文章编号:1000-5404(2006)14-1517-03

论著

溶葡萄球菌酶对创面肉芽组织抗菌效果的临床研究

陈 莉[1],郭 力[2],熊爱兵[2] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]泸州医学院附属医院烧伤科,泸州 646000)

提 要:目的 研究溶葡萄球菌酶在体外和创面肉芽组织中对金黄色葡萄球菌等几种有代表性的常见创面感染菌的抗菌效果。**方法** 用体外药敏试验观察了溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和铜绿假单孢菌抗菌效果;并用组织细菌定量分析的方法分析了溶葡萄球菌酶对29例Ⅲ度面积10%~30%总体表面积(total body surface area, TBSA)的烧伤患者残留创面肉芽组织中金黄色葡萄球菌的抗菌效果。**结果** 溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌有很强的抗菌效果,对白色念珠菌也有明显的抗菌效果;对铜绿假单孢菌的抗菌效果较差。溶葡萄球菌酶纱布在烧伤残留创面连续使用3 d后,能杀死肉芽组织中89.2%的细菌。证明溶葡萄球菌酶能有效控制肉芽组织中的细菌数量。同时,杀菌纱布所含成分是生物酶类,使用后未见全身不良反应。**结论** 溶葡萄球菌酶除了对金黄色葡萄球菌有很强的杀菌作用外,对白色念珠菌也有很好的杀菌作用,溶葡萄球菌酶可以作为控制中晚期烧伤残余创面金黄色葡萄球菌感染非常有效的局部用药。

关键词: 溶葡萄球菌酶;金黄色葡萄球菌;烧伤
中图法分类号: R378.11;R969.4;R977.3 **文献标识码:** A

Antibiotic effect of lysostaphin on granulation wound

CHEN Li[1], GUO Li[2], XIONG Ai-bing[2] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Burns, The Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of lysostaphin on golden staphylococcal bacteria *in vitro* and on acestoma tissue. **Methods** Effects of lysostaphin on golden staphylococcal bacteria, *Candida albicans* and *P. aeruginosa* were detected by drug sensitivity test. Quantitative analysis of bacteria was used to detect the effect of lysostaphin on golden staphylococcal bacteria in 29 cases of 10% -30% TBSA. **Results** Most golden staphylococcal bacteria, as well as *Candida albicans* could be killed by lysostaphin. Lysostaphin had little effect on *P. aeruginosa*. Eighty-nine percent bacteria could be killed by lysostaphin after gauze with lysostaphin had been used for over 3 d, indicating lysostaphin may control bacteria quantity and improve survival rate of skin graft on granulation tissue. Gauze with lysostaphin contained biological enzymes and it had no systemic side effects. **Conclusion** Gauze with lysostaphin may be available on controlling golden staphylococcal bacteria as well as *Candida albicans* in burnt patients. Lysostaphin is effective in controlling residual trauma infected by golden staphylococcal bacteria.

Key words: lysostaphin; golden staphylococcal bacteria; burns

金黄色葡萄球菌是临床最常见的化脓性球菌,分布广泛,传播快,对多种抗生素耐药,是医院交叉感染的重要来源[1]。金黄色葡萄球菌可产生多种毒素与酶,引起肺炎、化脓性骨髓炎、败血症等多种疾患,而且容易发生暴发,成为医院感染治疗工作中十分棘手的问题[2]。随着抗生素的广泛使用,耐药菌株日渐增多。对烧伤创面使用抗菌药物减少创面局部组织中的细菌含量是提高创面愈合速度并控制烧伤全身性感染的发生和发展的有效方法。烧伤残留创面中金黄色葡萄球菌的感染比例很高[3],是造成晚期皮肤移植失败

作者简介:陈 莉(1973-),女,江苏省南京市人,硕士,医师,主要从事细胞增殖与分化信号转导方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)66775327,E-mail:gloria_chen_nj@126.com

