

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2019.16.014

肺炎克雷伯菌耐药表型及分子分型特征分析*

熊流新¹, 陆丽苗¹, 梁启兰¹, 苏乐斌²

1. 广东省肇庆市第二人民医院检验科, 广东肇庆 526060; 2. 广东省肇庆市疾病预防控制中心微生物科, 广东肇庆 526060

摘要:目的 探讨肺炎克雷伯菌耐药表型及通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术分析其分子分型, 为完善肺炎克雷伯菌分子流行病学特征提供依据。方法 收集 2018 年 1—12 月肇庆市第二人民医院非重复分离的 51 株肺炎克雷伯菌为研究对象, 采用微量肉汤法进行药敏试验; 采用改良产碳青霉烯酶灭活试验(mCIM)检测 CRKP 表型; 采用 PFGE 进行分子分型, 建立 PFGE DNA 指纹图谱数据库, 并运用 Bionumerics 6.6 生物软件进行聚类分析。结果 51 株肺炎克雷伯菌根据耐药谱可以分为 4 个耐药表型, 其中产超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌(产 ESBLsKP)28 株(54.9%)、耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(CRKP)4 株(7.8%)、多重耐药肺炎克雷伯菌(MDRKP)9 株(17.7%)、高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP)10 株(19.6%)。PFGE 聚类分析结果显示, 51 株菌株间相似度为 47.8%~100.0%, 可分为 47 个 PFGE 型别, PFGE 型别相似度 $>85.0\%$ 共 10 株, 其中 I、II、III、IV 型具有 100.0% 相同 PFGE 图谱, 可以视为 4 个具有分子流行病学意义的单一克隆群。结论 肇庆市第二人民医院肺炎克雷伯菌耐药表型以产 ESBLsKP 为主, PFGE 分型呈多样性, 并存在院内散发感染风险, 需要注意菌株型别变异趋势。

关键词:肺炎克雷伯菌; 耐药表型; 脉冲场凝胶电泳; 改良产碳青霉烯酶灭活试验

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2019)16-2319-04

Analysis of drug-resistance phenotypes and molecular typing characteristics of *Klebsiella pneumoniae**

XIONG Liuxin¹, LU Limiao¹, LIANG Qilan¹, SU Lebin²

1. Department of Clinical Laboratory, Zhaoqing Municipal Second People's Hospital, Zhaoqing, Guangdong 526060, China; 2. Department of Microbiology, Zhaoqing Municipal Center for Disease Control and Prevention, Zhaoqing, Guangdong 526060, China

Abstract: **Objective** To investigate the drug resistance phenotypes of *Klebsiella pneumoniae* (KP) and analyze its molecular typing by using the pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) so as to provide a basis for perfecting the molecular epidemiological characteristics of KP. **Methods** Fifty-one strains of KP isolated from the Zhaoqing Municipal Second People's Hospital from January to December 2018 were selected as the research objects. The drug susceptibility test was performed by using microbroth dilution method (MIC). The CRKP phenotype was detected by adopting the modified carbapenem inactivation method (mCIM), and the molecular typing of KP was carried out by using PFGE and the PFGE DNA fingerprinting database was established, the clustering analysis was performed by using the Bionumerics 6.6 biologic software. **Results** Fifty-one strains of KP could be divided into 4 drug-resistant phenotypes according to the drug resistance spectrum, in which extended spectrum beta-lactamases KP (ESBLsKP) had 28 strains (54.9%), carbapenem resistant KP (CRKP) had 4 strains (7.8%), multidrug resistant KP (MDRKP) had 9 strains (17.7%), hypervirulent KP (HvKP) had 10 strains (19.6%). The PFGE clustering analysis result showed that the similarity of 51 strains was 47.8%—100.0%, and the 47 PFGE subtypes were identified, the PFGE genotype similarity $>85.0\%$, totaled 10 strains. Among them, type I, type II, type III and type IV had 100.0% the same PFGE maps, which could be regarded as four single clones with molecular epidemiological significance. **Conclusion** ESBLsKP is the main drug resistance phenotype in Zhaoqing Municipal Second People's Hospital. PFGE subtypes show diversity and have the risk of nosocomial sporadic infection. It is necessary to pay attention to the variation trend of strain types.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; drug-resistance phenotypes; pulsed-field gel electrophoresis; modified carbapenem inactivation method

