

[4] Ozer I, Bostanci EB, Koc U, et al. Surgical treatment for gastric cancer in Turkish patients over age 70; early post-operative results and risk factors for mortality[J]. *Lange-nbecks Arch Surg*, 2010, 395(8): 1101-1106.

[5] 孙秀娣, 李牧人, 周有尚, 等. 中国胃癌死亡率 20 年变化情况及其发展趋势预测[J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 269(1): 4-9.

[6] Moriawaki Y, Kobayaahi S, Kunisaki C, et al. Is D2 lymph-adenectomy in gastrectomy safe with regard to the skill of the operator[J]. *Digest Surg*, 2001, 18(2): 111-117.

[7] Lars-Tue S, Afshin-Malaki L, Wille-Jorgensenl P, et al. Risk factors for mortality and postoperative complications after gastrointestinal surgery[J]. *J Gastrointest Surg*, 2007, 11(7): 903-910.

[8] Hwang S, Park D, Jee Y, et al. Risk factors for operative complications in elderly patients during laparoscopy-assisted gastrectomy[J]. *J Am Coll Surg*, 2009, 208(2): 186-192.

[9] Huang T, Hu F, Fan CW, et al. A simple novel model to predict hospital mortality, surgical site infection, and pneumonia in elderly patients undergoing operation[J]. *Digest Surg*, 2010, 27(3): 224-231.

[10] Franco R, Daniele M, Alfonso S, et al. Complications after surgery for gastric cancer in patients aged 80 years and over[J]. *JPN J Clin Oncol*, 1998, 28(2): 116-122.

[11] 陈磊, 吕文杰, 张文杰, 等. 老年胃癌患者手术风险因素分析[J]. *中华消化杂志*, 2010, 30(9): 502-605.

[12] 陆琪, 李蔚萍, 朱捷, 等. 128 例老年胃癌患者手术风险因素分析[J]. *老年医学与保健*, 2012, 18(4): 232-235.

[13] 权继传, 张汝鹏, 王学军, 等. 435 例老年胃癌根治术后临床病理及预后分析[J]. *中国肿瘤临床*, 2012, 39(17): 1299-1304.

[14] 池肇春. *实用临床胃肠病学*[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2001: 344-346.

(收稿日期: 2017-01-17 修回日期: 2017-02-25)

• 临床探讨 •

91 株金黄色葡萄球菌毒力基因和耐药基因分布研究

王冬梅, 刘传桂, 梁晓静, 欧阳德宏
(广东省佛山市顺德区均安医院检验科 528329)

摘要:目的 探讨 91 株金黄色葡萄球菌菌株的毒力基因和耐药基因分布。方法 采用 PCR 方法检测金黄色葡萄球菌 30 个毒力基因和 13 个耐药基因。结果 毒力基因除肠毒素基因 see 和 sep, 其他 28 个均可在 91 株金黄色葡萄球菌菌株中检测到, 且某些毒力基因如溶血素基因 hla、hld、hlg-v 和杀白细胞毒素基因 lukED 的阳性率较高(>80%); 耐药基因除氨基糖苷类耐药基因 ant4', 其他 12 个均可在 91 株金黄色葡萄球菌菌株中检测到, 特别是青霉素耐药基因 blaZ, 阳性率达 100%。结论 金黄色葡萄球菌流行株均携带多个毒力基因和耐药基因。

关键词:金黄色葡萄球菌; 毒力基因; 耐药基因

DOI: 10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2017. 14. 054 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2017)14-2143-04

金黄色葡萄球菌是一种侵袭性细菌, 广泛地存在于自然界, 能产生多种毒素, 引起皮肤、软组织感染, 关节、骨感染, 心内膜炎、败血症及中毒性休克。自首次发现耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)后, 耐药金黄色葡萄球菌便迅速成为医院感染的主要致病菌, 并在全球扩散^[1]。监测数据显示耐药金黄色葡萄球菌在我国也是引起院内感染的主要致病菌, 是临床分离率最高的革兰阳性细菌, 多篇文献[2-4]报道耐药金黄色葡萄球菌引起院内感染。对耐药金黄色葡萄球菌进行毒力基因和耐药基因的检测, 可进一步了解耐药金黄色葡萄球菌的流行特点和耐药机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集该院近年来从临床标本中分离的金黄色葡萄球菌 91 株, 其中痰标本 33 株, 伤口分泌物 25 株, 穿刺液 13 株, 血液 11 株, 尿液 9 株。

