

工作场所空气中微生物采样与检测方法的研究进展

黄翔, 黎海红

(广西壮族自治区职业病防治研究院, 广西南宁 530021)

摘要: 生物因素是职业病危害因素的一大类。空气微生物的采样方法主要有自然沉降法、撞击法、气旋式采样法、过滤采样法和大气颗粒物采样法。近年来, 该领域的检测技术不断更新与升级, 出现了血清免疫学、基因、拉曼光谱和电阻抗等新的检测技术。本文对这些采样和检测方法进行简述与比较。

关键词: 工作场所; 微生物; 采样; 检测方法; 研究进展

中图分类号: R134 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2017)03-0187-04 DOI:10.13631/j.cnki.zggyx.2017.03.010

Research progress in sampling and detection method of microorganisms in air of workplace

Huang Xiang, Li Haihong

(Guangxi Zhuang Autonomous Region Institute for the Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Nanning 530021, China)

Abstract: Biological factors are a major class of occupational hazards. As to the sampling methods for microbe from workplace air the natural precipitation sampling, impacting sampling, cyclonic sampling, filter sampling and atmospheric particle sampling should be the most popular. In recent years, the detecting techniques have been constantly updated and upgraded, a lot of new methods were developed such as serum immunologic, genetic, Raman spectroscopic and electrical impedance, etc. The article will make a brief introduction and comparison on these techniques.

Key words: workplace; microorganisms; sampling; detection methods; research progress

生物因素是职业病危害因素的一大类。病原微生物的显著特点之一是种类繁多变异快, 微生物随着环境条件的改变而发生变异, 衍生出新物种。历史上发生的传染病, 如 SARS、结核、登革热等均由病原体变异形成新的病原体而导致。变异特性使得微生物不断产生新的病原体及其相应的传染病^[1]。医务工作者对有关疾病的统计中发现, 由生物因子所引起的疾病占 33.5%^[2], 其中微生物因子为主要因素, 因此对工作场所空气中微生物致病性的研究具有非常现实的意义。本文通过介绍工作场所微生物的采样与检测方法, 了解工作场所中微生物的种类、数量和分布, 以便制订相应的防治对策。

1 采样方法

单个微生物的粒径一般为 0.3~10 μm , 而在空气中形成微生物气溶胶后, 其粒径范围通常为 0.3~100 μm ^[3]。1861 年法国科学家巴斯德第一次从空气中采集到微生物, 从此开启了空气微生物采样研究的新领域。空气微生物采样的一般思路是将空气中的微生物富集在固体、半固体或液体采样介质中, 再进行后续检测分析。经过一百多年的发展, 多种多样的空气微生物采样器被研制出来, 根据采样器的不同原理, 归纳起来可分为五类, 即自然沉降法、撞击采样器法、气旋式采样法、过滤式采样器法及大气颗粒物采样法^[4]。

1.1 自然沉降法和撞击法

收稿日期: 2016-08-22; 修回日期: 2016-12-05

基金项目: 广西医疗卫生适宜技术开发与推广应用研究项目 (S2016073)

作者简介: 黄翔 (1983—), 男, 主管医师, 主要从事职业病防治。

通信作者: 黎海红, 副主任医师, 研究方向: 职业病防治, E-mail: lhhlyx@163.com。

在卫生领域, 工作场所空气中微生物采样方法基本参照《公共场所卫生检验方法 第 3 部分: 空气微生物》(GB/T 18202.3—2013)^[5]。该标准中有两种采样方法: 撞击法和自然沉降法。撞击法是使用六级筛孔撞击式微生物采样器, 无菌操作, 以 28.3 L/min 的流量采集 5~15 min, 采样器使用按照说明书要求进行。自然沉降法是将营养琼脂平板置于采样点处, 打开皿盖, 暴露 5 min。我国对公共场所的微生物采样普遍采用自然沉降法。

