DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.02.041

2.2 PCR法与 EIA法检测 3组尿液 HBV-DNA阳性率,见表 2

表 2 PCR法与 EIA法检测不同人群尿液 HBV情况比较

组别	例数	PCR阳性例数 (%)	EIA阳性例数 (%)
HBeAg阳性组	27	9(33.0)**	2(7.4)
HBeAb阳性组	8	2(25.0)*	0(0)
阴性组	14	0(0)	0(0)

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$与阴性组比较

3 讨论

3.1 HBV-DNA阳性率比较

EIA法检测血清 HBV的标志物为 HBeAg阳性组、HBeAb阳性组病人以及全阴性正常人的血清,其 HBV-DNA阳性率分别为 92.5% (25/27)、50% (4/8)、14.3% (2/14),与其他学者报告一致[1,2]。其对应尿液组的 HBV-DNA阳性率分别为 33% (2/27)、25% (2/8)、0 血清中的 HBeAg阳性组,血清和尿液中的 HBV-DNA检出阳性亦高,组间比较,血清、尿液 HBeAg阳性组与阴性组比较 $P<0.01$,相差非常显著; HBeAb阳性组与阴性组比较 $P<0.05$

3.2 方法学比较

本实验 PCR法检出了 HBeAg阳性中尿液 HBV-DNA阳性率 33%, HBeAb阳性组尿液中 HBV-DNA阳性率 14%,阴性组为 0。EIA法未能检出更多尿液中 HBV标志物,只检出 HBeAg阳性组中 2例 HBcAb阳性,证明 PCR法灵敏度高,较 EIA法更能有效地检出 HBV阳性病人尿中存在 HBV-DNA

3.3 PCR检测尿液中 HBV-DNA的意义

HBV-DNA阳性表明 HBV在体内复制,有传染性[1]。用 PCR法检出患者尿液中 HBV-DNA,则证明 HBV患者的尿液有传染性。由本实验资料表明当血中 HBeAg阳性时,其血清 HBV-DNA阳性率亦高,具有很好的相关性。由于 PCR手续麻烦、价格贵,若血清 HBeAg阳性,不必再用 PCR测血清中 HBV-DNA HBeAg阳性组的尿液 HBV-DNA33% 阳性; HBeAb阳性组其尿液中 HBV-DNA有 25%阳性,提示对 HBV阳性病人尿液注重防护措施。本实验中血清 HBeAb阳性的病人 HBV-DNA阳性在血清中占 50%,尿液占 25%。认为 HBcAb出现即表示该病人没有传染性这一看法值得商榷。

关键词 酶免疫法;聚合酶链反应;尿/分析
中图法分类号 R446.122

参考文献

1 李小玲.乙型肝炎患者血清 HBV-DNA与 e系统的相关性.中华传染病杂志, 1994; 12(3): 176
2 陈述林.乙型肝炎血清学标志临床意义的再认识.国外医学:传染学分册, 1993; (2): 60
3 李建标,谭 津,相瑞馥等.毛细管 PCR技术在传染病快速诊断上的初步应用.中华微生物学和免疫学杂志, 1997; 17(2): 144

(收稿: 1997-05-21;修回: 1997-10-28)
(编辑 汪勤俭)

鞭毛染色法染色条件的探索

A modified method of flagellum staining

蹇 锐* 李芹阶 刘启富 陈 剑 (第三军医大学基础医学部微生物学教研室)重庆, 400038

提 要 目的:探索一套细菌鞭毛染色法的最佳化条件。方法:采用不同琼脂浓度的培养基中生长的变形杆菌,以不同菌液浓度制成涂片,染色,对比其在不同媒染剂、媒染时间、染色液和染色时间条件下的影响。结果:通过对不同染色条件进行优化筛选,确定了一套最佳条件。结论:改进后的染色法所需试剂少,染色时间短,操作简单,鞭毛着色清晰,重复性好。

细菌的鞭毛染色法在细菌学分类,微生物教学实验和一些细菌学诊断中,都是一种常用的染色技术。目

* 蹇 锐,男, 25岁,助理实验师,大专

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

前常用的鞭毛染色法有利夫森氏法[1],户田法和西氵尺菅原法[2]。这些方法准备工作繁琐,技术难度大,且常出现鞭毛着色差的情况。本室曹俊杰曾对染色法进行改良[3],但仍存在操作时间长,指标未标准化和重复性不太好的缺点。为此,本实验对鞭毛染色法的染色条件进行摸索,确定了一套更佳的染色条件。

