DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.05.017

异硫氰荧光素活体体内标记绿脓杆菌示踪烫伤大鼠内脏播散的观察

秦孝建 肖光夏 彭毅志 张雅萍 刘明政（西南医院 烧伤研究所）

用绿脓杆菌肠道管饲实验动物，采用间接荧光染色法研究烧伤后肠源性感染的播散，在我所已获成功[1]。最近，我们用异硫氰荧光素直接标记绿脓杆菌示踪内脏播散又获成功[2]。本文是利用肠源性感染实验动物的肝、肾、肺组织标本482份同时进行匀浆液涂片和冰冻切片在荧光显微镜下镜检，对这两种方法进行了对比研究。采用异硫氰荧光素直接标记细菌，取组织匀浆液在镜下则可观察到游动的活菌。此外，匀浆液直接荧光法的检出率明显高于冰冻切片荧光法，本组标本中，匀浆液直接荧光法阳性率为62.6%，每视野平均检出菌体1.3个；而冰冻切片荧光法阳性率44.1%，每视野平均检出菌体只有0.3个，差别非常显著。在肝、肾、肺脏器匀浆液中检出率分别为71.2%、57.5%、45.3%。每视野的细菌数分别为2.1个，1.2个，0.7个菌体，这说明异硫氰荧光素直接标记活菌经胃肠道攻击动物首先侵犯的器官是肝、以后是肾、肺组织。

1 材料与方法

（1）标记细菌：

从烧伤病人分离的绿脓杆菌经成都生物制品研究所生产的绿脓杆菌分型血清鉴定为Ⅰ型。接种于血平板37℃24h孵育，无菌生理盐水洗脱（3000r/min，15min×2），制成菌液浓度为7×10^9/ml，加入磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液 pH 5。异硫氰荧光素（德国产）20μg/ml，4℃搅拌12h，再用无菌生理盐水洗脱（3000r/min，15min×2），除去多余的游离荧光素，使菌液浓度为7×10^9/ml，4℃保存，可使用1周。标记好的活菌在1月内还能看到细菌的游动，但荧光强度和细菌数已大大减少。

（2）实验动物大鼠，禁时8h，清醒状态下将胃管经口插入胃内，注入1.5% $NaHCO_3$ 1 ml，1min后再注入菌液（1 ml/100g），自由进食，8h后，1%戊巴比妥钠（5 mg/100g）腹腔麻醉，背部电推剃毛，置剃毛区于92℃水中18s，造成30%TBSAⅡ°烫伤，立即腹腔注入无菌生理盐水（8 ml/100g）抗休克。

（3）动物分别在4h，12h，24h，48h，72h活杀，取肝、肾、肺组织两份，一份马上进行冰冻切片，立即用荧光显微镜检查（简称冰冻切片荧光法）；另一份用电子称（瑞典产）称重0.2g组织，制成10%的匀浆液，用铂环6μl取匀浆液直接涂于干净的玻片上，在荧光显微镜镜检（简称匀浆液直接涂片荧光法），荧光显微镜（OLYMPUS VANO型日本产）10×100镜下观察10个视野的细菌总数，求出每个视野的平均数（冰冻切片与匀浆镜检计数相同）。

2 结果与讨论

2.1 组织匀浆液直接涂片荧光检测法优于冰冻切片荧光检测法

经两种方法的检测，匀浆直接荧光法有以下优点：（1）可观察到活菌的游动。以往我所采用间接荧光抗体法进行肠源性感染的研究[3]。该法在组织切片中，细菌已被固定。在镜下不能观察细菌的游动情况，采用直接标记细菌，取组织匀浆液在荧光显微镜下检查，则可观察到活菌的游动。（2）匀浆液直接荧光法对标记细菌的检出率明显高于冰冻切片荧光

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

法。两种方法的检测结果见表1。两法的注意点是匀浆时将匀管营置于冰浴内匀浆，匀浆液

表1　匀浆液直接荧光法、冰冻切片荧光法的检测结果

方　法	标本数	阳性数（%）	菌体数平均值/视野
匀浆液直接荧光法	482	302(62.6)	1.3*
冷冻切片荧光法	410	181(44.1)	0.3*

注：两组比较$P<0.001$相差非常显著

要准确定量和均匀涂片，切片和匀浆液要避光在4℃冰箱保存；一般在2 h内完成镜检，放置过久会使标本的荧光亮度减弱，影响检查结果。

2.2　在肝、肾、肺脏器标本荧光检查标记活菌的结果（见表2）

表2　匀浆液荧光镜检肝、肾、肺脏的结果

脏　器	标本数	阳性数（%）	菌数/野视（平均值）
肝	163	116(71.2)	2.1
肾	160	92(57.5)	1.2
肺	159	72(45.3)	0.7

注：肝与肾比较$P<0.02$、肝与肺比较$P<0.001$，相差非常显著

说明异硫氰荧光素直接活菌经胃肠道攻击动物，造成肠源性感染，首先是侵犯肝脏，时间也较早[4]，以后是肾、肺脏。

参考文献

1. 马利，等。严重烧伤后肠源性感染的实验研究。第三军医大学烧伤整形专辑　1984:99～109
2. 彭毅志，等。脂质过氧化在严重烫伤后肠源性感染发病机制中的作用。第二届中美烧伤创伤会议论文集　1989:83
3. 王德旺，等。脆弱类杆菌，产黑类杆菌间接荧光抗体染色法与厌氧菌培养法的对比研究。中华微生物与免疫学杂志。　1984;3(4):180～182
4. Howerton EE, et al. The intestinal tract as a portal of entry of Pseudomonas aeruginosa in burned rat. J. Trauma 1972;12(4):335～350

（收稿：1989.11.11；修回：1990.05.04）

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