1.2 菌株鉴定及药敏试验 菌株的形态学鉴定使用革兰染色镜检观察, 菌株的生化鉴定和药敏试验均使用梅里埃 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统。

1.3 DNA 提取 将金黄色葡萄球菌菌株接种至血平板过夜培养, 挑取菌落于 100 μ L 裂解液中制成菌悬液。将其置于干式恒温器上 100 $^{\circ}$ C 加热 10 min, 然后冰浴 5 min, 12 000 r/min

离心 10 min, 取上清液作为 PCR 扩增模板。

1.4 毒力基因检测 溶血素基因(hla、hlb、hld、hlg、hlg-v), 肠毒素基因(sea、seb、sec、sed、see、seg、seh、sei、sej、sek、sel、sem、sen、seo、sep、seq、ser、seu), 杀白细胞毒素基因(lukM、lukED、lukPV), 表皮剥脱素基因(eta、etb、etd)、中毒性休克综合征毒素基因(tsst)的引物序列参照文献[5]合成。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。同时设阳性对照和阴性对照, 阳性对照为工人合成的目标基因 DNA 片段, 阴性对照为蒸馏水。

1.4 耐药基因检测 青霉素耐药基因(blaZ)、克林霉素耐药基因(linA)、四环素耐药基因(tetK、tetL、tetM)、氨基糖苷类耐药基因(acc6'/aph2'、aph3'-III、ant4')、大环内酯类耐药基因(ermA、ermB、ermC、msrA、msrB)的引物序列参照文献[5]合成。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。同时设置阳性对照和阴性对照, 阳性对照为工人合成的目标基因 DNA 片段, 阴性对照为蒸馏水。

1.5 扩增产物电泳分析 取 5 μ L PCR 扩增产物, 与上样缓冲液混合, 点样在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 电压 5 V/cm。电泳

完毕后经 EB 染色,凝胶成像仪观察结果并拍照。

2 结 果

2.1 金黄色葡萄球菌的耐药性 91 株金黄色葡萄球菌对青霉素、红霉素、四环素、庆大霉素、克林霉素的耐药率较高,分别为 91.21%、54.95%、49.45%、39.56%、42.86%;而对替考拉宁、万古霉素、奎奴普丁/达福普丁较为敏感,仅 1 株金黄色葡萄球菌对奎奴普丁/达福普丁耐药。见表 1。

表 1 91 株金黄色葡萄球菌的耐药性		
抗菌药物	耐药菌株数(<i>n</i>)	耐药率(%)
青霉素	83	91.21
四环素	45	49.45
红霉素	50	54.95
利福平	10	10.99
左氧氟沙星	25	27.47
庆大霉素	36	39.56
克林霉素	39	42.86
替考拉宁	0	0.00
诺氟沙星	23	25.27
万古霉素	0	0.00
奎奴普丁/达福普丁	1	1.10

2.2 毒力基因检测结果 溶血素基因的阳性率较高,检测到 3 个及以上溶血素基因, hla 和 hld 在所有菌株中均检测到。肠毒素基因 sea、seb、seg、sei、sek、seq 和杀白细胞毒素基因 lukED 阳性率也较高,30% 以上的菌株中均可检测到,肠毒素基因 sec、sed、seh、sej、sel、sem、sen、seo、sep、ser 和表皮剥脱素基因 eta、etb、etd 阳性率较低(<10%),肠毒素基因 see、sep 未检测到。见表 2 和图 1。

表 2 91 株金黄色葡萄球菌毒力基因检测结果		
毒力基因	菌株数(<i>n</i>)	阳性率(%)
hla	91	100.00
hlb	62	68.13
hld	91	100.00
hlg	12	13.19
hlg-v	80	87.91
sea	30	32.97
seb	39	42.86
sec	6	6.59
sed	7	7.69
see	0	0.00
seg	41	45.05
seh	5	5.49
sei	35	38.46
sej	3	3.30
sek	28	30.77
sel	9	9.89
sem	2	2.20
sen	11	12.09
seo	7	7.69
sep	0	0.00
seq	30	32.97
ser	3	3.30
seu	27	29.67
lukM	12	13.19
lukED	80	87.91
lukPV	9	9.89