* 基金项目: 广东省肇庆市科技创新指导类项目(180526154160909)。

作者简介: 熊流新, 男, 主管技师, 主要从事病原微生物分子致病机制研究。

肺炎克雷伯菌(KP)是院内感染重要的条件致病菌之一,可引起呼吸道、泌尿道及血流感染等^[1]。近年来产超广谱 β-内酰胺酶肺炎克雷伯菌(产 ESBLsKP)、耐碳青霉烯酶类肺炎克雷伯菌(CRKP)及多重耐药肺炎克雷伯菌(MDRKP)等不同耐药表型的 KP 在世界范围内发生流行性传播,临床可选择的抗菌药物极为有限^[2]。根据 2017 年中国细菌耐药监测网(CHINET)中国细菌耐药性检测报告显示,KP 对亚胺培南的耐药率从 2005 年的 3.0% 上升至 20.9%,而且 CRKP 在临床的分离率亦呈上升趋势^[3]。KP 除了耐药性强的特点外,其高毒力也引起临床的极大关注。高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP)主要感染健康人群,导致社区感染,具有高黏液性、高侵袭性、高致死性等特点,HvKP 合并 MDRKP 感染将给公共卫生防控和临床患者抗感染治疗带来极大挑战^[4-5]。本研究以肇庆市第二人民医院检验科微生物室分离的 51 株 KP 为研究对象,分析其耐药表型,并通过脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术分析其分子分型,以建立该院 KP DNA 指纹图谱数据库,为 KP 感染防控提供分子流行病学参考依据,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2018 年 1—12 月肇庆市第二人民医院检验科临床标本分离的非重复 KP 51 株,标本来自痰液、脓液、分泌物、血液等。以 KP ATCC700603 作为质控菌株,大肠埃希菌 ATCC25922、大肠埃希菌 ATCC35218 均购自广东省临床检验中心。

1.2 仪器与试剂 Biofosun 微生物鉴定药敏分析系统及其配套革兰阴性菌药敏检测板购自上海星佰生物技术有限公司;VITEK2 compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统购自法国生物梅里埃公司;LB 肉汤、TSB 肉汤、血平板、M-H 琼脂培养基购自广州迪景公司;抗菌药敏纸片购自 OXOID 公司;PCR 仪、CHEF Mapper™ XA 脉冲场电泳仪、CHEMIDOC XRS+ 成像系统购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定及药敏试验 将保存菌株复苏后转种至平板,分离单个菌落后采用 Biofosun 微生物鉴定及药敏分析系统进行初次细菌鉴定,采用 VITEK2 compact 全自动细菌鉴定及药敏分析系统 GNI 卡进行二次细菌鉴定。采用 Biofosun 微生物鉴定及药敏分析系统配套的革兰阴性菌药敏检测板(货号: A-3009XS)进行微量肉汤法(MIC)药敏试验,根据美国临床和实验室标准协会(CLSI)M100-S27 文件进行操作并判断其耐药情况。产 ESBLsKP 表型确证试验按标准纸片扩散法进行,同时使用头孢他啶(30 μg)、头孢他啶/克拉维酸(30 μg)、头孢噻肟(30 μg)、头孢噻肟/克拉维酸(30 μg),使用上述药物后任何一个在加克拉维酸后形成的抑菌圈直径与不加克拉维酸形成的抑菌圈直径相比,增加值≥5 mm 判断为阳性。

1.3.2 黏液拉丝试验 用接种环轻触血平板上过夜培养的新鲜菌落并向外牵拉,重复牵拉 2 次,若 2 次均有黏液丝形成,且长度>5 mm 判断为阳性,该菌株为 HvKP。

