

• 基础实验研究论著 •

棒状杆菌临床分离株药物敏感性及其同源性分析

谢爱香

(河南省濮阳市中医院检验科 457000)

摘要:目的 了解棒状杆菌感染在临床中的耐药状况及其同源性。方法 用肉汤微量细菌定量法检测抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC),随机扩增多态性 DNA(RAPD-PCR)并对棒状杆菌进行基因分型。结果 184 株棒状杆菌对青霉素、头孢噻肟、红霉素、环丙沙星、四环素、克林霉素的耐药率均超过 50%,对多西环素、亚胺培南、庆大霉素、利福平的耐药率在 60%~80%之间,未发现对万古霉素和利奈唑胺耐药。18 株纹带分离株可分成 5 型,其中 A 型占 14 株(77.8%)。结论 棒状杆菌对多种抗菌药物的敏感性降低,纹带棒状杆菌存在院内传播的趋势。

关键词:棒状杆菌属; 耐药性; 聚合酶链反应; 基因分型; 序列同源性
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.07.006 文献标识码:A 文章编号:1673-4130(2012)07-0782-02

Antibiotic susceptibility and homology analysis of *Corynebacterium* isolated from clinical specimens

Xie Aixiang

(Department of Clinical Laboratory, Traditional Chinese Medicine
Hospital of Puyang City, Puyang He'nan 457000, China)

Abstract:Objective To investigate the drug susceptibility and homology of *Corynebacterium* isolated from clinical specimens. **Methods** Minimal inhibitory concentrations(MICs) of *Corynebacterium* to 12 antibiotics were tested with home-brew broth dilution microplates and genotypes of *Corynebacterium* were characterized by random amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction(RAPD-PCR). **Results** The drug resistance of 184 strains of *Corynebacterium* to penicillin, cefotaxime, erythromycin, ciprofloxacin, tetracycline and clindamycin were more than 50%, and to doxycycline, imipenem, gentamicin and rifampicin were about 60%—80%, to vancomycin and linezolid were 0%. Eighteen strains of *Corynebacterium stratum* could be divided into 5 types, among which 14(77.8%) strains belonged to A-type. **Conclusion** The sensitivity of *Corynebacterium* to various antibiotics might be decreasing and there could be a tendency of in-hospital spread of *Corynebacterium stratum*.

Key words: *Corynebacterium*; drug resistance; polymerase chain reaction; genotype; sequence homology

随着新病原体的不断出现,感染性疾病在各国致死性病因中的数量不断上升,以及多重耐药细菌和医院感染暴发流行,临床微生物检验在临床医疗工作中的作用日益重要^[1-2]。近年来棒状杆菌引起临床感染的报道越来越多,相关微生物指标的准则也对其临床意义进行评价^[3]。现对棒状杆菌的耐药情况及纹带棒状杆菌同源性进行研究,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2006 年 11 月至 2008 年 10 月该院临床标本分离的 184 株棒状杆菌。

1.2 仪器与试剂 2400 型 PCR 扩增仪器(美国 PE 公司),电泳仪(美国 BIO-RAD 公司),凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。5%羊血琼脂平板和微量细菌定量(MIC)药敏试剂盒购自天津金章科技发展有限公司,包括青霉素(PG)、头孢噻肟(CTX)、亚胺培南(IPM)、环丙沙星(CIP)、庆大霉素(CN)、红霉素(E)、克林霉素(CLI)、万古霉素(Va)、多西环素(DOX)、四环素(TE)、利福平(RD)、利奈唑胺(LZD)等 12 种抗菌药物。Taq DNA 聚合酶,10×loading buffer,PCR 染料,4 种 dNTP 混合液(μmol/L),染料 GOLD V 和琼脂糖均为北京赛百盛公司产品,DNA Marker(2 000 bp)为北京普博欣生物科技有限责任公司产品。蛋白酶 K、溶菌酶、SDS 均为上海生工生物工程有限公司产品。