续表 2 91 株金黄色葡萄球菌毒力基因检测结果		
毒力基因	菌株数(<i>n</i>)	阳性率(%)
eta	5	5.49
etb	3	3.30
etd	2	2.20
tsst	9	9.89

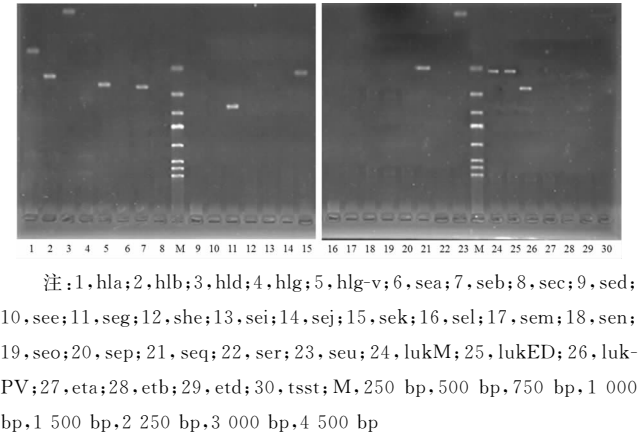


图 1 金黄色葡萄球菌毒力基因检测

表 3 91 株金黄色葡萄球菌耐药基因检测结果		
耐药基因	菌株数(<i>n</i>)	阳性率(%)
blaZ	91	100.00
linA	5	5.49
tetK	17	18.68
tetL	8	8.79
tetM	41	45.05
acc6'/aph2'	39	42.86
aph3'-Ⅲ	37	40.66
ant4'	0	0.00
ermA	43	47.25
ermB	22	24.18
ermC	25	27.47
msrA	6	6.59
msrB	20	21.98

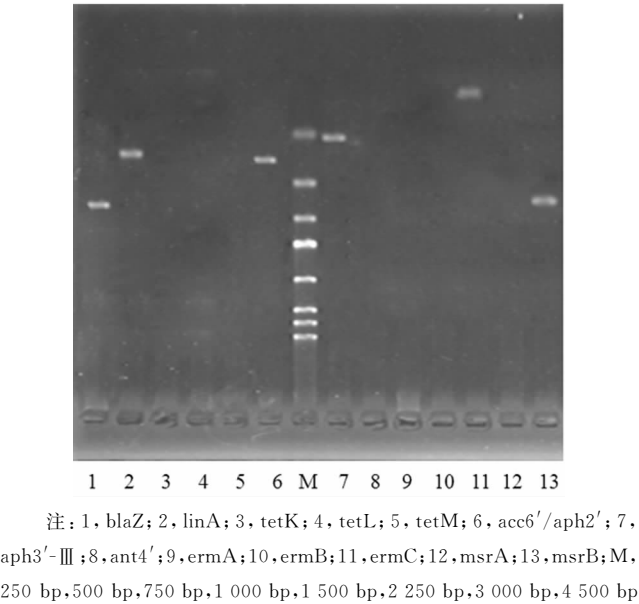


图 2 金黄色葡萄球菌耐药基因检测

2.3 耐药基因检测结果 青霉素耐药基因 blaZ 的阳性率最高,在所有菌株中均检测到。四环素耐药基因 tetM;氨基糖苷类耐药基因 acc6'/aph2'/aph3'-III;大环内酯类耐药基因 ermA 阳性率也较高,在 40%以上的菌株中可检测到。克林霉素耐药基因 linA、四环素耐药基因 tetL、大环内酯类耐药基因 msrA 阳性率较低(<10%)。氨基糖苷类耐药基因 ant4' 未在任何菌株中检测到。见表 3 和图 2。

3 讨 论

金黄色葡萄球菌引起的感染已经仅次于大肠杆菌,位居第 2 位,感染后未及时得到有效的治疗易导致败血症,甚至危及生命^[6]。金黄色葡萄球菌致病力强,是因其携带多个毒力基因,而感染后是否能得到有效治疗与其耐药性及耐药基因的携带密切相关。

