·论著·

烧伤病房铜绿假单胞菌 β 内酰胺类抗生素耐药基因分析

宋启发　林辉　郑剑　徐景野　金春光　李国军

【摘要】 **目的**　了解烧伤病房铜绿假单胞菌 β 内酰胺类抗生素耐药基因携带情况及耐药性。**方法**　采用 K-B 法检测来自烧伤创面和病房的铜绿假单胞菌对 9 种 β 内酰胺类抗生素的耐药谱。用 PCR 扩增法检出 β 内酰胺类抗生素耐药基因的阳性菌株，用他唑巴坦对哌拉西林阻断实验判断上述阳性菌株是否产超广谱 β 内酰胺酶(ESBL)。　**结果**　12 株检出 β 内酰胺类耐药基因的铜绿假单胞菌对所试的头孢菌素类抗生素和哌拉西林均耐药，其中 7 株对包括亚胺培南和氨曲南在内的 9 种抗生素耐药。他唑巴坦对哌拉西林耐药阻断实验提示，这 7 株耐药基因阳性菌株均产 ESBL。本实验扩增出 6 种 β 内酰胺耐药基因，分别为 VEB、IMP、PSE、FOX、OXA、VIM。　**结论**　烧伤病房铜绿假单胞菌 β 内酰胺类抗生素耐药基因携带率较高，与细菌多重耐药有密切关系。

【关键词】 烧伤病房；　假单胞菌，铜绿；　β 内酰胺抗药性；　基因

Analysis of β-lactam-resistance genes in Pseudomonas aeruginosa in burn ward

SONG Qi-fa, LIN Hui, ZHENG Jian, XU Jing-ye, JIN Chun-guang, LI Guo-jun. Department of Microbiology, Centre for Disease Control and Prevention, Ningbo 315010, P. R. China

Corresponding author: SONG Qi-fa, Email: songqf@nbcdc.org.cn, Tel: 0574 - 87274563

【Abstract】 **Objective**　To investigate the resistance genes and antiobiotic resistance patterns against β- lactams in Pseudomonas aeruginosa prevalent in burn ward.　**Methods**　K-B method was performed to test bacterial resistance patterns against 9 species of β-lactams in Pseudomonas aeruginosa isolated from wounds and dressings of the patient in burn wards. Seven species of resistance genes against β-lactams were detected with PCR. Tazobactam-inhibited piperacillin resistance test was performed to study whether the above strains produce extended spectrum β-lactams.　**Results**　All 12 strains of bacteria with resistance genes detected were resistant to penicillin and cephlosporins (100%), among them 11 were resistant to all antibiotics. Tazobactam-inhibited piperacillin resistance test demonstrated that all strains with resistance genes were ESBLs.　**Conclusion**　High incidence of β-lactams resistance genes is found in Pseudomonas aeruginosa isolated from burn ward, and they have close relationship with the occurrence of multiple drug-resistance.

【Key words】 Burn units;　Pseudomonas aeruginosa;　β lactam drug resistance;　Genes

铜绿假单胞菌(pseudomonas aeruginosa, PA)是医院感染常见条件致病菌，亦是重症患者感染的重要病原菌[1]。近年来随着临床抗菌药物的广泛使用，PA 的多重耐药越来越严重，给临床抗感染治疗带来了难题。造成 PA 对 β 内酰胺类抗生素耐药的机制包括：PA 存在外膜通透性下降和外膜主动药物外排系统；β 内酰胺酶对抗生素的水解等。其中临床上最重要的是 β 内酰胺酶水解抗生素引起的耐药，由一系列存在于染色体和质粒上的耐药基因编码，这些耐药基因可在菌株间通过转化、接合等机制转移，往往引起耐药菌株局部暴发[2]。

常见的耐药基因有 TEM、SHV、OXA、IMP、PSE、FOX、VEB 等家族，其作用底物包括青霉素类和头孢菌素类抗生素，尤其是 VIM 和 IMP 家族耐药基因还可以水解碳青霉烯类抗生素，引起 PA 几乎对所有的 β 内酰胺类抗生素耐药[3]。笔者收集了从医院烧伤病房分离的 PA 菌株，分析其耐药表型和耐药基因携带情况，以期为临床选择性应用抗生素治疗提供参考。

