

DOI:10.13350/j.cjpb.221215

• 临床研究 •

烧烫伤患者多重耐药菌感染情况及药敏分析

韩峰^{1*}, 谢晓繁²

(1. 盐城工学院, 江苏盐城 224000; 2. 中国人民解放军空军特色医学中心烧伤整形科)

【摘要】 **目的** 分析烧烫伤患者病房多重耐药菌病原菌分布及耐药性。 **方法** 采集患者创面分泌物、血液、中段尿、痰液、静脉置管等标本并进行细菌培养、分离和鉴定。采用 K-B 纸片琼脂扩散法和最低抑菌浓度 (MIC) 法进行药敏试验。采用 PCR 扩增检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的耐药基因携带情况。 **结果** 共分离出 212 株多重耐药菌, 其中 149 株 (70.28%) 来源于创面分泌物标本, 33 株 (15.57%) 来源于血液标本, 12 株 (5.66%) 来源于痰液标本, 7 株 (3.30%) 来源于中段尿标本, 5 株 (2.36%) 来源于静脉置管标本, 6 株 (2.83%) 来源于其他标本。212 株多重耐药菌中, 金黄色葡萄球菌 64 株, 铜绿假单胞菌 52 株, 大肠埃希菌 43 株, 肺炎克雷伯菌 11 株, 鲍曼不动杆菌 10 株, 奇异变形杆菌 6 株, 阴沟杆菌 4 株, 肠球菌 1 株, 其他肠杆菌 21 株。金黄色葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁敏感, 对红霉素、环丙沙星、庆大霉素、复方新诺明的耐药率分别为 79.69%、56.25%、59.38% 和 39.06%。铜绿假单胞菌对替加环素的敏感, 对环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为 44.23%、17.31%、59.62%、30.77% 和 34.62%。大肠埃希菌对替加环素的敏感, 对环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为 58.14%、9.30%、69.77%、39.53%、6.98% 和 9.30%。64 株金黄色葡萄球菌中, 58 株携带 *mecA* 耐药基因, 34 株携带 *aac(6')/aph(2'')* 耐药基因, 25 株携带 *Aph(3)-III* 耐药基因, 44 株携带 *ermA* 耐药基因, 31 株携带 *ermC* 耐药基因, 27 株携带 *tetM* 耐药基因。 **结论** 本次研究中的多重耐药菌主要分布于创面分泌物标本, 主要病原菌为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、多重耐药铜绿假单胞菌、产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌。万古霉素和替考拉宁对多重耐药阳性菌效果较好, 替加环素对多重耐药革兰阴性菌治疗效果较好。但由于副作用较大, 不宜用作一线用药。

【关键词】 烧烫伤; 多重耐药菌; 耐药性**【中图分类号】** R378**【文献标识码】** A**【文章编号】** 1673-5234(2022)12-1438-04

[Journal of Pathogen Biology. 2022 Dec;17(12):1438-1441.]

Analysis of infection and drug sensitivity of multi-drug resistant bacteria in scalded patients

HAN Feng¹, XIE Xiao-fan² (1. Yancheng Institute of Technology, Yancheng, 224000, Jiangsu, China; 2. PLA Air Force Characteristic Medical Center, Burn and Plastic Surgery)*

