

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2023.04.04

· 临床研究 ·

# 53 例开放性手部及前臂外伤厌氧菌感染临床及病原学特征

苏玉<sup>a</sup>, 孙丽颖<sup>b</sup>, 刘颖<sup>a</sup>(北京积水潭医院 a. 医学检验中心, b. 手外科, 北京 100035)

**摘要:**目的 分析开放性手部及前臂外伤厌氧菌感染患者的临床病原学特征及药敏情况。方法 回顾性分析 2015—2021 年 53 例开放性手部及前臂外伤厌氧菌感染患者的临床特征、实验室指标、病原菌鉴定和药敏试验结果。病原菌鉴定使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 方法,并用 16S rRNA 测序验证。药敏试验采用 E-test 法进行。结果 53 例患者感染类型中 1 种厌氧菌+1 种非厌氧菌感染占 52.8%,1 种厌氧菌+1 种及以上厌氧菌或非厌氧菌感染占 88.7%。共分离出 26 种 66 株厌氧菌,从直接或间接咬伤病例中分离的厌氧菌占总株数的 75.8%。23 株非拟杆菌群的革兰阴性厌氧菌最低抑菌浓度 (MIC)  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$  的药物种类为:亚胺培南(22 株,占 96%)、美罗培南(22 株,占 96%)、甲硝唑(22 株,占 96%)、哌拉西林/他唑巴坦(21 株,占 91%)、阿莫西林/棒酸(20 株,占 87%)。结论 开放性手部及前臂外伤的厌氧感染混合感染率高;直接或间接咬伤的患者病原菌复杂;革兰阴性厌氧杆菌引起的感染可选用亚胺培南、美罗培南、甲硝唑及哌拉西林/他唑巴坦等抗菌药物治疗。

**关键词:** 手部及前臂;开放性外伤;厌氧菌**中图分类号:** R446.5 **文献标志码:** A

## Clinical and pathogenic features of anaerobic infection in 53 patients with open injury of hands and forearms

SU Yu<sup>a</sup>, SUN Liying<sup>b</sup>, LIU Ying<sup>a</sup> (a. Medical Laboratory Center, b. Hand Surgery Department, Beijing Jishuitan Hospital, Beijing 100035, China)

**Abstract: Objective** To investigate the clinical and pathogenic features and drug sensitivity of anaerobic infection in patients with open injury of hands and forearms. **Methods** The clinical characteristics, laboratory indexes, and the results of pathogen identification and drug sensitivity test in 53 patients with anaerobic infection caused by the open injury of hands and forearms during 2015 and 2021 were retrospectively analyzed. Pathogens were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and verified with 16S rRNA sequencing. The drug sensitivity test was performed using the Epsilometric test (E-test). **Results** Among the 53 patients, 52.8% were infected with one kind of anaerobe and one kind of non-anaerobic bacteria, and 88.7% were infected with one kind of anaerobe and one or more kinds of anaerobe and/or non-anaerobic bacteria. A total of 26 species and 66 strains of anaerobes were isolated, and 75.8% of strains were isolated from the patients suffered direct or indirect bites. The types of drugs with a minimum inhibitory concentration (MIC)  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$  against 23 strains of Gram-negative anaerobes belonging to the non-Bacteroides group included imipenem (96%, 22/23), meropenem (96%, 22/23), metronidazole (96%, 22/23), piperacillin/tazobactam (91%, 21/23), and amoxicillin/clavulanic acid (87%, 20/23). **Conclusion** The mixed infection rate of anaerobic infection in the open injury of hands and forearms is high. The pathogens in the patients suffered direct or indirect bites are complex. The infections caused by Gram-negative anaerobes can be treated with imipenem, meropenem, metronidazole, piperacillin/tazobactam and etc.

**Key words:** hand and forearm; open injury; anaerobe

感染是手和前臂开放性外伤主要的并发症之一,引起感染的常见菌包括金黄色葡萄球菌、多杀巴斯德菌、链球菌属等<sup>[1]</sup>。厌氧菌感染的独立分析研究极少,可能与厌氧培养、病原学鉴定的实验室技术要求高有关。虽然大多数厌氧菌毒力较弱,患者的初始症状隐匿,但是如诊治不及时,可发生屈

