

10. 刘桐宇, 谢榕. TCT 标本检测高危 HPV E6/E7mRNA 及在宫颈病变中的应用研究[J]. 中华妇幼临床医学杂志: 电子版, 2011, 3(7): 202-205.

[3] 潘钦石, 王瑜敏, 陈洁, 等. 温州地区宫颈癌妇女人乳头瘤病毒 58E6/E7 基因变异分析[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(5): 1161-1163.

[4] 王华, 蔡红兵, 丁晓华, 等. 湖北地区宫颈癌组织 HPV16 E7 和 E5

转化基因变异分析[J]. 武汉大学学报: 医学版, 2009, 30(6): 759-762.

[5] 彭丽娜, 王言奎, 罗兵, 等. 山东青岛地区宫颈癌组织中 HPV16 型 E6 和 E2 基因突变分析[J]. 临床肿瘤学杂志, 2010, 15(7): 608-612.

(收稿日期: 2014-05-08)

## 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因分型的研究

王 玮

(天津南开医院核医学科, 天津 300100)

**摘要:**目的 应用多重聚合酶链反应(PCR)对临床分离的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(Methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)的金黄色葡萄球菌染色体 mec 基因盒(Staphylococcal chromosomal cassette mec, SCCmec)基因型及亚型进行分型。方法 收集该院 2012 年 1~9 月临床分离的 30 株耐甲氧西林金黄色葡萄球菌,用多重 PCR 检测 MRSA 的 SCCmec 的基因型及亚型。结果 检出 SCCmec I 型菌株 1 株(3.3%), SCCmec I A 型菌株 1 株(3.3%), SCCmec II 型菌株 4 株(13.3%), SCCmec III 型菌株 23 株(76.7%), SCCmec IV 型菌株 1 株(3.3%)。结论 该院分离的 MRSA 以携带 SCCmec III 为主。多重 PCR 可用于临床实验室 MRSA 的 SCCmec 基因分型。

**关键词:** 葡萄球菌, 金黄色; 甲氧西林; 基因型; 抗药性, 微生物

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.061

文献标识码: B

文章编号: 1673-4130(2014)17-2397-02

现今引起社区及医院内感染的主要致病菌以耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)为主。特别是院内感染的菌株病死率极高,常常呈现多重耐药特点,已经成为抗感染治疗中存在的严峻问题。目前的研究表明,金黄色葡萄球菌染色体 mec 基因盒(SCCmec)作为一种新型的可移动元件是编码金黄色葡萄球菌对甲氧西林耐药的 mec 基因,它区别于转座子和噬菌体。SCCmec 具有以下两种特点:(1)作为载体,使 mec 基因在葡萄球菌菌株之间水平传播;(2)可以整合除 mec 基因以外的许多耐药基因<sup>[1-2]</sup>,至今已发现 5 种 SCCmec 基因型及亚型,以 SCCmec I、II、III 和 IV 及亚型多见<sup>[3]</sup>。本研究针对本院分离的 MRSA 采用多重聚合酶链反应(PCR)进行基因分型,为进一步了解 MRSA 的耐药性打下基础。

### 1 材料与方 法

**1.1 菌株来源** 收集本院 2012 年 1 月至 9 月从临床各种标本(尿、引流液、胸腔积液和分泌物)中分离的 MRSA 30 株。

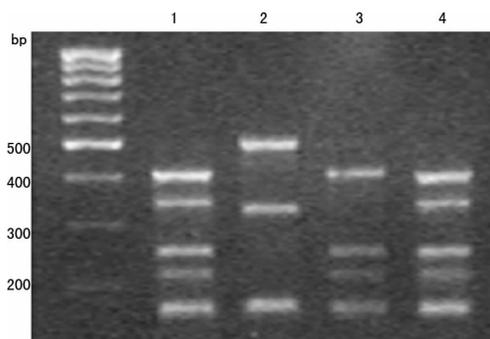
**1.2 仪器与试剂** 美国应用生物系统公司生产的 AB 9700 型 PCR 仪、北京双恒电泳仪公司生产的 JY600 电泳仪、北京君意东方电泳设备有限公司生产的 JY04S-3A 凝胶成像仪。9 对引物的设计参考文献<sup>[3]</sup>,由上海生工生物工程有限公司合成。dNTP、蛋白酶 K、MgCl<sub>2</sub>、10×Buffer、UNIQ-10 柱式细菌 DNA 抽提试剂盒由上海生工生物工程有限公司提供。