【Abstract】 **Objective** To analyze the distribution and drug resistance of multi drug resistant bacteria in burn and scald patients' wards. **Method** The samples of wound secretion, blood, middle urine, sputum and venous catheterization were collected for bacterial culture, isolation and identification. The K-B disk agar diffusion method and the minimum inhibitory concentration (MIC) method were used for drug sensitivity test. The drug resistance genes of MRSA were detected by PCR amplification. **Result** There were 212 strains of multidrug-resistant bacteria in this study, of which 149 strains (70.28%) were from wound secretion samples, 33 strains (15.57%) were from blood samples, 12 strains (5.66%) were from sputum samples, 7 strains (3.30%) were from middle urine samples, 5 strains (2.36%) were from venous catheter samples, and 6 strains (2.83%) were from other samples. Among the 212 strains of multi drug resistant bacteria, there were 64 strains of *S. aureus*, 52 strains of multi drug resistant *P. aeruginosa*, 43 strains of *E. coli*, 11 strains of *K. pneumoniae*, 10 strains of *A. baumannii*, 6 strains of *P. mirabilis*, 4 strains of lactamase cloacae and 1 strain of enterococcus, and 21 strains of other enterobacteriaceae. The *S. aureus* to vancomycin and teicoplanin was sensitive, and the resistance to erythromycin, ciprofloxacin, gentamicin and cotrimoxazole were 79.69%, 56.25%, 59.38% and 39.06% respectively. The *P. aeruginosa* to tegacyclin was sensitive, and the resistance to ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, meropenem and imipenem were 44.23%, 17.31%, 59.62%, 30.77% and 34.62% respectively. The *E. coli* to tegacyclin was sensitive, and the resistance to ciprofloxacin, amikacin, gentamicin, meropenem and imipenem were 58.14%, 9.30%, 69.77%, 39.53%, 6.98% and 9.30% respectively. Among the 64 strains of *S. aureus*, 58 strains carried *mecA* resistance gene, 34 strains carried *aac(6')/aph(2'')* resistance gene, 25 strains carried *aph(3)-III* resistance gene, 44 strains carried *ermA* resistance gene, 31 strains carried *ermC* resistance gene and 27 strains carried *tetM* resistance gene. **Conclusion** The multidrug-resistant bacteria in this study were mainly distributed in wound secretion samples, among which the

* **【通讯作者(简介)】** 韩峰(1980-), 男, 江苏盐城人, 本科, 主治医师, 研究方向: 临床医学, 烧伤外科方向。E-mail: hhhfff1212@163.com

top pathogens were *S. aureus*, *P. aeruginosa* and *E. coli*. Vancomycin and teicoplanin had better effect on multidrug-resistant positive bacteria, and tegacyclin had better effect on multidrug-resistant Gram-negative bacteria. However, it is not suitable to be used as a first-line drug because of its large side effects.

【Key words】 burn and scald; multidrug resistant bacteria; drug resistance

烧伤属于人体皮肤组织损伤,主要由高温气体、火焰、电流、热液等致病因素造成,感染率与死亡率居高不下^[1]。因为烧伤,全球每年约有7 000万人受伤,近1 800万人残疾,超25万人死亡^[2]。烧伤患者皮肤屏障功能遭到严重破坏,烧伤创面定植大量病原菌,甚至引发脓毒症导致危重烧伤患者死亡,烧伤已经成为人类第六位死亡原因^[3]。尤其是大面积烧伤患者由于开放性创面大、住院时间长、免疫力低、长期抗瘢痕治疗等原因,极易发生感染^[4]。近年来,由于广谱抗生素类药物在临床上的不规范使用,导致耐药率升高、致病菌菌谱变迁快、多重耐药现象增多。多重耐药菌,因其所呈现出复杂性、反复性的特点,已经成为医院重点关注的病原菌之一,是脓毒血症和多器官功能衰竭的重要因素,临床抗感染治疗面临巨大挑战^[5-6]。对烧伤病房进行定期的细菌培养与药敏试验,根据药敏结果合理应用抗菌药物,降低病原菌感染,是烧伤临床研究的重中之重。

材料与方 法

1 材 料

1.1 菌株来源 选取本院烧伤科病房2016年2月-2022年1月送检的患者创面分泌物、血液、中段尿、痰液、静脉置管等标本,共分离培养出多重耐药菌212株。剔除同个患者相同部位同种病原菌,保留同一标本分离出的不同种病原菌。标本的培养、鉴定、药敏试验及对多重耐药菌的鉴定由我院检验科完成,然后由院感染管理科对多重耐药菌进行二次核定。多重耐药菌诊断标准依据为2011年卫生部制定的《多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南(试行)》^[7]。