但在 10 多年前, 已有学者认为自然沉降法对可进入人体呼吸道的微生物粒子 ($d < 8 \mu\text{m}$) 采集效率低, 结果不能完全反映微生物在空气中的整体分布状况, 不适宜用于研究与人类健康有关的微生物气溶胶^[6,7]。近年来仍有学者呼吁, 自然沉降法空气采样细菌总数合格率与撞击法有差异, 传统的空气监测方法“沉降法”无法适应实际工作中空气洁净度监测的需要, 撞击法更能反映出洁净手术室空气微生物的动态变化^[8,9]。郭雅蓉等人^[10]认为, 固体撞击法由于受环境因素影响小, 准确可靠, 应优先采用, 但自然沉降法 (液体撞击法) 的检测结果也是可靠的。

尽管对自然沉降法和撞击法仍在争论不休, 但自然沉降法操作简单、经济, 可大致反映空气中微生物的数量状况和群落结构, 仍被用作空气微生物采样的常用方法。目前, 仍有一些国家将该方法作为空气质量评估的标准采集方法。

1.2 气旋式采样法

气旋式采样器是基于旋风除尘器中两相流体力学的原理, 利用气流在高速旋转过程中的惯性作用将气流和微生物颗粒进行分离。研究表明, 气旋式采样器对病毒粒子 (T-3 噬菌

体)的采集效率较 Andersen 采样器高约 30 倍^[11]。气旋式采样器还可对微生物颗粒进行分粒径收集。美国职业与安全研究院(NOISH)设计了一种新型的分粒径气旋式采样器,可将微生物颗粒分三种粒径范围($<1\ \mu\text{m}$ 、 $1\sim 4\ \mu\text{m}$ 、 $>4\ \mu\text{m}$)进行收集,并通过烟雾舱实验验证该采样器对甲型流感病毒有较高的采样效率^[12,13]。气旋式采样器的缺点是易发生收集的粒子被气流重新带走,出现再携带现象,导致采样出现较大的误差。

1.3 过滤式采样法

过滤采样器的原理是通过截留、碰撞、沉降等机制,将微生物粒子阻留在滤膜上。其优点是采集效率较高,操作简单;缺点是在采样过程中,活性较低的微生物容易因为脱水而死亡,后续的洗脱过程也会影响微生物的活性,且滤膜容易堵塞,难以保持稳定的采气量^[14,15]。Thorne 等^[16]通过实验认为,液体撞击式采样器和微孔滤膜过滤式采样器的采集效率比过滤式采样器高。Myatt 等^[17]的研究表明过滤采集方法结合 PCR 的分子检测手段有明显的优势,且过滤采样法可进行长时间的采样。

1.4 大气颗粒物采样法

大气颗粒物采样法是通过具有一定切割特性的采样器,以恒速抽取定量体积的空气,将空气中相应粒径的颗粒物截留在已经恒重的滤膜上。大气颗粒物采样器缺点是不适用于基于培养的微生物检测方法,优点是采样流量大(中流量 100 L/min,大流量 1 000 L/min),可富集较多空气微生物,与分子生物学检测技术结合具有优势,可关注与人类健康相关的颗粒物(PM₁₀、PM_{2.5}),具有实际研究意义。

2 检测方法

对空气中的微生物进行定量研究,准确了解其危害程度,除了选择合适的采样方法外,还需要结合高效的微生物检测手段。常规检测方法主要是基于病原体水平进行操作,采用直接涂片镜检、分离培养等操作,这些操作繁琐、耗时,对操作人员的要求比较高^[18]。目前一些微生物快速检测的方法主要是通过综合应用微生物学、化学、生物化学、生物物理学、免疫学以及血清学试验技术对微生物进行分离、检测、鉴定和计数,相比较常规的检测方法,快速检测方法更加快捷、方便和灵敏^[19]。

