

小鼠胃白色念珠菌感染动物模型及G实验应用于医学微生物学实验教学研究

肖颖 曹倩 王瑞睿

山东大学 山东 济南 250012

【摘要】：临床G实验需抽取病人静脉血检测，在面向学生开设此实验项目后，无法采集病人静脉血。国内外已有多篇文章报道通过口服白色念珠菌后取小鼠肠道组织匀浆进行真菌培养、然后再菌落计数，发现用白色念珠菌口服或灌胃的方法均能发现白色念珠菌在小鼠胃肠道定植，证明作为条件致病菌的白色念珠菌可在小鼠胃肠道粘附。本实验项目拟进行方法学的优化与可控性的探索，建立小鼠白色念珠菌感染动物模型后取血或获取体液进行G实验，使之适用于医学微生物学实验教学，实现动物模型研究与临床检验试验引入本科实验教学的目标。深化医学微生物学实验的教学改革。

【关键词】：微生物学实验；G实验；动物模型

1 研究意义

医学微生物学在基础医学学科中占有重要地位，是医学教育教学中理论性及操作性很强的一门学科。其实验教学是对医学微生物学教学活动的巩固与加强，是提高学生观察能力、思维能力、实践能力、创新能力、运用能力的一个重要手段。我校医学微生物实验目前一直沿用“细菌形态观察、常规细菌的培养、非常规性细菌的培养、病原性球菌分离鉴定、药物敏感实验、结核分枝杆菌的培养及形态观察”这一实验体系，这些实验内容已经沿用了将近20余年甚至更长时间。实验内容虽均属于医学微生物学的经典实验，但已严重脱离临床，缺乏创新性与系统性。国务院《统筹推进世界一流大学和一流学科建设总体方案》提出，要坚持以一流为目标，培养富有创新精神和实践能力的创新型、应用型、复合型优秀人才^[1]。我们要培养具有科研创新精神与技术探究能力并存的综合性医学生，为此对医学微生物学实验教学进行改革创新，引进新的实验项目迫在眉睫。经我们调研，G实验为临床广泛使用的早期诊断深部真菌感染的实验方法。我们拟将这一实验方法引入医学微生物学实验教学。

2 国内外研究现状

侵袭性真菌感染(invasive pulmonary fungal infection, IPFI)又称深部真菌感染，是指当机体免疫力严重下降时，真菌侵犯皮下组织，黏膜和内脏而引起的感染性疾病。随着广谱抗菌药物、免疫抑制剂及各种重症患者的介入治疗在临床的广泛应用，侵袭性真菌感染的病发率逐年升高。IPFI具有发病率高、临床表现无特异性、病情进展迅速、临床实验诊断率低、致死率高等临床特点，是困扰临床治疗的一大难题。目前治疗真菌的特异性抗菌药较少，临床IPFI有效治疗手段为早期快速准确的诊断，以进行积极预防和有效治疗。培养基

培养真菌及菌落计数方法为判断真菌感染的金标准，但此传统方法培养时间长(约7~14天)，阳性率低；即使培养结果为阴性也不能排除真菌感染的可能，很可能延误病人的治疗。因此，检测真菌的抗原、抗体及代谢产物已逐步成为临床诊断深部真菌感染的早期有效手段。

血浆1,3-β-D-葡聚糖(β-G)是真菌细胞壁中含量较高的一种多聚糖成分，约占真菌细胞壁干重的50%以上，只存在于除隐球菌和结合菌(包括根霉菌、毛霉菌等)以外所有深部真菌内，但在人类细胞和原核病毒内不含有，当人体深部受白色念珠菌、曲霉菌、耶氏肺孢菌等这类真菌感染时，真菌在代谢过程会不断释放出β葡聚糖。检查患者的血液(血浆或血清)，会发现β葡聚糖含量明显高于非感染者。因此，β葡聚糖可作为具有这种细胞结构的真菌感染标识物。医学上通常把用于检测真菌β葡聚糖的酶试验称为G试验。与培养基培养真菌的传统方法比较，G实验检测具有灵敏度高、特异性高、快速、简便等优点。因此G实验可以作为临床深部真菌感染早期诊断的方法^[2]。

临床G实验需抽取病人静脉血检测，在面向学生开设此实验项目后，无法采集病人静脉血。本实验拟进行方法学的优化与可控性的探索，建立小鼠白色念珠菌感染动物模型后取血或获取体液进行G实验，使之适用于医学微生物学实验教学，实现动物模型研究与临床检验试验引入本科实验教学的目标。以期突破现有的医学微生物学实验教学单学科、单元化、单一性的传统模式。

