论著

文章编号:1000-5404(2010)01-0016-03

内陆地区自然环境中战备消毒包内细菌同源性的实验研究

张 颖,王仙园,周 娟 (400038 重庆,第三军医大学护理系野战护理学教研室)

[摘要] **目的** 探讨内陆地区自然环境中战备消毒包内细菌来源。**方法** 根据战备消毒包内蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种筛选战备仓库空气同种细菌不同菌株,提取基因组DNA,以其为模板,对16S rRNA和23S rRNA的转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)序列进行PCR扩增,将扩增产物回收测序,将测得的基因序列用Blast进行比对。**结果** 蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种DNA PCR扩增产物分别在850、1 200、1 000 bp左右显现单一特异性条带;战备消毒包与空气同种细菌不同菌株之间的ITS序列相似性为98% ~99%。**结论** 内陆地区自然环境中战备消毒包内细菌来源于空气细菌。

[关键词] 内陆地区;战备消毒包;细菌;同源性

[中图法分类号] R821.15; R117; R823 **[文献标志码]** A

Bacterial homology in sterile packages for war readiness under natural environment in inland region

Zhang Ying, Wang Xianyuan, Zhou Juan (Department of Field Nursing, College of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the origin of bacteria in sterile packages for war readiness under natural environment in inland region. **Methods** Genomic DNAs from the *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus cohnii ureal* in sterile packages for war readiness and from air bacteria strains in war readiness warehouse were extracted, and then used as templates to amplify the 16S rRNA and 23S rRNA ITS (internal transcribed spacer) sequences by PCR. The PCR products were extracted and sequenced, and the sequences homology analysis was performed with BLAST. **Results** Amplification products of DNA PCR from *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus* and *Staphylococcus cohnii ureal* were about 800, 1 200 and 1 000 bp respectively; The 16S rRNA-23S rRNA ITS sequences of bacterial strains in sterile packages shared 98% to 99% homology with those from the air bacteria strains in war readiness warehouse. **Conclusion** The bacteria in sterile packages for war readiness come from the air in war readiness warehouse under natural environment in inland region.

[Key words] inland region; sterile packages of strategic reserve; bacteria; homology

Supported by the Special Project of the "Eleventh Five-year Plan" for Medical Sci & Tech Research of PLA (06Z078). Corresponding author: Wang Xianyuan, Tel: 86-23-68753632, E-mail: zhouxz11@yahoo.com.cn

战备消毒包是战时对伤员开展救治的医疗装备,通常备用存放在自然环境中,消毒包的无菌状态是战时救治质量的重要保障。超过一定的储存时限,无菌消毒包内就会培养出细菌。了解消毒包内细菌来源,有利于采取针对性措施,确保或延长消毒包的有效储存时限。我们在内陆地区重庆市某医院战备仓库对压力蒸汽灭菌战备消毒包的储存时限进行了动态观察,对消毒包首次培养细菌进行分类,发现消毒包内细菌为空气中的优势菌[1],高原地区实验结果也显示消毒包内细菌为当地空气中的优势菌[2]。消毒包内细菌是否来源于空气,对此本实验对消毒包的细菌和空气中的细菌进行了同源性研究,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

1.1.1 战备消毒包菌株来源 战备消毒包按照《消毒技术规范》进行清洗、打包、压力蒸气灭菌。灭菌后的消毒包存放在战备仓库的储存箱内,按照不同的时相点对消毒包进行取样培养。培养前对培养平板进行功能、无菌性检测,对孵箱环境、洗脱液进行无菌性检测。所有检测合格后,每次取9个消毒包,在超净工作台按照无菌要求依次打开消毒包,取包内棉签浸无

[基金项目] 全军医学科研"十一五"计划专项课题(06Z078)

[通信作者] 王仙园,电话:(023)68753632, E-mail: zhouxz11@yahoo.com.cn

菌洗脱液涂抹包内物品,剪去手接触部分,投入5 ml洗脱液试管中,振荡混合,取洗脱液分别接种于血琼脂平板和沙保氏琼脂平板,9个消毒包共接种血琼脂平板48个、沙保氏琼脂平板33个。将培养平板置于35~37 ℃培养120 h,对消毒包内首次培养的细菌进行分类鉴定,得到细菌为蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种。