2.1 传统病原微生物的检测技术

直接涂片染色镜检:该法简便快捷,无需特殊的仪器和设备。将病原微生物染色后用显微镜观察个体形态,该法对有特殊形态的病原微生物尤其适合。

分离培养与生化反应:主要用于从多种细菌中分离纯化某一种细菌,并对分离出来的细菌进行分类鉴定。该法需要培养细菌,检测周期长,不能同时处理批量样本。为解决这一问题,不断研制出各种自动化培养和鉴定系统,如全自动微生物分析仪,可同时做细菌鉴定和药敏试验,批量检验 500 多个菌种。

活体组织细胞培养:该法适用于专营活组织细胞内存活的病毒类病原体,不同病原体敏感的组织细胞不一样,通过

培养后产生的特异病变对病原体进行鉴定。该法需要专一性的活体组织细胞,操作时间长,对操作人员要求比较高。

2.2 血清学与免疫学检测技术

通过已知的抗体或抗原来检测病原体的抗原或抗体从而对病原体进行快速鉴定,常用的方法包括血清凝集技术、乳胶凝集试验、荧光抗体检测技术、协同凝集试验、酶联免疫测试技术等。其中,酶联免疫技术的应用大大提高了血清学检测的敏感性和特异性^[20]。

2.3 基因水平的检测技术

病原微生物的基因片段具有种属的特异性,检测其特有的基因片段序列可用来鉴别病原微生物的种属。这一鉴定方法不再局限于对普通外部形态结构和生理生化特性的检验水平上,而是深入到分子水平及核酸水平,成为了鉴定病原体的主要检测技术^[21]。

核酸杂交技术:该法的原理是碱基互补配对原则,杂交双方是所使用的单链探针与拟检测的核酸,主要包括膜上印迹杂交和核酸原位杂交两种,探针还可以用荧光标记,在荧光显微镜或激光扫描共聚焦显微镜下即可鉴别病原体,还可显示其所在三维空间的位置。该法简便、敏感、快速、特异。

基因芯片技术:将数以万计的基因探针有规律地排列成二维阵列,固定到固态支持物上,然后与标记的样品分子进行核酸杂交。该法检测原理与核酸杂交一样,但解决了传统核酸杂交技术操作繁杂、自动化程度不高的问题,大大缩短了鉴定需要的时间,且能检测出病原体是否具有耐药的特性。

PCR 技术:PCR 法是对特定核苷酸片段进行指数级的扩增,在扩增反应结束后,再通过凝胶电泳对扩增产物进行定性分析的方法,是分子生物学技术的基础方法。PCR 技术具备敏感度高、特异性强、可实现快速检测等优点,样品中大部分的微生物能同时被检测出来,是检测微生物气溶胶的有效途径,已经得到了广泛的应用。近些年来,PCR 技术应用于空气微生物的研究程度不断深入,表现出很好的应用前景^[22]。2007 年,刘家云等人^[23]建立了敏感、特异、快速检测志贺菌属 *ipaH* 基因、沙门菌属 *ipaB* 基因以及霍乱弧菌 *EPSM* 基因的多重 PCR 方法。对多种病原体 DNA 的同步快速扩增,可用于高危致病菌的早期快速诊断。2008 年,Reyes 等人^[24]利用多重 PCR 对 99 例智利儿童的脑脊液样本中易引起急性细菌性脑膜炎的常见致病菌(肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟球菌和流感嗜血菌)进行检测,证实了多重 PCR 对常见的 3 种细菌性脑膜炎的检测是一种快速而可靠的方法。2009 年,Schmitz 等人^[25]用多重 PCR 技术建立了一种快速高效鉴定 7 种高危人乳头状瘤病毒(HPV)基因型方法,并且达到了定量的检测,同时也解释了不同基因型感染的持续时间、病毒载量的动力学和疾病重现性等问题。

2.4 光镊拉曼光谱技术

该技术原理是利用高度会聚的激光束,囚禁溶液中的活细胞,再通过瞬时加大囚禁细胞的光束来激发细胞内分子的拉曼散射,并收集该细胞的拉曼光谱。该技术可以在接近其自然生理状态下研究单个细胞或细胞器,可以实时观察单个