指肌腱鞘炎、脓毒性关节炎,导致手部功能障碍<sup>[2]</sup>。少数毒力极强的厌氧菌(如 A 型产气荚膜梭菌等梭菌属细菌)延诊可导致创伤性气性坏疽,致使患者截肢甚至危及生命<sup>[2-3]</sup>。所以对于手部和前臂开放性外伤发生的感染,厌氧菌的分析研究十分必要。本研究对 53 例手部及前臂厌氧菌感染患者的

作者简介:苏玉,1987 年生,女,主管技师,博士,主要从事疾病的分子诊断和发病机制研究。

通信作者:刘颖,主任技师,E-mail:liuying\_jstyy@aliyun.com。

临床和病原学资料进行了回顾性分析,并对厌氧菌药敏结果进行分析,为开放性手部及前臂创伤相关的厌氧菌感染提供诊断和治疗依据。

## 1 对象和方法

**1.1 研究对象** 回顾性分析 2015 年 1 月—2021 年 12 月就诊于北京积水潭医院的开放性手部和前臂外伤患者,纳入全部术中取材送检发现至少存在 1 种厌氧菌感染者,并排除 3 d 内使用抗菌药物治疗的患者和术中送检标本数少于 3 份的患者,共 53 例患者纳入分析。术前消毒程序遵守医院骨科标准消毒程序(GB 15982-2012)。收集性别、年龄、基础疾病、受伤原因、临床表现、实验室指标等临床数据,以及病原学鉴定和药敏试验结果数据。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则并且通过本院伦理委员会审查(批文号:202102-10)。

53 例患者年龄范围 5~83 岁,中位年龄 56 岁;男性 41 例,女性 12 例;有基础疾病(糖尿病、高血压)患者 14 例;受伤原因为直接或间接咬伤(动物咬伤、人咬伤、牙签刺伤等)共 39 例,利器伤、机械伤或车祸伤 14 例;感染指标中,白细胞升高( $>9.50 \times 10^9/L$ )31 例,中性粒细胞百分比升高( $>75\%$ )30 例;根据临床表现,局部感染表现(红肿、流脓、窦道形成)49 例,发生感染部位坏死 4 例。

**1.2 主要仪器与试剂** MALDI-TOF 质谱仪(德国布鲁克公司),SimpliAmp PCR 仪(美国 ABI 公司);CDC 厌氧菌血琼脂培养基(2015-2020 年购于天津市金章科技公司,2021 年购于江门市凯林贸易有限公司),厌氧环境指示剂(法国生物梅里埃公司),DNeasy PowerLyzer 细菌 DNA 提取试剂盒(德国 Qiagen 公司),PCR 预混液(赛默飞世尔公司),甲硝唑和莫西沙星药敏试条(意大利 Liofilchem 公司),亚胺培南等其他药敏试条(中国温州康泰生物公司),引物合成(上海生工生物公司),PCR 产物测序(北京博迈德基因技术有限公司)。

**1.3 标本采集和厌氧培养** 标本采集及厌氧培养操作流程遵循美国临床和实验室标准协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)标准 M56-A<sup>[4]</sup>。至少采集患者术中感染组织样本 3 份,立刻送至实验室进行需氧、微需氧、厌氧培养,覆盖普通细菌、微需氧菌、真菌及专性厌氧菌。对于厌氧培养,接收厌氧标本后立即接种于 CDC 厌氧菌血琼脂培养基,置于 35~37 °C 的厌氧袋。至少经过 48 h 初代培养(产气荚膜梭菌 16~18 h),观察初代培养基上

不同形态的菌落,并进行革兰染色,对疑似厌氧菌的菌落进行 2 次耐氧试验,以排除兼性厌氧菌。2 次耐氧试验为阴性的细菌确定为专性厌氧菌。大于或等于 3 份样本中生长同一种菌确定为致病菌。