目前研究显示与金黄色葡萄球菌致病性密切相关的毒力基因主要有溶血素基因、肠毒素基因、杀白细胞毒素基因、表皮剥脱素基因、中毒性休克综合征毒素基因。溶血素基因编码的溶血素能插入宿主细胞膜的疏水区形成小孔,破坏细胞膜的完整性,造成细胞内液外流而使细胞裂解。溶血素可作用于平滑肌的血管壁细胞,引起平滑肌收缩,导致平滑肌坏死,还能特异性地裂解细胞膜上的鞘磷脂,使细胞膜渗漏致使细胞溶解^[7]。肠毒素基因编码的肠毒素是一组毒力相似、结构相关,但抗原性不同的胞外蛋白质,可与肠道神经细胞受体作用刺激呕吐中枢导致以呕吐为主要症状的急性肠胃炎^[8]。杀白细胞毒素基因编码的杀白细胞毒素,可在线粒体外膜上建立孔道,破坏线粒体的内环境,激活 caspase-3 和 caspase-9,诱导免疫细胞凋亡^[9]。表皮剥脱毒素基因编码的表皮剥脱毒素,可导致角质细胞分离而引起烫伤样皮肤综合征^[10]。中毒性休克综合征毒素基因编码的中毒性休克综合征毒素,可使淋巴细胞活化、增殖,进而释放大炎症因子,引起机体多个器官系统的功能紊乱或损伤^[11]。本研究对 91 株金黄色葡萄球菌进行毒力基因检测,结果显示均可检测到多个毒力基因,特别是溶血素基因 hla 和 hld,在所有菌株中均可检测到,溶血素基因(hlb、hlg、hlg-v)、肠毒素基因(seb、seg、sei、sek、seq)、杀白细胞毒素基因(lukED)的阳性率也较高,与虞亦鸣等^[12]和童俊等^[13]研究结果基本一致,表明目前我国医院感染的金黄色葡萄球菌流行株均携带多个毒力基因,致病力强。

本研究结果表明,青霉素耐药基因 blaZ,四环素耐药基因 tetM,氨基糖苷类耐药基因 acc6'/aph2'/aph3'-III,大环内酯类耐药基因 ermA 阳性率较高,特别是青霉素耐药基因 blaZ,在所有菌株中均阳性,与李英^[14]和杨雅芸等^[15]研究结果基本一致,也与耐药性检测的结果基本对应,耐药基因检测结果青霉素耐药基因 blaZ 阳性率最高,耐药性检测也显示青霉素的耐药率最高。虽然前期对金黄色葡萄球菌耐药性研究大多检测其对克林霉素的耐药性^[16-18],但是对克林霉素耐药基因检测的研究甚少。本研究检测了克林霉素耐药基因 linA,阳性率为 5.49%,远低于克林霉素的耐药率(42.86%),Argudin 等研究也发现了类似现象,且 linA 基因阴性的克林霉素耐药菌株常携带 ermB 基因,表明金黄色葡萄球菌耐药基因的携带虽然与菌株的耐药性基本对应,但并非简单的一一对应,某些情况下金黄色葡萄球菌的耐药性可能是多个基因联合作用的结果。

参考文献

[1] Stefani S, Chung DR, Lindsay JA, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): global epidemiology

and harmonisation of typing methods[J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2012, 39(4): 273-282.

[2] 代晓明, 时坤, 吴向东, 等. 腹腔感染病原菌分布与细菌耐药性监测研究(附 310 例报告)[J]. *中国实用外科杂志*, 2016, 36(2): 196-201.

[3] 崔黎红, 郑志辉, 郎丹丹, 等. 新生儿医院感染细菌分布及耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(7): 1660-1662.

[4] 于学斌, 彭跃进, 史帅涛. 糖尿病足患者金黄色葡萄球菌感染的临床特点与耐药性分析[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(16): 3664-3666.

[5] Argudin MA, Tenhagen BA, Fetsch A, et al. Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(9): 3052-3060.

[6] Vergnano S, Menon E, Smith Z, et al. Characteristics of Invasive *Staphylococcus aureus* in United Kingdom neonatal units[J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2011, 30(10): 850-854.

