

• 检验技术与方法 •

刚果红黏附试验对致病性凝固酶阴性葡萄球菌的鉴定^{*}

崔显念¹, 黄丽亚², 戴万案¹, 徐先早¹, 李宗清¹, 许 兰¹, 廖明凤¹, 徐 锋¹, 姜 宜¹
(1. 湖北省恩施自治州中心医院检验科 445000; 2. 湖北省民族学院湖北省
生物资源保护与利用重点实验室, 恩施 445000)

摘 要:**目的** 探讨刚果红黏附试验对致病性凝固酶阴性葡萄球菌(CNS)的鉴定意义。**方法** 采用刚果红琼脂培养法从血液、尿液、痰、精液、分泌物、脑脊液中分离 CNS,再用刚果红-阿里新蓝进行联合染色,与获自皮肤的阴性样本作对照。**结果** 致病性 CNS 在刚果红琼脂培养基中菌落呈黑色,阴性对照组菌落为红色。镜下观察在淡蓝色背景下,致病性 CNS 菌体着色较深,菌体表面的胞外多糖黏附素(PIA)为深红色,阴性对照组菌体着色较浅,菌体表面无 PIA 而显淡红色。**结论** 刚果红黏附试验和刚果红-阿里新蓝联合染色,对致病性 CNS 鉴定及其毒力评价可为医院预防、治疗获得性 CNS 感染提供理论依据和实验基础。
关键词:凝固酶阴性葡萄球菌; 胞外多糖黏附素; 刚果红黏附试验; 刚果红-阿里新蓝
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.037 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)20-2382-02

凝固酶阴性葡萄球菌(coagulase-negative staphylococci, CNS)大多数寄生于人体的皮肤和黏膜,为正常菌群的重要组成部分,在皮肤和黏膜完整、生理功能和免疫功能正常时,与机体保持平衡一般不致病。但当内环境发生变化,CNS 因有了特殊的生物学性状而表现出毒力,使 CNS 成为医院获得性感染(hospital acquired infection)的最主要致病菌。怎样快速、准确地鉴定 CNS 并预测其耐药性,对预防及合理应用抗菌剂都有十分重要的意义^[1-3]。本研究旨在通过刚果红黏附实验和刚果红-阿里新蓝联合染色^[4],对采自各途径的细菌样本进行胞外多糖鉴定及其毒力评价,以确定 CNS 的致病性,为治疗、控制医院获得性感染提供实验基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 临床组 60 株,采自湖北恩施自治州中心医院各科不同年龄和性别患者的痰液、中段尿液、创面分泌物、精液、血液和脑脊液。对照组 20 株,采自湖北民族学院医学院不同年龄和性别学生的手部、耳垂皮肤。临床组标本按常规要求采集,对照组标本按规定要求采集。

1.2 细菌培养基及细菌染液配制

1.2.1 牛脑心浸液肉汤刚果红琼脂细菌培养基 刚果红水溶液(0.8 g/L),121 ℃ 高压灭菌 15 min。蔗糖(50 g/L)、琼脂(10 g/L),加双蒸水 1 000 mL,于 121 ℃ 及高压灭菌 15 min,待温度缓慢降至 55 ℃ 时,加入牛脑心浸液(37 g/L)及刚果红水溶液(适量),制成固体培养基。

1.2.2 染液配制 阿里新蓝染液:阿里新蓝 2 g,冰醋酸 3 mL,蒸馏水 97 mL。刚果红染液:刚果红 2 g,蒸馏水 100 mL。

1.3 细菌分离和鉴定

1.3.1 刚果红琼脂黏附试验 将各标本分离出的 CNS 接种于培养基中,37 ℃ 条件下孵育 24 h,然后置室温中 24 h。

1.3.2 刚果红-阿里新蓝染色 滴生理盐水少许于洁净载玻片上,用接种针挑取黏附试验分离的细菌与之混匀后,再滴加与生理盐水等量的阿里新蓝染液,混匀并静置 3~5 min,烤箱 50~60 ℃ 加热固定,直到染液水分完全挥发,然后再滴加少许刚果红染液,均匀涂布,用烤箱干燥,以蒸馏水冲洗至无染料流下为止,烤干水分,油镜观察。