1.1.2 战备仓库空气菌株来源 消毒包灭菌当天及每次消毒包取样前对存放战备消毒包的仓库空气进行取样。将5个营养琼脂平板(直径9 cm)按照"五点法"放在1.5 m空气培养台上,将平板盖打开,倒扣放于平板旁,暴露15 min后盖好。将培养平板置于孵箱37 ℃培养48 h。得到空气中的细菌,根据细菌形态、革兰染色镜检、生化实验及VITEK系统对细菌进行鉴定,按照消毒包内的细菌种类,挑选出蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种菌株。

1.2 主要仪器和试剂

XW-80A涡旋振荡器(上海医科大学仪器厂),Sigma 2K-15离心机(美国Sigma公司),Forma3111型CO_2培养箱(美国Thermo公司),SmartSpace3000核酸蛋白分析仪(美国Bio-Rad公司),PTC-100型PCR扩增仪(美国MJ Research公司),DYY-Ⅲ型电泳仪(北京六一仪器厂),Gel Doc2000凝胶成像分析系统(美国Bio-Rad公司),YJ-875SA型超净工作台(上海复星高科技有限公司),DK-8B型电热恒温水浴箱(上海精密实验设备有限公司),Omega基因组DNA提取试剂盒(美国Omega公司),DNA Ladder Marker(DL 2000)、Prime STAR HS DNA Polymerase、5×PrimeSTAR Buffer、dNTP mixture、6×loading Buffer、10×loading Buffer、PCR扩增引物、DNA凝胶回收试剂盒(大连宝生物工程有限公司)。

1.3 方法

挑取上述细菌单个菌落,划线转种血平板,37 ℃培养24 h;将细菌转种至3 ml LB培养基中,放置于涡旋振荡器,固定,200 r/min,37 ℃,振荡过夜;按照Omega基因组DNA提取试剂盒操作说明提取基因组DNA;取DNA溶液2 μl,以198 μl去离子水稀释,取100 μl至比色杯中,调零后测定DNA浓度;引物设计:检索NCBI(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez)得到蜡样芽孢杆菌(GI:42779081)基因组全序列,在细菌的16S rRNA基因的2区及23S rRNA基因的10区序列内,应用分子生物学软件Primer Premier 5.0设计通用引物,P1:5′-TTGTACACACCGCCCGTC-3′,P2:5′-CCTTTCCCTCACGGTACTG-3′,如图1所示;反应总体系为50 μl:5×Prime STAR Buffer(Mg^{2+} plus)10 μl,dNTP Mixture(各2.5 mmol/L)4 μl,Prime 1(10 μmol/L),Prime 2(10 μmol/L),模板10 pg~100 ng各1 μl,DNA polemerase(2.5 U/μl)0.5 μl,去离子水32.5 μl;反应条件:94 ℃预变性5 min,28个循环(94 ℃变性30 s,60 ℃退火30 s,72 ℃延伸70 s),72 ℃延伸7 min,4 ℃保温;取PCR产物5 μl,在1%的琼脂糖凝胶上电泳,电压200 V,时间25 min;将凝胶置于凝胶成像系统中进行扫描,对扩增产物利用Quantity One软件进行图像分析;抽取蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种各2株(战备消毒包、空气各1株),共6株细菌,按照DNA凝胶回收试剂盒操作说明进行PCR产物进行回收;将回收产物送公司进行P1、P2方向测序,将测得的基因序列用Blast(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)进行同源性分析。

