

烧伤患者肺炎克雷伯菌分离株氨基糖苷类耐药基因研究

黄璇 潘宇红 吕国忠 朱婕 程华莉 糜祖煌 张烽

肺炎克雷伯菌属于肠杆菌科克雷伯菌属,是临床常见分离菌,除能引起典型的原发性肺炎外,还能导致各种肺外感染,是医院感染最常见致病菌之一^[1-2]。在南通大学附属第三医院(以下简称我院)烧伤病房,肺炎克雷伯菌分离率在革兰阴性杆菌中排第 3 位,加之多药耐药性日益严重,多次发生医院感染造成流行。氨基糖苷类药物是治疗革兰阴性杆菌感染的常用抗生素之一,烧伤患者肺炎克雷伯菌分离株对此类药物耐药的情况非常严重。笔者对 20 株分离自烧伤患者的肺炎克雷伯菌 9 种氨基糖苷类修饰酶基因和 6 种 16S 核糖体 RNA(rRNA)甲基化酶基因进行检测,以了解氨基糖苷类药物相关耐药基因情况,为临床抗生素治疗提供参考。

1 材料与与方法

1.1 菌株来源及鉴定

2008 年 6 月—2009 年 2 月,收集由我院烧伤病房临床标本分离的肺炎克雷伯菌共 20 株,标本来源包括血液 3 份、创面分泌物 14 份、静脉导管 1 份、痰液 1 份、中段尿 1 份。全部菌株均使用 VITEK32 型全自动微生物分析仪(法国生物梅里埃公司)鉴定菌种。其中 3 号菌株分离自血液,其来源病例于 2008 年 8 月 1 日血培养检出肺炎克雷伯菌,8 月 2 日给予美罗培南行抗感染治疗,8 月 9 日再次行血培养未检出肺炎克雷伯菌。

1.2 药物敏感试验

采用 K-B 法测定肺炎克雷伯菌对 20 种抗菌药物的敏感性。氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林、头孢哌酮、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、亚胺培南、美罗培南、氨基曲南、庆大霉素、阿米卡星、妥布霉素、环丙沙星、左旋氧氟沙星、米诺环素、复方磺胺甲噁唑和头孢哌酮/舒巴坦纸片均为英国 Oxoid 公司产品。根据美国临床实验室标准化协会 2009 年版标准规定的临界值判定耐药、中介和敏感。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 购自卫生部临床检验中心。

1.3 细菌处理

挑取纯培养菌落置入 0.5 mL 离心管(内置 200 ng/mL 蛋白酶 K 液 200 μL),56 °C 水浴 2 h,95 °C 水浴 10 min。加入 40 μL 螯合树脂 Chelex-100,20 000 × g 离心 30 s。上清液即为基因检测的模板液,-20 °C 保存备用。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2011.05.017

基金项目:无锡市社会发展科技指导性计划(CSZ00829)

作者单位:214041 江苏无锡,南通大学附属第三医院检验科(黄璇、潘宇红、朱婕、程华莉、张烽),烧伤科(吕国忠);无锡市克隆遗传技术研究所(糜祖煌)

通信作者:张烽,Email:z9958@163.com,电话:0510-82607391

1.4 基因检测

本研究共进行 15 种氨基糖苷类相关耐药基因检测,其中氨基糖苷类修饰酶基因 9 种,16S rRNA 甲基化酶基因 6 种。均采用 PCR 法,各种靶基因引物序列和目的产物长度见表 1。

