

• 经验交流 •

糖尿病足病原菌培养及相关结果分析

李雪璐<sup>1</sup>, 孙 娜<sup>2</sup>, 严宗逊<sup>2△</sup>, 朱 红<sup>1</sup>

(1. 川北医学院微生物与免疫学教研室, 四川南充 637000;  
2. 川北医学院附属医院内分泌科, 四川南充 637000)

**摘 要:**目的 对糖尿病足患者感染的病原菌种类及药敏情况进行分析总结, 指导临床选用有效的抗菌治疗方案, 提高疗效。方法 回顾性分析 2010 年 1 月至 2011 年 5 月本院糖尿病足溃疡分泌物中分离的病原菌及药敏情况。结果 66 例患者分泌物分离培养病原菌 46 例(69.7%), 分离培养病原菌 62 株, G<sup>+</sup> 菌为 58.1%, G<sup>-</sup> 杆菌为 38.7%, 真菌为 3.2%; 单一菌株感染 34 例, 混合感染 12 例; G<sup>+</sup> 菌对万古霉素、磺胺类抗菌药、利奈唑胺较敏感, 对亚胺培南、四环素、克林霉素有一定的耐药性; G<sup>-</sup> 菌对亚胺培南、氨基糖苷类、第 2、3 代头孢菌素、碳青霉烯类、β-内酰胺酶抑制剂较敏感, 对第 1 代头孢菌素及青霉素类耐药性高。结论 糖尿病足患者溃疡感染主要为 G<sup>+</sup> 菌, 其次为 G<sup>-</sup> 菌。应重视糖尿病足感染患者病原菌培养和药物敏感试验结果, 根据试验结果选用有效的抗生素, 提高治愈率。

**关键词:**糖尿病足; 感染; 病原菌; 药物敏感性测定  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.042 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2013)05-0607-03

糖尿病足(DF)是糖尿病严重并发症之一,是指发生于糖尿病患者的足部感染、溃疡和(或)深层组织破坏,与局部神经异常和下肢远端外周血管病变相关<sup>[1]</sup>。感染是糖尿病足发生、加重,甚至截肢的主要因素,因此,治疗糖尿病足、避免截肢的关键措施是及时给予有效的抗感染治疗。临床医院应严格掌握当地致病菌及其药敏情况,制定出合理的个体给药方案,提高疗效。现将本院收治的糖尿病足感染病例的病原菌分布与药敏情况进行回顾性分析。

1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2010 年 1 月至 2011 年 5 月在本院住院的糖尿病足患者病历资料,回顾性分析病历资料、细菌培养及药敏结果。66 例患者均符合 1999 年 ADA 制定的糖尿病诊断标准,男 28 例,女 38 例。年龄 46~84 岁,平均(64.9±9.1)岁,糖尿病病程 1~30 年,平均(8.6±7.5)年,糖尿病足病程 1 d 至 6 个月,糖尿病足按 Wanger 分级<sup>[2]</sup>,1 级 12 例,2 级 24 例,3 级 26 例,4 级 4 例,待截肢的有 4 例。

**1.2 方法** 入院后使用抗生素前,用灭菌棉拭子取糖尿病足患者溃疡分泌物或脓液,置于灭菌试管内 1 h 内送检,采用法国生物梅里埃全自动微生物鉴定/药敏系统进行病原菌(细菌、真菌)的普通培养鉴定及药敏试验。试验方法与判定标准参照美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)的规定。入院时检测血常规、血糖(MBG)、糖化血红蛋白(HbA1c)等。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计学处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

**2.1 清蛋白、白细胞及血糖水平** 入院时患者清蛋白(31.7±7.3)g/L,白细胞数(10.8±7.2)×10<sup>9</sup>/L,中性细胞分类(71.7±14.6)%,MBG(16.9±7.1)mmol/L,HbA1c(10.7±3.6)%。