1　对象与方法

1.1　菌株来源与处理

26 株 PA 分离于 2003—2005 年宁波市 2 ~ 3 家医院烧伤患者创面(8 株)和烧伤病房物体表面涂抹标本(18 株)。菌株经培养、鉴定后，应用 VITEK 细菌鉴定仪(法国生物梅里埃公司)确认。加入 LB 培

作者单位：315010　浙江省宁波市疾病预防控制中心微生物检验科

通讯作者：宋启发，Email：songqf@nbcdc.org.cn，电话：0574 - 87274563

中华医学会杂志社 版权所有 违者必究　Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

养液，置于培养箱中以 200 次/min 频率振荡培养 8 h，获得对数生长期细菌，作为 PCR 实验用模板。

1.2　主要试剂及材料来源

基因组提取试剂、PCR 产物纯化试剂、PCR 试剂、长片段 PCR 试剂、脱氧核苷三磷酸（dNTP）和 DNA marker 均为大连宝生物工程有限公司产品，marker 长度分别为 2000、1000、750、500、250、100 bp。MH 琼脂和药物敏感纸片均为美国 Oxoid 公司产品。

1.3　研究方法

1.3.1　药物敏感试验　采用 K-B 法对 9 种 β 内酰胺类抗生素进行监测。药物选择参考 2004 版美国国家临床实验室标准化委员会（NCCLS）抗微生物药物敏感性试验执行标准，包括头孢菌素类：头孢他啶、头孢哌酮、头孢曲松、头孢唑肟、头孢吡肟；青霉素类：哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦；碳青霉烯类：亚胺培南；单环内酰胺类：氨曲南。他唑巴坦为 β 内酰胺酶抑制剂，根据它对哌拉西林耐药阻断结果判断菌株是否产超广谱 β 内酰胺酶（ESBL）。参照 1997 版 NCCLS 抗微生物药物敏感性试验执行标准[4]，质控菌株为铜绿假单胞菌 ATCC27853。

1.3.2　PCR 扩增耐药基因　PCR 引物由北京赛百盛生物工程有限公司合成，所用引物见表 1。煮沸法制备细菌基因组模板。反应体系为：总体积 50 μl，10 倍稀释 PCR 缓冲液（含 2.5 mmol/L Mg^{2+}）5 μl，引物各 40 pmol，dNTP 各 10 μmol，*Taq* 酶 2.5 U，模板 2 μl。反应条件：94 ℃预变性 3 min，94 ℃变性 30 s，52 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 60 s，共 30 个循环，最后 72 ℃延伸 5 min。不同引物因其变性温度和产物长度不一样，退火温度和延伸时间有所不同。

表 1　扩增耐药基因所用引物

引物名称	引物序列（5′-3′）	产物长度（bp）	基因组位置	参考序列号
PSE	上游：ACTGCGGCAAATATCATCCT 下游：ATACTCCGAGCACCAAATCC	338	382 ~ 719	AY560837
TEM	上游：TGTCGCCCTTATTCCCTTTT 下游：ATAGTTGCCTGACTCCCCGT	783	21 ~ 803	AY293072
OXA	上游：CTGAAGGTTGTTTTTTACTT 下游：AGTGTGTTTAGAATGGTGAT	703	119 ~ 821	AF2275005
IMP	上游：GCGTTTATGTTCATACTTCG 下游：TTACTTTCGTTTAACCCTTT	619	98 ~ 716	AY625689
FOX	上游：GGTCGCCGTGCTGAAAGATG 下游：GGCCTCGATGGGATAGTTGC	950	150 ~ 1104	X77455
VEB	上游：AAAAATGCCAGAATAGGAGT 下游：CAACATCATTAGTGGCTGCT	649	115 ~ 763	AF010416
VIM	上游：GGCTGTCGCAACTCCGTTAG 下游：GTGCGCCATTCAGCCAGATC	612	51 ~ 662	AY15282

