

• 临床检验研究论著 •

604 例眼球贯通伤患者眼内取材标本病原菌分布及药敏试验结果分析

卓卫¹△, 徐和平¹, 杨兰翎², 伍端晓³, 马晓波¹

(厦门大学附属: 1. 第一医院检验科; 2. 眼科中心检验科; 3. 眼科中心眼外伤科 361001)

摘要:目的 分析眼球贯通伤患者眼内病原菌分布及其对药物敏感性的特点, 为临床用药提供依据。方法 采集 604 例眼球贯通伤患者前房液或玻璃体切割液进行病原菌培养和药敏试验并对结果进行分析。结果 604 例标本中分离病原菌 155 例, 检出率为 25.7%。其中葡萄球菌属 72 株(46.5%), 肠杆菌科 22 株(14.2%), 非发酵菌 14 株(9.0%), 革兰阳性需氧杆菌 15 株(9.7%), 真菌 12 株(7.7%), 其他菌 20 株(12.9%), 葡萄球菌属最为常见。革兰阳性菌敏感率较高的药物为万古霉素, 革兰阴性杆菌敏感率较高的药物为亚胺培南、头孢哌酮。结论 对眼球贯通伤患者前房液或玻璃体切割液进行病原菌种类和药物敏感性变化的监测有助于指导临床用药, 预防感染性眼内炎的发生。目前万古霉素、亚胺培南和头孢哌酮是最有效的抗菌药物。

关键词:眼损伤, 穿透性; 病原; 微生物敏感性试验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2012.09.011

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2012)09-1049-02

Distribution and drug resistance of pathogenic bacteria in aqueous or vitreous specimens of 604 patients with perforating injury of eyeball

Zhuo Wei¹△, Xu Heping¹, Yang Lanling², Wu Duanxiao³, Ma Xiaobo¹

(1. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital; 2. Department of Clinical Laboratory, Eye Center Affiliated Hospital; 3. Department of Clinical Ocular Trauma, Eye Center Affiliated Hospital, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361001, China)

Abstract: Objective To study the distribution and drug-resistance of pathogenic bacteria in aqueous or vitreous specimens from patients with perforating injury of eyeball, to provide clinical options for effective antibiotics. **Methods** Anterior chamber fluid or fluid of vitrectomy from 604 patients with perforating injury of eyeball were detected for pathogenic bacteria culture and drug sensitivity tests. **Results** In 604 cases of specimens, 155 pathogens were isolated, with a total detection rate of 25.7%, and with 72 strains(46.5%) of Staphylococcus, 22 strains(14.2%) of Enterobacteriaceae, 14 strains(9.0%) of non-fermenting bacteria, 15 strains(9.7%) of Gram-positive aerobic bacteria, 12 strains(7.7%) of fungi and 20 strains(12.9%) of other bacteria. Gram-positive were highly resistant to vancomycin, and Gram-negative bacteria were highly resistant to Imipenem and Cefoperazone. **Conclusion** It might be necessary to monitor changes in species distribution and drug susceptibility for effective treatment of perforating injury of eyeball and prevention of endophthalmitis. Vancomycin, Cefoperazone and Imipenem could be the most effective antimicrobial agents.

Key words: eye injuries, penetrating; noxae; microbial sensitivity tests

眼球是位于人体最暴露部位的器官,也是人体组织最精密、最脆弱的器官,因此,很容易受伤,而且受伤后变化最大,预后最复杂^[1-2]。眼球贯通伤是眼科常见的一种严重损害视功能和眼球结构的眼部损伤疾病,是致盲的主要原因之一,早期正确处理有助于减少致盲率和并发症发生率。有研究认为病原菌培养, B超、CT 等辅助检查的应用,及时给予药物及显微手术治疗是决定最终治疗效果的关键。近年来随着玻璃体手术的发展,有针对性的对眼球贯通伤患者进行眼内取材进行病原菌培养,以了解其分布类型并对其常见病原菌进行耐药性分析,以指导临床采取更有效措施,对预防感染性眼内炎的发生有重要意义。现将 604 例眼球贯通伤患者分离的 155 株病原菌分布及药敏试验结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 选择 2005~2010 年厦门市两家医院眼外伤科眼球贯通伤住院患者(眼外伤一、二期手术患者)604 例,其中男 465 例,女 139 例;年龄 7~69 岁,平均 29 岁。