细胞及细胞器的生化变化过程, 判别不同类型、不同状态的细胞, 获知很多掩盖在群体平均信息下的个体生命信息, 已开展的研究对象有芽孢、细菌、染色体、淋巴细胞、病毒感染细胞、血液成分、酵母细胞等。此项技术高度敏感, 为研究细胞的生命过程和诊断细胞异常提供了有用工具^[26]。

2.5 电阻抗法

电阻抗法是近年发展起来的一项生物学技术, 已应用于食品微生物的检验中。其原理是细菌在培养基内生长繁殖的过程中, 将会使培养基中的大分子电中性物质如碳水化合物、蛋白质和脂类等, 代谢成为具有电活性的小分子物质如乳酸盐、醋酸盐等, 这些离子态物质能增加培养基的导电性, 使培养基的阻抗发生变化, 通过检测培养基的电阻抗变化情况, 判定细菌在培养基中的生长繁殖特性, 即可检测出相应的细菌种类。该法目前已经用于检测细菌总数、霉菌、酵母菌、大肠杆菌、沙门氏菌、金黄色葡萄球菌等微生物种属及个体, 如以 AOAC991.38 食品中沙门氏菌电阻抗检测法为例^[27]。

2.6 其他快速检测方法

如即用型试纸检验法、PerrifilmTMPlate 系列生物测试片, 可分别检测菌落种数、大肠菌群计数、霉菌和酵母计数。由 RCPScientific Inc 公司开发上市的 Regdigel 系列, 除上述项目外还有检测乳酸杆菌、沙门氏菌、葡萄球菌的产品; 还有霉菌快速检测纸, 应用于食品霉菌的检测操作快捷, 在 36℃ 的条件下培养, 仅需 2 d 就可观察结果, 比现在的国家标准检测方法缩短了 3~5 d, 大大提高了工作效率^[28]。

随着分子生物学的发展, 非培养方法是未来发展的趋势。Angenent 等人^[29]分别使用微生物培养法、荧光显微镜计数法和分子生物学技术(非培养法)研究医院污水池和周边空气中病原菌的污染状况, 研究结果表明荧光显微镜计数法检测出的微生物浓度是培养法的 1 000 倍, 传统的培养法用于潜在病原菌研究上已显得力不从心。Korzeniewska 等人^[30]的研究表明, 培养法和荧光原位杂交技术(FISH)检测出的微生物浓度具有统计学上的显著相关性, 且荧光原位杂交技术法检测出的微生物浓度是培养法的 1 000 倍, FISH 方法更适用于评价空气样品中的细菌浓度。

3 结语

近年来, 各种手持便携式的空气微生物采样器相继产生, 种类齐全, 各具特色^[31], 可以满足作业场所空气中各种微生物采样的需要。

在我国职业卫生标准中, 工作场所空气中有毒物质的测定方法约有 100 种, 物理因素的测量方法 10 种, 但却没有工作场所空气中微生物的测定方法和标准, 目前是参照《公共场所卫生检验方法 第 3 部分: 空气微生物》(GB/T 18202.3—2013) 的标准进行检测。尽管对自然沉降法尚有争论^[32,33], 但自然沉降法因其简便经济仍被广泛应用。

通过比较可以发现, 不同的采样与检测方法各具优缺点, 每一种检测方法对于灵敏度、耗时和成本的考虑不能同时兼顾。在实际选择检测方法时, 需要针对不同的检测目标和限量要求来确定, 从而达到最佳的技术性价比。目前大多数岗

位对检测技术的要求不高, 在这种情况下选择方法简单、经济可行的采样与检测方法就可以满足其要求, 因此要在了解各种采样器及其检测原理的基础上, 进一步开发灵敏准确、简便快捷、成本低的方法, 以满足不同场所空气中微生物的检测要求。

参考文献:

- [1] 贾文祥. 医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 9.
- [2] 孙贵范. 职业卫生与职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013: 243.
- [3] Agranovski V, Ristovski Z D. Real-time monitoring of viable bioaerosols: Capability of the UVAPS to predict the amount of individual microorganisms in aerosol particles [J]. Journal of Aerosol Science, 2005, 36 (5): 665-676.
- [4] 贺小萌. 空气微生物污染的检测方法及其在污水厂的应用研究 [D]. 哈尔滨工业大学, 2014.
- [5] GB/T 18204.3—2013, 公共场所卫生检验方法 第 3 部分: 空气微生物 [S].
- [6] 于玺华, 车凤翔. 现代空气微生物学及采检鉴技术 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1998: 87-174.
- [7] 陈新宇, 毕新慧, 李冰. 细菌气溶胶粒径分布特征的检测方法 [J]. 环境科学学报, 2008, 28 (3): 589-592.
- [8] 王亚霞, 魏兰芬, 潘协商, 等. 撞击法与沉降法采样对洁净手术室空气细菌总数检测结果比较 [J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31 (3): 291-292.
- [9] 许娜, 陈翠萍. 撞击式空气微生物采样器在层流手术间空气监测中的应用 [J]. 护理实践与研究, 2014, 11 (2): 143.
- [10] 郭雅蓉, 廖春蓉, 刘玉梅. 室内空气微生物不同采样方法的检测分析 [J]. 疾病预防控制通报, 2014, 29 (4): 75-76.
- [11] McFarland A R, Haglund J S, King M D, et al. Wetted wall cyclones for bioaerosol sampling [J]. Aerosol Science and Technology, 2010, 44 (4): 241-252.
- [12] Cao G, Noti J D, Blachere F M, et al. Development of an improved methodology to detect infectious airborne influenza virus using the NIOSH bioaerosol sampler [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2011, 13 (12): 3321-3328.
- [13] Blachere F M, Cao G, Lindsley W G, et al. Enhanced detection of infectious airborne influenza virus [J]. Journal of Virological Methods, 2011, 176 (1): 120-124.
- [14] 杜睿. 大气生物气溶胶的研究进展 [J]. 气候与环境研究, 2006, 11 (4): 546-552.
- [15] 李涛. 空气微生物采样及发展趋势 [J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13 (5): 538-539.
- [16] Thorne P S, Kiekhaefer M S, Whitten P, et al. Comparison of bioaerosol sampling methods in barns housing swine [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58 (8): 2543-2551.
- [17] Myatt T A, Johnston S L, Rudnick S, et al. Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay [J]. BMC Pub Heal, 2003, 3 (5): 1-7.
- [18] 何海音, 凌罗庆, 史国萍. 中药广佛手的化学成分研究 [J]. 中药通报, 1998, 13 (6): 32-34.
- [19] 张志洁, 韩剑众. 食品微生物快速检测技术及其自动化研究进展 [J]. 食品研究与开发, 2003, 24 (2): 97-100.