1 材料与方法

1.1 材料

菌株为普通变形杆菌;鞭毛培养基由胰多价蛋白胨 1.5%,NaCl 0.5%,牛肉浸膏 0.5%,琼脂(设 1.5%、2.0%、3.0% 3个不同浓度,pH7.2~7.6)组成;甲醛;媒染液(20% 鞣酸水溶液 3份;10% $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 水溶液 1份,混合)[3];染色液(美蓝 0.1 g;硼砂 1 g;蒸馏水 100 ml);干净载玻片。

1.2 方法

将变形杆菌在上述培养基中传代 2~3次;取生长较好的菌落,划线法接种于直径 10 cm平板的一半,37℃培养至细菌长满平板未划线部分时取出(约 7~10 h);用 5 ml蒸馏水吹洗下平板上未划线部份迁徙生长的菌苔,收集菌液于试管中,加甲醛(使其终浓度为 1%),摇匀,放 4℃备用;染色时将制备好的菌液用蒸馏水稀释成不同浓度,涂片,自然干燥;用媒染液覆盖标本,作用不同时间,充分水洗;再用染色液覆盖标本,作用不同时间,水洗,干后镜检。

2 结果

2.1 培养基琼脂浓度的影响

用 1.5%、2%、3% 3种不同浓度的琼脂作培养基,培养变形杆菌,结果以 1.5% 的培养效果最好,变形杆菌呈典型迁徙生长现象,生长快速,洗下菌液染色表明鞭毛生长良好。2% 和 3% 的效果较差,细菌扩散速度慢,染色发现鞭毛发育不良。

2.2 菌液浓度的影响

分别用不稀释以及稀释成 1∶10、1∶20、1∶30、1∶50浓度的菌液进行涂片染色,结果以 1∶30染色效果最好,菌量合适,细菌在显微镜视野中均匀分布,鞭毛着色清晰无粘连。1∶10、1∶20效果次之,部分细菌鞭毛未见着色。未稀释的几乎无鞭毛着色。1∶50的菌量略少。

2.3 固定液对染色的影响

用 1∶30稀释的菌液来探索固定液对染色的影响,分别用经鞭毛固定液固定[3]和未固定的涂片进行染色。结果发现,相比之下,未经固定液处理的涂片上的细菌数量未见减少,经固定的涂片上鞭毛有一定程度折损。

2.4 媒染剂成分和媒染时间的影响

本实验所用媒染剂与利夫森氏法、户田法、西氵尺菅原法所用媒染剂进行比较染色。结果:本实验所用媒染剂能充分增粗鞭毛和菌体,镜下鞭毛形态生动清晰,且媒染剂可长期保存,西氵尺菅原法所用媒染剂不易配制,只能保存 1周,利夫森和户田法所用媒染剂染出的鞭毛较细,镜下见鞭毛着色不充分,背景较脏。本实验又分别以 3、5、10、20、30 min5种不同时间进行媒染,发现 5 min媒染后能充分增粗鞭毛和菌体,背景干净;10、20、30 min媒染后,背景较脏,3 min媒染后鞭毛着色不好。

2.5 染色时间的影响

本文用美蓝、硼砂配制的染色液分别染色 2、5、10 min,结果表明染色时间以 10 min最佳,鞭毛上色深且清晰;5 min的菌体基本着色,但鞭毛着色浅,不易观察;2 min的菌体鞭毛均不着色,见附图。



附图 变形杆菌菌体和鞭毛均被染上蓝色
(改进法染色× 100)

3 讨论

实验表明,细菌鞭毛染色的影响因素主要在于以下方面:① 培养基琼脂浓度过高,不利细菌迁徙生长,过低又不易划线接种。② 菌液浓度过高导致菌量过大,媒染剂作用不充分;过低亦将影响镜下观察效果。③ 细菌经洗下后加入甲醛已被固定,涂片再用固定液无必要。④ 染色中过多使用辅助媒染剂或媒染时间过长均无必要,在本实验筛选的媒染条件下已可达到理想效果。⑤ 染色时间过短,鞭毛不易着色,过长将造成鞭毛间染料粘连,不易洗净,影响观察效果。

关键词 变形杆菌;鞭毛;染色条件
中图法分类号 R372

参考文献

1 钱存柔编.微生物学实验.北京:北京大学出版社,1985.206~207
2 [日]微生物研究法讨论会编.微生物学实验法.北京:科学出版社,1981:102~103
3 曹俊杰.改进鞭毛染色液.第三军医大学学报,1990;12(2):137

(收稿:1997-11-10;修回:1998-01-05)
(编辑 刘 鹏)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net