2　结果

2.1　药物敏感性及耐药基因检出情况

各菌株药物敏感试验结果和 β 内酰胺类耐药基因检出情况见表 2。

表 2　26 株 PA 药物敏感试验和 β 内酰胺类耐药基因检出情况

菌株编号	检出耐药基因种类	耐受药物种类			是否产 ESBL	耐药合计（种）
		头孢菌素类	青霉素类	其他		
PA001	VEB	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA002	VEB	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI	IPM、AZT	否	8
PA003	VEB、PSE	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA004	VEB、IMP	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI	IPM、AZT	否	8
PA005	IMP	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA006	IMP	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA007	PSE	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	— —	是	7
PA008	PSE	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI	IPM、AZT	否	8
PA009	FOX	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI	IPM、AZT	否	8
PA010	FOX	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA011	FOX、VIM	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA012	OXA	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA013	—	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA014	—	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI、TZP	IPM、AZT	是	9
PA015	—	CAZ、CFP、CRO、CZX、FEP	PI	— —	否	6
PA016	—	CAZ、CFP、CRO	PI、TZP	— —	是	5
PA017	—	CAZ	PI	— —	否	2
PA018	—	CAZ	PI	— —	否	2
PA019	—	—	PI	— —	否	1
PA020	—	—	PI	— —	否	1

注："—"表示无此项；PA021 ~ PA026 菌株对所用抗生素敏感，表中未列出；PA：铜绿假单胞菌，ESBL：超广谱 β 内酰胺酶，CAZ：头孢他啶，CFP：头孢哌酮，CRO：头孢曲松，CZX：头孢唑肟，FEP：头孢吡肟，PI：哌拉西林，TZP：哌拉西林/他唑巴坦，IPM：亚胺培南，AZT：氨曲南

中华医学会杂志社 版权所有 违者必究
Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

26 株 PA 对抗生素的耐药率如下：头孢他啶 69%、头孢哌酮 62%、头孢曲松 62%、头孢唑肟 58%、头孢吡肟 58%、哌拉西林 77%、哌拉西林/他唑巴坦 42%、亚胺培南 50%、氨曲南 50%，11 株 PA（58%）产 ESBL。在 26 株 PA 菌株中共有 12 株检出 1 种或 1 种以上 β 内酰胺类耐药基因，阳性率 46%。

β 内酰胺类耐药基因检出与多重耐药（对 4 种以上抗生素耐药）的关系见表 3。

表 3　β 内酰胺类耐药基因与多重耐药的关系（株）

菌株分类	菌株总数	耐药基因阳性菌	耐药基因阴性菌
多重耐药菌株	16	12	4
非多重耐药菌株	10	0	10

注：多重耐药指对 4 种以上抗生素耐药

2.2　耐药基因扩增结果

PCR 法从 26 株 PA 中扩增出 6 种 β 内酰胺类耐药基因（图 1）。

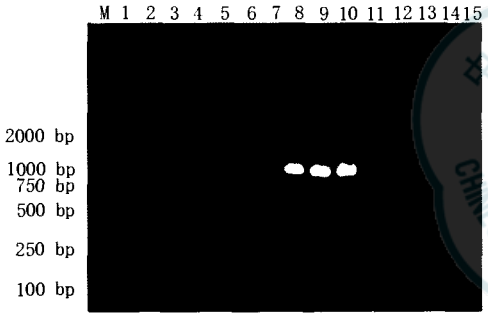

图 1　β 内酰胺类抗生素耐药基因扩增条带。M. marker；1～4. VEB（649 bp）；5～7. PSE（338 bp）；8～10. FOX（950 bp）；11～13. IMP（619 bp）；14. OXA（703 bp）；15. VIM（612 bp）

3　讨论

26 株 PA β 内酰胺类抗生素药物敏感试验和耐药基因检测结果表明，烧伤病房 PA 对 β 内酰胺类抗生素耐药率较高，在检测的 9 种抗生素中，对 4 种以上耐药的有 16 株（62%），其中有 9 株对 9 种抗生素全部耐药（35%）。12 株检出 β 内酰胺类抗生素耐药基因，分别为 VEB（4 次）、IMP（3 次）、PSE（3 次）、FOX（3 次）、OXA（1 次）和 VIM（1 次），未检出 TEM 基因。12 株检出耐药基因的 PA 均对所试的头孢菌素类抗生素和哌拉西林耐药，其中有 7 株对包括亚胺培南和氨曲南在内的 9 种抗生素耐药。出现多重耐药的菌株中耐药基因检出率高达 75%。

由于 β 内酰胺类抗生素耐药基因家族种类繁多，如 OXA 家族有几十种型，本研究仅检测了最常见的基因型，因此未检出耐药基因的多重耐药菌株并不能排除存在耐药基因的可能。他唑巴坦对哌拉西林耐药阻断实验提示，7 株对 9 种抗生素全部耐药的耐药基因阳性菌株均产 ESBL。