[7] Doery HM, Magnusson BJ, Gulasekharan J, et al. The properties of phospholipase enzymes in staphylococcal toxins[J]. *J Gen Microbiol*, 1965, 40(2): 283-296.

[8] Varshney AK, Mediavilla JR, Robiou N, et al. Diverse enterotoxin gene profiles among clonal complexes of *Staphylococcus aureus* isolates from the Bronx, New York[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(21): 6839-6849.

[9] Reyes-Robles T, Alonzo F, Kozhaya L, et al. *Staphylococcus aureus* leukotoxin ED targets the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 to kill leukocytes and promote infection[J]. *Cell Host Microbe*, 2013, 14(4): 453-459.

[10] Rolle CE, Chen J, Pastar I, et al. Keratinocytes produce IL-6 in response to desmoglein 1 cleavage by *Staphylococcus aureus* exfoliative toxin A[J]. *Immunol Res*, 2013, 57(1-3): 258-267.

[11] 马丁, 艾路, 王笑, 等. 金黄色葡萄球菌中毒性休克毒素-1 的临床研究进展[J/CD]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(5): 2206-2208.

[12] 虞亦鸣, 马红映, 王翎, 等. 金黄色葡萄球菌血液分离株毒力与耐药编码基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2015, 25(19): 4332-4335.

[13] 童俊, 占志平. 金黄色葡萄球菌毒力基因检测及分子分型研究[J]. *中华微生物学和免疫学杂志*, 2015, 35(1): 46-50.

[14] 李英. 儿科患者院内感染金黄色葡萄球菌耐药基因检测及耐药情况分析[J]. *中国病原生物学杂志*, 2016, 11(1): 82-86.

[15] 杨雅芸, 许小敏, 范友芬, 等. 烧伤患者分离金黄色葡萄球菌耐药性与耐药基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2016, 26(3): 516-518.

[16] 徐奋奋, 徐景野, 黄亚琴, 等. 89 株不同来源金黄色葡萄球菌耐药及肠毒素基因分析[J]. *中国卫生检验杂志*, 2016, 26(7): 1054-1056.

[17] 张渝, 高向阳. 2013—2014 年我院临床分离 518 株金黄色葡萄球菌耐药分析[J]. *中国实用医药*, 2015, 10(33):

175-177.

975-976.

[18] 王凤玲,代荣琴,刘玉枝,等. 2006—2011 年金黄色葡萄球菌耐药情况分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(8): (收稿日期:2017-01-19 修回日期:2017-02-27)

• 临床探讨 •

胸腺肽和抗菌药物联合治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重患者的临床研究

余汉霞¹, 蔡德栋²

(湖北省十堰市东风公司茅箭医院:1. 大内科;2. 眼科 442012)

摘要:目的 探讨联合应用胸腺肽、抗菌药物治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重(AECOPD)的疗效及安全性。方法 采用分层随机分组法将 88 例 AECOPD 患者分为对照组和研究组,各 44 例。对照组采用抗菌药物治疗,研究组使用胸腺肽+抗菌药物治疗,2 组患者均以 2 周为 1 个疗程。比较 2 组患者的外周血免疫功能、血气指标、临床疗效及不良反应情况。结果 治疗前,2 组患者外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平变化比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。治疗后,2 组患者外周血免疫细胞水平与治疗前比较,差异有统计学意义(均 $P<0.05$),但研究组改善水平显著高于对照组($P<0.05$);2 组患者的血气指标最大肺活量(VC)、1 秒钟用力呼气量(FEV1)、PaO₂、PaCO₂ 均显著优于治疗前(均 $P<0.05$),且研究组改善水平较对照组更优($P<0.05$)。研究组无效患者 2 例,有效率 95.5%,对照组无效患者 6 例,有效率 86.4%,差异有统计学意义($P<0.05$);2 组患者均未出现严重的不良反应,差异无统计学意义($\chi^2=5.361, P>0.05$)。结论 AECOPD 患者应用胸腺肽、抗菌药物治疗具有较好的疗效,且能显著提高患者机体免疫功能、改善血气指标,且无明显不良反应,安全性良好,值得临床推广和应用。