1.2 标本采集 所有标本均在未使用抗菌药物前,在手术时或治疗时用玻璃体切割器械或一次性注射器采集玻璃体液或前房液,于无菌试管中立即送检。

1.3 微生物培养

1.3.1 培养方法 所有标本均进行常规涂片,以及细菌、真菌培养,11 例疑似厌氧菌感染者进行厌氧培养。

1.3.2 培养基及试剂 血平板为郑州安图生物技术股份有限公司产品,细菌鉴定和药敏试验分别采用美国 BD 公司 CRYSTAL 微生物分析仪及其配套试剂或法国生物梅里埃公司 ATB Haemo 药敏试验试剂条;用于 β-内酰胺酶检测的头孢哌啶吩纸片为 Oxoid 公司产品;真菌用沙保弱培养基,部分用科玛嘉念珠菌显色琼脂。

1.3.3 仪器及设备 细菌培养采用日本 SANYO 公司 MCO-15A 型二氧化碳孵箱及美国 BD 公司 CRYSTAL 微生物分析仪。

1.3.4 质控菌株 大肠埃希菌 ATC25922、铜绿假单胞菌 ATCC27853、金黄色葡萄球菌 ATCC25923 均由卫生部临床检验中心提供。

1.4 药敏试验 采用 K-B 法,结果根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI)/美国国家临床实验室标准化委员会(NCCLS)2004~2010 年^[3]标准判读。药敏试验纸片由杭州天和生物制品所提供。真菌药敏试验参照美国 CLSI/NCCLS M27A 真菌药敏试验标准。

1.5 数据处理 细菌耐药性分析采用 WHONET5.4 软件。

△ 通讯作者, Tel:13606078563; E-mail: w. zhuo@qq. com.

2 结 果

2.1 病原菌培养结果 604 例标本的培养阳性率为 25.7% (155 例, 包括 1 株厌氧菌), 2005~2010 年各年度培养阳性率分别为 21.9%、25.8%、30.1%、24.3%、25.5%、26.2%。分离菌中葡萄球菌属、肠杆菌科、非发酵菌、革兰阳性需氧杆菌、真菌、其他菌分别占 46.5% (72 株)、14.2% (22 株)、9.0% (14 株)、9.7% (15 株)、7.7% (12 株)、12.9% (20 株), 以葡萄球菌属最为常见。其中凝固酶阴性葡萄球菌 63 株 (40.6%), 大肠埃希菌 12 株 (7.7%), 金黄色葡萄球菌 9 株 (5.8%), 链球菌属 9 株 (5.8%), 变形杆菌 9 株 (5.8%), 枯草杆菌 8 株 (5.3%), 不动杆菌 7 株 (4.5%), 铜绿假单胞菌 6 株 (3.87%)。

2.2 药敏试验结果 大肠埃希菌、变形杆菌、铜绿假单胞菌对亚胺培南、头孢哌酮较敏感, 敏感率大于 80%; 铜绿假单胞菌、不动杆菌对环丙沙星、左氧氟沙星敏感性较低; 大肠埃希菌对环丙沙星、妥布霉素敏感性较低。凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、链球菌属、枯草杆菌对万古霉素高度敏感, 敏感率为 100%; 凝固酶阴性葡萄球菌、金黄色葡萄球菌对环丙沙星敏感率较低。凝固酶阴性葡萄球菌中耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌 (MRCNS) 分离率呈逐年上升趋势, 2005~2010 年 MRCNS 分离率见图 1。

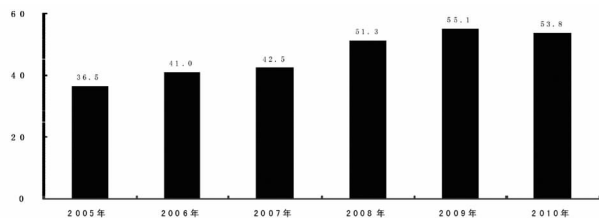


图 1 MRCNS 不同年份检出率 (%)