1.3.3 CRKP 表型检测 参考文献[6]进行改良产碳青霉烯酶灭活试验(mCIM 试验)及结果判断。

1.3.4 PFGE 分型及聚类分析 参照中国细菌性传染病分子分型实验室网络 KP 的 PFGE 分子分型方法进行试验。采用 Xba I 限制性内切酶,设置电压 6.0 V/cm,脉冲参数 6~36 s,电泳 18.5 h。EB 染色 20 min,采用纯水脱色 3 次,每次持续 30 min。然后用 Gel Doc EQ 拍摄图像。采用 Bionumerics6.6 生物软件识别 PFGE 电泳条带图,运用非加权组平均法进行聚类分析。PFGE 带型>85% 为相同菌株,50%~85% 为相似菌株,<50% 为流行病学不相关菌株。

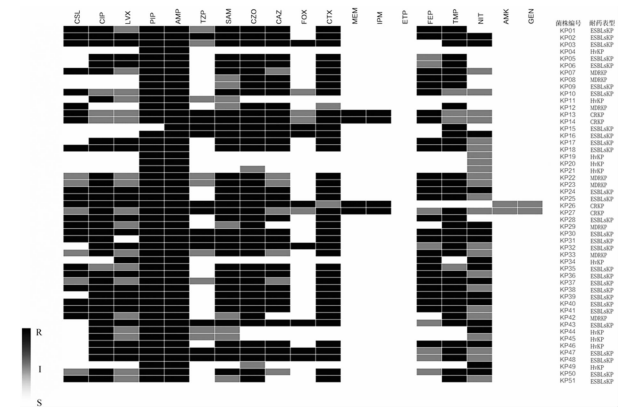
2 结果

2.1 KP 的临床科室及标本来源分布 51 株 KP 来源于 12 个不同临床科室,其中排名前 3 的科室为 ICU、普外科、泌尿外科。51 株 KP 标本分别来自痰液 31 株(60.8%)、尿液 12 株(23.5%),还有的来自胆汁、血液、宫颈分泌物及脓液。见表 1。

表 1 51 株 KP 的科室分布

科室	菌株(n)	构成比(%)	科室	菌株(n)	构成比(%)
ICU	11	21.6	神经外科	4	7.8
普外科	7	13.7	妇科	3	5.9
泌尿外科	7	13.7	肿瘤一区	2	2.9
呼吸科	6	11.8	产科	1	2.0
新生儿科	4	7.8	普儿科	1	2.0
内分泌血液科	4	7.8	神经内科	1	2.0

2.2 51 株 KP 药敏试验结果分析 51 株 KP 根据耐药谱特征可以分为 4 个耐药表型,其中主要为产 ESBLsKP 28 株(54.9%)、HvKP 10 株(19.6%)、MDRKP 9 株(17.7%)、CRKP 4 株(7.8%)。KP 对 18 种抗菌药物的耐药谱见图 1,标本具体来源信息见图 2。ESBLsKP 主要分离于痰液标本,占 64.3%(18/28),对多种抗菌药物有较高的耐药性,对亚胺培南、美罗培南、厄他培南、阿米卡星及庆大霉素敏感性较好。HvKP 主要分离于痰液标本,占 50.0%(5/10),尿液及宫颈分泌物也有分布,对所检测的抗菌药物敏感性较好。MDRKP 主要分离于痰液标本,占 44.4%(4/9),对 3 种或 3 种以上抗菌药物耐药。本研究共分离 4 株 CRKP,对包括亚胺培南和美罗培南在内的大多数抗菌药物高度耐药。对亚胺培南及美罗培南耐药的 4 株菌株(KP13、KP14、KP26、KP27)进行 mCIM 试验,结果均为阳性。KP13、KP14 来源于 ICU 患者痰液标本,KP26 来源于 ICU 患者血液标本,KP27 来源于肿瘤一区的尿液标本。



注:18 种抗菌药物分别为头孢哌酮/舒巴坦(CSL)、环丙沙星(CIP)、左氧氟沙星(LVX)、哌拉西林(PIP)、哌拉西林/他唑巴坦(TZP)、氨苄西林/舒巴坦(SAM)、头孢唑林(CZO)、头孢他啶(CAZ)、头孢西丁(FOX)、头孢噻肟(CTX)、美罗培南(MEM)、亚胺培南(IPM)、厄他培南(ETP)、头孢吡肟(FEP)、甲氧苄啶(TMP)、呋喃妥因(NIT)、阿米卡星(AMK)、庆大霉素(GEN);黑色区域代表耐药、灰色区域代表中介、白色区域代表敏感