表 1 氨基糖苷类相关耐药基因 PCR 引物序列及产物长度

基因名称	引物序列 (5'→3')	产物长度 (bp)
修饰酶基因		
<i>aac(3)-I</i>	P1:ACCTACTCCCAACATCAGCC P2:ATATAGATCTCACTACGCGC	169
<i>aac(3)-II</i>	P1:ACTGTGATGGGATACGCGTC P2:CTCCGTGACGCTTTCAGCTA	237
<i>aac(6')-Ib</i>	P1:TATGAGTGGCTAAATCGA P2:CCCGCTTCTCTGTAGCA	394
<i>aac(6')-II</i>	P1:TTCATGTCCGCGAGCACCCC P2:GACTCTCCGCCATCGCTCT	178
<i>ant(3'')-I</i>	P1:TGATTTGCTGTTACGGTGAC P2:CGCTATGTTCTCTGTGTTTTG	284
<i>ant(2'')-I</i>	P1:GAGCGAAATCTGCCGCTCTGG P2:CTGTTACAACGGACTGGCCGC	320
<i>aadA 4/5</i>	P1:ATGGGTGAATYTTYCCTGCACAA P2:TCAACGCAAGATTCTCTATTCTGT	789
<i>aadA6/16</i>	P1:ATGAGYAACGCAGTRCCCGCC P2:TTAAGCYGCGCCGGAAGCGG	846
<i>aph(3')-I</i>	P1:ATGTGCCATATTAACGGGAAACG P2:TCAGAAAACTCATCGAGCATCAA	816
16S 核糖体 RNA 甲基化酶基因		
<i>armA</i>	P1:ATGCATAAGAATGATGTTGTTAAG P2:TTATTTCTGAAATCCACTAGTAATTA	774
<i>rmtA</i>	P1:CCTAGCGTCCATCCTTTCTCTC P2:AGCGATATCCAACACAGGATGG	315
<i>rmtB</i>	P1:ATGAACATCAACGATGCCTC P2:TTATCCATTCTTTTTATCAAGTATAT	756
<i>rmtC</i>	P1:ATGAAAACCAACGATAATTATC P2:TTACAATCTCGATACGATAAAATAC	846
<i>rmtD</i>	P1:ATGAGCGAACTGAAGGAAAACTGCT P2:TCATTTTCTGTTTCAGCACGTAACACG	744
<i>npmA</i>	P1:TTGGCTACTGGAGACGGTAG P2:CAGCTTTGTATTGTTGCTC	421

注:P1 为上游引物,P2 为下游引物

每个扩增体系均为:上、下游引物各 0.5 μmol/L,三磷酸脱氧核糖核苷各 200 mmol/L,KCl 为 10 mmol/L,(NH₄)₂SO₄

8 mmol/L, MgCl₂ 2 mmol/L, Tris-HCl (pH 值 9.0) 10 mmol/L, 非离子去污剂 NP-40 体积分数为 0.5%, 牛血清白蛋白为 0.2 g/L, Taq DNA pol 1 U。总反应体积 20 μL, 其中模板液 5 μL。PCR 扩增产物长度大于 500 bp 者, 热循环参数为: 93 °C 预变性 2 min, 93 °C 变性 60 s, 55 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 共循环 35 个周期, 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物长度小于 500 bp 者, 热循环参数为: 93 °C 预变性 2 min, 93 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 35 个周期, 最后 72 °C 延伸 5 min。扩增产物行 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳, Gel Doc XR 型凝胶电泳成像仪(美国 Bio-Rad 公司)下观察结果。

1.5 基因测序与比对

PCR 阳性产物测序委托上海博尚生物技术有限公司完成。测序结果在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> 上作 BLASTx 比对分析。

2 结果

2.1 药物敏感试验

烧伤病房 20 株肺炎克雷伯菌多药耐药性非常严重, 其中对氨基糖苷类抗生素妥布霉素耐药率达 100% (20/20), 对庆大霉素耐药率为 95% (19/20), 对阿米卡星耐药率为 80% (16/20); 对喹诺酮类抗生素环丙沙星耐药率为 100% (20/20), 对左旋氧氟沙星耐药率为 95% (19/20)。分离自血液的 3 号菌株对 3 种氨基糖苷类抗生素(妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星)和 2 种喹诺酮类抗生素(环丙沙星、左旋氧氟沙星)均耐药, 对 β 内酰胺类药物头孢西丁、亚胺培南、美罗培南和头孢哌酮/舒巴坦敏感。