**2.2 病原菌培养结果** 66 例糖尿病足患者溃疡分泌物进行分离培养,获阳性结果 46 例(69.7%),无细菌、真菌生长 20 例(30.3%)。单一菌株感染 34 例(73.91%),混合感染 12 例(26.09%)(同时检出大于或等于 2 种细菌)。混合感染均为细

菌,2 种细菌感染 8 例,3 种细菌感染 4 例。分离培养出病原菌 62 株, G<sup>+</sup> 菌 36 株(58.1%), G<sup>-</sup> 杆菌 24 株(38.7%), 真菌 2 株(3.2%), 依次为葡萄球菌(25.8%), 肠球菌(16.1%), 链球菌(9.7%), 普通变形菌(9.7%), G<sup>+</sup> 杆菌(6.5%), 大肠埃希菌(6.5%), 其他菌(各占 3.2%)(见表 1)。由于实验室条件的限制,未做厌氧菌群的培养。

**2.3 病原菌药敏结果** G<sup>+</sup> 菌对万古霉素、磺胺类抗菌药、利奈唑胺较敏感,对头孢菌素、氯霉素、喹诺酮类及氨基糖苷类均有耐药性(见表 2); G<sup>-</sup> 菌对亚胺培南、氨基糖苷类、第 2、3 代头孢菌素、碳青霉烯类和 β-内酰胺酶抑制剂较敏感,对第 1 代头孢菌素及青霉素类耐药性高(见表 3)。

表 1 62 株病原菌分布情况

| 菌种                       | 株数 | 所占比例(%) |
|--------------------------|----|---------|
| G <sup>+</sup> 菌         | 36 | 58.1    |
| 葡萄球菌(金/里昂/溶血葡萄球菌)        | 16 | 25.8    |
| 肠球菌(粪肠/鸟肠/屎肠球菌)          | 10 | 16.1    |
| 链球菌(中间/草绿色/β溶血非 AB 型链球菌) | 6  | 9.7     |
| G <sup>+</sup> 杆菌        | 4  | 6.5     |
| G <sup>-</sup> 菌         | 24 | 28.7    |
| 普通变形菌                    | 6  | 9.7     |
| 大肠埃希菌                    | 4  | 6.5     |
| 奇异变形菌                    | 2  | 3.2     |
| 阴沟肠杆菌                    | 2  | 3.2     |
| 类志贺邻单胞菌                  | 2  | 3.2     |
| 摩氏摩根菌                    | 2  | 3.2     |
| 产酸克雷伯氏菌                  | 2  | 3.2     |
| 丙二酸盐阳性枸橼酸杆菌              | 2  | 3.2     |
| 产气肠杆菌                    | 2  | 3.2     |
| 真菌(酵母样)                  | 2  | 3.2     |

**2.4 各级糖尿病足的病原菌分布情况** 分离培养结果显示,Ⅰ级糖尿病足获阳性结果 4 例,为大肠埃希菌和金葡萄菌各 2 例,Ⅱ和Ⅳ级以 G<sup>+</sup> 菌感染为主,主要是葡萄球菌(57.1%),Ⅲ级以 G<sup>-</sup> 菌感染为主,主要是普通变形菌(40%)。混合感染分布在Ⅱ~Ⅳ级,都有 G<sup>+</sup> 菌感染,其中Ⅱ级 6 例,2 例为 G<sup>+</sup> 菌(2 种),2 例为 G<sup>+</sup> 菌(1 种)并 G<sup>-</sup> 菌(2 种),2 例为 G<sup>+</sup> 菌(2 种)并