1.2 主要仪器与试剂 Phoenix™-100全自动微生物鉴定仪,美国Becton Dickinson公司;细菌比浊仪,法国梅里埃;PCR扩增仪,美国PE公司;电泳仪、凝胶成像仪,美国BIO-RAD公司;离心机,德国Thermo; -20℃冰箱,美国西门子;培养基,法国梅里埃;细菌鉴定卡,美国Becton Dickinson公司;PCR反应试剂,北京天根生化。质控菌株:金黄色葡萄球菌ATCC25923、铜绿假单胞菌ATCC15442、大肠埃希菌ATCC25922,上海信帆生物科技。

2 方 法

2.1 细菌培养与药敏测试 严格按照《全国临床检验操作规程(第4版)》对采集到的标本接种于不同培养

基,于培养箱内培养24~48 h,对可疑菌落进行进一步鉴定。采用全自动微生物鉴定仪进行细菌鉴定,采用K-B纸片法和最低抑菌浓度(MIC)法进行药敏试验,结果按照美国临床实验室标准化委员会2020版(CLSI-2020)进行判读。

2.2 DNA提取 参照DNA提取盒操作说明书进行操作,采用无菌接种环适量刮取培养后的饱满菌落放入高压灭菌后的离心管内,加入200 μl无菌水,PCR仪器煮沸10 min,10 000 r/min(离心半径10.5 cm)离心1 min。弃上清,保留较高浓度的菌体。加入缓冲液与溶解酶,涡轮振荡摇匀,10 000 r/min离心15 s,56℃水浴15 min。加入30 μl Proteinase K溶液,涡轮振荡摇匀,10 000 r/min离心15 s,65℃金属浴15 min。加入RNAaseA,涡轮振荡摇匀,30℃水浴15 min,8 000 r/min离心5 min,弃上清。加入无水乙醇,涡轮振荡摇匀,10 000 r/min离心15 s。将离心管内液体导入吸附柱内,置于收集管中,10 000 r/min离心1 min,弃废液。加入缓冲液,10 000 r/min离心40 s,弃废液。加入漂洗液,10 000 r/min离心40 s,弃废液。将吸附柱移入新的离心管中,静置15 min。加入缓冲液,10 000 r/min离心1 min,将收集到的DNA模板于-20℃冰箱内保存备用。

2.3 PCR扩增耐药基因 参照文献^[8]及Genbank设计引物序列及产物长度,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成(表1)。PCR反应体系:2×Taq PCR Master Mix 1.25 μl, F-Primer 1 μl, R-Primer 1 μl, DNA模板2 μl, dNTPs 1 μl, PCR buffer 2 μl, ddH₂O补足25 μl。反应条件:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,55℃退火30 s,72℃延伸60 s,循环35次;72℃延伸10 min。取PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳,用凝胶成像仪拍照分析。

结 果

1 菌株来源构成分布

本次研究共分离出212株多重耐药菌,其中149株来源于创面分泌物标本,占总标本70.28%;33株来源于血液标本,占总标本数15.57%,12株来源于痰液标本,占总标本数5.66%;7株来源于中段尿标本,占总标本数3.30%;5株来源于静脉置管标本,占总标本数2.36%;6株来源于其他标本,占总标本数2.83%。

2 病原菌分布

2016年2月-2022年1月共分离培养多重耐药菌212株,其中金黄色葡萄球菌64株,占比30.19%;铜绿假单胞菌52株,占比24.53%;大肠埃希菌43株,占比20.28%;肺炎克雷伯菌11株,占比5.19%;鲍曼不动杆菌10株,占比4.72%;奇异变形杆菌6株,占比2.83%;阴沟杆菌4株,占比1.89%;肠球菌1株,占比0.47%,其他肠杆菌21株,占比9.91%。