2.2 耐药基因检测

20 株肺炎克雷伯菌中, *aac(6')-Ib* 基因表达阳性的有 4 株占 20%, *ant(3'')-I* 基因表达阳性的有 17 株占 85%, *aph(3')-I* 基因表达阳性的有 4 株占 20%, *rmtB* 基因表达阳性的有 1 株占 5%, 其余基因均为阴性。

2.3 基因测序与比对

所有阳性产物基因测序后作 BLASTx 比对, 显示分别为 *aac(6')-Ib-cr*、*ant(3'')-I*、*aph(3')-I* 和 *rmtB*, 其中分离自血液的 3 号菌株同时检出这 4 种基因。

3 讨论

烧伤患者由于免疫力低下、创面暴露及深静脉置管等, 给细菌侵入机体提供了便利, 极易发生医院感染。进行本研究之前, 由我院烧伤患者铜绿假单胞菌和鲍氏不动杆菌分离株中, 分别检出了氨基糖苷类修饰酶基因和 16S rRNA 甲基化酶基因^[3-5]。已知的氨基糖苷类修饰酶有乙酰转移酶、核苷转移酶和磷酸转移酶 3 类共 100 多种^[6]。本组 20 株肺炎克雷伯菌 *ant(3'')-I* 基因阳性率高达 85%, 而 *aac(6')-Ib* 基因和 *aph(3')-I* 基因均有 20% 的菌株为阳性。2006 年, 美国学者发现了不仅对氨基糖苷类药物有修饰作用, 而且对喹诺酮类药物也有修饰作用的双功能酶 *aac(6')-Ib-cr* 型^[7]。本实验 4 株 *aac(6')-Ib* 基因阳性的细菌经测序, 有 3 株为 *aac(6')-Ib-cr* 型。*aph(3')-I* 介导了肺炎克雷伯菌对卡那霉素和新霉素的耐药。此前, 仅西班牙和我国浙江绍兴有学者报道在肺炎克雷伯菌中同时检出 *aac(6')-Ib-cr*

和 *aph(3')-I* 基因^[8-9]。

16S rRNA 甲基化酶能使药物作用靶位甲基化, 导致甲基化后与氨基糖苷类药物亲和力下降而对所有氨基糖苷类药物高度耐药。16S rRNA 甲基化酶在细菌间快速传播, 使得“通过改造氨基糖苷类药物结构而研发出抗菌效果更高的新药”这一设想变得不可行。常见的 16S rRNA 甲基化酶编码基因主要有 *armA*、*rmtA*、*rmtB*、*rmtC*、*rmtD* 等。目前国内鲜见肺炎克雷伯菌同时携带 *aac(6')-Ib-cr* 和 *rmtB* 基因的报道。仅吕火祥等^[10]从 84 株肺炎克雷伯菌中检出 8 株携带 *aac(6')-Ib-cr* 基因, 1 株携带 *rmtB* 基因, 但并未明确是否有菌株同时携带这 2 种基因。本研究中, 笔者检出大部分 *aac(6')-Ib* 基因已突变为 *aac(6')-Ib-cr*, 还有 1 株来源于烧伤患者血液的肺炎克雷伯菌(3 号株)同时携带 *aac(6')-Ib-cr*、*ant(3'')-I*、*aph(3')-I* 和 *rmtB* 基因。此菌株对 3 种氨基糖苷类抗生素和 2 种喹诺酮类抗生素均耐药, 推测与其携带 16S rRNA 甲基化酶基因 *rmtB* 以及 *aac(6')-Ib-cr* 双功能酶基因有关。更为严重的是, 此菌株来源于血液而非定植于创面, 能引起全身血行性感染导致严重后果。由于其对氨基糖苷类和喹诺酮类抗生素均耐药, 因此检出后第 2 天未再使用上述 2 类抗生素而改用了敏感的美罗培南, 7 d 后血培养未再检出肺炎克雷伯菌。