编码 β 内酰胺酶的耐药基因已知有数百种，根据其基本结构分为 A、B、C、D 4 种[5]。由染色体或质粒编码，与转录子或整合子结合，几种耐药基因可被组合在一起，通过转化、接合等方式在菌株间转移，因此很容易引起较大范围的耐药菌株产生[6]。这些耐药基因往往与其他耐药机制（如药物外排以及细菌外膜对药物通透性降低）协同发挥作用，使耐药现象更加严重[7]。

临床上为了控制感染，往往采用大剂量抗生素，使烧伤病房长期存在高抗生素浓度环境，为耐药菌株形成优势克隆创造了条件，导致携带耐药基因的菌群量增大，为耐药基因在菌株间扩散提供了充足的基因盒供给池[8,9]。这种作用反过来也促使耐药菌群进一步壮大，形成恶性循环，可能使其耐药种类更多、扩散更广泛。

笔者认为，β 内酰胺类耐药基因是引起烧伤病房等收治危重患者场所 PA 多重耐药的重要因素，应该引起注意并加大监测力度，预防医院感染，在抗生素选择上注意感染是否由产 ESBL 菌株引起。

参考文献

[1] 王辉，陈民钧. 1994～2001 年中国重症监护病房非发酵糖细菌的耐药变迁. 中华医学杂志，2003，83（5）：385－390.

[2] Chen HY, Yuan M, Livermore DM. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics amongst Pseudomonas aeruginosa isolates collected in the UK in 1993. J Med Microbiol, 1995, 43（4）：300－309.

[3] Nordmann P, Guibert M. Extended-spectrum beta -lactamases in Pseudomonas aeruginosa . J Antimicrob Chemother, 1998, 42（2）：128－131.

[4] National Committee for Clinical Laboratory Standards. M2-A6 Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests 7th edition. Wayne, Pennsylvania: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.

[5] Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1980, 289（1036）：321－331.

[6] Montserrat S, Elisenda M, Ferran N, et al. β-lactamases involved in resistance to broad-spectrum cephalosporins in Escherichia coli and Klebsiella spp. Clinical isolates collected between 1994 and 1996, in Barcelona (Spain). J Antimicrob Chemother, 2002, 49（6）：989－997.

[7] Martinez -Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, et al. Roles of beta-lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against Klebsiella pneumoniae. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43（7）：1669－1673.

[8] Carmeli Y, Troillet N, Eliopoulos GM, et al. Emergence of antibiotic-resistant Pseudomonas aeruginosa: comparison of risks associated with different antipseudomonal agents. Antimicrobial Agents Chemother, 1999, 43（6）：1379－1382.

Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?

[9] Nandi S, Maurer JJ, Hofacre C, et al. Gram-positive bacteria are a major reservoir of Class 1 antibiotic resistance integrons in poultry litter. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(18): 7118 - 7122.

(收稿日期:2006 - 08 - 21)
(本文编辑:赵敏)

·病例报告·

胸大肌肌皮瓣转移修复上臂广泛Ⅳ度烧伤一例

李利平　刘明寿　丁腊春

患者女,28 岁,一氧化碳中毒昏迷致右上臂、肩、肩胛、腋窝Ⅳ度烧伤,伤后 8 h 急诊入院。查体:急性重病面容,意识清楚,面色潮红,右上臂前、外、后侧和同侧肩、肩胛及腋部均为黑色焦痂(图 1),烧伤面积 16% TBSA。伤后 2 d 在全身麻醉下进行手术,彻底切除失活组织,包括皮肤、皮下组织及部分三角肌、肱三头肌、背阔肌,可见腋部大血管及神经干暴露,肱骨前外侧及少许肩胛骨外上部分暴露(图 2)。依据创面大小及肌肉等软组织缺损情况,在同侧胸前壁设计约 50 cm × 35 cm 的胸大肌肌皮瓣:做肩峰至剑突的连线(AB),再过锁骨中点(C)做 AB 线的垂直线(交点为 O),COB 线即为胸肩峰动脉的体表投影;皮瓣设计在 AB 线两侧,上达锁骨、下抵腹直肌鞘前鞘上部(包括前鞘),内线越过中线,肌皮瓣较肌瓣大 50%。