△ 通讯作者, E-mail: yzxlxh@163.com。

G<sup>-</sup>菌(1种);Ⅲ级4例,2例为G<sup>+</sup>菌(2种),2例为G<sup>+</sup>菌(1种)并G<sup>-</sup>菌(1种);Ⅳ级2例,均为G<sup>+</sup>菌并G<sup>-</sup>菌(各1种)。单一感染,多重耐药菌株比例低;混合感染,多重耐药菌株比例较高。

| 表 2 主要 G <sup>+</sup> 菌对常见抗菌药物的敏感率(%) |      |     |     |
|---------------------------------------|------|-----|-----|
| 抗生素                                   | 葡萄球菌 | 肠球菌 | 链球菌 |
| 氨苄西林                                  | 25   | 80  | —   |
| 头孢唑林                                  | 50   | —   | —   |
| 亚胺培南                                  | 50   | —   | —   |
| 氧氟沙星                                  | 75   | 100 | 100 |
| 头孢噻肟                                  | 100  | —   | 100 |
| 哌拉西林他唑巴坦                              | 100  | 0   | —   |
| 氯霉素                                   | 100  | 40  | 100 |
| 氯洁霉素                                  | 100  | —   | —   |
| 苯唑西林                                  | 62.5 | 0   | —   |
| 复方新诺明                                 | 100  | 100 | —   |
| 万古霉素                                  | 100  | 100 | 100 |
| 利奈唑烷                                  | 100  | 100 | —   |
| 红霉素                                   | 37.5 | 0   | 0   |
| 青霉素                                   | 12.5 | 80  | 100 |
| 四环素                                   | 75   | 25  | 0   |
| 利福平                                   | 83.3 | 60  | —   |
| 环丙沙星                                  | 60   | 40  | —   |
| 庆大霉素                                  | 60   | 40  | —   |
| 链霉素                                   | —    | 80  | —   |
| 克林霉素                                  | 33.3 | —   | 0   |

—:表示未做。

| 表 3 主要 G <sup>-</sup> 菌对常见抗菌药物的敏感率(%) |     |     |     |      |        |
|---------------------------------------|-----|-----|-----|------|--------|
| 抗生素                                   | 普通  | 大肠  | 奇异  | 产酸克  | 丙二酸盐阳性 |
|                                       | 变形菌 | 埃希菌 | 变形菌 | 雷伯杆菌 | 枸橼酸杆菌  |
| 阿米卡星                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | —      |
| 头孢唑林                                  | 0   | 100 | 0   | 100  | 100    |
| 亚胺培南                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | 100    |
| 头孢噻肟                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | —      |
| 头孢他啶                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | —      |
| 头孢哌酮舒巴坦                               | 100 | 100 | 100 | 100  | —      |
| 氨苄西林                                  | 0   | —   | 0   | —    | 100    |
| 头孢西丁                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | 100    |
| 氧氟沙星                                  | 100 | 50  | 0   | 100  | 100    |
| 美洛培南                                  | 100 | 100 | 100 | 100  | —      |
| 头孢呋辛钠                                 | 0   | 50  | 0   | 100  | —      |
| 哌拉西林舒巴坦                               | 100 | 100 | 100 | 100  | 100    |

—:表示未做。

**2.5 各种病原菌的糖尿病足的 HbA1c 比较** 据统计结果显示,感染 G<sup>-</sup>菌的糖尿病足的 HbA1c(11.80±3.49)与 G<sup>+</sup>菌的 HbA1c(11.38±2.71)比较, $P>0.05$ ,无显著统计学意义( $t=0.348,P=0.731$ ),二者的 HbA1c 水平无显著差异;混合感染的糖尿病足 HbA1c(12.28±0.93)与单一菌株感染的 HbA1c(11.07±3.89)比较, $P>0.05$ ,无显著统计学意义( $t=0.676,P=0.508$ ),二者的 HbA1c 水平无显著差异。

### 3 讨 论

66 例糖尿病足患者溃疡分泌物共培养出病原菌 62 株,平均每个患者有 0.93 个病原菌被检测出来,主要是以单一感染(51.5%)为主,混合感染(18.2%)低,这与 Bansal 等<sup>[3]</sup>及 Chopdekar 和 Ameeta<sup>[4]</sup>的以多重感染为主的研究结果有所不

同,当然本研究未做厌氧培养,很可能降低了混合感染的阳性检出率。本研究虽然显示混合感染率低,但提示混合感染时可因细菌间协同作用而导致病原菌对抗生素的敏感性的下降,值得重视。本研究显示真菌的检出率(3.2%)低,与大多数研究结果相符合,也应该关注。

