

104.58%,均在 80%~120%可接受范围内,完全可满足 hs-CRP 与 CRP 检测的临床需求。

参考区间是指一群健康人针对特定项目的检测结果的可信区间。若实验室采用厂家或出版物提供的参考区间,须对其进行验证确认。CLSI C28-A2 提供了 3 种参考区间的确认方案,审查与评估最初建立参考区间过程所分析的影响因子、由于 CRP 为常规生化项目,《全国临床检验操作规程(第 3 版)》提供了最新的参考区间,因此选用 20 个参考个体数据的方法对其进行验证,结果显示,参考区间 0.068~8.200 mg/L 符合临床要求。

综上所述,西门子 BNⅡ全自动特定蛋白分析仪采用乳胶增强散射比浊法检测 CRP 的主要分析性能验证结果符合质量目标要求。对检测系统的性能进行有效地评估和监测,有助于提高检测结果的准确性和可靠性。国内检测系统种类繁多且自建系统较多,更应系统和合理地选择、设计定量检测项目的性能验证实验方案。

参考文献

[1] 中国合格评定国家认可委员. ISO15189 医学实验室质量和能力认可准则[R]. 2006-06-01.

[2] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP5-A2 Evaluation of precision performance of quantitative measurement methods[S]. Wayne,PA: CLSI,2004.

• 检验技术与方法 •

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2 User demonstration of performance for precision and accuracy[S]. Wayne, PA: CLSI,2004.

[4] 张葵. 定量检测系统方法学性能验证实验的基本方法[J]. 临床检验杂志,2009,27(5):321-323.

[5] 毕波,吕元. 定量检测系统方法学性能验证实验的系统设计[J]. 中华检验医学杂志,2007,30(2):143-145.

[6] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:591.

[7] Clinical and Laboratory Standards Institute. C28-A2: How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory[S]. Wayne, PA: CLSI,2000.

[8] Charuruks N,Laohajinda B,Rujiwanitgun S,et al. Reference value for C-reactive protein and its distribution pattern in Thai Adults [J]. Cire J,2005,69(3):339-344.

[9] Tomoda H,Aoki N. Prognostic value of C-reactive protein levels within six hours after the onset of acute myocardial infarction[J]. Am Heart J,2000,140(2):324-328.

[10] 程红革. 超敏 C 反应蛋白与心血管疾病的预防[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1291-1293.

[11] 连连. 血清同型半胱氨酸和超敏 C 反应蛋白与脑梗死关系的探讨[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(11):1315-1316.

(收稿日期:2011-03-09)

细菌鞭毛染色法的改良研究

梁 莹,邓毛子

(咸宁学院基础医学院病原实验室,湖北 437100)

摘要:目的 探讨简便的细菌鞭毛染色法。方法 对细菌的鞭毛染色法在染液浓度、温度、时间上进行了调整。结果 镜检细菌菌体呈深红色,鞭毛呈浅红色,背景清晰。**结论** 该染色方法更加简便,染色结果耗时更短,效果良好。

关键词:研究; 细菌鞭毛染色; 改良研究

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.043 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)20-2390-02

细菌的鞭毛直径非常纤细仅有 10~30 nm,需要用电子显微镜才能观察^[1],或经 Leifson 法^[2]、Gray 法^[2]、镀银法^[3]、Ryu 法^[4]等方法染色,使鞭毛增粗后才能在普通光学显微镜下观察到。在这些特殊染色过程中又受许多因素影响。本实验研究细菌的鞭毛染色,在染液浓度、温度、时间上都作了改变,进行了调整,现将结果报道如下。

1 材料与方 法

1.1 材料 变形杆菌(来源华中科技大学同济医学院微生物学教研室),营养琼脂(生化试剂 BR,购自北京奥博星生物技术有限责任公司),普通肉汤培养基(由本室提供),DHP-9082D 电热恒温培养箱两台(购于上海申贤恒温设备厂),一台调至 37℃,另一台调至 50℃,普通光学显微镜(购于重庆光电仪器有限公司),钾明矾[KAL(SO4)₂,H₂O 化学试剂 CR,购自北京化工厂],鞣酸(C₇₆H₅₂O₄₆ 化学试剂 CR 来源于天津市恒兴化学试剂制造有限公司),苯酚(C₆H₆O 化学试剂 CR 来源武汉市江北化学试剂厂),碱性复红乙醇饱和液(碱性品红 1 g+95%乙醇 100 mL),碱性品红(生化试剂 CR,购自上海化学试剂公司)。