3 讨 论

眼球穿通伤后受伤眼最容易出现感染性眼内炎, 眼球穿通伤清创术后, 在以前虽然全身应用广谱抗生素, 但时有眼内炎的发生, 原因多与穿孔伤本身创口感染, 晶体损伤, 眼内异物存留时间过长, 清创缝合时间过晚, 未及时使用抗炎、抗感染的敏感药物等因素有关^[4]。眼球穿通伤不同于一般的外科创伤, 其致残、致盲的危险性极大。现在随着玻璃体手术的发展, 眼内取材进行病原菌培养以了解其分布和特性, 为预防性玻璃体腔注射敏感抗菌药物治疗提供了可靠的依据。对其致病微生物的研究有助于感染性眼内炎的预防和控制。本研究中眼球穿通伤后病原菌检出率高达 25.7% (155/604), 并且有不少病原菌为多药耐药菌株, 表明眼球穿通伤后抽取眼内容物进行病原菌培养十分必要, 并且应在用药前及早手术采集标本对指导临床治疗更有意义。

本研究结果显示, 病原菌的分布以革兰阳性菌特别是葡萄球菌多见。而以往报道非致病的枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌和大肠埃希菌均成为引起眼内感染的致病菌, 与汪振芳和肖斯贤^[5]研究结果比较接近, 可能与本研究收集的病例主要为外伤引起有关, 尤其是蜡样芽胞杆菌、枯草杆菌和产气荚膜梭菌, 因其发病快, 常引起剧烈眼炎, 现已成为主要致病菌之一。

细菌耐药性具有时间性和地域特征, 不同时期、不同地区, 甚至同一医院的不同时期和不同病区分离的同种细菌, 其标本来源和耐药性也不相同。有研究表明临床分离的葡萄球菌主要来自眼球标本, 本研究 MRCNS 平均分离率为 46.7%, 比李家泰等^[6]报道的 MRCNS 分离率偏低, 可能是大部分眼外伤患者都是结膜囊细菌异位感染或社区获得性感染而非医院内感染所致。表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌等凝固酶阴性葡萄球

菌原被认为是条件致病菌, 现已成为外伤性眼感染的主要致病菌, 且 MRCNS 检出率有逐年增加的趋势。关于 MRCNS 的致病机制可能与其产生黏质有关^[7]。MRCNS 的耐药率及多重耐药率较高, 多与耐药质粒有关, 耐药质粒可通过转化、转导等方式进行耐药性转移, 也与某些抗生素长期广泛使用有关。有研究表明表皮葡萄球菌对甲氧西林的耐药性较金黄色葡萄球菌更普遍^[8-9], 耐药率应引起临床医师的足够重视, 应加强抗菌药物的合理使用, 并根据药敏试验结果选择用药, 并提醒临床应加强高级别抗菌药物如万古霉素、亚胺培南的使用, 延缓耐药菌株的发生。

有流性病学研究表明 39.8% 真菌性角膜炎有明确的外伤史^[10], 特别是穿通性外伤。一旦丝状真菌侵入角膜形成真菌性角膜炎在治疗上是一个十分棘手的问题, 国内外尚缺乏对真菌性角膜炎强有效的、广谱的抗真菌药物。本研究中病原性真菌检出率为 2.0% (12/604), 主要是假丝酵母菌和丝状真菌。4 株假丝酵母菌对 5 种常用抗真菌药物 (两性霉素 B、氟康唑、伊曲康唑、伏立康唑和 5-氟胞嘧啶) 大部分都敏感。丝状真菌的菌属鉴定结果为曲霉属 6 例, 镰刀菌属 1 例, 毛霉菌属 1 例, 由于丝状真菌的药敏试验影响因素较多, 特别是接种物制备较难标准化, 至今还没有一个可参考的判读标准^[11], 且对生物安全的要求较高, 故本研究对丝状真菌未进行药敏试验。有研究表明丝状真菌同一菌属表现出不同的生长方式, 同一菌属的不同菌种在眼球的同一部位也可能表现为不同的生长方式^[12], 因此, 作者认为通过真菌培养、菌属分型诊断对临床诊断和疗效更有参考价值。但要真正从菌属分型诊断、药敏试验标准化、强有效的抗真菌药的筛选及耐药性的监测上去寻找丝状真菌眼内感染的特性和新疗效还有待进一步研究。虽然真菌分离培养和菌型鉴定在现阶段还是真菌感染诊断的“金标准”^[11], 但由于病原微生物的表型变化总是落后于基因型的变化, 随着分子诊断水平的进一步深入, 传统的分型方法将会逐渐被分子分型方法所取代, DNA 测序分型将有望在临床得到广泛应用^[13]。作者认为眼内取材进行真菌培养耗时较长, 平均需 1~4 周, 一旦延误治疗, 因眼球的特殊结构, 病情将不可逆转, 因此, 应用实时 PCR 检测等分子诊断方法缩短检测和报告时间, 快速、准确地为临床医生提供检测结果显得十分必要。总之, 眼球穿通伤是感染性眼内炎的最主要原因, 故完善相关病原学检查以做到早期诊断, 及时处理, 动态掌握病原菌的构成特点及耐药性变化, 特别是指导术中和术后抗菌药物的使用, 对预防感染性眼内炎的发生、减少医源性感染意义重大。