2 结 果

临床组分离出 35 个阳性菌株,总阳性率为 58.3%,对照

组全部为阴性菌株(表 1)。致病性 CNS 有胞外多糖黏附素生成,在刚果红琼脂培养基中菌落呈黑色,且干燥、显晶体光泽,阴性对照组 CNS 菌落为红色。镜下观察在淡蓝色背景下,致病性 CNS 菌体着色较深,围绕菌体的多糖黏附素呈暗红色,阴性对照组菌体颜色明显淡于阳性组而为淡红色。

表 1 CNS 黏附试验结果

组别	参检标本	阳性菌株	阳性率(%)
临床组			
痰液	20	11	55
尿液	10	8	80
分泌物	8	3	38
精液	4	2	50
血液	14	9	64
脑脊液	4	2	50
对照组			
手部、耳垂皮肤	20	0	0

3 讨 论

在 CNS 引起的感染中,胞外多糖黏附素的作用通过动物模型和临床研究已得到确认^[5]。Christenses 等^[6]报道,60% 有临床意义的血培养分离 CNS 产生了胞外多糖黏附素,虽不能直接说明胞外多糖黏附素产生和疾病发生的关系,但有显著的统计学意义。从一些临床分离 CNS 产生胞外多糖黏附素的研究表明,胞外多糖黏附素有助于 CNS 黏附生物大分子并与疗效差和易复发有关^[4]。CNS 胞外多糖黏附素为介导外源物体表面黏附和延长感染病程的主要毒力因子,是评定 CNS 致病性的重要条件^[7]。

CNS 胞外多糖黏附素检测可提示其致病意义,且可提示其耐药性变化。对明确感染诊断、制定有效治疗方案有十分重要的意义,但不能做为惟一的因素。CNS 有数 10 种之多,是否所有 CNS 与医院获得性感染都有关,同一菌种是否都存在黏附性,在机体中所表现的毒力是否有差异,目前还不完全清

^{*} 基金项目:湖北省教育厅 2006 年重点科研项目(D200629009)。

楚^[3]。对于这些问题,有待进一步研究 CNS 的基因标志物,只有建立起敏感、快速、精确性和可靠性更高的鉴定技术,才能更有效地解决医院获得性 CNS 感染的治疗和控制问题。

在细菌培养过程中,CNS 胞外多糖黏附素可能会丢失,因此本研究将采自不同途径的 CNS 标本用牛脑心浸液肉汤刚果红琼脂培养基获取黏附菌株和非黏附菌株,即直接向培养基加入刚果红,使菌落在形成过程中便得以显色,且在细菌生长的最佳时期作涂片,用刚果红-阿里新蓝进行联合染色,直接、客观地观察到 CNS 胞外多糖黏附素的生成情况,避免了阳性结果偏低的可能性,结果总阳性率为 58.3%,与文献报道大致相同^[1],所获取的 CNS 黏附株也为下一步作基因多态性分析奠定了基础。

参考文献

[1] Poyart C, Quesne G, Boumaila, et al. Rapid and accurate species-level identification of coagulase-negative staphylococci by using the sod gene as a target[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(12): 4296-4301.

• 检验技术与方法 •

[2] Kloos WE, Bannerman TL. Update on clinical significance of coagulase-negative staphylococci[J]. Clin Microbiol Rev, 1994, 7(1): 117-140.

[3] Spare MK, Tebbs SE, Lang S, et al. Genotypic and phenotypic properties of coagulase-negative staphylococci causing dialysis catheter-related sepsis[J]. J Hosp Infect, 2003, 54(4): 272-278.

[4] Freeman DJ, Falkner FR, Keane CT. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci[J]. J Clin Pathol, 1989, 42(8): 872-874.

[5] Ishak A, Groschel HM, Mandell L, et al. Association of slime with pathogenicity of coagulase-negative staphylococci causing nosocomial septicemia[J]. Microbiology, 1985, 22(6): 1025-1029.

[6] Christensen GD, Simpson WA, Bisno AL, et al. Adherence of slime-producing strains of Staphylococcus epidermidis to smooth surfaces[J]. Infect Immun, 1982, 37(1): 318-326.

[7] Huebner J, Goldmann DA. Coagulase negative staphylococci: role as pathogens[J]. Annu Rev Med, 1999, 50: 223-236.