**1.3 方法** 采用 UNIQ-10 柱式细菌 DNA 抽提试剂盒提取 DNA 模板(参考说明书)。所得基因组 DNA 于 -20℃ 保存备用。参照文献<sup>[3]</sup>,把 9 对引物放入同一反应体系建立多重 PCR 检测 SCCmec,反应条件:PCR 反应总体积 50 μL,MECAP4、MECAP7、IS431P4、DCSF2、DCSR1 浓度为 800 nmol/L,MECIP3、MECIP2、pUB110R1、pT181R1、CIF2F2、CIF2R2、RIF5F10、RIF5R13 浓度为 400 nmol/L, RIF4F3、RIF4R9、KDPF1、KDP1R1 浓度为 200 nmol/L, DNA 模板 5 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 镁离子 2.5 mmol/L, dNTP (200

μmol/L) 5 μL, Taq 酶 0.5 μL, 双蒸水补足 50 μL。扩增条件: 94℃ 初变性 4 min; 94℃ 变性 30 s, 退火温度 52℃, 时间 30 s, 72℃ 延伸 60 s, 进行 30 个循环; 最后延伸 4 min。在 1.5% 的含溴乙锭的琼脂糖凝胶中将所生成的 PCR 产物电泳, 最后用凝胶成像系统观察结果。

### 2 结 果

根据凝胶成像图判定所有菌株基因型,与参考文献<sup>[3]</sup>进行比对所得。本实验中 30 株 MRSA 中 SCCmec I A 型菌株 1 株(3.3%), SCCmec I 型菌株 1 株(3.3%), SCCmec II 型菌株 4 株(13.3%), SCCmec III 型菌株 23 株(76.7%), SCCmec IV 型菌株 1 株(3.3%)。选取的清晰的凝胶成像图,见图 1。



1, 4; SCCmec III 型; 2; SCCmec I 型; 3; SCCmec II 型

图 1 多重 PCR 检测 SCCmec 电泳图

### 3 讨 论

存在于 SCCmec 上的插入序列 IS431 是形成 MRSA 多重耐药的原因,同时,SCCmec 基因型别的差异会造成其整合后的耐药基因的差异<sup>[4]</sup>。在研究金黄色葡萄球菌获得 mec 基因和 MRSA 菌株获得多重耐药的机制方面,SCCmec 基因分型方法要优于其他的分型方法。SCCmec 基因分型结果的不同在一定程度上也取决于 MRSA 菌株来源背景不同。通过实验数

据证明,社区感染的 MRSA 菌株基因型别为 IV 型,耐药特点是对非 β 内酰胺类的抗菌药物敏感<sup>[5]</sup>,而院内感染的 MRSA 很少为 IV 型,以 I、II、III 型为主,其耐药特点是对多种抗菌药物耐药,从而表明 SCCmec 基因分型在区分社区和院内感染的 MRSA 有着重要的意义。

本研究采用多重 PCR 对 SCCmec 进行分型,分型结果清晰,具有快速简单的特点,一般微生物实验室都可以开展。SCCmec 在日益增加的抗菌药物选择压力下不断地通过突变获得外源性基因,更像一个抗菌药物耐药岛,增加了对多种抗菌药物的耐药性。当然,任何一种基因分型方法都不能作为判断的绝对指标。因此,SCCmec 基因分型方法结合 PFGE、MLST 分型方法能够更深入地了解其起源及遗传背景,有助于进一步治疗和控制 MRSA 感染。

参考文献

[1] 林金兰,李六亿.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌医院感染及社区感  
• 经验交流 •

染的流行特点[J].中华医院感染学杂志,2011,12:2643-2645.  
[2] Mody L,Kauffman CA,Donabedian S. Epidemiology of Staphylococcus aureus colonization in nursinghome residents[J]. Clinical Infectious Diseases,2008,46(9):1225-1240.  
[3] 欧阳范献,鲍时翔. MRSA 全基因结构及 SCCmec 分型的意义[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2006,12(8):1118-1121.  
[4] Ito T, Ma XX, Takeuchi F, et al. Novel type V staphylococcal cassette chromosome mec driven by a novel cassette chromosome recombinase, ccrC[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2004, 48(7):2637-2651.  
[5] 鲍泽芹,孙杰,王强.耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药分析[J]. 中国医药指南,2011,21(1):72-73.