参 考 文 献:

- [1] 李凤鸣. 中华眼科学: 下册 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 3076-3080.
- [2] 刘嫣, 丁慰祖. 眼外伤的临床及实验研究概况 [J]. 临床眼科杂志, 2007, 15(6): 570-572.
- [3] Clinical Laboratory standards Institute (CLSI). M100-S20 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 14-20 th informational supplement [S]. Dennysylvania: CLSI, 2004-2010.
- [4] 罗兴中, 杨爱维, 谢世华, 等. 眼球穿孔伤发生眼内炎的危险因素探讨 [J]. 眼外伤职业眼病杂志, 2001, 23(5): 488-489.
- [5] 汪振芳, 肖斯贤. 169 例外伤感染性眼内炎发病细菌和抗生素敏感分析 [J]. 中国病理杂志, 1998, 14(5): 511.
- [6] 李家泰, 李耘, 王进. 中国医院和社区获得性感染革兰阳性球菌耐药性监测研究 [J]. 中华医学杂志, 2003, 83(5): 365-374.
- [7] 贾文祥. 医学微生物学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 109-110.
- [8] 马越, 李学云, 姚蕾, 等. 内、外、儿科、重症监护 (下转第 1052 页)

1.3.4 RT-PCR 检测 SCAMP2 mRNA 表达 以 RNA 为模板,利用大连宝生物公司逆转录反应试剂盒进行 RT-PCR 反应。反应条件为 50 °C 30 min, 94 °C 2 min, 然后 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 2 min, 30 个循环。RT-PCR 反应完成后取 3 μL RT-PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中于 80 V 恒压电泳 30 min, 紫外透射仪观察并拍照。图片经图像分析软件 Band Scan 进行光密度值扫描分析, 计算各泳道 SCAMP2 与内参照 β-actin 光密度之比作为 SCAMP2 相对含量值。

1.3.5 Western blot 检测 SCAMP2 蛋白表达 取单个核细胞 (1×10⁶) 裂解后以 Bradford 法测定蛋白浓度, BSA 为标准品; 每个标本取 50 μg 蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将蛋白电转至 PVDF 上, ECL 法显色。

1.4 统计学处理 采用 SPSS15.0 统计软件进行分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验, 检验水准: α=0.05。

2 结 果

2.1 外周血单个核细胞 SCAMP2 mRNA 表达 AS 组 SCAMP2 和 β-actin 的光密度值分别为 0.276 6±0.082 9、0.573 1±0.183 2; 对照组分别为 0.462 4±0.134 1、0.598 2±0.209 3。AS 组 SCAMP2 mRNA 表达量显著高于对照组, 差异有统计学意义 (*P*<0.05)。

2.2 外周血单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达 AS 组单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达比对照组明显升高, 差异有统计学意义 (*P*<0.05), 见图 1。

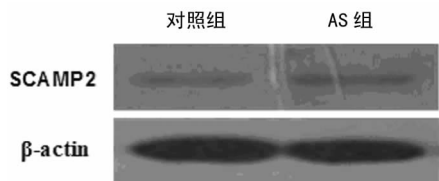


图 1 外周血单个核细胞 SCAMP2 蛋白表达

3 讨 论

SCAMP2 是由 SCAMP2 基因编码的一种蛋白, 是 SCAMP 蛋白家族主要成员之一, 在进化过程中相对保守, 其分布于胞内具有循环作用的细胞器的膜及分泌囊泡中、高尔基体及胞膜等, 主要功能是在后期高尔基体转运途径中作为携带者将细胞内物质运送到细胞表面, 主要包括分选、囊泡转运体的形成及胞吞/胞吐作用等^[6-7]。

