

住院患者分离的纹带棒状杆菌耐药性及同源性研究

邓洪均(重庆市渝北区中医院检验科 401147)

【摘要】 目的 分析研究住院患者分离的纹带棒状杆菌耐药性及同源性。**方法** 选取于 2013 年 10 月至 2014 年 4 月在该院住院患者 58 例,对患者不同部位分离的纹带棒状杆菌 58 株,采用肉汤微量稀释法对患者进行体外药敏试验,对纹带棒状杆菌阳性患者的周边环境采用盐水棉拭子法进行采样,对分离的纹带棒状杆菌进行体外药敏试验;对 58 株纹带棒状杆菌采用脉冲场凝胶电泳法(PFGE)进行分子分型。**结果** 纹带棒状杆菌聚集分布于 2013 年 12 月至 2014 年 3 月。药敏试验结果显示,四环素、红霉素、克林霉素、环丙沙星和青霉素这 5 种抗菌药物的最小抑菌浓度(MIC)≥64 μg/mL;万古霉素、利福平和庆大霉素的 MIC 均为 0.5 μg/mL;只有 1 株分离的纹带棒状杆菌对除克林霉素之外的所用抗菌药物全部敏感。PFGE 分型结果显示,50 株纹带棒状杆菌共分为 7 个不同基因型,其中 0002 型和 0006 型这两种基因型为优势型。从同期住院的同一病房患者身上分离出的纹带棒状杆菌同源性高。环境采样结果显示,纹带棒状杆菌分离阳性率达 43.48%(10/23)。**结论** 住院患者分离纹带棒状杆菌呈多重耐药性,且从不同患者身上分离出的菌株同源性极高。

【关键词】 棒状杆菌属; 耐药性; 同源性; 分子分型

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.18.037 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)18-2741-02

Study on drug resistance and homology of *Corynebacterium striatum* isolated from inpatients DENG Hong-jun (Department of Clinical Laboratory, Yubei District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 401147, China)

【Abstract】 Objective To analyze the drug resistance and homology of *Corynebacterium striatum* isolated from inpatients. **Methods** 58 inpatients in our hospital from 2013 October to 2014 April were selected. 58 strains *Corynebacterium striatum* were isolated from different parts. The in vitro drug susceptibility test was performed by using the broth microdilution method. The surround environment in the patients with *Corynebacterium striatum* positive were sampled by saline cotton swab. The isolated *Corynebacterium striatum* was performed the in vitro drug susceptibility test; 58 strains of *Corynebacterium striatum* were performed the molecular typing by using the pulsed field gel electrophoresis (PFGE). **Results** *Corynebacterium striatum* aggregation was distributed in December 2013, January, February and March 2014. The results of drug susceptibility test showed that the minimal inhibitory concentrations (MIC) of the 5 kinds of antibacterial drugs, tetracycline, erythromycin, clindamycin, ciprofloxacin and penicillin, were more than or equal to 64 μg/mL; MIC of vancomycin, rifampicin and gentamicin all were 0.5 μg/mL; only 1 isolated strain of *Corynebacterium striatum* was sensitive to all antibacterial drugs except for clindamycin. The pulsed field gel electrophoresis typing results showed that 50 strains of *Corynebacterium striatum* were divided into 7 different genotypes, in which 0002 genotype and 0006 genotype were predominant type. *Corynebacterium striatum* isolated from the patients in the same ward during the corresponding period had high homology. The environmental sampling results showed that the isolation positive rate of *Corynebacterium striatum* reached 43.48%(10/23). **Conclusion** *Corynebacterium striatum* isolated from inpatients presents multi-drug resistance, and which isolated from different in patients has extremely high homology.