**1.4 细菌鉴定** 用 MALDI-TOF 质谱仪进行厌氧菌和非厌氧菌鉴定,操作依据仪器说明书,鉴定分值 $\geq 2.0$ 的菌株结果可信,分值在 1.700~1.999 的菌株使用 16S rRNA 基因测序复核。仅发现部分微小单孢菌或小韦荣球菌需作测序复核,从上述细菌培养平皿刮取菌落,用 pH 8.0 TE 缓冲液配制  $1.5 \times 10^7$  CFU/mL 菌液浓度,取 300  $\mu$ L 菌液使用商品化试剂盒进行 DNA 提取;引物设计参照 GenBank 中微小单孢菌 3119B 株(序列号:NR\_036934.1)等 18 株微小单孢菌序列、小韦荣球菌 DMS2008 株(序列号:NR\_074980.1)等 10 株小韦荣球菌序列,以及参考文献报道方法<sup>[5-6]</sup>,采用 Primer Premier 5.0 和 Clustal FW1.8 软件辅助设计,正向引物:5'-A GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3',反向引物:5'-ACGG MTACCTTGTTACGACTT-3'。PCR 反应体系共 25  $\mu$ L,包括 DNA 模板 2  $\mu$ L,20  $\mu$ mol/L 正、反向引物各 1  $\mu$ L,2 $\times$ PCR 预混液 12.5  $\mu$ L,无核酸酶水 8.5  $\mu$ L。PCR 反应参数:94 °C 预变性 7 min;94 °C 变性 1 min,56 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1.5 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 5 min。PCR 产物及原引物外送测序,经 15 g/L 琼脂糖凝胶电泳、纯化回收目的片段后使用 ABI 3730xl 测序仪双向测序,测序结果使用 DNASTAR Lasergene v7.1 组件处理:EditSeq 查看序列;SeqMan 拼接序列;微小单孢菌、小韦荣球菌序列用 MegAlign 分别与序列 NR\_036934.1 和序列 NR\_074980.1 进行比对,其间所需序列格式转换采用 SeqVet1.4。

**1.5 抗菌药物敏感性试验** 用 E-test 法测定最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。依据 CLSI 标准 M11-A8 选择药物种类<sup>[7]</sup>,包括甲硝唑、阿莫西林/克拉维酸、亚胺培南、美罗培南、莫西沙星、哌拉西林/他唑巴坦、头孢曲松。使用商品化的含有不同浓度的药敏试条,实验操作遵循参考文献<sup>[4,7]</sup>,将试条与厌氧菌进行 35~37 °C 厌氧培养,42~48 h 后读取 MIC 值。结果判定参照 CLSI 标准 M11-A8<sup>[7]</sup>。

**1.6 统计学分析** 使用 Excel 2017 和 SPSS 26.0 软件进行。计量资料采用  $M(P_{25}, P_{75})$  表示;计数资料以  $n(\%)$  表示。

## 2 结果

**2.1 感染类型** 53 例患者可细分为 6 种感染类型:1 种厌氧菌感染的病例较少,仅有 6 例(占 11.3%);2 种厌氧菌感染的 4 例(占 3.8%);3 种厌氧菌感染的 3 例(占 5.7%);1 种厌氧菌+1 种非厌氧菌感染最多,共 28 例(占 52.8%);1 种厌氧菌+2 种非厌氧菌 9 例(占 17.0%);2 种厌氧菌+2 种非厌氧菌的 3 例(占 5.7%)。53 例患者中存在 2 种及以上细菌感染的共 47 例(占 88.7%)。

**2.2 厌氧菌种类分布** 53 例患者共分离出 26 种 66 株厌氧菌,其中,革兰阴性杆菌 12 种 36 株,革兰阳性球菌 5 种 15 株,革兰阳性芽胞杆菌 6 种 8 株,革兰阴性球菌 1 种 5 株,革兰阳性杆菌 2 种 2 株。见表 1。

表 1 26 种 66 株厌氧菌种类及分布

细菌类别	厌氧菌名称	株数	百分比(%)
革兰阴性杆菌(12 种)	中间普雷沃菌	7	10.6
	具核梭杆菌	6	9.1
	脆弱拟杆菌	5	7.6
	产黑普雷沃菌	5	7.6
	双路普雷沃菌	4	6.1
	卵形拟杆菌	2	3.0
	猕猴卟啉单胞菌	2	3.0
	多形拟杆菌	1	1.5
	单行拟杆菌	1	1.5
	颊普雷沃菌	1	1.5
	口普雷沃菌	1	1.5
	坏死梭杆菌	1	1.5
革兰阳性球菌(5 种)	海氏嗜脓菌	5	7.6
	厌氧消化链球菌	5	7.6
	大芬戈尔德菌	2	3.0
	微小单胞菌	2	3.0
	厌氧球菌属	1	1.5
革兰阳性厌氧芽胞杆菌(6 种)	第三梭菌	2	3.0
	产气荚膜梭菌	2	3.0
	索氏梭菌	1	1.5
	拜氏梭菌	1	1.5
	生孢梭菌	1	1.5
	双酶梭菌	1	1.5
革兰阴性球菌(1 种)	小韦荣球菌	5	7.6
革兰阳性杆菌(2 种)	瘰疬丙酸杆菌	1	1.5
	莫氏细小杆菌	1	1.5
合计		66	100.0