表1 耐药基因引物设计
Table 1 Primer design of drug resistance gene

基因 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence	片段长度(bp) Length
mecA	AAATCGATGGTAAAGGTTGGC AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	530
aac(6')/aph(2'')	CCAAGAGCAATAAGGGCATA CACTATCATAACCACTACCG	220
Aph(3)-III	GCCGATGTGGATTGCGAAAA GCTTGATCCCCAGTAAGTCA	292
ermA	GTTCAAGAACAATCACAGAG GGATCAGGAAAGGACATTTAC	533
ermC	AGTAACGGTACTAAAAATTGTTAC GCTAATAITGTTAAATCGTCAAT	540
tetM	AAGAATATTCATAGAGATCAIT TCATACCAATCGATGGTGGATTTGC	310

3 主要多重耐药菌耐药性分析

金黄色葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁100.00%敏感,对红霉素、环丙沙星、庆大霉素、复方新诺明的耐药率分别为79.69%、56.25%、59.38%和39.06%。铜绿假单胞菌对替加环素100.00%敏感,对环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为44.23%、17.31%、59.62%、30.77%和34.62%。大肠埃希菌对替加环素100.00%敏感,对环丙沙星、阿米卡星、庆大霉素、美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为58.14%、9.30%、69.77%、39.53%、6.98%和9.30%(表2)。

4 金黄色葡萄球菌耐药基因分析

64株金黄色葡萄球菌中,58株携带mecA耐药基因,携带率90.63%。34株携带aac(6')/aph(2'')耐药基因,携带率53.13%。25株携带Aph(3)-III耐药基因,携带率39.06%。44株携带ermA耐药基因,携带率68.75%。31株携带ermC耐药基因,携带率48.44%。27株携带tetM耐药基因,携带率42.19%。

讨论

随着抗生素的大量使用,多重耐药甚至泛耐药的现象越来越多,成为目前临床医生的头号难题,不仅导致患者治疗费用增加,对生命健康形成极大威胁。由于多重耐药菌分布存在地区差异化,了解本地区烧伤病房中多重耐药菌的病原菌分布特点、耐药性对加强多重耐药菌的监控及抗菌药物的临床应用,具有重要

价值。

表2 主要多重耐药菌耐药性分析
Table 2 Drug resistance analysis of main multi drug resistant bacteria

抗菌药物 种类 Types of drugs	金黄色葡萄球菌 (n=64)		铜绿假单胞菌 (n=52)		大肠埃希菌 (n=43)	
	耐药株 (株)	耐药率 (%)	耐药株 (株)	耐药率 (%)	耐药株 (株)	耐药率 (%)
	Drug-resistant strain	Drug resistance rate	Drug-resistant strain	Drug resistance rate	Drug-resistant strain	Drug resistance rate
万古霉素	0	0.00	/	/	/	/
替考拉宁	0	0.00	/	/	/	/
红霉素	51	79.69	/	/	/	/
环丙沙星	36	56.25	23	44.23	25	58.14
阿米卡星	/	/	9	17.31	4	9.30
庆大霉素	38	59.38	31	59.62	30	69.77
替加环素	/	/	0	0.00	0	0.00
复方新诺明	25	39.06	/	/	17	39.53
美罗培南	/	/	16	30.77	3	6.98
亚胺培南	/	/	18	34.62	4	9.30

本次研究中,212株多重耐药菌主要分布于创面分泌物标本(70.28%),其次分布于血液标本(15.57%)。陈小熙^[9]对石家庄市河北友爱医院烧伤科研究发现,创面分泌物占送检标本的75.6%,其次为血液标本,与本研究结果一致。大多数烧伤患者以开放性创面为主,早期创面渗出大量液体,成为有利于细菌大肆繁殖的“天然”发源地。王墨华等^[10]研究发现,产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌、产β-内酰胺酶奇异变形杆菌为主要多重耐药菌。本次研究中,金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌为主要多重耐药菌。两者研究结果,存在差异化。造成研究结果差异化的原因,可能与患者的烫伤病因、创面位置、病情严重程度等有关。