关键词:胸腺肽; 抗菌药物; 免疫功能; 安全性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.055 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2017)14-2146-03

慢性阻塞性肺疾病(COPD)是一种常见的呼吸系统疾病,以中老年人居多。COPD 急性加重期(AECOPD)是导致患者病死的主要原因,其发生多与机体慢性缺氧、细菌感染及机体免疫功能下降等因素有关^[1]。50%~70%的急性加重由细菌感染引起,主要为流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、肺炎链球菌等,因此抗菌药物治疗已成为该病的常见必要手段^[2]。胸腺肽是一种免疫调节药物,能促使 T 淋巴细胞成熟,具有调节和增强人体细胞免疫功能的作用,近年来研究显示其治疗 AECOPD 中具有一定的临床价值^[3]。现探讨胸腺肽与抗菌药物联合应用治疗 AECOPD 的疗效及安全性,报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2014 年 3 月至 2015 年 10 月该院呼吸内科进行治疗的 88 例 AECOPD 患者,均符合中华医学会制定的相关标准(2007 版)^[4]。临床多表现气急,同时伴有喘鸣和胸部紧迫感,咳嗽、咳痰增多,痰转为脓性或黄绿色,黏稠,不易咳出。纳入标准:(1)未接受过有创或无创机械通气治疗。(3)近期(<1 个月)无糖皮质激素、胸腺肽等免疫制剂治疗史。(3)无肺心病、严重肝肾疾病、内分泌及全身性疾病。(4)经该院伦理委员会批准,患者知情并签署知情协议书。排除标准:(1)严重内脏(心、肝、肾)功能不全者。(2)高血压、糖尿病、恶性肿瘤等。(3)精神疾病、意识障碍及不愿配合研究者。(4)胸腺肽不耐受者。采用分层随机分组法将患者分为对照组和研究组,各 44 例。2 组患者的年龄、性别等一般资料比较,差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。见表 1。

1.2 方法 2 组患者均进行基础治疗:取舒适卧位,可采取半坐卧位或半卧位,头部垫高,床头抬高。评估病情严重程度,给予持续低流量氧疗、应用支气管舒张剂(β_2 受体激动剂、茶碱类药物等)、机械通气支持、纠正水电解质酸碱失衡、营养支持等治疗。对照组患者根据以往病原菌或所在地常见病原菌类型、耐药流行趋势及痰培养药敏试验,选择合理的抗菌药物进行治疗。研究组在对照组的基础上静脉注射胸腺肽(内蒙古白

医制药股份有限公司,国药准字 H20023389,规格 10 mL:60 mg)进行治疗,剂量为 60 毫克/支 $\times$ 2,120 mg/d。1 个疗程(2 周)后,对 2 组患者的临床治疗效果进行比较。

表 1 2 组患者一般资料结果比较			
项目	对照组($n=44$)	研究组($n=44$)	P
性别(n/n ,男/女)	28/16	29/15	>0.05
年龄($\bar{x}\pm s$,年)	65.3 $\pm$ 6.4	65.5 $\pm$ 6.8	>0.05
文化程度(n)			>0.05
高中以下	20	21	
专科及以上	24	23	
病程($\bar{x}\pm s$,年)	12.7 $\pm$ 3.5	12.6 $\pm$ 3.6	>0.05
病情分级(n)			>0.05
Ⅱ级	20	19	
Ⅲ级	16	18	
Ⅳ级	8	7	

1.3 观察指标及疗效判定 (1)免疫功能:于治疗前后清晨空腹抽取患者静脉血,采用酶联免疫吸附法检测 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺。(2)肺功能:包括最大肺活量(VC)、1 秒钟用力呼气量(FEV1)。(3)不良反应:治疗过程中注意有无不良反应(过敏、胃肠道反应、皮疹等)。(4)参考文献[5]:疗效可分为治愈、显效、有效、无效;有效率=1-无效率。

1.4 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,使用 χ^2 检验,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2 组患者治疗前后外周血免疫细胞水平结果比较 治疗前,2 组患者外周血 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺/CD8⁺ 水平变化比较,差异无统计学意义($P>0.05$);治疗后,2 组患者外周血免疫细