人类 SCAMP2 基因定位于 15q23-q25 染色体上, 编码的蛋白与其他囊泡转运膜蛋白一样形成复合体, SCAMP 包括同源多聚体^[8]。SCAMPs 广泛存在于跨膜结构的整合蛋白中如胞内具有循环作用的细胞器的膜及分泌囊泡等, 因此, 其参与了细胞内囊泡转运过程^[9]。基因敲除 SCAMP2 会阻止起始阶段的囊泡转运途径^[10], 从而严重影响囊泡转运体的转运活性, 细胞功能会受到严重损害^[11-12]。本研究采用 RT-PCR 和 Western blot 比较 AS 患者和健康者外周血单个核细胞 SCAMP2 mRNA 表达水平的差异, 发现 AS 患者 SCAMP2 mRNA 和蛋白水平均明显升高 (*P*<0.05), 表明 SCAMP2 可能参与了 AS 发病机制。结合本研究结果, 作者认为 AS 患者

外周血单个核细胞 SCAMP2 基因表达增高, 是由于患者血液中胆固醇含量升高所产生的代偿反应, 而 SCAMP2 基因表达高、低可能是 AS 发病机制的重要环节之一。

总之, 本研究结果提示, SCAMP2 参与了 AS 的发生以及发展, 可能是 AS 潜在的预防或治疗靶点, 深入研究 SCAMP2 会为 AS 的预防和治疗提供新的思路。

参考文献:

- [1] 张艳波, 王军. 端粒、端粒保护蛋白与动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(10): 1078-1081.
- [2] 林伟华, 何艳, 黄秀红, 等. 凝血纤溶系统标志物动态变化在冠状动脉粥样硬化性心脏病的应用研究 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(12): 1279-1280.
- [3] Malygina NA, Kostomarova IV, Vodolagina NN. The genes of atherosclerosis and cardiovascular diseases [J]. Klin Med (Mosk), 2011, 89(3): 14-18.
- [4] Singleton DR, Wu TT, Castle JD. Three mammalian SCAMPs (secretory carrier membrane proteins) are highly related products of distinct genes having similar subcellular distributions [J]. J Cell Sci, 1997, 110(17): 2099-2107.
- [5] Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined a co-sensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2000, 36(3): 959-969.
- [6] McNew JA, Sogaard M, Lampen NM, et al. Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport [J]. J Biol Chem, 1997, 272(28): 17776-17783.
- [7] Wu TT, Castle JD. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kD isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) [J]. J Cell Sci, 1997, 110(13): 1533-1541.
- [8] Wu TT, Castle JD. Evidence for colocalization and interaction between 37 and 39 kDa isoforms of secretory carrier membrane proteins (SCAMPs) [J]. J Cell Sci, 1997, 110(13): 1533-1541.
- [9] Matthies HJ, Han Q, Shields A, et al. Subcellular localization of the antidepressant-sensitive norepinephrine transporter [J]. BMC Neurosci, 2009, 10: 65.
- [10] Liao H, Zhang J, Shestopal S, et al. Nonredundant function of secretory carrier membrane protein isoforms in dense core vesicle exocytosis [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2008, 294(3): C797-809.
- [11] Diering GH, Church J, Numata M. Secretory Carrier Membrane Protein 2 Regulates Cell-surface Targeting of Brain-enriched Na⁺/H⁺ Exchanger NHE5 [J]. J Biol Chem, 2009, 284(20): 13892-13903.
- [12] Mota LJ, Ramsden AE, Liu M, et al. SCAMP3 is a component of the Salmonella-induced tubular network and reveals an interaction between bacterial effectors and post-golgi trafficking [J]. Cell Microbio, 2009, 11(8): 1236-1253.

(收稿日期: 2012-01-08)

(上接第 1050 页)

病房和门诊患者分离的表皮葡萄球菌耐药率比较分析 [J]. 世界感染杂志, 2003, 2(3): 24-27.

[9] 张培, 王卫文, 夏永祥. 医院葡萄球菌的临床分布及其耐药性分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(8): 902-904.

[10] 刘昭升, 谢素贞, 闫蕾, 等. 福建地区真菌性角膜炎的流行病学研究 [J]. 国际眼科杂志, 2009, 9(5): 976-977.

[11] 王鸿利. 实验诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 394-395.

[12] 史伟云, 谢立信, 刘昭升, 等. 部分板层角膜移植术治疗真菌性角膜炎的初步报告 [J]. 中国实用眼科杂志, 2001, 19(11): 826-828.

[13] 夏季. 分子生物学技术应用于病原微生物分子分型的研究进展 [J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(11): 1278-1279.

(收稿日期: 2012-01-08)