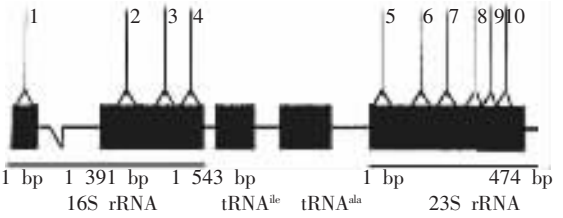


图1 16S-23S rRNA结构及10个保守区段所在的位置

2 结果

2.1 基因组DNA的提取

核酸蛋白分析仪测定18株细菌DNA浓度为0.19~6.15 μg/ml,说明已成功提取DNA。

2.2 ITS-PCR扩增结果

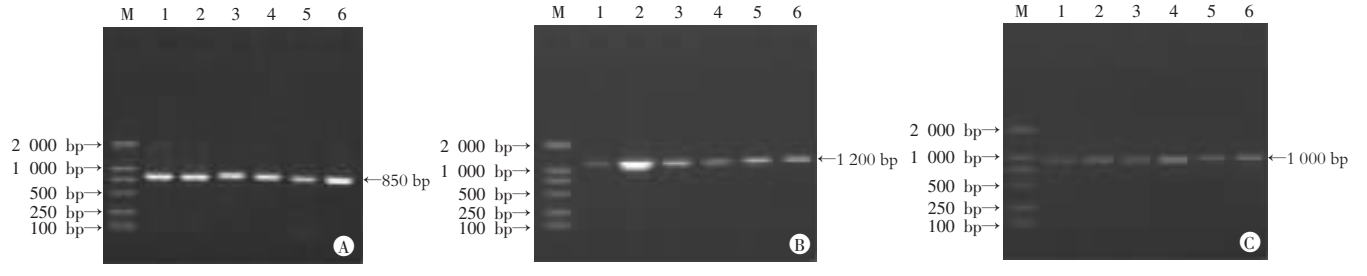
蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种DNA ITS-PCR扩增产物经1%琼脂糖凝胶电泳后,分别在850、1 200、1 000 bp左右显现单一的特异性条带。扩增的结果与预计的碱基长度相吻合。见图2。

2.3 战备消毒包内细菌同源性分析

6株细菌16S rRNA-23S rRNA ITS PCR回收产物进行测序:测序峰主峰高,噪峰低,少见干扰峰,结果可信。战备消毒包蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种与空气同种细菌不同菌株的序列相似性为98%~99%。见表1。

表1 战备消毒包细菌与空气同种细菌不同菌株ITS序列相似性比对结果

细菌种类	得分(bits)	序列相似性(%)	空缺	期望值(E值)
蜡样芽孢杆菌	1 483	99	1/807	0
藤黄微球菌	1 895	98	8/1 069	0
科氏葡萄球菌解脲亚种	1 770	99	0/961	0



M:DNA标准(DL 2000);1-5:空气样本;6:战备消毒包样本

图2 蜡样芽孢杆菌(A)、藤黄微球菌(B)、科氏葡萄球菌解脲亚种(C)ITS-PCR电泳图

3 讨论

原核生物的rRNA位于同一操纵子(rrn)上,包含有16S rRNA、23S rRNA和5S rRNA,其间隔区就是ITS。不同细菌及同种细菌不同菌株之间的16S rRNA、23S rRNA之间的ITS序列存在着不同程度的差异[3]。正是由于ITS的变异性以及处于16S rRNA和23S rRNA之间的位置特殊性,使其不仅可以用于菌种间的鉴别,还可以用来分辨非常接近的同种细菌内的不同菌株[4-6]。

本实验消毒包、储存环境的空气细菌培养、鉴定分类结果显示,消毒包内细菌与空气中的细菌有密切的关系,包内的细菌是否来源于空气需要科学求证。因此,我们对消毒包、空气同种细菌不同菌株采用ITS-PCR技术进行了分子水平的深入研究。