本研究资料显示,糖尿病足溃疡感染病原菌以 G<sup>+</sup>菌为主(58.1%),这与周丽杰等<sup>[5]</sup>报道的 89 例糖尿病足深部感染的病原菌培养结果相似,而与金虹飞等<sup>[6]</sup>报道的 125 例糖尿病足感染病原菌以 G<sup>-</sup>菌为主不同,说明在不同地区病原菌分布有差异,临床治疗要注意当地病原菌的分布。其中 G<sup>+</sup>菌主要为葡萄球菌、肠球菌和链球菌,对万古霉素、磺胺类抗菌药、利奈唑烷较敏感,对头孢菌素、氯霉素、喹诺酮类及氨基糖苷类均有耐药性;本次未发现对万古霉素耐药,但肠球菌耐万古霉素在国内外已有报道,因此,应限用万古霉素,延缓耐万古霉素的葡萄球菌和肠球菌的出现和增速。G<sup>-</sup>菌主要为普通变形菌和大肠埃希菌,对亚胺培南和氨基糖苷类较敏感;大肠埃希菌也未发现产超广谱  $\beta$ -内酰胺酶(ESBLs),故对多种抗菌药敏感性都较高。根据本研究的结果,临床医师在细菌培养及药敏试验出来之前可考虑选用上述敏感性高的药物,以提高临床疗效。但是因为本研究未做厌氧菌的培养,如抗感染效果不佳,或局部恶臭味明显,应注意加用抗厌氧菌药物。

关于糖尿病足各分级的病原菌的分布规律,本研究发现糖尿病足Ⅰ~Ⅳ级的病原菌种分布各不同,Ⅱ和Ⅳ级感染以 G<sup>+</sup>菌为主,Ⅲ级以 G<sup>-</sup>菌为主。但徐灵芝等<sup>[7]</sup>报道随着糖尿病足分级的增加,G<sup>-</sup>杆菌的感染虽增加但其分级和菌种无相关性。混合感染分布在Ⅱ~Ⅳ级,其分布的菌种不同,但都合并 G<sup>+</sup>菌感染。这提示在临床要注意当地各级病原菌感染的差异性。

与以往报道<sup>[8]</sup>相似,本研究显示患者 HbA1c 平均为(10.7±3.6)%,较正常(3%~6%)增高。持续的高血糖可造成胶原蛋白非酶性糖化反应及多元醇通路活性增强,导致山梨醇的生成增加从而促进血管硬化和神经病变。但仅有一项报道,HbA1c 每增加 2%,糖尿病足的发生率增加 1.4~1.5 倍<sup>[9]</sup>。本研究发现感染 G<sup>-</sup>菌和 G<sup>+</sup>菌的 HbA1c 水平无显著差异,混合感染和单一菌株感染的 HbA1c 水平也无显著差异。所以菌种分布和感染类型与 HbA1c 的关系需进一步研究探讨。

有文献报道,糖尿病足患者在严重感染时白细胞及中性细胞分类也可不升高或升高不明显<sup>[10]</sup>。本研究显示糖尿病足患者白细胞数为(10.8±7.2)×10<sup>9</sup>/L,中性细胞分类为(71.7±14.6)%。这可能与糖尿病足溃疡局限化和糖尿病史较长、患者机体免疫应答及应激能力下降有关<sup>[11]</sup>。因此,一旦糖尿病足发生感染,应及时取其溃疡分泌物进行病原菌培养和药敏试验,以早日确诊而采取针对性抗感染为首要的治疗措施。

在糖尿病足抗感染的治疗中,保持血清总蛋白大于 62 g/L、清蛋白大于 35 g/L、总淋巴细胞计数大于 1.5×10<sup>9</sup>/L,对溃疡的愈合有积极意义。本资料结果显示清蛋白平均为(31.7±7.3)g/L,总清蛋白水平低。因此,除了应根据药敏结果并结合其他指标综合分析,适时合理的选择敏感性高的抗感染药物,减少耐药性的发生,同时应注意加强患者的营养给予,促进溃疡的愈合,降低截肢率,提高糖尿病足的治愈率。

### 参考文献

[1] 许樟荣,廖二元. 内分泌学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001: 1584-1592.  
[2] Wagner FW Jr. The dysvascular foot: a system for diagnosis and

treatment[J]. Foot Ankle, 1981, 2(2): 64-122.