收稿日期:2006-04-10;修回日期:2006-05-30

的主要原因[4]。近年来,对抗生素耐药细菌的数量有逐年增加的趋势[5],很多研究者在寻找能有效发挥抗菌作用,不良反应小而又不易产生耐药的新药物来替代抗生素在创面的应用,减少耐药菌的出现。本研究使用的溶葡萄球菌酶(lysostaphin),是一种来源于微生物,经过人工基因重组的蛋白质,它具有切断致病金黄色葡萄球菌细胞壁肽聚糖成分中五甘氨酸肽键的酶活性,能在几分钟内迅速破坏金黄色葡萄球菌细胞壁,从而达到快速杀死致病菌的作用[6]。

本研究的目的主要是为了确证溶葡萄球菌酶对晚期残留创面肉芽组织中的金黄色葡萄球菌的杀菌作用,为临床提供了抗生素以外的新的创面杀菌药物。

1 材料与方法

1.1 仪器及耗材

Vitek AMS 全自动微生物分析仪(美国,Vitek)原理见参考文献[7]。生化分析使用 LYMPUS-640 全自动生化分析仪。

溶葡萄球菌酶纱布(规格:7 cm × 14 cm,每片含重组溶葡萄球菌酶 100 U,1 U/cm^2,中国高科提供)。

细菌来源:体外实验使用的金黄色葡萄球菌、白色念珠菌和铜绿假单孢菌均来自 2005 年 1 - 5 月烧伤患者创面分离出的菌株。

1.2 病例选择

烧伤患者Ⅲ度面积 10% ~ 30% TBSA;男性 25 例,女性 9 例;患者年龄 20 ~ 50 岁,平均 38.6 岁。选择患者被烧伤后 3 周以上,有多处残余肉芽创面者。取肉芽组织样本鉴定其中的细菌种类,选择金黄色葡萄球菌感染者,征得患者同意后作为符合条件的病例,以进一步疗效观察。

1.3 肉芽组织细菌含量的确定

清洗残余创面后将同一患者的创面大致分为 2 个区域,创面大小、烧伤的深浅和所处的身体位置大致对称或相似,随机取一块作为对照区,另一块作为实验区;对照区用常规的纱布换药覆盖,实验区用溶葡萄球菌酶杀菌纱布换药覆盖。每天换药 1 次,连续换药 3 d 后,取对照区和实验区的肉芽组织 0.5 g左右,用无菌试管封装好后,立即送细菌培养室处理。

在净化工作台内无菌条件下用电子天平准确称取肉芽组织 0.1 g,将取下的组织放入无菌玻璃匀浆器中,加入 1 ml 生理盐水,制做组织匀浆,取匀浆 1 μl,涂抹在平板上接种,37 ℃ 培养 24 h 后,计数细菌菌落数,剩以 1 万倍,计算出每克组织中所含细菌的个数。以 CFU/g 组织表示。

杀菌率 = (对照区组织细菌计数 - 实验区组织细菌计数)/对照区组织细菌计数 × 100%。

1.4 细菌种类的确认

将培养出的细菌送 AMS 全自动微生物鉴定仪鉴定细菌种类。按照 VitekAMS 技术手册的要求制备细菌悬液,充填测试卡,封口后放入读数箱内自动分析。

1.5 对创面分离细菌进行体外药物敏感性试验

药敏试验采用药敏纸片法进行。用溶葡萄球菌酶 100 U/ml 和 10、20、40、80 倍比稀释浓度,对几种创面常见菌进行药物敏感性检测。根据抑菌环的大小判断药物敏感性。

1.6 创面和患者全身情况的观察

观察对照区和实验区创面肉芽组织有无特殊变化;并注意患者在使用溶葡萄球菌酶纱布前后有无全身性的反应,特别注意眼鼻黏膜是否有出血情况。

1.7 不良反应的观察

在使用溶葡萄球菌酶纱布前后注意观察生命体征、检测血尿常规以及肝功能,在使用溶葡萄球菌酶纱布前后,分别采血测定肝功、肾功(前 1 d、后 1、3、8 d):丙氨酸氨基转移酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、总胆红素(TBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、碱性磷酸酶(ALP)、血肌酐(Cr)及尿素氮(BUN);记录局部不良反应如皮肤灼痛、皮疹、水肿等刺激性和过敏性反应。