图 1 51 株 KP 耐药谱

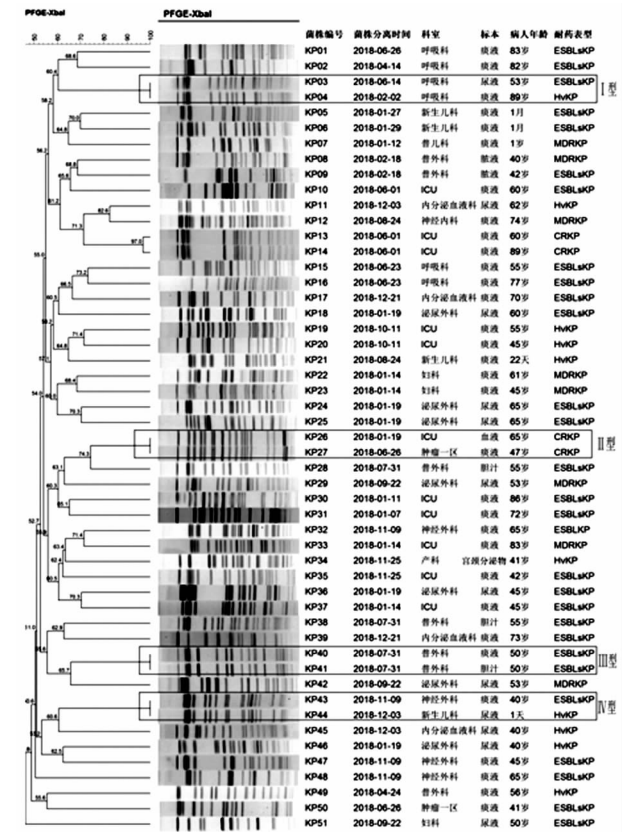


图 2 51 株 KP PFGE 聚类分析

2.3 KP 分离株的 PFGE 分子分型 51 株 KP 采用 Xba I 限制性内切酶进行 PFGE 分型,结果显示菌株间相似度为 47.8%~100.0%,可分为 47 个型别,PFGE DNA 指纹图谱表现出明显的多样性。PFGE 型别相似度 100.0%的可视分子流行病学同一克隆群。从图 2 可见,PFGE 型别相似度>85.0%共 10 株,其中 I、II、III、IV 型具有 100.0%相同的 PFGE 图谱,可以视为 4 个具有分子流行病学意义的单一克隆群,其中 I 型为 KP03(产 ESBLsKP)、KP04(HvKP),

II 型为 KP26(CRKP)、KP27(CRKP),III 型为 KP40(产 ESBLsKP)、KP41(产 ESBLsKP),IV 型为 KP43(产 ESBLsKP)、KP44(HvKP)。KP13(CRKP)、KP14(CRKP)相似度为 97.0%。PFGE 型别相似度在 50.0%~85.0%的有 40 株,4 种耐药表型均有分布,主要为产 ESBLsKP,占 57.5%(23/40),PFGE 型别相似度<50.0%有 1 株,为 KP51(产 ESBLsKP)。

