

• 临床研究 •

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及同源性分析*

周 辉,周万青,张 燕,张之烽,沈 瀚[△]
(南京大学医学院附属鼓楼医院检验科,江苏南京 210008)

摘 要:**目的** 分析耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染及耐药情况,为临床提供科学依据。**方法** 收集 2015 年 11—12 月本院普外科 7 例住院患者粪便标本非重复分离的 MRSA 菌株作为研究对象,回顾性分析患者临床资料,采用全自动微生物分析系统对菌株进行药敏分析,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术分析菌株同源性。**结果** 7 例患者均为普通外科术后住院患者,手术前后均不同程度的使用过抗菌药物,尤其是术后均使用过 3 种或 3 种以上的抗菌药物;分离的 7 株 MRSA 菌株对喹努普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、利福平、复方磺胺甲噁唑均敏感,对青霉素、苯唑西林、庆大霉素、环丙沙星、左氧氟沙星、莫西沙星、红霉素、克林霉素、四环素均耐药。7 株 MRSA 菌株均来源于同一克隆,其中 A1 型 4 株,A2 型 2 株和 A3 型 1 株。**结论** MRSA 感染一般发生于有严重基础疾病且长期使用抗菌药物的住院治疗患者,院内感染是 MRSA 最主要的传播方式。
关键词:金黄色葡萄球菌; 腹泻; 院内感染; PFGE
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.032 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)22-3162-03

金黄色葡萄球菌在临床分离革兰阳性菌中居首位,是引起医院感染的常见病原菌之一^[1]。近年来由于抗菌药物的广泛使用,耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染日益严峻,已经与艾滋病、病毒性肝炎并列为 3 大感染性疾病,成为危害公共健康的重要因素之一^[2]。MRSA 仅占健康人群肠道菌群的 10%左右,其繁殖受肠道其他正常菌群的制约。正常情况下,MRSA 难以引发肠炎,而肠道内菌群生态平衡失调时会引发肠炎^[3]。利用脉冲场凝胶电泳(PFGE)分型技术对对菌株进行同源性分析,有助于了解本地区 MRSA 进化与传播特征,有助于监测其暴发流行,有助于合理治疗感染者^[4]。本研究对 2015 年 11—12 月本院普外科腹泻患者粪便标本分离的金黄色葡萄球菌进行药物敏感性 & 菌株同源性分析,旨在为临床提供参考,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集 2015 年 11—12 月本院普外科 7 例住院患者粪便标本非重复分离的 MRSA 菌株进行研究。
1.2 仪器与试剂 Vitek 2 Compact 全自动微生物分析系统及配套 GP 鉴定卡、GP67 药敏卡购自法国梅里埃公司,金黄色葡萄球菌胶原凝集试剂购自英国 Oxoid 公司,CHEF Mapper XA 型脉冲场凝胶电泳仪、Gel Doc XR 型凝胶成像分析系统及 PFGE 琼脂糖购自美国 Bio-Rad 公司,十二烷基肌氨酸钠、乙二胺四乙酸(EDTA)、溶菌酶、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、蛋白

酶 K 购自德国 Merck 公司,Sma I、Xba I 内切酶购自加拿大 Fermentas 公司,溶葡萄球菌素购自上海生工公司。菌株(H9812)及质控菌株(ATCC 29213)均来源于本实验室。
1.3 药敏试验 采用全自动微生物分析系统及其配套药敏卡对菌株进行常规药物敏感性检测,按试剂说明书操作。判断标准参见美国临床实验室标准化研究所标准(2015 版)。
1.4 PFGE 分析 用 PIV 缓冲液(1 mol/L NaCl,10 mmol/L Tris-HCl,pH 7.4)将培养过夜的细菌调节成浓度为 4 个麦氏单位的菌液,低熔点胶灌模,37℃置于 2.5 mL 的 Lysis 缓冲液(25 mg/L 溶菌酶,1 mol/L NaCl,6 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L EDTA,0.2%去氧胆酸钠,0.5%十二烷基肌氨酸钠,pH 7.4)中过夜;弃去上述缓冲液,加入 2.85 mL 的 ESP 缓冲液(20 mg/mL 蛋白酶 K,0.5 mol/L EDTA,1%十二烷基肌氨酸钠,pH 8.0),56℃消化 4 h;加入 30 U 限制性内切酶 Sma I,于 37℃酶切 2 h。将酶切产物进行凝胶电泳,电泳条件:电压 6 V/cm,夹角 120 度,脉冲参数 1~30 s,电泳时间 21 h,电泳温度 14℃。电泳后 EB 染色 30 min,用凝胶成像分析系统拍照分析。判定标准参照 Tenover 等的分型标准^[5]。