**2.3 受伤原因与厌氧菌种类的关系** 受伤原因为直接或间接咬伤的患者中,共分离出 19 种 50 株厌氧菌,占厌氧菌总株数的 75.8%,其中 39 株为革兰

阴性菌,11 株为革兰阳性菌;从利器伤、机械伤或车祸伤患者中分离出 11 种 16 株厌氧菌,占 24.2%,其中 14 株为革兰阳性菌,2 株为革兰阴性菌。见表 2。

表 2 受伤原因与厌氧菌种类分布

受伤原因	厌氧菌名称	株数	百分比(%)
直接或间接咬伤(19 种)	中间普雷沃菌	7	10.6
	具核梭杆菌	6	9.1
	产黑普雷沃菌	5	7.6
	脆弱拟杆菌	4	6.1
	小韦荣球菌	4	6.1
	双路普雷沃菌	4	6.1
	厌氧消化链球菌	3	4.6
	海氏嗜脓菌	3	4.6
	卵形拟杆菌	2	3.0
	猕猴卟啉单胞菌	2	3.0
	微小单胞菌	2	3.0
	多形拟杆菌	1	1.5
	坏死梭杆菌	1	1.5
	莫氏细小杆菌	1	1.5
	单行拟杆菌	1	1.5
	颊普雷沃菌	1	1.5
	口普雷沃菌	1	1.5
	瘰疬丙酸杆菌	1	1.5
	厌氧球菌属	1	1.5
利器伤、机械伤或车祸伤(11 种)	海氏嗜脓菌	2	3.0
	厌氧消化链球菌	2	3.0
	第三梭菌	2	3.0
	大芬戈尔德菌	2	3.0
	产气荚膜梭菌	2	3.0
	脆弱拟杆菌	1	1.5
	小韦荣球菌	1	1.5
	索氏梭菌	1	1.5
	拜氏梭菌	1	1.5
	生孢梭菌	1	1.5
	双酶梭菌	1	1.5
合计		66	100.0

**2.4 非厌氧菌种类与分布** 53 例患者中,共分离出 22 种 49 株非厌氧菌,依次为咽峡炎链球菌 9 株、粪肠球菌 5 株、中间链球菌 4 株、表皮葡萄球菌 3 株、阴沟肠杆菌 3 株、肺炎克雷伯菌 3 株、多杀巴斯德菌 2 株、产酸克雷伯菌 2 株、星座链球菌 2 株、金黄色葡萄球菌 2 株、铜绿假单胞菌 2 株、大肠埃希菌 2 株、弗氏柠檬酸杆菌 1 株、缓症链球菌 1 株、雷氏普罗威登斯菌 1 株、门多撒假单胞菌 1 株、嗜水气单胞菌 1 株、停乳链球菌 1 株、图列茨放线菌 1 株、魏氏柠檬酸杆菌 1 株、无乳链球菌 1 株、血链球菌 1 株。

**2.5 主要革兰阴性厌氧杆菌的药物敏感性试验** 5 种 23 株非拟杆菌群的革兰阴性厌氧菌包括中间

普雷沃 7 株、具核梭杆菌 6 株、小韦荣球菌 5 株和产黑普雷沃菌 5 株。药敏试验结果显示,其中 22 株菌对亚胺培南、美罗培南及甲硝唑的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 21 株菌对哌拉西林/他唑巴坦的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 20 株菌对阿莫西林/棒酸、莫西沙星的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 16 株菌对头孢曲松的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ 。见表 3。

表 3 5 种 23 株非拟杆菌群的革兰阴性厌氧菌药敏试验结果 [n(%)]

药物名称	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )			
	$\leq 0.5$	1~4	$\geq 32$	$\geq 256$
阿莫西林/棒酸	20(87)	3(13)	0	N/A
亚胺培南	22(96)	1(4)	0	N/A
美罗培南	22(96)	1(4)	0	N/A
莫西沙星	20(87)	3(13)	0	N/A
哌拉西林/他唑巴坦	21(91)	2(9)	0	0
头孢曲松	16(70)	7(30)	0	0
甲硝唑	22(96)	1(4)	0	0

