1987, 41: 435~464.
- [3] komiyama K, Habbick B, Tumber S. *et al.* Infect Immun, 1978, 55: 2364~2369.
- [4] 徐启旺, 张邦夔, 李惠荣等. 中国微生物学杂志, 1990, 2(1): 1~4.