1.2 试验菌 变形杆菌经普通肉汤培养基培养 18 h 复活,点

种普通营养琼脂培养基平皿培养 16 h,传代 5 次(以增强细菌的运动力)^[5],备用。

1.3 玻片脱脂处理^[6] 将载玻片一片一片放入 1%清洁液中浸泡 30 min,以热水冲洗数次,彻底洗净、晾干、备用。

1.4 染液的配制 (1)传统染液的配制^[7]:20%钾明矾饱和液 20 mL,20%鞣酸溶液 20 mL,5%苯酚溶液 20 mL,碱性复红乙醇饱和液 15 mL。将钾明矾饱和液和鞣酸溶液混匀加热,一边振摇,一边缓慢地将碱性复红乙醇饱和液滴进去,直到完全溶解、过滤、备用。(2)改良染液的配制:钾明矾 1 g,鞣酸 4 g,苯酚 2 mL 加入蒸馏水 80 mL,隔水加热,待完全融化后,再加入碱性复红乙醇饱和液 10 mL 混匀,过滤,放入 40~50℃的热水中保温待染色用(防止染液结晶),备用。

1.5 方法 取第 5 代变形杆菌普通营养琼脂培养物周边菌苔,放入 1 mL 无菌蒸馏水中,浓度约 1.5×10¹²/L^[8](麦氏比浊法)^[9],轻轻摇匀,置 37℃恒温培养箱 8 min 取出,用毛细管吸取菌液放入脱脂处理过的载玻片上马上回吸(仅仅在玻片上看到有菌液的湿影即可),将带有菌液的玻片迅速放入 50℃的恒温培养箱内 5~8 min 干燥,取出进行染色,滴加传统染液保持 1 min,滴加 40~50℃改良染液保持 30~40 s,快速小水

流迅速冲掉染液,室温干燥,观察结果。

2 结 果

普通光学显微镜直接油镜观察:变形杆菌菌体着色殷红,鞭毛深红且粘连脱落较多,菌体与鞭毛颜色对比深,背景有块状染液沉淀(图 1)。改良后,变形杆菌菌体着色深红,鞭毛呈浅红,背景淡红,层次分明,轮廓清晰。鞭毛粗细适合染色效果好,见图 2。

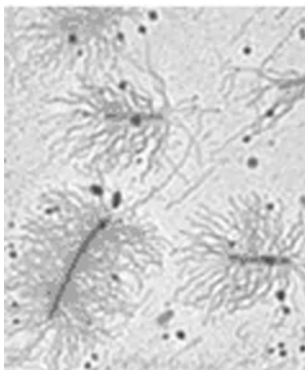
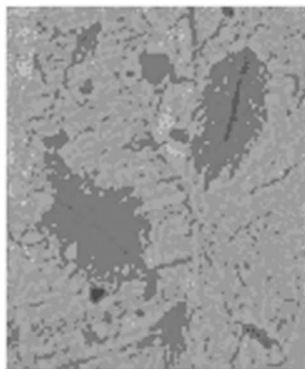


图 1 传统的鞭毛染色 图 2 改良后的鞭毛染色

3 讨 论

经过多次反复的试验,染液配制的浓度及温度与染色时间,都与染色的效果有密切的关系。(1)染液的配制在传统的基础上,其方法及用量都作了相应的调整,减少了配制上的繁琐。不像传统的配制方法先将各种固体溶解成溶液^[7,10],再将其溶液按一定的用量混合。而改良染液是首先将各种溶剂在用量上作了加减的调整,再一次性加量溶解,即可过滤,增强了其中的亲和力,减少了细菌的着色时间,只需 30~40 s 即可。(2)在染色的过程中,改良染液的温度始终保持在 40~50 ℃,它直接影响标本片的质量,温度偏低,标本片上因染液结晶而出现许多染液沉渣,而温度过高,容易蒸发掉水分,染液浓度偏高,使标本没有层次之分。(3)采用 50 ℃ 的恒温培养箱快速烘