[3] Bansal E, Garg A, Bhatia S, et al. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers[J]. Indian J Pathol Microbiol, 2008, 51(2): 204-208.

[4] Chopdekar KA, Ameeta A. Bacteriological analysis of diabetic foot infection[J]. Bombay Hospital Journal, 2011, 53(4): 706-711.

[5] 周丽杰, 张静萍, 张静. 糖尿病足深部感染的病原菌分布与耐药性变迁[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(2): 121-123, 129.

[6] 金虹飞, 蔡少平, 顾慧群, 等. 544 例糖尿病足感染患者的病原菌特点及药敏分析[J]. 检验医学, 2010, 25(5): 356-359.

[7] 徐灵芝, 杨叶虹, 叶红英, 等. 糖尿病足感染的细菌学特点与预后分析[J]. 浙江临床医学, 2008, 10(4): 451-452.

[8] 杨靖, 文芳. 68 例糖尿病足细菌培养及相关结果分析[J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(16): 2500-2502.

[9] Moss SE, Klein R, Klein BE. The prevalence and incidence of lower extremity amputation in a diabetic population[Z], 1992: 610.

[10] Muhammad RK, Khaled A. Prevalence of ischemia in diabetic foot infection[J]. World J Surg, 2003, 27(1): 797-799.

[11] Lavery LA, Armstrong DG, Wunderlich RP, et al. Risk factors for foot infections in individuals with diabetes[J]. Diabetes Care, 2006, 29(6): 1288-1293.

(收稿日期: 2012-12-18)

• 经验交流 •

# 女性人乳头状瘤病毒与单纯疱疹病毒Ⅱ型感染的相关性研究

向华国, 曾锦婷, 颜 容, 刘典浪, 刘小君, 高 丹  
(广东省深圳市宝安区福永人民医院, 广东深圳 518103)

**摘 要:**目的 探讨女性生殖道人乳头状瘤病毒(HPV)与单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-Ⅱ)感染的相关性。方法 对 427 例女性宫颈脱落细胞标本采用 PCR-反向点杂交进行 HPV-DNA 分型检测, 将其中的 49 例 HPV 阳性标本作为 HPV 阳性组, 同时随机选取 40 例 HPV 阴性标本组作为对照组, 再利用实时荧光 PCR 同时检测上述两组病例的 HSV-Ⅱ 感染情况。结果 HPV 阳性组及 HPV 阴性组的 HSV-Ⅱ 阳性率分别为 20.4%(10/49)和 7.5%(3/40), HPV 和 HSV-Ⅱ 的感染有显著的相关性( $P < 0.05$ )。结论 女性生殖道 HPV 与 HSV-Ⅱ 感染具有协同作用并密切相关, 早发现、早治疗对于预防宫颈癌具有十分重要的意义。

**关键词:**人乳头状瘤病毒; 单纯疱疹病毒Ⅱ型; 反向点杂交; 聚合酶链反应  
**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.043 **文献标识码:**B **文章编号:**1673-4130(2013)05-0609-02

研究表明, 人乳头状瘤病毒(HPV)是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌发生的必要条件和高危因素<sup>[1-3]</sup>。而宫颈发生癌变亦与多种性传播疾病感染密切相关, 这些病原体可能与 HPV 协同作用从而加速宫颈的病变进程<sup>[4]</sup>。流行病学调查显示, 单纯疱疹病毒Ⅱ型(HSV-Ⅱ)作为常见的性传播病原体, 亦会诱发宫颈癌<sup>[5]</sup>。本文通过 PCR-反向点杂交(PCR-RDB)基因分型技术对女性宫颈脱落细胞标本进行 23 种 HPV 亚型检测; 然后再利用实时荧光 PCR 检测 HSV-Ⅱ, 从而对 HPV 与 HSV-Ⅱ感染的相关性进行探讨。