3 讨论

KP 是院内感染最主要的条件致病菌,容易导致院内低免疫力人群、长期使用抗菌药物的患者出现机会性感染。主要引起健康人群社区性感染的 HvKP 可以引起肝脓肿、肺炎、脑膜炎等疾病,其高侵袭性、高致死性的特点引起临床的高度关注^[7-8]。本研究 51 株 KP 根据耐药谱特征、mCIM 试验及黏液拉丝试验结果将其分为产 ESBLsKP、CRKP、MDRKP 和 HvKP 4 个耐药表型。本研究数据显示,51 株 KP 主要来源于 ICU,占 21.6%,主要标本类型为痰液,占 60.8%,这与苏珊珊等^[9]研究报道一致,说明 KP 主要导致呼吸道相关的感染,ICU 为高发区域。KP 的 4 种耐药表型以产 ESBLsKP(54.9%)为主,ESBLsKP 耐药表型的菌株主要携带 TEM、SHV、非 TEM 及非 SHV 基因型 β-内酰胺酶,临床上可以根据头孢菌素类、碳青霉烯类及 β-内酰胺酶抑制复合物类抗菌药物敏感性来选择有针对性的抗菌药物^[10]。碳青霉烯类抗菌药物是临床治疗革兰阴性杆菌感染的重要药物,根据徐安等^[11]研究的 2005—2014 年 CHINET 克雷伯菌属耐药性监测结果显示,近 10 年间肠杆菌科细菌对碳青霉烯类药物的耐药性逐年上升,其中 KP 在肠杆菌科细菌中耐药性最高。药敏试验结果显示(图 1),10 株 HvKP 对 18 种抗菌药物较为敏感外,其余的几个耐药表型(产 ESBLsKP、CRKP、MDRKP)均存在比较强的耐药性,与苏乐斌等^[12]研究结果一致,表明引起院内感染的 KP 流行株大部分为耐药性强的菌株。

CHEN 等^[13]研究表明,KP 耐药菌株流行播散的重要原因之一是克隆播散。PFGE 对大片段 DNA 的检测具有高分辨力、高重复性及高稳定性的特点,是目前细菌分子分型的金标准^[14]。本研究通过 Xba I 限制性内切酶将 KP 染色体 DNA 酶切为大小不同的 DNA 片段后进行 PFGE 分子特征分析。不同来源的 KP 产生不同的 PFGE 型别,对基因组进行差异性分析以追溯感染的源头,建立肇庆市第二人民医院 KP DNA 指纹图谱库,这对 KP 院内感染防控具有重要意义。PFGE 分型结果显示,菌株间相似度为 47.8%~100.0%,可分为 47 个型别,具有明显的多样性。I、II、III、IV 型具有 100.0%相同的 PFGE 图谱,其中 I 型为 KP03(产 ESBLsKP)、KP04(HvKP),在不同时间分离于同一科室(呼吸科),从分子角度视为其来自于同一克隆,两种不同的耐药表型可能因为菌株在

进化变异的过程中并未影响到 Xba I 限制性内切酶位点;Ⅱ型为 KP26(CRKP)、KP27(CRKP),在不同时间分离于不同科室,提示可能存在科室间的流行传播,由耐药基因长期在宿主体内表达造成;Ⅲ型为 KP40(产 ESBLsKP)、KP41(产 ESBLsKP),在同一时间分离于同一科室(普外科)且耐药表型相同,提示可能存在同一感染来源;Ⅳ型为 KP43(产 ESBLsKP)、KP44(HvKP),在相近时间分离于不同的科室,提示可能存在科室间的流行传播。KP13(CRKP)、KP14(CRKP)PFGE 型别相似度为 97.0%且耐药表型相同,亲缘关系十分密切,提示可能存在同一感染来源。不同时间段分离的 KP 归属同一 PFGE 图谱(同一克隆来源),菌株的耐药元件可以通过流行菌株的克隆传播或者通过质粒等方式进行传播,耐药性逐渐增强,可引起散发甚至是暴发流行。

综上所述,肇庆市第二人民医院 KP 耐药表型以产 ESBLsKP 为主,PFGE 分型呈多样性,发现 4 个具有分子流行病学意义的单一克隆群(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ型),需要注意菌株型别变异趋势。

参考文献

- [1] TZOUVELEKIS L, MARKOGIANNAKIS A, PSICHOGIOU M, et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions[J]. Clin Microbiol Rev, 2012, 25(4): 682-688.
- [2] INVERARITY D, KILGOUR E, DUNN C, et al. Screening haematology patients for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Infect Prev, 2014, 15(2): 50-56.
- [3] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.
- [4] 魏丹丹, 李喜红, 王莲慧, 等. 血液分离高黏液表型肺炎克雷伯菌的毒力基因检测及生物膜形成测定[J]. 中国感染

与化疗杂志, 2016, 16(5): 622-626.