(收稿日期:2014-04-08)

## VCS 技术检测白细胞时无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类的原因分析

田 宇<sup>1</sup>,陈常飞<sup>2</sup>,王永锋<sup>1</sup>,杨 超<sup>1</sup>,康 炜<sup>1△</sup>

(1. 西安医学院第一附属医院检验科,陕西西安 710077;2. 吴起县计划生育服务站,陕西榆林 717600)

**摘要:**目的 研究 VCS 技术检测白细胞时无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的原因。方法 采用以 VCS 技术为检测原理的血分析仪分析血常规标本,无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的为测试组,有中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的为对照组,分别对以上两组中的中性粒细胞和嗜酸性粒细胞的体积(V)、传导性(C)和光散射(S)这三项参数进行统计。制备血涂片染色后,于显微镜下进行白细胞形态观察并进行分类计数。结果 对照组中性粒细胞的 VCS 参数分别为 V:(141.8±6.9)fL、C:145±7.3、S:136±4.8;对照组嗜酸性粒细胞的 VCS 参数分别为 V:(152.9±10.1)fL、C:147±12.0、S:194±7.6。染色后显微镜下观察细胞形态无明显异常;测试组两类细胞的 3 项 VCS 参数仪器皆未提供,经涂片染色后显微镜观察细胞形态和分类计数后,其嗜酸变的中性粒细胞比例皆大于 40%。结论 VCS 技术检测白细胞若出现无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的标本,应该制备血涂片并进行瑞-吉染色,人工镜检分析其实际分类比例并在报告中予以描述。

**关键词:**VCS 技术; 中性粒细胞; 嗜酸性粒细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.062

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)17-2398-02

随着检验技术的迅猛发展,自动化血液分析仪在检验领域的应用日趋广泛。自动化血液分析仪以其检测速度快,提供参数多,精密度好,易于标准化等优点,受到一线检验人员的一致好评。但是仪器检测结果只能用于初筛,在一些异常情况下,仍需手工法确认与补充,这已是不争的事实。各类仪器由于方法学所限,在某些情况下无法提供白细胞分类结果,检验人员应对其原因进行深入研究分析。笔者通过显微镜下观察细胞形态和分类计数的方法,对本科室使用的以 VCS 技术为分类原理的血液分析仪检测白细胞时出现无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的原因进行了分析,现报道如下。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集本院 2010~2012 年门诊健康体检者经血液分析仪检测有中性粒细胞和嗜酸细胞分类结果的标本 1 000 例及住院患者无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的标本 1 000 例,其中呼吸科 500 例,经临床确诊为重度感染者;产科患者 500 例,经检测其孕激素水平偏高。

**1.2 仪器与试剂** 美国 Beckman-coulter LH-500 五分类血液分析仪及原装配套试剂,校准品,及高、中、低三水平质控品。

LYMPUS CX31 双目光学显微镜,瑞-姬染液<sup>[1]</sup>。

**1.3 方法** 以规范操作采集健康体检者和患者肘静脉血 2 mL 于含 EDTA-K<sub>2</sub> 抗凝的真空采血管内,颠倒混匀后上机检测。在分析之前已对仪器的分析性能进行验证,所有分析过程 2 h 内完成。排除白细胞分类失败的其他因素对仪器分类结果的干扰。对有中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类的健康体检者的标本和无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的患者标本,对其两类细胞的检测结果分别进行 VCS 的 3 项参数统计并分别涂片两张,经瑞-姬染色后由本科 2 名资深技术人员在显微镜下观察,重点观察白细胞形态并进行白细胞分类计数,每片计数 200 个白细胞,共计计数 400 个白细胞。

### 2 结果

**2.1 结果记录** 1 000 例健康体检者中性粒细胞 VCS 的 3 项参数分别为 V:(141.8±6.9)fL、C:145±7.3、S:136±4.8;嗜酸性粒细胞的 3 项 VCS 参数分别为 V:(152.9±10.1)fL、C:147±12.0、S:194±7.6;1 000 例患者经仪器检测无中性粒细胞和嗜酸性粒细胞分类结果的标本,仪器未能提供两类细胞的 3 项 VCS 参数。

△ 通讯作者,E-mail:kang-wei2008@163.com。