1.3 引物合成 按文献[4]设计,引物均由北京赛百盛生物技术有限公司合成。见表 1。

1.4 药敏试验 药敏试验使用肉汤微量细菌定量(MIC)试剂盒,操作按试剂盒说明书和标准规程完成^[5]。结果按 CLSI

M45-A 棒状杆菌 MIC 判断标准。庆大霉素和环丙沙星用大肠埃希菌 ATCC25922 菌株进行质控,其他药物用肺炎链球菌 ATCC49619 菌株进行质控。

表 1 6 种引物序列

引物	序列顺序
1	5'-GGTGC GGGAA-3'
2	5'-GTTTCGCTCC-3'
3	5'-GTAGACCCGT-3'
4	5'-AAGAGCCCGT-3'
5	5'-AACGCGCAAC-3'
6	5'-CCCGTCAGCA-3'

1.5 基因分型

1.5.1 DNA 提取 每个 EP 管中加入 50 μL 溶菌酶(50 mg/mL),再加入 1 环待检菌株的纯培养物,37℃ 孵育 30 min;加入 50 μL 的蛋白酶 K(200 μg/mL)和 150 μL Tris(pH=7.5)及 20 μL 10% SDS,37℃ 孵育 30 min,52℃ 30 min,95℃ 2 min。

1.5.2 DNA 纯化 将 200 μL DNA 样本、20 μL 3M NaAC、250 μL 异丙醇混匀,室温放置 1 h,13 000 r/min 离心 12 min,去掉上清液;用无水乙醇洗涤 2 次;然后加入 350 μL 无水乙醇,稍混匀,13 000 r/min 离心 3 min,弃上清液;晾干 2~10 min,再加 150 μL Tris,混匀后-20℃ 冻存。

1.5.3 DNA 扩增 扩增条件:反应体系 20 μL,95℃ 预变性 5

min。循环参数:变性 95 ℃ 1 min,退火 40 ℃ 1 min,72 ℃ 延伸 2 min,45 个循环,末次循环后 72 ℃ 延伸 7 min。

1.5.4 最佳引物筛选 将 10 号菌分别用引物 1、2、3、4、5、6 扩增及电泳筛选出最佳引物 2。见图 1。

1.5.5 电泳 将 PCR 产物置 1.2% 琼脂糖凝胶电泳观察结果,与 DNA 标记物比较。其 DNA PCR 扩增条带位置完全相同,为同一基因型;主条带位置相同,副条带相差不大者为基因型相似或密切相关;不满足上述条件者为不同的基因型。

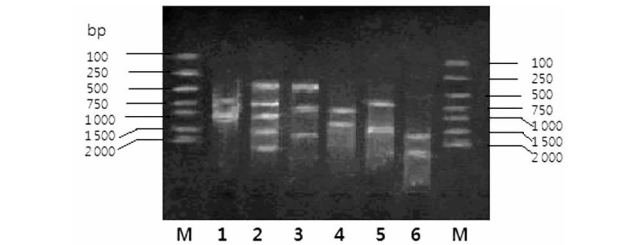
1.5.6 基因定型 用引物 2 对 18 株棒状杆菌进行基因分型。

2 结 果

2.1 棒状杆菌的药敏试验 将分离的 184 株棒状杆菌对 12 种抗菌药物进行药敏试验,抗菌药物种类为 β-内酰胺类抗菌药物 2 种、头孢类 1 种、糖肽类 1 种、氨基糖苷类 1 种、四环素类 2 种、喹诺酮类 1 种、大环内酯类 1 种、林可胺类 1 种、抗结核类 1 种、恶唑酮类 1 种。见表 2。