烧伤病房是院内感染高发科室之一,患者皮肤呈开放性创伤状态,为金黄色葡萄球菌入侵提供了得天独厚的条件。随着第三代头孢菌素的广泛应用,金黄色葡萄球菌的耐药率呈不断上升趋势,尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检出率显著增加,导致患者创面不易愈合、住院时间延长^[11]。由于烧伤患者免疫力降低、侵入性治疗操作多,伤口长期暴露于空气环境中,导致铜绿假单胞菌成为重要的致病菌之一^[12]。大肠埃希菌作为人类肠道中的一种正常菌群,当患者免疫力低下时,会入侵肠道以外的组织引发感染,特别是创面感染、泌尿道感染、菌血症等^[13]。近年来,产超广谱β-内酰胺酶大肠埃希菌在危重烧伤患者的标本中不断被检出,这是因为危重烧伤患者免疫功能失调、住院时间久、留置导尿管时间长。

关立锋^[14]关于烧伤病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药现状研究发现,MRSA对青霉素及头孢类抗

生素 100% 耐药,对万古霉素、替考拉宁、利奈唑胺敏感。本次研究中,金黄色葡萄球菌对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类耐药性较高,对万古霉素、替考拉宁敏感性为 100.00%。王翌华等^[10] 研究中,多重铜绿假单胞菌与产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌对氨基糖苷类、头孢菌素类、喹诺酮类、磺胺类、四环素类的耐药率高于 70%。本次研究中铜绿假单胞菌、大肠埃希菌对替加环素的敏感性为 100.00%,对阿米卡星的耐药性低于 10%,对环丙沙星、庆大霉素耐药性较高。

本次研究中,64 株金黄色葡萄球菌 90.63% 携带 mecA 耐药基因,53.13% 携带 aac(6')/aph(2'') 耐药基因,39.06% 携带 Aph(3)-III 耐药基因,68.75% 携带 ermA 耐药基因,48.44% 携带 ermC 耐药基因,42.19% 携带 tetM 耐药基因。徐国超等研究中,MR-SA 携带 mecA、ermA、ermB、ermC、aac(6')/aph(2'')、Aph(3)、tetM 等携带率分别为 100%、39.83%、5.93%、20.34%、21.19%、8.47% 和 41.53%^[15]。两者的研究结果存在差异,主要由于本次研究中的全部样本来自烧伤患者病房有关。

综上所述,本次研究中的多重耐药菌主要分布于创面分泌物标本,其中前三名病原菌为金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠埃希菌。金黄色葡萄球菌对万古霉素、替考拉宁敏感性为 100.00%,铜绿假单胞菌、大肠埃希菌对替加环素的敏感性为 100.00%,对其他抗菌药物均呈现不同程度的耐药性。由于替加环素副作用较大,仅在其他药物无效时使用。本次研究中的金黄色葡萄球菌主要携带 mecA、ermA、aac(6')/aph(2'') 耐药基因。通过分析研究结果,可以为本科临床抗感染治疗提供参考。