【Key words】 *Corynebacterium*; drug resistance; homology; molecular typing

棒状杆菌属是因为其菌体一端或者两端膨大,类似棒状而得名,它属于无芽孢的革兰阳性杆菌^[1]。棒状杆菌大多数是致病菌,容易在机体抵抗力低下时引发机体感染。近年来,抗菌药物大量运用于临床,甚至出现滥用抗菌类药物状况,导致细菌出现耐药性或多重耐药性,大大增加了临床治疗的难度^[2]。据相关研究报道,纹带棒状杆菌能够在医院传播,尤其对于长期住院患者,该病菌滋生速度极快。本文旨在研究住院患者分离的纹带棒状杆菌耐药性及同源性,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取于 2013 年 10 月至 2014 年 4 月在本院住院的患者 58 例,其中男 30 例,女 28 例,年龄 18~85 岁、平均年龄(54.3±2.5)岁,住院 5~35 d、平均住院(9.1±2.1)d。

1.2 仪器与试剂 采用 VITEK2 全自动微生物鉴定系统进行细菌鉴定,鉴定卡选用厌氧菌-棒状杆菌鉴定卡;采用天津金章有限公司的氧化发酵管进行氧化发酵试验;选用 ATCC 经黄色葡萄球菌进行协同溶血试验;血琼脂平板以及药敏试验板均选自天津金章有限公司;选用美国 bio-rad 公司的脉冲场凝胶电泳(PFGE)系统;添加 2.5%~5.0% 溶解的马血进肉汤,根据 Plassmeier 等^[3] 研究选择如下 8 种抗菌药物:四环素、红霉素、克林霉素、环丙沙星、青霉素、万古霉素、利福平和庆大霉素,对纹带棒状杆菌阳性患者的周边环境采用盐水棉拭子法进行采样。

1.3 体外药敏试验 在血琼脂平板上对分离出来的纹带棒状杆菌进行传代培养。采用肉汤微量稀释法对所有菌株的最小

抑菌浓度(MIC)值进行测定。按梯度将 8 种抗菌药物分布于 96 孔板中^[4],对四环素、红霉素、环丙沙星、青霉素、万古霉素、利福平和庆大霉素设置 8 个梯度浓度;对克林霉素设置 7 个梯度浓度。最高浓度均为 64 μg/mL,最低浓度为 0.5 μg/mL。另外设置一个不含任何抗菌药物的空白生长孔。以肺炎链球菌 ATCC49619 为质控菌株。药敏平板温度控制在 35 ℃,培养 24~48 h。观察试验结果。

1.4 分子分型 制备好菌悬液和胶块,进行细胞裂解,做好胶块内 DNA 的酶切,再进行电泳,电泳时长为 19 h,完毕后,用 0.1 μg/mL EB 液染色 30 min,纯水脱色 20 min。用凝胶成像仪成像,每块胶块上的 DNA 均用 ATCC33591 菌株以及相对分子质量标准进行标准化,方便对比。

1.5 聚类分析 采用第 5 版 BioNumerics 软件处理胶块间图像的对比。采用 1.5% 的条带差异容许度。菌株间相似性系数大于 90% 则归为一类。

1.6 统计学处理 本次研究采用 SPSS17.0 统计学软件处理,以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌株分布情况 对患者不同部位分离的纹带棒状杆菌 58 株,其中 12 株从重症病房患者身上分离,15 株从精神外科患者身上分离,5 株从精神内科患者身上分离,14 株从呼吸内科患者身上分离,7 株从普通外科病房患者身上分离,3 株从泌尿内科患者身上分离,2 株从口腔科患者身上分离。58 株分离的纹带棒状杆菌标本中有 41 株下呼吸道标本,5 株脓液标本,7 株尿液标本和 5 株脑脊液标本。58 例患者在分离纹带棒状杆菌前正在使用不少于 1 种抗菌药物,使用频率最高的是 β-内酰胺类抗菌药物,其次是喹诺酮类抗菌药物。2013 年 10 月纹带棒状杆菌有 2 株,2013 年 11 月有 3 株,2013 年 12 月有 15 株,2014 年 1 月有 12 株,2014 年 2 月有 11 株,2014 年 3 月有 13 株,2014 年 4 月有 2 株。纹带棒状杆菌主要集中在分布于 2013 年 12 月至 2014 年 3 月。