2 结 果

2.1 研究对象临床资料分析 7 例患者为胃肠道相关性疾病,手术前后均不同程度的使用过抗菌药物,尤其是术后均使用过 3 种或 3 种以上的抗菌药物。见表 1。

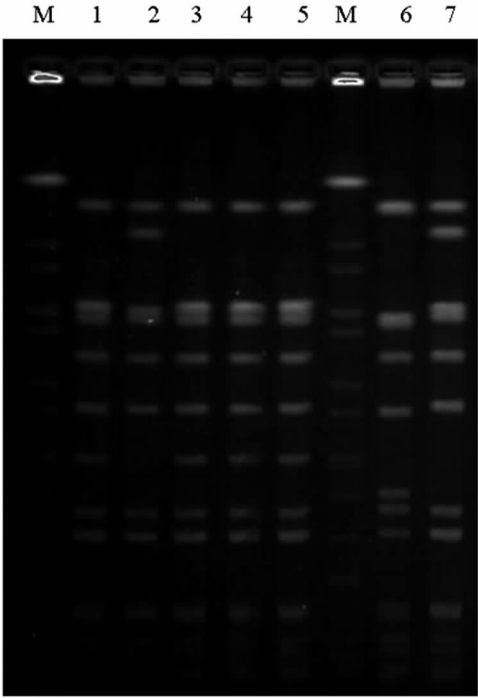
表 1 研究对象临床资料

患者编号	菌株编号	基础疾病	手术类型	分离前使用的抗菌药物	分离后使用的抗菌药物	结局
a	20151112139	高血压、糖尿病、 直肠站位	直肠 ESD 术	天册、乌司他丁、 头孢地嗪	头孢地嗪、天册、 万古霉素	出院,消化 科门诊随诊
b	20151123196	肝囊肿、肠梗阻、 乙状结肠癌	乙状结肠肿瘤切除术、降 结肠造瘘术、阑尾切除术	益保世灵、圣诺安、	天册、稳可信 、益保世灵、万古霉素	病情稳定, 恢复良好
c	20151205106	消化道穿孔、 腹膜炎	剖腹穿孔修补术	头孢他啶、万古霉素、复方 氨林巴比妥、泰能、伏立康唑	万古霉素(静滴、口服)、 特治星、稳可信	生命体征平稳, 继续康复治疗
d	20151209089	糖尿病、胆囊结石、 胆总管占位	肝部分切除术、肝外胆管切除术、 胆囊切除术、胆肠吻合术	头孢地嗪、氨基曲南、天册、泰能、 稳可信、替考拉宁	天册、泰能、稳可信、替考拉宁、 万古霉素	出院,随诊

* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金项目(021414380025)。
[△] 通信作者,E-mail:shenhan10366@sina.com。

续表 1 研究对象临床资料						
患者编号	菌株编号	基础疾病	手术类型	分离前使用的抗菌药物	分离后使用的抗菌药物	结局
e	20151209177	高血压、 消化道穿孔	剖腹穿孔修补术	头孢他啶、万古霉素、 复方氨林巴比妥	万古霉素、特治星、 稳可信	出院, 随诊
f	20151224013	糖尿病、胃癌	胃癌根治术	头孢哌酮、天册、 泰能、替考拉宁	头孢哌酮、泰能、稳可信、 万古霉素	出院, 随诊
g	20151221145	糖尿病、 胃底间质瘤	胃大部切除术	头孢呋辛钠	稳可信、天册、 万古霉素	出院, 随诊

2.2 MRSA 药敏及 PFGE 分型结果 分离的 7 株 MRSA 菌株对喹努普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、利福平、复方磺胺甲噁唑均敏感, 对青霉素(100.0%)、苯唑西林(100.0%)、庆大霉素(28.5%)、环丙沙星(85.7%)、左氧氟沙星(85.7%)、莫西沙星(85.7%)、红霉素(100.0%)、克林霉素(85.7%)、四环素(100.0%)均耐药。7 株 MRSA 菌株均来源于同一克隆, 其中 A1 型 4 株(20151112139、20151205106、20151209089、20151209177), A2 型 2 株(20151123196、20151221145)和 A3 型 1 株(20151224013)。见图 1。



注: M 为 H9812; 1~7 分别为 20151112139、20151123196、20151205106、20151209089、20151209177、20151224013、20151221145。