3 研究方法

(1) 小鼠胃白色念珠菌感染动物模型的建立：机体免疫力功能下降及消化道溃疡可能给定植于胃肠道的白色念

珠菌以大量繁殖和侵入胃肠道粘膜创造了条件。本实验通过降低小鼠免疫力并给小鼠胃肠道造成溃疡,然后用白色念珠菌灌胃建立小鼠胃白念珠菌感染动物模型:将120只小鼠随机分成四组。对照1组(30只)给予细菌浓度为 5×10^{12} 个细菌/ml白念珠菌菌液0.5ml灌胃后在标准饲养条件下喂养;对照2组(30只)腹腔内注射浓度50mg/ml的环磷酸胺溶液0.02ml/g(小鼠体重),0.3%冰醋酸溶液0.5ml灌胃后在标准饲养条件下喂养;实验1组(30只)腹腔内注射浓度50mg/ml的环磷酸胺溶液0.02ml/g(小鼠体重),0.3%醋酸溶液0.5ml灌胃,3小时后给予细菌浓度 5×10^{12} 个细菌/ml白念珠菌菌液0.5ml灌胃,然后在标准饲养条件下喂养。实验2组(30只)腹腔内注射浓度50mg/ml的环磷酸胺溶液0.02ml/g(小鼠体重),0.3%醋酸溶液0.5ml灌胃,3小时后给予细菌浓度 5×10^{12} 个细菌/ml白念珠菌菌液1ml灌胃,然后在标准饲养条件下喂养。3小时后取对照2组小鼠3只拉颈处死、剖腹,沿胃长轴剪开胃壁,观察胃外观及溃疡情况。于第7天将四组存活小鼠耳缘静脉取血后进行G实验,记录实验结果。然后将小鼠拉颈处死,观察胃外观及溃疡情况,解剖后取胃组织置于含一滴10%KOH溶液的载玻片上,放入60℃恒温水湿箱中溶解10分钟做真菌镜检、并剪取胃组织进行组织病理检查,比较结果以期获得白色念珠菌悬液灌胃剂量。

(2) G实验:建立小鼠胃白色念珠菌感染动物模型后,取血进行G实验。获取G实验检测的阳性结果分析,使学生了解目前临床广泛使用的G实验操作方法及实验原理。这一实验是一种快速定量的临床检测方法,帮助早期诊断传统方法难以判断的侵袭性真菌感染。

4 实验结果

(1) 对照1组小鼠未出现死亡。对照2组小鼠分别于实验第二天、第四天各死亡1只,实验1组小鼠于实验第二天、第四天、第六天各死亡1只。实验2组小鼠于实验第二天死亡3只、第三天死亡5只、第五天死亡3只。

(2) 对照2组中3只小鼠在灌胃2小时后解剖观察胃部出现肉眼可见溃疡。

(3) 对照1组有5只小鼠胃组织真菌镜检见少量假菌丝;对照2组存活的28只小鼠胃组织真菌镜检未见孢子及

菌丝;实验1组存活的27只小鼠中有24只胃组织真菌镜检发现念珠菌孢子、芽生孢子、假菌丝及大量成团菌丝,24只真菌镜检阳性的小鼠中,有23只胃在胃粘膜表面溃疡中及粘膜浅层见大量芽生孢子、假菌丝及菌丝;实验2组存活的19只小鼠中有18只胃组织真菌镜检发现念珠菌孢子、假菌丝及大量成团菌丝,19只真菌镜检阳性的小鼠中,有17只胃粘膜表面溃疡中及粘膜浅层见大量假菌丝及菌丝。

(4) 实验1组、实验2组小鼠取血后进行G实验结果与胃组织经念珠菌显色培养基30℃培养48小时后菌落计数结果基本相符。

5 结论

(1) 由于实验2组小鼠死亡率过高,所以确定建立小鼠胃白色念珠菌感染动物模型的给药条件为腹腔内注射浓度50mg/ml的环磷酸胺溶液0.02ml/g(小鼠体重),0.3%醋酸溶液0.5ml灌胃,3小时后给予细菌浓度 5×10^{12} 个细菌/ml白念珠菌菌悬液0.5ml灌胃。

(2) 建立小鼠胃白色念珠菌感染动物模型后,取血进行G实验。获取G实验检测的阳性结果分析。

6 该实验创新点与推广价值

该实验首次将小鼠胃白色念珠菌感染动物模型建立介绍给学生。并可以在此模型建立的基础上进行医学微生物学、生物化学和病理学实验项目。实现医学实验多学科的创新。突破现有基础医学实验教学单学科、单元化、单一性的传统模式,可在医学院校本科及研究生实验教学中进行推广。该项目也是首次将G实验应用于小鼠血清检测的一次大胆实践,实现临床与基础实验教学的有机结合。基于本项目涉及多学科知识内容,可以对各类指标检测实验进行综合与拆分,可应用于融合实验教学或各学科的常规实验中。

7 意义

在科学技术高速发展的当今时代,医学发展势不可挡。不论从科技发展角度,还是社会需求角度来看,都亟须大量的医学专业人才。高校教师在进行教学工作时,必须积极转变教学思维,加大改革力度,不断提升教学效果与质量,提高学生的专业水平,为学生日后成为一名合格的医生及科研工作者打下坚实的基础。

参考文献:

[1] 李玲.“双一流”医科院校建设背景下医学微生物与免疫学实验教学的优化探讨[J].医学教育研究与实践,2020年6月第28卷第3期.

[2] 刘媛.G实验在早期诊断深部真菌感染中的临床意义[J].临床医学工程,2017年9月第24卷第9期.

作者简介:肖颖,1977年12月生,女,山东济南人,硕士,实验师,研究方向:医学免疫学与病原生物学。