2.2 细菌鉴定结果 氧发酵试验检验纹带棒状杆菌的氧化型为 100%。本组 58 株菌中有 57 株 CAMP 为阳性,占 98.27%。VITEK-2 鉴定率达到 94%,Bionumber 为 7323120600001,与

其他棒状杆菌无重码。

2.3 体外药敏试验结果 四环素、红霉素、克林霉素、环丙沙星和青霉素这 5 种抗菌药物的 MIC≥64 μg/mL;万古霉素、利福平和庆大霉素的 MIC 均为 0.5 μg/mL;只有 1 株分离的纹带棒状杆菌对除克林霉素之外的所用抗菌药物全部敏感。详见表 1。

2.4 耐药性分析 根据脉冲场凝胶电泳分型结果,按 90% 相似度进行划分,58 株菌共有 7 个不同基因型,每种不同的基因型菌株都具有一定的耐药性。其中 0002 型(除 C13 和 C14 之外)为优势耐药型,耐药型与 0001 型、0003 型和 0004 型以及除 C9 和 C8 之外的 0006 型、0007 型耐药型相同。在 0002 型中,优势耐药型 C4 和 C13、C14 的主要区别为青霉素敏感以及庆大霉素敏感。在 0006 型中,C9 和 C1 菌株的差异为红霉素、青霉素、环丙沙星以及四环素敏感。C18 和 C1 菌株的差异在于庆大霉素耐药。详见表 2。

2.5 环境采样结果 菌株集中出现在呼吸内科病房、神经外科病房以及重症监护病房。根据 23 份有效环境标本检测结果,纹带棒状杆菌分离率达 43.48%(10/23)。对 2 个疑似纹带棒状杆菌菌落进行进一步鉴定,并进行体外药敏试验,发现 20 株环境标本分离出的纹带棒状杆菌中有 17 株(85%)和从相应的患者身上分离出的菌株耐药型相同。

表 1 58 株纹带棒状杆菌药敏试验结果(μg/mL)

| 抗菌药物 | MIC ₅₀ | MIC ₉₀ | 范围 | 折点范围 | | |
|------|-------------------|-------------------|---------|------|-------|-------|
| | | | | 敏感性 | 中介 | 耐药性 |
| 四环素 | 64 | >64 | 1~>64 | ≤4 | 8 | ≥16 |
| 红霉素 | 64 | 64 | 2~>64 | ≤0.5 | 1 | ≥2 |
| 克林霉素 | >64 | >64 | 8~>64 | ≤0.5 | 1~2 | ≥4 |
| 环丙沙星 | 64 | >64 | 2~>64 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| 青霉素 | >64 | >64 | 2~>64 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| 万古霉素 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | ≤4 | 无判断依据 | 无判断依据 |
| 利福平 | 0.5 | 0.5 | 0.5~1 | ≤1 | 2 | ≥4 |
| 庆大霉素 | 0.5 | 0.5 | <0.5~16 | ≤4 | 8 | ≥16 |

表 2 不同 PFGE 型纹带棒状杆菌 MIC 值分析(ng/mL)

| PFGE 分型 | 四环素 | 红霉素 | 克林霉素 | 环丙沙星 | 青霉素 | 万古霉素 | 利福平 | 庆大霉素 |
|-------------|-----|-----|------|------|-----|------|-----|------|
| 0001 型(C8) | >64 | 64 | >64 | 64 | 64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0002 型(C4) | >64 | 64 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0002 型(C13) | >64 | 16 | >64 | 64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0002 型(C14) | >64 | 64 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 16 |
| 0003 型(C28) | 0.5 | >64 | >64 | 0.5 | 32 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0004 型(C45) | >64 | 64 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0005 型(C24) | >64 | 16 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0006 型(C1) | >64 | 64 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0006 型(C9) | 0.5 | 0.5 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 0006 型(C18) | 16 | 64 | >64 | >64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 16 |
| 0007 型(C3) | >64 | 64 | >64 | 64 | >64 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |

3 讨 论

纹带棒状杆菌能够在医院内通过异体传播,引发患者伤口、呼吸道等部位感染。但由于棒状杆菌生长较缓慢,临床上往往忽视其危害性。然而不断有研究表明纹带棒状杆菌在医院传播能力强,而且具有多重耐药性^[5]。临床上正确对待并重视纹带棒状杆菌的特征,有利于更好地防止其滋生,降低其耐药性^[6]。

本组研究中,纹带棒状杆菌在一定的时间段集中分布,且分布地点也较集中。根据 PFGE 分型显示,同期住院的同一病房患者身上分离出的纹带棒状杆菌同源性高,存在交叉感染的可能。而且,根据环境采样结果显示,环境标本中纹带棒状杆菌阳性率为 43.48%,其耐药型和从相应的患者身上分离出的菌株耐药型相同。这表明纹带棒状杆菌在医院的传播能力较强,然而,临床上对其传播机制尚不清楚^[7]。(下转第 2745 页)

2.5 C 组与 D 组治疗疗效的比较 结果显示, C 组患者中, 显著有效 24 例, 有效 9 例, 无效 17 例; D 组患者中, 显著有效 32 例, 有效 15 例, 无效 3 例。D 组患者临床疗效显著优于 C 组患者, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05, Z = 5.838$)。

3 讨论

上世纪 90 年代以前, 国内 UC 的发病和检出率均很低, 该病主要发生在西方国家。近 20 年来, UC 的发病在我国呈逐年上升趋势, 越来越引起临床医生的重视。到目前为止, UC 的发病原因尚不明确, 但是诸多学者一致认为 UC 的发病与感染、免疫失调、肠道微生物失调等存在密切的联系^[6-7]。本文将健康体检者、活跃期溃疡性结肠炎患者、缓解期溃疡性结肠炎患者肠道的菌群状况以及通过双歧杆菌治疗结肠炎患者不同疗效, 为初步分析 UC 的发病机制提供科学依据。

AUC 组患者与 RUC 组患者的双歧杆菌、乳酸杆菌、球状梭菌、拟杆菌的菌落数均显著低于对照组, AUC 组患者与 RUC 组患者的大肠埃希菌、肠球菌均高于对照组, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$); AUC 组患者的双歧杆菌、乳酸杆菌的菌落数显著低于 RUC 组患者, AUC 组患者的大肠埃希菌菌落数明显高于 RUC 组患者。研究结果提示, UC 患者的肠道菌群与健康者比较已经发生了很大的变化。在正常条件下, 肠道内的菌群保持平衡, 相互作用、制约。UC 患者体内的肠道菌群受外界因素或者自身因素的影响产生变化, 使得肠道内的有益菌减少。或者由于患者体内的有益菌群减少, 导致其他菌群的生长失去平衡, 细菌以及产物会多诱导遗传性易感人群的肠道黏膜免疫系统失去平衡, 使得肠道内抗原性耐受减退, 甚至消失, 最终诱发结肠炎的发生^[8]。

A 组患者的双歧杆菌、乳酸杆菌的菌落数显著低于 B 组患者, A 组患者的大肠埃希菌的菌落数显著高于 B 组患者, C 组患者的双歧杆菌、乳酸杆菌的菌落数显著低于 D 组患者, C 组患者的大肠埃希菌的菌落数显著高于 D 组患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。到目前为止, 服用活性双歧杆菌治疗溃疡性结肠炎的作用机制尚不明确, 但是可能与双歧杆菌可以有效调节患者肠道菌群有关, 可以有效地发生拮抗作用, 可以通过代谢产生对肠道有重要作用的营养物质^[9]。另外一种可能是双歧杆菌可以磷壁酸的黏附作用在肠道上皮细胞上形成一层保护膜屏障, 有效阻止肠道内致病菌的生长和定位^[10]。通过以上因素的共同作用使得不同程度的 UC 患者均具有显著的疗效, B 组患者的临床疗效以及组织学疗效均显著优于 A 组患者, D 组患者的临床疗效显著优于 C 组患者, 差异有统计

学意义 ($P < 0.05$)。

综上所述, UC 患者较健康人群有很大变化, 有益菌明显减少, 服用活性双歧杆菌可以有效改善患者菌群的平衡, 还可以改善治疗效果, 因此, 结肠炎患者肠道内菌群的平衡与治疗效果具有密切的联系。