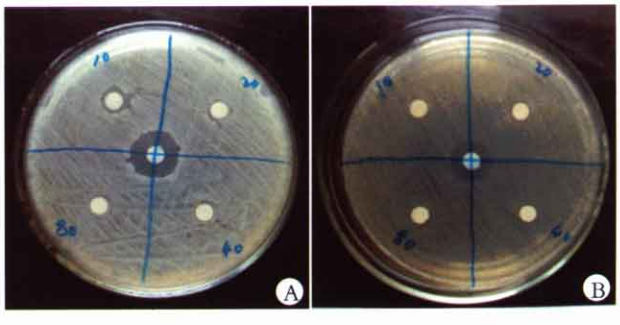
1.8 统计学分析

数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 8.0 统计软件,杀菌效果用配对资料 t 检验,生化指标用多元方差分析。

2 结果

2.1 溶葡萄球菌酶对几种肉芽创面常见菌的体外抗菌效果观察

根据抑菌环大小我们分别将体外抗菌效果判断为:抑菌环 >5 mm 为显效,2 ~ 5 mm 为有效,<2 mm 为弱效。从图 1 可以看出溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌试验都为显效,两者间比较溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌的抑菌效果更好。对铜绿假单孢菌的抑菌环约2 mm,我们将其判断为弱效。



A:金黄色葡萄菌;B:白色念珠菌

培养器中央溶葡萄球菌酶浓度为 100 U/ml,左上、右上、右下和左下分别为 10、20、40、80 倍稀释后的抗菌效果

图 1 溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的抑菌试验

2.2 溶葡萄球菌酶纱布对烧伤创面残留肉芽组织的抗菌效果分析

通过对烧伤残留创面肉芽组织中细菌定量分析结果表明,

使用溶葡萄球菌酶纱布 3 d 后，对烧伤创面残留肉芽组织中的金黄色葡萄球菌的含量有明显的抑制作用。对照区肉芽组织中细菌含量为（$2.077 \times 10^9 \pm 1.27 \times 10^9$）CFU/g，实验区肉芽组织中细菌含菌量为（$1.95 \times 10^7 \pm 1.1 \times 10^7$）CFU/g，杀菌率（89.2 ± 6.9）%。经过统计学分析（配对资料 t 检验），两区（组）间组织含菌量有非常显著的差异（$P < 0.01$）。

2.3　组织中分离细菌的确认

由于我们主要目的是观察溶葡萄球菌酶对烧伤创面残留肉芽组织中的金黄色葡萄球菌的抗菌效果，从我们观察的肉芽组织中分离出的细菌再次经 VitekAMS 全自动微生物分析仪检测，确认是金黄色葡萄球菌。

2.4　创面局部观察

使用溶葡萄球菌酶纱布后，患者局部创面肉芽组织未出现异常变化，但创面渗出物明显减少。实验区创面愈合有明显加快的趋势。

2.5　患者全身状况的观察

使用溶葡萄球菌酶纱布前后对比，患者生命体征平稳，未见出现明显异常波动。患者没有皮肤灼痛、局部刺激性、过敏等全身和局部不良反应。各项肝肾功能指标在使用溶葡萄球菌酶纱布前后经多元方差分析未见显著性差异。使用溶葡萄球菌酶纱布前、后（1、3 d）各时相点血生化各指标如 ALT、GGT、AST 、ALP 等无显著性差异（$P > 0.05$）。说明溶葡萄球菌酶对肝、肾功能没有明显影响。

3　讨论

溶葡萄球菌酶是一种经过人工基因重组并且来源于微生物的蛋白质，它不仅能溶解金黄色葡萄球菌[8]，而且能有效阻止生物体的免疫抑制[9]。国内外陆续有学者发现溶葡萄球菌酶能提高机体吞噬细胞的吞噬能力[10]，有潜在治疗各种感染[11]，促进创面的愈合的功能。