干细菌标本,可使鞭毛蛋白高热凝固,不致过于膨大。快速流水冲掉标本染液,既能保证鞭毛染色效果又能保持视野背景洁净。

综上所述,改良方法染色方法简便、操作简单,呈现结果时间短、效果良好。适用于微生物学实验教学和临床微生物学鉴定,具有一定的推广价值。

参考文献

- [1] 谢文熙. 细菌鞭毛染色的效果和影响因素[J]. 检验医学与临床, 2010, 12(7): 1208.
- [2] Murray RGE, Doetsch RN, Robinow CF. Determinative and cytological light microscopy//Gerhardt P, Murray RGE, Wood WA, et al. Methods for general and molecular bacteriology[M]. Washington DC: American Society for Microbiology, 1994: 35-36.
- [3] Rhodes ME. The cytology of Pseudomonas spp. as revealed by a silverplating staining method[J]. J Gen Microbiol, 1958, 18(3): 639-648.
- [4] Kodaka H, Armfield AY, Lombard GL, et al. Practical procedure for demonstrating bacterial flagella[J]. J Clin Microbiol, 1982, 16(5): 948-952.
- [5] 潘运珍, 梁惠冰. 鞭毛镀银染色片的制作和体会[J]. 卫生职业教育, 2010, 28(4): 90.
- [6] 钱晓强, 张维萍. 载玻片清洁的新方法[J]. 医疗保健器具, 2008, 111(5): 66.
- [7] 于爱莲. 医学微生物学实验指导[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 59.
- [8] 吕锐. 细菌鞭毛染色法染色条件的探讨[J]. 青岛大学医学院学报, 2006, 42(1): 81.
- [9] 谭瑶, 赵清. K-B 纸片扩散法药敏试验[J]. 检验医学与临床, 2010, 7(20): 2290-2291.
- [10] 胡开辉. 微生物学实验[M]. 北京: 中国林业出版社, 2004: 30-31.

(收稿日期: 2011-03-09)

(上接第 2365 页)

参考文献

- [1] Allander T, Tammi MT, Eriksson M, et al. Cloning of a human parovirus by molecular screening of respiratory tract samples[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102(36): 12891-12896.
- [2] Kapoor A, Mehta N, Esper F, et al. Identification and characterization of a new bocavirus species in gorillas[J]. PLoS One, 2010, 5(7): 119-148.
- [3] Shirkoohi R, Endo R, Ishiguro N, et al. Antibodies against structural and nonstructural proteins of human bocavirus in human sera[J]. Clin Vaccine Immunol, 2010, 17(1): 190-193.
- [4] Song JR, Jin Y, Xie ZP, et al. Novel human bocavirus in children with acute respiratory tract infection[J]. Emerg Infect Dis, 2010, 16(2): 324-327.
- [5] Chow BD, Esper FP. The human bocavirus: a review and discussion of their role in infection[J]. Clin Lab Med, 2009, 29(4): 695-713.
- [6] Qu XW, Duan ZJ, Qi ZY, et al. Human bocavirus infection, People's Republic of China[J]. Emerg Infect Dis, 2007, 13(1): 165-168.
- [7] Naghipour M, Cuevas LE, Bakhshinejad T, et al. Human bocavirus in Iranian children with acute respiratory infections[J]. J Med

Virol, 2007, 79(5): 539-543.

- [8] Bastien N, Chui N, Joan L, et al. Detection of Human Bocavirus in Canadian children in a 1-year study[J]. J Clinical Microbiology, 2007, 45(2): 610-613.
- [9] Jacques J, Moret H, Renois F, et al. Human bocavirus quantitative DNA detection in French children hospitalized for acute bronchiolitis[J]. J Clin Virol, 2008, 43(2): 142-147.
- [10] Moriyama Y, Hamada H, Okada M, et al. Distinctive clinical features of human bocavirus in children younger than 2 years[J]. Eur J Pediatr, 2010, 169(9): 987-992.
- [11] Lindner J, Karalar L, Zehentmeier S, et al. Humoral immune response against human bocavirus VP2 virus-like particles[J]. Viral Immunol, 2008, 21(4): 443-449.
- [12] Zhao LQ, Qian Y, Ding YX, et al. The expression of the capsid protein VP2 from human bocavirus identified in Beijing and formation of virus-like particles (VLPs) in insect cells[J]. Bing Du Xue Bao, 2009, 25(5): 333-338.
- [13] Kapoor A, Slikas E, Simmonds P, et al. A newly identified bocavirus species in human stool[J]. J Infect Dis, 2009, 199(2): 196-200.

(收稿日期: 2011-08-09)