图 1 MRSA PFGE 电泳图谱

3 讨 论

金黄色葡萄球菌广泛存在于人的鼻咽、肠道、皮肤等部位, 是社区和医院获得性感染的重要病原菌, 尤其是 MRSA, 自发现以来, 其感染几乎遍及全球^[6]。在国内一些大型医院, MRSA 检出率已高达 60.0%~80.0%^[7]。MRSA 致病原因主要是能产生多种外毒素如 α-溶血素、β-溶血素、γ-溶血素等, 而这些外毒素会破坏宿主细胞膜使其死亡^[8]。如果胃肠道疾病患者在围手术期处理不当, 或者不合理使用抗菌药物则可导致或加重肠道内菌群生态平衡失调而出现 MRSA 肠炎。MRSA 肠炎起病急, 发展快, 常可并发感染性休克及多器官功能衰竭, 病死率极高^[9]。若对 MRSA 监测、控制不当, 则可造成区域性暴发流行^[10]。因此, 应对 MRSA 肠炎患者进行隔离治疗, 同时

医护人员要严格执行无菌操作, 对重点科室进行定期筛查^[11]。

本研究中, 7 例患者均为胃肠道疾病术后患者, 手术前后均不同程度的使用过抗菌药物, 尤其是术后均使用过 3 种或 3 种以上的抗菌药物。7 例患者粪便标本分离培养的菌株均为 MRSA 菌株, 其检测结果与 MRSA 肠炎所致的腹泻表现一致。药敏结果显示, 7 株 MRSA 菌株对喹努普汀/达福普汀、利奈唑胺、万古霉素、替加环素、利福平、复方磺胺甲噁唑均敏感。这表明万古霉素仍是治疗 MRSA 所致感染的首选药物, 利奈唑胺、喹努普汀/达福普汀、替加环素可作为万古霉素治疗效果欠佳时的备选药物。

同源性分析对监测院内分离菌株的传播源头, 分析传播途径, 发现流行菌株有重要作用。对怀疑为 MRSA 的流行株进行流行病学研究是遏制其爆发流行的关键。目前 MRSA 分子流行病学的监测方法主要有 PFGE 分型、金黄色葡萄球菌 A 蛋白基因分型、葡萄球菌染色体 mec 耐药盒分型、多位点序列分型等^[12], 其中 PFGE 技术可分离分辨范围达到 10Mb 的大分子质量 DNA, 主要被应用于细菌感染性疾病的暴发流行^[13-14]。由于 PFGE 技术具有结果稳定、分辨力强、重复性好的优点, 被誉为用于监测细菌暴发流行性的分子生物学分型技术“金标准”。本研究对 7 例 MRSA 菌株机进行 PFGE 分型, 结果显示这些菌株均为同一来源, 均为 A 型: A1 型 4 株, A2 型 2 株和 A3 型 1 株, 提示 2015 年 11—12 月间普外科暴发了 MRSA 感染性腹泻, 患者存在院内感染的可能。

综上所述, MRSA 感染一般发生于有严重基础疾病且长期使用抗菌药物的住院治疗患者, 院内感染是 MRSA 最主要的传播方式。因此, 对 MRSA 感染患者要进行彻底消毒隔离, 采取专人治疗和护理, 同时应根据细菌药敏分析结果合理选择抗菌药物, 谨防抗菌药物滥用及耐药菌株的产生和泛滥, 避免 MRSA 的医院感染爆发流行。

参考文献

[1] 葛瑛.《耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染防治专家共识》解读[J]. 中国临床医生, 2014, 42(3): 11-12.

[2] 李飞, 周帅, 董慧, 等. 金黄色葡萄球菌肠毒素 B 基因在大肠杆菌中的克隆及表达[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(18): 2553-2555.

[3] Causey MW, Spencer MP, Steele SR. Clostridium difficile enteritis after colectomy[J]. Am Surg, 2009, 75(12): 1203-1206.

[4] Xiao M, Wang H, Zhao Y, et al. National surveillance of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in China highlights a still-evolving epidemiology with 15 novel emerging multilocus sequence types[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(11): 3638-3644.

[5] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting

chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233-2239.

[6] Medina G, Egea AL, Otth C, et al. Molecular epidemiology of hospital-onset methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in southern Chile[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2013, 32(12): 1533-1540.

[7] Javidnia S, Talebi M, Saifi M, et al. Clonal dissemination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in patients and the hospital environment[J]. Int J Infect Dis, 2013, 17(9): e691-e695.

[8] Dinges MM, Orwin PM, Schlievert PM. Exotoxins of Staphylococcus aureus[J]. Clin Microbiol Rev, 2000, 13(1): 16-34.