参考文献

- [1] 王旭霞, 赵曙光, 刘震雄, 等. 双歧杆菌对溃疡性结肠炎大鼠肠黏膜屏障功能及细胞因子的影响[J]. 山西医科大学学报, 2011, 42(8): 621-623.
- [2] 王晓梅, 枯草杆菌二联活菌肠溶胶囊、双歧杆菌乳杆菌三联活菌片联合美沙拉嗪治疗溃疡性结肠炎疗效分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(21): 1697-1698.
- [3] 刘伟, 刘翔, 林漫鹏, 等. 溃疡性结肠炎患者正常与病变肠段肠道菌群比较[J]. 湖北民族学院学报: 医学版, 2011, 28(1): 4-6.
- [4] 翁一洁, 江丹贤. 双歧杆菌对大鼠急性溃疡性结肠炎模型的预防及治疗作用研究[J]. 临床医学工程, 2011, 18(10): 1523-1524.
- [5] 邱春雷, 严红, 吴雄健, 等. 溃疡性结肠炎的微生物生态学改变及双歧杆菌的治疗作用研究[J]. 中国全科医学, 2014, 17(26): 3077-3082.
- [6] 金士毛, 倪景斌, 孙辉, 等. 乳酸菌和双歧杆菌在溃疡性结肠炎维持缓解期的疗效比较[J]. 南通大学学报: 医学版, 2012, 32(6): 575-576.
- [7] 褚源, 王巧民. 不同分期溃疡性结肠炎患者黏膜相关菌群的变化及意义[J]. 安徽医科大学学报, 2014, 49(10): 1444-1447.
- [8] 王红彬. 双歧杆菌治疗溃疡性结肠炎实验研究进展[J]. 中国民康医学, 2012, 25(22): 2779.
- [9] 阚存玲, 陈敬华. 康复新液联合庆大霉素治疗溃疡性结肠炎的疗效观察[J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 217-219.
- [10] 陈芙蓉, 刘彤, 商丹丹, 等. 固肠胶囊治疗动物慢性溃疡性结肠炎及其机制研究[J]. 现代药物与临床, 2014, 35(12): 1350-1356.

(收稿日期: 2015-02-25 修回日期: 2015-03-15)

(上接第 2742 页)

这需要临床上对其进行进一步研究。

综上所述, 住院患者分离纹带棒状杆菌呈多重耐药性, 且从不同患者身上分离出的菌株同源性极高, 临床上应对纹带棒状杆菌高度重视, 分析其对临床用药的影响。

参考文献

- [1] 王俊瑞, 杜小莉, 崔晶花, 等. 住院患者分离纹带棒状杆菌耐药性及同源性分析[J]. 中华医学杂志, 2014, 100(32): 2501-2505.
- [2] 李玮, 张正. 66 株棒状杆菌临床分离株的鉴定及其药物敏感性分析[J]. 中国实验诊断学, 2007, 11(7): 932-936.
- [3] Plassmeier JK, Busche T, Molck S, et al. A propionate-inducible expression system based on the *Corynebacterium glutamicum* prpD2 promoter and PrpR activator and its

application for the redirection of amino acid biosynthesis pathways[J]. J Biol, 2013, 163(2): 225-232.

- [4] 陈东科, 许宏涛, 胡付品, 等. 纹带棒状杆菌医院内感染状况分析[J]. 中华流行病学杂志, 2013, 34(9): 947-948.
- [5] 苏瑞蕊. 棒状杆菌细胞壁中的主要成分的合成过程[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(7): 853-855.
- [6] Brune I, Goetker S, Schneider J, et al. Negative transcriptional control of biotin metabolism genes by the TetR-type regulator BioQ in biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. J Biol, 2012, 159(3): 225-234.
- [7] 谢爱香. 棒状杆菌临床分离株药物敏感性及其同源性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(7): 782-783.

(收稿日期: 2015-03-17 修回日期: 2015-04-19)