(收稿日期:2011-03-09)

全自动血红蛋白电泳在珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的临床价值

卢新光, 黄晓华, 赖东莲

(福建医科大学附属龙岩市第一医院检验科 364000)

摘要:目的 探讨全自动血红蛋白电泳在珠蛋白生成障碍性贫血诊断中的应用。方法 收集 696 例受检者,应用法国西比亚公司(sebia)生产的全自动血红蛋白高效毛细管电泳仪进行血红蛋白电泳,同时分析其检测结果。结果 696 例受检者中,检出 α 珠蛋白生成障碍性贫血 41 例,阳性为 5.9%; β 珠蛋白生成障碍性贫血 146 例,阳性为 21.0%;异常血红蛋白病 21 例,阳性为 3.0%。结论 全自动血红蛋白电泳仪能为临床诊断珠蛋白生成障碍性贫血及分类提供了重要的依据。

关键词:地中海贫血; 诊断; 血红蛋白电泳

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.20.038 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)20-2383-02

珠蛋白生成障碍性贫血是中国南方常见的遗传病之一,其是由于遗传的基因缺陷导致血红蛋白至少一种珠蛋白合成缺乏或不足,引起的贫血或病理状态^[1]。临床上珠蛋白生成障碍性贫血的诊断及鉴别主要依靠血红蛋白电泳分析,但最后的确诊和类型判断常需要采用基因诊断^[2]。本院应用全自动血红蛋白毛细管电泳仪进行血红蛋白电泳检测,诊断珠蛋白生成障碍性贫血,现对 2010 年门诊及病房的 696 例受检者血红蛋白电泳结果进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2010 年 1~12 月门诊及住院的血液科、消化科、儿科、产科及正常体检者共 696 例,其中男 308 例,占 44.3%,女 388 例占 56.7%,年龄 6 个月至 72 岁。所有受检者血红蛋白小于 120 g/L 作为贫血组(559 例),血红蛋白大于 120 作为正常对照组(137 例)。

1.2 方法 使用法国西比亚公司(Sebia)生产的全自动血红蛋白毛细管电泳仪进行血红蛋白电泳,所用试剂和质控品为法国西比亚公司(Sebia)生产的配套试剂,按照仪器使用说明书及试剂说明进行操作。先用质控品进行血红蛋白电泳,质控品结果在控后,然后把处理好的标本和溶血素放置于标本架上,由仪器自动定量加样于孔中,置于仪器上进行电泳,电泳完毕及时取出,由仪器全自动完成血红蛋白电泳结果的分析处理,在全自动吸光度扫描仪上对各成分进行扫描定量,绘出扫描

图谱。

1.3 诊断标准 血红蛋白电泳的正常参考值:成年男女 HbA_2 为 2.0%~3.5%,并且没有出现异常血红蛋白带。如 $HbA_2 < 3.5\%$,出现异常血红蛋白带(HbH 、 $HbBart's$)判为 α 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性;如 $HbA_2 > 3.5\%$ 或出现异常血红蛋白带($HbF > 2.0\%$),则判为 β 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性^[3]。

2 结果

559 例贫血组检出 $HbBart's$ 带 29 例, HbH 带 40 例,同时检出两种带 20 例占总数 3.6%, α 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率为 7.2%。559 例贫血组检出 $HbA_2 > 3.5\%$ 和(或) $HbF > 2.0\%$ 者 133 例, β 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率占 23.8%。559 例贫血组检出 HbC 带 6 例, HbJ 带 5 例, HbS 带 5 例, HbD 带 1 例, $Hbcon$ 带 1 例, $Hb\delta$ 带 2 例, HbE 带 1 例,异常血红蛋白病表型阳性率为 3.8%。137 例正常对照组检出 $HbBart's$ 1 例, α 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率为 0.73%。正常对照组检出 $HbA_2 > 3.5\%$ 和或 $HbF > 2.0\%$ 者 13 例, β 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率为 9.5%。正常对照组未检出其他异常血红蛋白区带。696 例受检者中 α 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率为 5.9%, β 珠蛋白生成障碍性贫血表型阳性率为 21.0%,异常血红蛋白病表型阳性率为 3.0%。