经检索, 国内外在肺炎克雷伯菌中检出 *aph(3')-I* 基因的报道不足 10 篇, 但该基因在我院已有较高的检出率。*aac(6')-Ib-cr*、*ant(3'')-I*、*aph(3')-I* 和 *rmtB* 基因在烧伤患者肺炎克雷伯菌分离株中同时检出, 使所有包括新研发的氨基糖苷类抗生素和喹诺酮类药物无法用于治疗此患者。如不加以控制, 一旦此克隆在烧伤科蔓延, 将会带来严重后果。3 号菌株这种新基因组合, 预示着它是不同于以往报道的一种新型菌株, 还有待分析其基因环境后进一步确定。

本研究针对 20 株肺炎克雷伯菌进行了检测, 接下来拟扩大样本量进行烧伤科肺炎克雷伯菌氨基糖苷类分子流行病学调查, 并将所得结果与烧伤科此类耐药基因乃至此类耐药菌流行的预防控制工作相结合。氨基糖苷类耐药基因与细菌对此类抗生素耐药之间的相互关系, 还缺乏 mRNA 水平、蛋白水平等更为直接的证据, 有待进一步深入研究。

参考文献

- [1] 钱小毛, 金海勇. 肺炎克雷伯菌医院感染的临床分布及耐药性分析. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(19): 2632-2634.
- [2] Guggenheim M, Zbinden R, Handschin AE, et al. Changes in bacterial isolates from burn wounds and their antibiograms; a 20-year study (1986-2005). Burns, 2009, 35(4): 553-560.
- [3] 张烽, 潘宇红, 黄璇, 等. 烧伤病房铜绿假单胞菌耐药基因聚类分析. 中国抗生素杂志, 2009, 34(2): 107-110.
- [4] 吕建国, 苏青和, 张烽, 等. *rmtB* 基因在铜绿假单胞菌烧伤分离株中流行. 中华医院感染学杂志, 2009, 19(20): 2686-2689.
- [5] 张烽, 虞俊杰, 程华莉, 等. 烧伤患者鲍氏不动杆菌氨基糖苷类耐药基因研究. 中华烧伤杂志, 2010, 26(2): 117-119.
- [6] Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. Drug Resist Updat, 2010, 13(6): 151-171.
- [7] Robicsek A, Strahilevitz J, Jacoby GA, et al. Fluoroquinolone-modifying enzyme: a new adaptation of a common aminoglycoside

acetyltransferase. Nat Med, 2006,12(1):83-88.

[8] Ruiz E, Rojo-Bezares B, Sáenz Y, et al. Outbreak caused by a multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain of new sequence type ST341 carrying new genetic environments of *aac(6')-Ib-cr* and *qnrS1* genes in a neonatal intensive care unit in Spain. Int J Med Microbiol, 300(7):464-469.

[9] 王华钧, 陈秋美, 金法祥. 肺炎克雷伯菌老年患者分离株氨基糖苷类药物耐药相关基因研究. 中华医院感染学杂志, 2010,20(3):308-311.

[10] 吕火祥, 糜祖煌, 胡庆丰, 等. 肺炎克雷伯菌 16S rRNA 甲基化酶基因及氨基糖苷类修饰酶基因研究. 浙江检验医学, 2008,6(4):7-10.

(收稿日期:2010-12-02)
(本文编辑:罗勤)

早期薄层削痂联合负压封闭引流技术修复深 II 度烧伤创面临床观察

张兵 李巍 李峥 何小龙 高兵

深 II 度烧伤创面坏死组织的存在是导致创面进行性加深及体内一系列病理生理性改变的根源,应用手术方法早期去除坏死组织并有效覆盖创面,是救治深 II 度烧伤的主要手段^[1]。2008 年 7 月—2010 年 6 月,笔者单位应用早期薄层削痂联合 VSD 技术治疗深 II 度烧伤创面,效果令人满意,现报告如下。