[9] Ramsing BG, Arpi M, Andersen EA, et al. First outbreak with MRSA in a Danish neonatal intensive care unit: risk factors and control procedures[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e66904.

[10] 万小涛, 钟方财, 叶帮芬, 等. 医院与社区获得性耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(19): 2775-2776.

[11] Huang SS, Septimus E, Kleinman K, et al. Targeted versus universal decolonization to prevent ICU infection[J]. N Engl J Med, 2013, 368(24): 2255-2265.

[12] Liu Y, Wang H, Du N, et al. Molecular evidence for spread of two major methicillin-resistant Staphylococcus aureus clones with a unique geographic distribution in Chinese hospitals[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2009, 53(2): 512-518.

[13] Rivoal K, Fablet A, Courtillon C, et al. Detection of listeria ssp. In liquid egg products and in the egg breaking plants environment and tracking of Listeria monocytogenes by PFGE[J]. Int J Food Microbiol, 2013, 166(1): 109-116.

[14] Park SH, Kim SY, Lee JH, et al. Community-genotype strains of methicillin-resistant Staphylococcus aureus with high-level mupirocin resistance in a neonatal intensive care unit[J]. Early Hum Dev, 2013, 89(9): 661-665.

(收稿日期: 2017-04-04 修回日期: 2017-07-24)

• 临床研究 •

广西人群血清铁蛋白与冠心病危险因素的相关性研究*

农乐关¹, 王晓刚², 孔 勇³, 覃 平⁴

(广西桂东人民医院: 1. 输血科; 2. 医疗管理科; 3. 院办; 4. 检验科, 广西梧州 543001)

摘要:目的 探讨化学发光法测定下的血清铁蛋白和对冠心病患病风险的相关性。方法 选取临床确诊的冠心病患者 100 例和健康体检者 100 例, 采用化学发光法测定血清铁蛋白水平。结果 血清铁蛋白水平与冠心病危险因素明显相关($P < 0.05$)。结论 广西人群血清铁蛋白水平与冠心病危险因素有明显相关性, 为临床上更好地诊疗、防治冠心病提供了理论依据。

关键词:冠心病; 血清铁蛋白; 化学发光法; 广西人群

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.22.033 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2017)22-3164-03

铁元素在人体的生命活动发挥重要的作用, 包括有氧气运输、呼吸作用、DNA 修复、细胞分裂等。铁作为重要的微量元素, 在人体代谢中起着重要作用同时也有毒性作用, 可生成超氧化物和羟基^[1]。血清铁蛋白检测已广泛地被应用于临床, 如贫血性疾病、肿瘤等疾病。在正常生理条件下, 血浆中的去铁转铁蛋白可结合铁, 从而限制铁产生有毒的基团。当血浆中的铁超过去铁转铁蛋白的结合能力时会产生游离铁, 形成“铁过载”, 这部分游离铁将沉积在实质组织中, 导致组织代谢障碍^[2]。血清铁蛋白在许多感染性疾病和恶性肿瘤中均有增高^[3]。冠状动脉粥样硬化性心脏病是指冠状动脉粥样硬化使血管腔狭窄或阻塞, 或因冠状动脉功能性改变(痉挛)导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病, 统称冠状动脉性心脏病, 简称冠心病, 亦称缺血性心脏病。根据世界卫生组织 2011 年的报告, 心血管疾病是全球人类死亡的头号杀手, 其中冠心病占了心血管类疾病的 42%。冠心病是一类严重危害人类健康、影响生活质量的常见病, 在我国具有较高发病率和致死率^[4]。本研究探讨广西人群血清铁蛋白与冠心病患病风险因素的相

关性, 旨在为临床提供参考, 现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2016 年本院心血管内科接受冠状动脉造影的住院患者 100 例作为冠心病组。纳入标准: 左主干病变、左前降支病变、左回旋支病变, 以及右冠状动脉病变患者; 广西本地患者。排除标准: 感染、贫血、肝脏疾病、肿瘤患者。同时选取健康体检者 100 例作为对照组。所有研究对象均知情同意并签署知情同意书。

1.2 方法 清晨空腹立位采静脉血 2~3 mL, 采集血液不得溶血、不得混入组织液, 如有不合格标本应重新采集, 采血管为不添加剂的商品真空采血管, 送检立即分离血清, 用贝克曼全自动化学发光仪(型号为 DX1800)检测, 测定前每日维护仪器、做室内质控。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理; 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用配对 t 检验; 计数资料以频数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验; 血清铁蛋白与冠心病危险因素的相关性采用单因素和多因素 Logistic 回归分析; 以

* 基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)项目(2014AA022304)。