- [5] 吴翰欣, 丁家伟, 高凌, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌的毒力机制研究进展[J]. 生物技术通讯, 2018, 6(1): 119-122.
- [6] 马玉兰, 宋文杰, 李继红, 等. mCIM 与 eCIM 筛选肠杆菌科细菌碳青霉烯酶的效果评价[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(9): 650-654.
- [7] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.
- [8] KONG Q, BEANAN J M, OLSON R, et al. Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of *Klebsiella pneumoniae* does not enhance serum resistance or survival in an in vivo abscess model[J]. Virulence, 2012, 3(3): 309-318.
- [9] 苏珊珊, 宫雪, 张吉生, 等. 重症监护室流行耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及同源性分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(5): 66-72.
- [10] 张晶晶, 谢永富, 黄印启, 等. 超广谱 β -内酰胺酶肺炎克雷伯菌底物筛选与耐药性及耐药基因分型研究[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 12(7): 661-664.
- [11] 徐安, 卓超, 苏丹虹, 等. 2005—2014 年 CHINET 克雷伯菌属细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(3): 267-274.
- [12] 苏乐斌, 李柏生, 谭海芳, 等. 广东省肇庆市肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性与 MLST 分型研究[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(2): 260-265.
- [13] CHEN L, MATHEMA B, CHAVDA K D, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding[J]. Trends Microbiol, 2014, 22(12): 686-696.
- [14] 谭海芳, 苏乐斌, 朱颖梅, 等. 肇庆市副溶血性弧菌血清型、毒力基因和脉冲场凝胶电泳分子分型研究[J]. 实用预防医学, 2018, 12(8): 929-933.

(收稿日期: 2018-12-26 修回日期: 2019-04-12)

(上接第 2318 页)

- [5] 辛荣传. 新生儿溶血病三项试验在临床中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(6): 680-681.
- [6] 王茂玲, 林海容, 贺国风, 等. IgG ABO 型抗体效价与 ABO 新生儿溶血病的相关性研究[J]. 贵州医药, 2015, 39(6): 552-553.
- [7] 蔡忠鹤, 遇红梅, 刘铁梅. 孕妇血型 IgG 抗体效价与新生儿溶血病发病率关系的分析[J]. 中国实验诊断学, 2015, 19(4): 629-631.
- [8] 魏寿忠, 康晓珍, 林桂花, 等. 3 160 例高胆红素血症新生儿溶血病实验室检测结果分析[J]. 临床血液学杂志(输血与检验), 2017, 30(2): 279-281.
- [9] 李小红, 程磊, 黄红莉, 等. 430 例新生儿溶血病实验室检测结果分析与报告[J]. 中国输血杂志, 2013, 26(5): 472-474.
- [10] 刘小谷. 新生儿溶血三项检测结果 680 例分析[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(7): 1076-1077.
- [11] 郭莹莹, 霍姿含, 王震, 等. 1 350 例新生儿溶血三项试验

的血清学检测分析[J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(9): 1357-1359.

- [12] 李军, 周勇, 胡月圆, 等. 新生儿溶血病血清学变化特征分析[J]. 中国新生儿科杂志, 2015, 30(2): 108-111.
- [13] 刘达庄. 免疫血液学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 224-225.
- [14] BRUMIT M C, STUBBS J R. Conventional tube agglutination with poly-ethylene glycol versus Red Cell Affinity Column Technology (RE-ACT): a comparison of antibody detection methods[J]. Ann Clin Lab Sci, 2002, 32(2): 155-158.
- [15] 曾德理, 周文娟, 曾惠琼, 等. 探讨提高新生儿 ABO 溶血病抗体释放试验阳性的方法[J]. 大家健康, 2014, 8(11): 8.
- [16] 徐艳, 文永, 张绍基. Rh 新生儿溶血病换血方案的选择[J]. 现代医药卫生, 2015, 31(17): 2632-2633.

(收稿日期: 2019-01-06 修回日期: 2019-03-10)