## 1 材料与与方法

**1.1 标本来源** 2012 年 8 月 8 日至 2012 年 9 月 3 日, 采集就诊于深圳市宝安区福永人民医院妇科门诊的共 427 例女性患者的宫颈脱落细胞, 先通过 PCR-RDB 筛查 HPV 的感染情况, 然后将 HPV 阳性的标本和随机选取的 40 例 HPV 阴性标本分为 HPV 阳性组和 HPV 阴性组, 并采用实时荧光 PCR 技术检测其 HSV-Ⅱ 的感染情况。

**1.2 仪器与试剂** 人乳头状瘤病毒 PCR-反向点杂交法基因分型检测试剂由深圳亚能生物技术有限公司提供, HSV-Ⅱ 核酸扩增(PCR)荧光定量测定试剂由中山大学达安基因股份有限公司提供。ABI Steponeplus PCR 扩增仪由美国应用生物系统公司生产, FYY-3 分子杂交仪由江苏兴化分析仪器厂生产。

## 1.3 方法

**1.3.1 标本的采集** 以窥阴器或阴道张开器暴露宫颈, 通过用棉拭子将宫颈口过多的分泌物擦去, 取出宫颈刷置于宫颈口, 单方向旋转转 4~5 圈以获得足量的上皮细胞样本, 然后将宫颈刷头部放洗脱管中, 沿刷柄折痕处将宫颈刷柄折断, 放入有专用细胞保存液的试管中, 于 4℃ 保存, 1 周内测定。

**1.3.2 PCR-反向点杂交法的 HPV 分型** 可同时检测 23 种 HPV 基因型, 包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、83、MM4 等 18 种高危型, HPV6、11、42、43、44 等 5 种低危型。HPV 分型检测步骤(1)HPV DNA 提取; (2)PCR 扩增; (3)杂交; (4)洗膜; (5)显色。结果判定: 实验的每张膜条在 PC 位点必须出现蓝色显色信号, 阴性质控品除 PC 位点出现显色信号外其余位点均不出现显色信号, 阳性质控品除 PC 位点出现显色信号外, 必须在相应 HPV 基因型位点出现显色信号。由斑点显色的位置即可判定 HPV 的亚型。

**1.3.3 荧光定量 PCR 定量检测单纯疱疹病毒Ⅱ型** 采用一对 HSV-Ⅱ 型特异性引物和一条单纯疱疹病毒Ⅱ型特异性荧光探针。实验步骤: (1)DNA 的提取; (2)PCR 扩增; 循环参数: 93℃ 预变性 2 min; 然后按 93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10 个循环; 再按 93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30 个循环。 (3)结果判断: 按厂家说明书及提供软件来分析结果。

**1.4 统计学处理** 利用 SPSS10.0 软件进行  $\chi^2$  检验。

## 2 结 果

**2.1 PCR-RDB 检测 HPV-DNA 的感染情况** 通过对 427 例女性患者的宫颈脱落细胞标本采用 PCR-RDB 检测, 共检出 49 例 HPV 阳性, 22 种 HPV 亚型中共有 15 种被检出, 包括 HPV16、18、31、33、35、52、53、56、59、66、68 等 11 种高危型和 HPV6、11、42、43 等 4 种低危型。

**2.2 HPV 阳性组和阴性组的 HSV-Ⅱ 的检测结果及其相关性分析** HPV 阳性组及阴性对照组其 HSV-Ⅱ 的阳性率分别为 20.4%(10/49)和 7.5%(3/40), HPV 阳性组其 HSV-Ⅱ 的感染率均明显高于 HPV 阴性对照组, HPV 和 HSV-Ⅱ 的感染