通过创面抗菌药物的应用减少烧伤创面局部组织中的细菌含量是提高创面愈合速度的最有效方法[12]。本研究使用溶葡萄球菌酶纱布，其主要有效成分是溶葡萄球菌酶。实验显示，溶葡萄球菌酶纱布连续使用 3 d 后，能杀死烧伤残余创面肉芽组织中 89.2% 的细菌。并在整个使用过程中未发现耐药菌株。溶葡萄球菌酶对金黄色葡萄球菌具有很强的杀灭能力。即使在常用浓度稀释 10 倍的情况下也有明显的抑菌环。证明溶葡萄球菌酶能有效减少肉芽组织中的细菌数量，从而提高了肉芽创面植皮的存活率，为加速创面愈合创造了条件。同时，杀菌纱布所含成分是生物酶类，使用后未见全身不良反应和过敏反应，对皮肤无刺激性，不引起疼痛，无眼周黏膜出血及皮肤出血。证明以溶葡萄球菌酶为主要药效成分的溶葡萄球菌酶纱布是控制中晚期烧伤创面金黄色葡萄球菌感染有效的局部用药。

让我们意外的是溶葡萄球菌酶对白色念珠菌也有明显的杀菌效果，抑菌环明显，但对其作用机制还不清楚，有必要去进一步研究。但我们在临床上可以考虑使用溶葡萄球菌酶制剂作为抗念珠菌的创面用药。在 3 种代表性细菌中，溶葡萄球菌酶对铜绿假单孢菌的抑菌作用最弱，但实验中仍能发现有抑菌环。根据以上实验观察，我们认为溶葡萄球菌酶是一种不仅仅是对金黄色葡萄球有效的杀菌谱比较广的蛋白，在临床上有广阔的应用前景。

参考文献：

[1] 李胜利，张婴元，吴菊芳，等. 葡萄球菌医院感染的调查研究[J]. 中华医院感染学杂志，1998，8(2)：65－67.

[2] 赵先颖，徐元宏，江晓平. 医院感染葡萄球菌菌种变迁与耐药性近况[J]. 中国微生态学杂志，2003，15(1)：40－41，46.

[3] 马　骢，郝秀红，蒋学兵，等. 2170 株革兰阳性球菌对临床常用抗菌药物的耐药性监测[J]. 中华医院感染学杂志，2005，15(7)：827－829.

[4] 王配合，彭毅志. 烧伤创面痂下活组织细菌定量培养与植皮存活率分析[J]. 中华烧伤杂志，2004，20(1)：45－46.

[5] 俞慧菊，康金凤，刘　瑛. 合理应用抗菌药物能减缓细菌耐药性产生[J]. 中国科技信息，2005，(12)：136，141.

[6] 郇京宁，黄青山，陆婉英，等. 外用 FE 复合酶消毒剂控制烧伤创面感染的临床观察[J]. 中华医院感染学杂志，1999，9(3)：167.

[7] 芮期义，王新为，欧阳川，等. Vitek 微生物分析仪测定传代的大肠杆菌生理生化变化[J]. 解放军预防医学杂志，1994，12(3)：196－198.

[8] SHAW L N，GOLONKA E，SZMYD G. Cytoplasmic control of premature activation of a secreted protease zymogen：deletion of staphostatin B (SspC) in Staphylococcus aureus 8325-4 yields a profound pleiotropic phenotype[J]. J Bacteriol，2005，187(5)：1751－1762.

[9] KOEL J L，MUTHAIYAN A，JAYASWAL R K，*et al*. Cell wall composition and decreased autolytic activity and lysostaphin susceptibility of glycopeptide－intermediate Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother，2004，48(10)：3749－3457.

[10] HUANG J，HAN Y，CHEN Y. Effect of lysostaphin on phagocyte function in burn mice[J]. Zhonghua Zheng Xing Shao Shang Wai Ke Za Zhi，2005，11(4)：255－257.

[11] KUSUMA C M，KOKAI KUN J F. Comparison of four methods for determining lysostaphin susceptibility of various strains of Staphylococcus aureus[J]. Antimicrob Agents Chemother，2005，49(8)：3256－3263.

[12] 黄跃生. 烧伤早期损害防治研究近况[J]. 第三军医大学学报，2003，25(18)：1593－1595.

（编辑　张大春）