注:N/A,该药物的 E-test 法没有此浓度。

其次对 5 株脆弱拟杆菌的药敏结果进行分析,发现 4 株对甲硝唑的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 3 株菌对亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 2 株菌对阿莫西林/棒酸、莫西沙星的 MIC 值  $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$ , 对头孢曲松的 MIC 值  $\geq 1 \mu\text{g/mL}$ 。见表 4。

表 4 5 株脆弱拟杆菌药敏试验结果 [n(%)]

药物名称	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )			
	$\leq 0.5$	1~4	$\geq 32$	$\geq 256$
阿莫西林/棒酸	2(40)	2(40)	1(20)	N/A
亚胺培南	3(60)	2(40)	0	N/A
美罗培南	3(60)	2(40)	0	N/A
莫西沙星	2(40)	3(60)	0	N/A
哌拉西林/他唑巴坦	3(60)	2(40)	0	0
头孢曲松	0	2(40)	3(60)	0
甲硝唑	4(80)	1(20)	0	0

注:N/A,该药物的 E-test 法没有此浓度。

### 3 讨论

本研究共培养出厌氧菌 26 种,非厌氧菌 22 种,厌氧菌和非厌氧菌的混合感染占 75.5%,说明同时进行厌氧菌和非厌氧菌的培养和鉴定具有重要临床意义。

此外,本研究发现细菌种类与受伤原因直接相关。直接或间接咬伤是发生厌氧菌感染的主要原因,其中革兰阴性菌占比较高,主要为人或动物口腔来源的厌氧菌(如中间普雷沃菌、具核梭杆菌、产黑普雷沃菌等);而来源于外部环境的厌氧菌中革

兰阳性菌占比高(如梭菌属的厌氧菌、海氏嗜脓菌、厌氧消化链球菌等)。受伤原因可对判断感染部位的细菌种类起到重要的参考作用。

革兰阴性厌氧杆菌是本研究中主要出现的厌氧菌类型。在分析主要革兰阴性厌氧杆菌的药敏结果时,因拟杆菌群易产生  $\beta$ -内酰胺酶,所以将脆弱拟杆菌进行单独分析<sup>[8]</sup>。革兰阴性厌氧菌首选抗菌药物依次为甲硝唑、亚胺培南、美罗培南、哌拉西林/他唑巴坦。但因混合感染比例高,细菌种类复杂,如单纯使用甲硝唑不能覆盖所有病原菌种类,更建议使用超广谱抗菌药物。对于非拟杆菌群的厌氧菌,头孢曲松的 MIC 值更低,而拟杆菌群的 MIC 值更高,说明头孢曲松更适用于非拟杆菌群的厌氧菌感染治疗。

手部和前臂的厌氧菌感染并不罕见,但文献报道极少,本研究为开放性手部及前臂创伤相关的厌氧菌感染提供诊断和治疗依据。本研究来自单中心数据,未来尚需扩大样本量并进行多中心研究。

### 4 参考文献

- [1]李威,李丽红,毛瑞涛,等. 275 例手外伤感染患者创口病原菌分布及耐药性分析[J]. 中华实验外科杂志, 2020, 37(7): 1357-1358.
- [2]Crowe CS, Yu JL, Yesantharao P, et al. Predictors of mortality and amputation in patients with necrotizing soft tissue infections of the upper extremity[J]. J Hand Surg, 2022, 47(7): 629-638.
- [3]Visse M, Vernet-Garnier V, Bajolet O, et al. Bone and joint infections caused by *Clostridium perfringens*: a case series[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2021, 40(10): 2221-2225.
- [4]Clinical and Laboratory Standards Institute. M56-A. Principles and procedures for detection of anaerobes in clinical specimens[S]. Wayne, PA: CLSI, 2012.
- [5]Knapp S, Brodal C, Peterson J, et al. Natural competence is common among clinical isolates of *Veillonella parvula* and is useful for genetic manipulation of this key member of the oral microbiome[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 139.
- [6]Liu Y, Su Y, Cui Z, et al. Clinical and microbiological features of anaerobic implant-related infection in 80 patients after orthopedic surgery[J]. Anaerobe, 2021, 71: 102413.
- [7]Clinical and Laboratory Standards Institute, M11-A8. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria[S]. Wayne, PA: CLSI, 2016.
- [8]Hashimoto T, Hashinaga K, Komiya K, et al. Prevalence of antimicrobial resistant genes in *Bacteroides* spp. isolated in Oita Prefecture, Japan[J]. J Infect Chemother, 2023, 29(3): 284-288.

(收稿日期:2023-02-19)

(本文编辑:刘群)