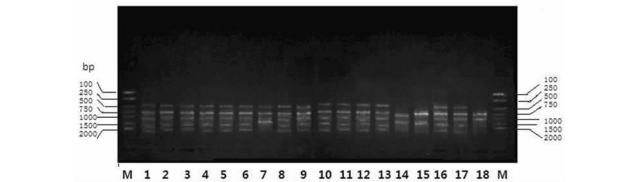
表 2 184 株棒状杆菌的耐药率结果比较[n(%)]			
抗菌药物	S	I	R
青霉素	45(24.5)	8(4.3)	140(76.1)
头孢噻肟	33(17.9)	6(3.3)	144(78.3)
亚胺培南	127(69.0)	8(4.3)	49(26.6)
庆大霉素	126(68.5)	20(10.9)	38(20.7)
红霉素	18(9.8)	—	166(90.2)
环丙沙星	29(15.8)	3(1.6)	142(77.2)
多西环素	75(40.8)	27(14.7)	82(44.6)
四环素	69(37.5)	2(1.1)	113(61.4)
克林霉素	18(9.8)	1(0.5)	165(89.7)
万古霉素	139(75.5)	4(2.2)	41(22.3)
利福平	184(100.0)	—	—
利奈唑烷	184(100.0)	—	—

—:无数据;S:敏感;I:中介;R:耐药。



M:标记物;1~6:10 号菌株 RAPD-PCR 扩增产物,对应引物序列见表 1 中引物 1~6。

图 1 RAPD-PCR 方法学比较



M:标记物;1~18:18 株纹带棒状杆菌 RAPD-PCR 扩增产物;1~6、8~13、16~17:A 型纹带棒状杆菌;7:B 型纹带棒状杆菌;4:C 型纹带棒状杆菌;15:D 型纹带棒状杆菌;18:E 型纹带棒状杆菌。

图 2 18 株纹带棒状杆菌 RAPD-PCR 电泳结果

2.2 基因分析及同源性分析

2.2.1 方法学研究 6 对合成的随机引物进行 DNA 扩增和电泳,与其他引物比较,引物 2 的条带较多而且清晰,片段长度 250~3 000 bp。见图 1。

2.2.2 18 株纹带棒状杆菌基因分析 将 18 株纹带棒状杆菌进行基因分析,可分成 5 个类型:1、2、3、4、5、6、8、9、10、11、12、13、16、17 可归为 A 型;7、14、15、18 分别为 B、C、D、E 型。见图 2。

3 讨 论

棒状杆菌目前包括 59 种(2 个分类组),其中 36 种与医学相关。除白喉棒状杆菌外大多为条件致病菌,可引起人类组织和血液感染^[6]。棒状杆菌引起的临床感染及耐药性常常被忽视,而且因其菌属分类复杂,菌落形态多样,所需培养时间长短不一,而多数细菌生长缓慢,超过一般实验室 24 h 培养时间而经常被临床所忽视,出现漏报或不报情况,临床实际检出率应该更高。棒状杆菌曾被认为是敏感菌,现在有越来越多的研究表明,棒状杆菌对多种抗菌药物 MIC 值有升高的趋势,棒状杆菌的耐药基因的检出率也多有报道^[7]。

纹带棒状杆菌可引起伤口、呼吸道等多部位的感染,可通过异体传播造成医院内感染^[8-9]。纹带棒状杆菌在棒状杆菌菌种中占 56%,是明显的优势菌种^[10]。近两年来,该院纹带棒状杆菌在临床的分离率越来越高,且集中在呼吸科和神经内科病房。

老年人常患有多种基础疾病,组织器官功能退化,自身免疫力较健康者低下,因此老年人常成为多种疾病的易感人群,尤其是下呼吸道感染成为老年患者的常见病^[11]。本实验根据国外 Ready-To-Go 试剂盒的 6 种引物序列,进行了方法学评价试验,筛选出对纹带棒状杆菌最佳的引物序列,图 1 显示引物 2 的条带多且较清晰明了,这也与有关文献报道一致^[4]。因此本组用引物 2 对 18 株纹带棒状杆菌 RAPD-PCR 基因分析,发现可分成 5 个类型,A 型菌株有 14 株(77.8%)。这 14 株纹带棒状杆菌中 1、6、16、17 号菌株来自同一病区,2、3、4、5、8、9、10、11、12、13 来自 A6 病房,且同一病区不同病房间的菌株也有同源性,表明 A 型的纹带棒状杆菌在该院病房与病房、病区与病区之间有传播。