- [20] 陈思强, 钟伟强, 曾振兴. 自动酶联荧光免疫分析系统检测冻肉中沙门菌的评价 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2004, 27 (5): 309.
- [21] 云云, 汪长中, 吴璇. 病原微生物检测技术进展 [J]. 安徽医药, 2013, 17 (3): 501-503.
- [22] Li D W, LaMondia J. Airborne fungi associated with ornamental plant propagation in greenhouses [J]. *Aerobiologia*, 2010, 26 (1): 15-28.
- [23] 刘家云. 志贺菌、沙门菌和霍乱弧菌多重 PCR 快速检测体系的建立 [J]. 解放军医学杂志, 2007, 32 (11): 1190-1191.
- [24] Reyes S M, Torres J P, Prado J V, *et al.* Multiplex PCR assay in spinal fluid to identify simultaneously bacterial pathogens associated to acute bacterial meningitis in Chilean children [J]. *Rev Med Chile*, 2008, 136 (3): 338-346.
- [25] Schmitz M, Scheungraber C, Herrmann J, *et al.* Quantitative multiplex PCR assay for the detection of the seven clinically most relevant high-risk HPV types [J]. *J Clin Virol*, 2009, 44 (4): 302-307.
- [26] 彭立新, 王桂文, 廖威, 等. 光镊拉曼光谱分析酿酒活性干酵母的活化与生长 [J]. 微生物学通报, 2009, 36 (8): 1137-1142.
- [27] 张洁梅. 食品微生物检验技术的研究进展 [J]. 现代食品科技, 2005, 21 (2): 221-222.
- [28] 林文辉. 浅谈食品微生物检测方法的进展 [J]. 医药与卫生, 2010, 2 (3): 295-296.
- [29] Angenent L T, Kelley S T, Amand A S, *et al.* Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (13): 4860-4865.
- [30] Korzeniewska E, Harnisz M. Culture-dependent and culture-independent methods in evaluation of emission of enterobacteriaceae from sewage to the air and surface water [J]. *Water Air&Soil Pollution*, 2012, 223 (7): 4039-4046.
- [31] 王汝彬. 过滤膜式大气微生物采样器的设计和实现 [D]. 中国科学技术大学, 2015.
- [32] 张海燕. 试论空气微生物检验技术 [J]. 科技展望, 2015, 25 (35): 144.
- [33] 陈锷, 万东, 褚可成, 等. 空气微生物污染的监测及研究进展 [J]. 中国环境监测, 2014, 30 (4): 172-178.

护理人员职业应激源、应激评估和干预研究现状

余丹¹, 余善法², 高喻宏¹, 聂云峰¹

(1. 湖南省职业病防治院, 湖南长沙 410007; 2. 河南省职业病防治研究院, 河南郑州 450052)

摘要: 医务人员的职业环境具有高科技、高风险、高负荷、高压力的“四高”特点。护理工作的工作性质决定其工作的内容围绕病人展开, 繁重的工作负担与不良的工作环境更易对其身心健康造成伤害。本文对造成护理人员职业紧张的主要应激源、应激评估方法及其干预措施进行综述, 为提高护理人员职业紧张应对能力, 改善职业紧张特征和心理症状提供一些线索。

关键词: 护理人员; 职业应激; 应激源; 应激评估; 应激干预

中图分类号: R135 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2017)03-0190-04 DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2017.03.011

Research status on occupational stressor, and its assessment, or intervention in nurses

Yu Dan*, Yu Shanfa, Gao Yuhong, Nie Yunfeng

(* .Hunan Provincial Prevention and Treatment Institute for Occupational Diseases, Changsha 410007, China)

Abstract: The occupational environment of medical personnels has “Four Highs” feature, namely “high technology”, “high risk”, “high load” and “high pressure”. The work essence of nursing staffs decided that their daily work was carrying out around the patients, thus, over-load work and undesirable work environment would be more likely to cause harm to their physical and mental health. This paper will give a brief review on the main stressor, its assessment methods and interventions measures, provide some clues to improve the response capacity of the nursing staffs on occupational stress, thereby relieve their occupational stress and psychological symptoms.

Key words: nursing staffs; occupational stress; stressor; stress assessment; stress intervention

随着经济全球化、人口流动、技术创新和知识经济的发展, 生产方式发生了巨大变化, 社会心理因素成为了传统生物理化因素外又一个重要的职业危害因素, 其中最引人注目的因素是职业心理学危害因素。职业应激又称职业紧张, 是

指在某种职业环境中, 客观或认知上的要求与个体适应能力之间失衡时所产生的心身紧张状态及其反应。研究表明, 职业应激虽不像生物、物理或化学因素一样导致特殊的“职业病”, 但可能非特异性地损害职工健康, 导致或诱发冠心病、消化性溃疡、神经症等疾病^[1]。有关资料报道, 仅在美国, 每年为职业应激疾病所付出的医疗费达 500~1 000 亿美元, 职业应激致劳动效率降低而造成的经济损失高达 3 000 亿美元^[2]。

收稿日期: 2016-09-26; 修回日期: 2017-04-19

作者简介: 余丹 (1975—), 女, 副主任医师, 研究方向: 职业卫生管理。