【参考文献】

[1] Salerian AJ. Burn wound infections and Pseudomonas aeruginosa [J]. Burns, 2020, 46(1): 257-258.
[2] Elsous A, Ouda M, Mohsen S, et al. Epidemiology and outcomes of hospitalized burn patients in Gaza strip: a descriptive study [J]. Ethiop J Health Sci, 2016, 26(1): 9-16.
[3] Haagama JA, Graetz N, Boilliger I, et al. The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the global burden of disease study 2013 [J]. Injury Prev, 2016, 22(1): 3-16.
[4] Li H, Yao Z, Tan J, et al. Epidemiology and outcome analysis of 6325 burn patients: a five-year retrospective study in a major burn center in Southwest China [J]. Scientific Reports, 2017, 7(1): 1.
[5] Norbury W, Herndon DN, Tanksley J, et al. Infection in Burns [J]. Surg Infect (Larchmt), 2016, 17(2): 250-255.
[6] Kargozar S, Mozafari M, Hamzehlou S, et al. Using Bioactive Glasses in the Management of Burns [J]. Front Bioeng Biotechnol, 2019, 7(62): 101.
[7] 卫生部, 卫生部办公厅. 卫生医政发[2011]5号多重耐药菌医院感染与控制技术指南[M]. 北京: 卫生部办公厅, 2011.
[8] Bazzi AM, Rabaan AA, Fawarah MM, et al. Prevalence of panton valentine leukocidin positive methicillin susceptible Staphylococcus aureus infections in a Saudi Arabian hospital [J]. Infect Public Health, 2015, 8(4): 364.
[9] 陈小熙. 石家庄市烧伤患者感染病原菌分析及抗生素耐药性变迁 [D]. 河北医科大学, 2017.
[10] 王翌华, 赵培东, 卢文霄, 等. 烧伤患者多重耐药菌感染情况及耐药性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(10): 1194-1198.
[11] 戴嘉喜, 李琳, 许乐, 等. 541 例烧伤感染住院患儿病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华烧伤杂志, 2016, 32(11): 670-675.
[12] Durante-Mangoni E, Zarrilli R. Global spread of drug-resistant Acinetobacter baumannii: molecular epidemiology and management of antimicrobial resistance [J]. Future Microbiol, 2011, 6(4): 407-422.
[13] 岳欣, 田文君, 王鹏, 等. 产超广谱 β -内酰胺酶大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌的耐药及 TEM 与 SHV 基因型分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(14): 3125-3128.
[14] 关立锋. 烧伤病房耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药现状及耐药基因研究 [D]. 宁夏医科大学, 2014.
[15] 徐国超, 关若为, 朱明武, 等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌院内感染分布及耐药机制研究 [J]. 中国病原生物学杂志, 2020, 15(4): 477-482.

[6] 张岱, 刘朝晖, 廖秦平, 等. 中国医院就诊人群阴道微生态状况调查 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 287-291.
[7] 黄晓宇, 李桂梅, 李华维. 女性细菌性阴道病的流行病学调查及阴道分泌物检测结果分析 [J]. 宁夏医科大学学报, 2021, 43(4): 377-381.
[8] 王晓平, 裴银辉, 安新, 等. 细菌性阴道炎病原菌分布调查 [J]. 华北理工大学学报(医学版), 2020, 22(6): 421-425.
[9] 王辰, 董梦婷, 薛凤霞. 重视阴道微生态检测在女性阴道炎诊治中的应用 [J]. 中华检验医学杂志, 2018, 41(4): 256-258.
[10] 武静文, 胥爱辉, 陈可艳, 等. 阴道微生态检测系统在妇科门诊患者阴道疾病诊断中的应用价值 [J]. 医学临床研究, 2019, 36(1): 168-170.
[11] 李春霞, 伍辉, 熊丽, 等. 老年阴道感染患者的细菌分布及耐药性分析 [J]. 中国药房, 2017, 28(35): 4928-4931.
[12] 杨文静, 王璐, 张帆. 江汉地区 3812 例育龄妇女阴道分泌物病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中国病原生物学杂志, 2019, 14(2): 217-219, 225.
[13] 李一鹏. 复发性尿路感染的细菌检验、药敏情况对临床用药的意义分析 [J]. 中国现代药物应用, 2019, 13(1): 231-232.
[14] 刘志. 170 例细菌性阴道炎患者阴道分泌物标本细菌培养及常见致病菌耐药性分析 [J]. 首都食品与医药, 2020, 2(12): 127-128.
[15] 张玉炜. 细菌性阴道炎的临床治疗研究进展 [J]. 中国城乡企业卫生, 2021, 3(233): 72-74.

【收稿日期】 2022-08-16 【修回日期】 2022-11-01

(上接 1437 页)

【收稿日期】 2022-11-14 【修回日期】 2022-12-11