目前,感染性疾病的患病率逐步上升,感染性病原体的种类日益增加,以及抗菌药物的广泛使用,使微生物检验医师和临床医师均面临更严峻的挑战^[12]。综上所述,临床棒状杆菌感染越来越多,纹带棒状杆菌最常见,棒状杆菌对多种抗菌药物的敏感性降低,多重耐药株在增加,该院存在棒状杆菌院内相互传播的趋势,应该引起重视,采取积极措施防止棒状杆菌的暴发流行。

参考文献

[1] Dunder D, Sayan M, Arsian Z, et al. Routine using pattern and performance of diagnostic tests for tuberculosis on a university hospital[J]. AM J Medsci, 2010, 339(3): 224-228.

[2] Deleo FR, Otto M, Kreiswirth BN, et al. Community-associated methicillin-resistant staphylococcus aureus[J]. Lancet, 2010, 375(21): 1557-1568.

[3] Funke GA, Graevenitz JE, Clarridge I, et al. Clinical microbiology of coryneform bacteria[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(1): 125-159.

[4] Zoysa AS, Efstratiou A. PCR typing of Corynebacterium diphtheriae by random amplification of polymorphic DNA(下转第 786 页)

表激光散射,可以用于单核细胞和 3 种粒细胞的区分^[8]。通过综合处理 3 个参数的特性,可全面对白细胞的各种特征进行综合评价分析,得到 5 项白细胞分类结果。而且由于仪器在 20 s 能分析 8 192 个白细胞,故可精确检测白细胞的各项参数。

机体由于各种病因刺激发生应激反应时,骨髓贮存池中粒细胞或边缘池粒细胞进入血液循环,出现反应性粒细胞增多,大多表现为中性分叶核、杆状核粒细胞增多或幼稚粒细胞增多,胞质中可出现中毒颗粒、空泡和 Dohle 小体等病理性改变^[1]。其中手术致组织严重损伤时,WBC 会显著增高,以中性分叶核粒细胞增多为主^[9]。术后并发感染时,是机体在应激状态下继发细菌感染,血常规分析并不能进行有效的区别诊断。本研究中 WBC 和 NE%在术后感染组和无感染组间也是差异无统计学意义($P<0.05$);而临床上进行特异性诊断常依靠细菌的培养鉴定,其周期较长,且病原菌的检出灵敏度较低^[2];所以目前的现状是缺乏灵敏又特异的实验室诊断指标进行早期区别诊断。

本研究中针对中性粒细胞 VCS 参数在该并发症中的变化进行分析,结果显示,术后感染组和无感染症状组均出现 WBC 和 NE%增多,中性粒细胞体积增大且大小不一,胞质中颗粒增多等一系列改变,而中性粒细胞 VCS 参数在并发细菌感染患者中表现得更为明显($P<0.05$)。可见细菌感染会使应激状态下的中性粒细胞形态发生更显著的变化,其相应的形态学(VCS)参数反映了这种特异性改变。中性粒细胞转换参数在术后无感染组和感染组间比较差异有统计学意义($P<0.05$),表现为随着细菌感染程度增强而出现了有意义的增大。且经 ROC 曲线分析其线下面积为 0.831,要大于其他指标。故其无论在实际可操作性还是临床的应用价值都优于其他参数,是因其不仅反映了中性粒细胞体积的变化,也体现射频电导率的差异。

hs-CRP 水平能反映炎症的范围和活动力,其改变早于临床其他症状,故 hs-CRP 水平与机体内炎症反应程度相关^[10]。本组中对 hs-CRP 与 VCS 参数进行了平行检测并进行相关分析,结果显示,中性粒细胞转换参数与 hs-CRP 水平呈正相关关系($r=0.774,P=0.000$),说明中性粒细胞 VCS 参数的变异程度也是与机体内炎症反应程度相关的,是反映机体内炎症状态的量化指标。