沿皮瓣上、内、下侧缘做一弧形切口,切开皮肤、皮下、胸大肌起始点、乳腺组织,间断缝合肌肉或乳腺组织与皮缘,以免皮肤、乳腺组织与胸大肌分离,确保进入乳腺组织及皮肤的穿支血管血供。在胸大肌与胸小肌间的筋膜层进行分离,可见进入胸大肌的神经血管束,加以保护并由内向外、由下向上游离皮瓣。向上游离皮瓣的同时,在右胸壁外侧(即皮瓣外侧)与焦痂创面分界线做切口,切开皮瓣各层,结扎来自肋间血管的吻合支,尽可能游离达皮瓣外上方的止点,保留胸大肌止点及相应的皮肤作为瓣蒂。将整块皮瓣包绕覆盖右上臂后侧、外侧及前上方缺损创面,并将胸大肌的起始点由上至下缝合固定于残留的三角肌、肱骨上方及肘后,间断缝合皮瓣边缘,瓣下置负压引流管引流。部分肩部、肩胛及腋部创面用断层中厚游离皮片移植覆盖,一次性修复后创面愈合。术后 4 个月随访,患者受区外形及功能恢复满意(图 3)。供区创面直接闭合且愈合良好,右侧乳房稍向上偏移;患肢能外展、内收肩关节,能上举前臂、伸屈肘关节、握笔写字;上臂外形尚可。

讨论　上臂Ⅳ度烧伤或损伤造成软组织缺损较前臂或手少见。局部的上臂软组织缺损,一般采用局部旋转皮瓣或带蒂背阔肌肌皮瓣转移修复。若为上臂广泛软组织缺损,常伴有肩、肩胛及腋部的损伤,因缺损范围大且程度深,使大血管、神经干、骨质暴露,结构破坏和功能障碍严重,修复难度大,并有进一步致残和致命的危险,需立即予以修复[1]。本例患者用局部旋转皮瓣难以修复创面;肩胛、腋部及背部广泛深度损伤使大血管、神经干、骨质暴露,同时伤侧背阔肌肌皮瓣蒂部明显受损(血供不可靠),因此不能采用背阔肌肌皮瓣及其他背部带蒂皮瓣进行修复;由于上臂组织结构、外形破坏严重,亦不能采用前臂皮瓣,故取伤侧大块的胸大肌肌皮瓣覆盖创面,是较为合理可靠的选择。胸大肌主要血供来自胸肩峰动脉的胸支、三角肌支、腋动脉的胸肌支,其次是胸廓内动脉、胸最上动脉和胸外侧动脉。乳房的血供也主要来自于胸肩峰动脉和胸外侧动脉的分支。胸大肌皮瓣不仅有恒定、丰富的血液循环,而且皮肤色泽、质地好,供瓣面积大,只要手术操作得当,不会发生血液循环障碍。另外,切除部分或全部胸大肌,对其功能不会造成明显的影响。

单纯的胸大肌肌皮瓣切取长度可达 30 cm[2]。笔者在胸大肌肌皮瓣基础上连同部分乳房切取的整块胸大肌肌皮瓣长达 50 cm,能满足上臂广泛软组织缺损创面修复的需求,使患者恢复外形、重建功能。

参考文献

[1] 陈璧. 深度烧伤创面早期处理及促进创面修复的进展. 中华烧伤杂志, 2001, 17(1): 8 - 9.
[2] Jones GE, Mattox K. Reconstructive Surgery. TRAUMA. 4th ed. 北京:人民卫生出版社, 2001: 1187 - 1200.

图 1　患者入院时肩胛与上臂创面呈黑色焦痂　**图 2**　术中清除失活的皮肤、皮下组织及肌肉组织后,肱骨和腋部大血管、神经干暴露　**图 3**　右侧胸大肌肌皮瓣转移修复术后 4 个月,创面愈合,肩关节外形、功能尚可

作者单位:421001　湖南衡阳,南华大学附属第一医院烧伤整形外科

(收稿日期:2006 - 07 - 31)
(本文编辑:莫愚)

中华医学会杂志社 Chinese Medical Association Publishing House 版权所有 违者必究
Q2xvdWRWZXJzaW9uLQo?