1 对象与方法

1.1 临床资料

入选标准:烧伤总面积为 10% ~ 30% TBSA、创面分布于四肢、以深 II 度创面为主者。排除标准:有糖尿病等影响创面愈合的疾病者。共 60 例患者入选本研究,按随机数字表法分为试验组和对照组,每组 30 例。试验组中男 25 例、女 5 例,年龄(37 ± 11)岁,烧伤总面积为(23 ± 4)%,深 II 度面积(18 ± 3)% TBSA;对照组中男 23 例、女 7 例,年龄(40 ± 14)岁,烧伤总面积(21 ± 5)%,深 II 度面积(16 ± 4)% TBSA。2 组患者后 3 项资料比较,差异均无统计学意义(*t* 值分别为 2.135、2.002、2.021, *P* 值均大于 0.05)。

1.2 治疗方法

2 组患者均在伤后 48 h 内行削痂术:无止血带下薄层削痂,去除坏死组织至基底有少量点状出血、显露组织发暗、有淤血感,尽量保存残余真皮组织。采用双极电凝和热盐水纱布止住创面渗血,依次用过氧化氢溶液、生理盐水冲洗创面各 3 遍。而后试验组采用 VSD 技术治疗:按创面大小用含多侧孔引流管聚乙烯醇海绵(武汉维斯第医用科技有限公司)覆盖,确保海绵与创面充分接触、不留空隙,边缘与创缘缝合固定。用具有分子阀门功能的半透性粘贴薄膜(英国施乐辉公司)封闭创面以及创缘周围 2 ~ 3 cm 范围内的正常皮肤。将引流管接通负压吸引机(武汉维斯第医用科技有限公司),维持负压在 -53 ~ -26 kPa,持续吸引 6 ~ 7 d 后更换海绵与半透性薄膜,直至创面愈合。对照组予以油纱贴敷创面,大

量无菌纱布敷料加压包扎治疗,适时更换敷料直至创面愈合。治疗期间,2 组患者均采用相同静脉抗炎对症支持治疗。

1.3 观测指标及评价标准

(1)测量并计算 2 组患者伤后 10、20 d 创面愈合率,公式为:(原始创面面积 - 残余创面面积) ÷ 原始创面面积 × 100%^[2]。(2)以创面完全由上皮组织覆盖、无渗出物为愈合标准^[2],观察并记录 2 组患者创面愈合时间。(3)观察 2 组患者创面感染及瘢痕形成情况。

1.4 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果

试验组患者伤后 10、20 d 创面愈合率及创面愈合时间明显优于对照组(*P* 值均小于 0.05)。见表 1。试验组患者无创面感染或全身感染病例,创面无需植皮;随访 6 ~ 12 个月,肢体功能恢复令人满意,瘢痕形成少。对照组患者中 4 例出现创面感染、加深,后期植皮修复;随访 6 个月,创面愈合后均不同程度遗留瘢痕,部分增生挛缩畸形。

表 1 2 组患者创面愈合情况比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	创面愈合率(%)		创面愈合时间(d)
		伤后 10 d	伤后 20 d	
试验组	30	55.3 ± 4.1 ^a	92.8 ± 0.5 ^a	19 ± 4 ^a
对照组	30	31.7 ± 8.9	61.4 ± 3.7	30 ± 8
<i>t</i> 值		23.56	76.36	-17.26

注:与对照组比较,^a*P* < 0.05

3 讨论

深 II 度烧伤创面可通过残留的上皮组织上皮化自行愈合,但坏死组织引起创面加深后,使原本可以自愈的 II 度创面转化为需要植皮的 III 度创面,不但使愈合时间延长,而且愈合质量差,瘢痕增生严重并伴有不同程度的功能障碍。据报道,早期削痂可清除坏死组织,使烧伤转变成新的创伤,促进局部组织释放 EGF、bFGF 和血小板源性生长因子 α(β) 等多种生长因子,有利于创面愈合^[3-4]。深 II 度烧伤创面加深常发生在伤后 48 h 以内,早期手术去除坏死组织并有效覆