总之,VCS 参数作为一种量化的细胞形态学指标,能准确反映细胞在各种免疫进程中的形态学变化,有助于临床早期灵敏、特异地诊断相关疾病,是高效、客观、经济、实用的实验室指标。

参考文献

[1] 熊立凡. 临床检验基础[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:36-49.

[2] 李振华,许丽娇,韦宁. 全自动血液分析仪新参数在细菌性感染疾病中的变化及临床应用[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(1):90-92.

[3] Chaves F, Tierno B, Xu D. Neutrophil volume distribution width: a new automated hematologic parameter for acute infection[J]. Arch Pathol Lab Med, 2006, 130(3):378-380.

[4] Briggs C, Costa A, Freeman L, et al. Development of an automated malaria discriminant factor using VCS technology[J]. Am J Clin Pathol, 2006, 126(5):691-698.

[5] Silva M, Fourcade C, Fartoukh C, et al. Lymphocyte volume and conductivity indices of the haematology analyser Coulter GEN in lymphoproliferative disorders and viral diseases[J]. Clin Lab Haematol, 2006, 28(1):1-8.

[6] Marionneaux S, Monsalve B, Plante N, et al. The application of Beckman Coulter VCS technology at a major cancer center, with emphasis on the detection of circulating immature plasma cells in plasma cell leukemia[J]. Lab Hematol, 2006, 12(4):210-216.

[7] 中华人民共和国卫生部. 医院感染诊断标准(试行)[J]. 中华医学杂志, 2001, 81(5):314-320.

[8] Chaves F, Tierno B, Xu D. Quantitative determination of neutrophil VCS parameters by the Coulter automated hematology analyzer: new and reliable indicators for acute bacterial infection[J]. Am J Clin Pathol, 2005, 124(3):440-444.

[9] 黄德明. 现代医学检验新技术与操作规程全书[M]. 合肥:安徽文化音像出版社,2004:274-275.

[10] 刘德贝,曹艳林,邹飞扬,等. 超敏 CRP、IL-6 及 PCT 对新生儿脓毒症早期诊断的意义[J]. 国际检验医学杂志,2010,31(3):212-213.

(收稿日期:2012-01-14)

(上接第 783 页)

[J]. J Med Microbiol, 1999, 48(4):335-340.

[5] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:74-82.

[6] Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, et al. Manual of clinical microbiology[M]. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2003.

[7] 陈东科,许宏涛,艾晓曼,等. 临床分离棒状杆菌对常用抗菌药物的敏感性分析[J]. 临床检验杂志,2011,29(3):191-192.

[8] Graevenitz A, Frommelt L, Pünter-Streit V, et al. Diversity of coryneforms found in infections following prosthetic joint insertion and open fractures[J]. Infection, 1998, 26(1):36-38.

[9] Brandenburg AH, Belkum A, Pelt C, et al. Patient-to-patient

spread of a single strain of corynebacterium striatum causing infections in a surgical intensive care unit[J]. Clin Microbiol, 1996, 34(9):2089-2094.

[10] 陈东科,沙丽搭娜提·贺纳亚提,许宏涛,等. 纹带棒状杆菌在临床标本中的分布及耐药性调查[J]. 中华医院感染学杂志,2010,20(2):285-287.

[11] 田新村,吴文哲,张静,等. 老年人下呼吸道感染常见病病原菌与 G⁻杆菌耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(6):696-697.

[12] 马立艳. 加强微生物检验医师与临床医师的有效沟通[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(10):1138-1139.

(收稿日期:2012-01-30)