由于产物片段小,目前研究者多在16S rRNA的3、4区和23S rRNA的5区设计引物。但这些区段和tRNA相邻,突变性相对较高,产物也并非单一的特异性条带[5,7]。为此,我们在16S rRNA及23S rRNA最保守的序列2区和10区设计1对通用引物,在同一反应条件下对战备消毒包与空气中蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种的不同菌株进行ITS-PCR扩增,分别获得了大小约为850、1 200、1 000 bp的单一特异性条带,重复性好,证明选择在16S rRNA及23S rRNA最保守的序列上设计扩增引物非常重要,为本实验的顺利进行奠定了基础。消毒包与空气细菌是否同源必须通过它们基因序列的相似性来判定[8]。如果不同菌株之间的ITS序列相似性>87%,且序列长度变异小于2%,就可以断定为序列同源,而且序列相似性越高,关系越密切[9]。战备消毒包中的蜡样芽孢杆菌、藤黄微球菌、科氏葡萄球菌解脲亚种与空气中同种细菌不同菌株之间的ITS序列E值小,空缺少,序列相似性为98%~99%,说明消毒包与空气中的同种菌完全同源。这就表明了战备消毒包存放于自然环境,暴露在空气中,超过一定储存时限,空气中细菌可以穿过消毒包外包装,对战备消毒包造成污染。这一结果说明消毒包内出现细菌与消毒包外包装材料对细菌的阻隔作用和储存环境空气中的细菌数量有关。保持消毒包的有效储存时限应考虑选择细菌阻隔能力强的外包装材料[10,11];降低空气湿度,减弱细菌的渗透能力[12];减少储存环境人员流动[13,14],以此提高空气的洁净度,保证战备消毒包的储存质量,减少短时间内反复消毒灭菌带来的人力、物力消耗。本研究还需要从储存环境的温度、湿度等自然环境因素进行单因素控制研究,为延长战备消毒包的有效储存时限,提供更为准确的信息。

参考文献:

[1] 张颖, 王仙园, 周娟, 等. 战备手术包保存时限的实验研究[J]. 护理研究, 2008, 22(6A): 1424-1426.

[2] 张颖, 王仙园, 周娟. 高原地区自然环境中战备消毒包储存时限的实验研究[J]. 护理研究, 2009, 23(3C): 761-762.

[3] 毕春霞, 闫志勇, 王斌. 16S rRNA基因及16S~23S rRNA基因区间在临床细菌学检验中的应用[J]. 青岛大学医学院学报, 2003, 39(4): 493-495, 498.

[4] Couto I, Pereira S, Miragaia M, *et al*. Identification of clinical staphylococcal isolates from humans by internal transcribed spacer PCR[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(9): 3099-3103.

[5] Daffonchio D, Cherif A, Brusetti L, *et al*. Nature of polymorphisms in 16S-23S rRNA gene intergenic transcribed spacer fingerprinting of Bacillus and related genera[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(9): 5128-5137.

[6] Daffonchio D, Raddadi N, Merabishvili M, *et al*. Strategy for identification of Bacillus cereus and Bacillus thuringiensis strains closely related to Bacillus anthracis[J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72(2): 1295-1301.

[7] Cherif A, Borin S, Rizzi A, *et al*. Bacillus anthracis diverges from related clades of the Bacillus cereus group in 16S-23S ribosomal DNA intergenic transcribed spacers containing tRNA genes[J]. Appl Environ Microbiol, 2003, 69(1): 33-40.

[8] Baxevanis A D, Francis B F. 生物信息学: 基因和蛋白质分析的实用指南[M]. 李衍达, 孙之荣, 译. 北京: 清华大学出版社, 2000: 134.

[9] Nathalie L B, Herve P, Irene M, *et al*. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analysis reveal inter and intraspecific Bifidobacterium phylogeny[J]. Int J Sys Bacteriol, 1996, 46(1): 102-111.

[10] 吴文君. 三种包装材料阻菌效果和在不同存放条件有效期的观察[J]. 中国热带医学, 2008, 8(5): 868-869.

[11] 陈玉莲. 一次性纸塑包装袋与纯棉包布阻菌效果分析[J]. 护理研究, 2007, 21(4B): 1011.

[12] 张敬党, 李继耀, 李清, 等. 沈阳市医院空气微生物监测结果分析[J]. 中国消毒学杂志, 2004, 21(3): 254-256.

[13] 王丹敏, 董小青, 赵哲, 等. 某医院Ⅱ类环境细菌学监测[J]. 解放军预防医学杂志, 2004, 22(2): 144.

[14] 吕蓓, 魏彩珠, 黎敏. 空气监测提高无菌贮存室空气质量的临床研究[J]. 国际医药卫生导报, 2004, 10(2-3): 69-70.

(**收稿**:2009-06-29;**修回**:2009-08-13)

(编辑 龙 亮)