

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2017.08.001

· 论 著 ·

患者及相关环境分离 CRKP 的耐药谱与同源性

杨竹兰¹, 张震², 刘智勇¹, 吴昊¹, 张波¹

(1 第三军医大学附属西南医院, 重庆 400038; 2 重庆市人民医院, 重庆 400014)

[摘要] **目的** 了解某医疗机构耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)感染患者临床分离株与环境分离株的同源性。**方法** 收集该院 1 例患者分离的 CRKP 与该患者周围环境中检出的 4 例肺炎克雷伯菌,测定 5 株菌对临床上常用抗菌药物的敏感性,利用改良 Hodge 试验和 CIM(Carbapenem Inactivation Method)试验检测 5 株菌产碳青霉烯酶情况,采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)对其进行同源性分析。**结果** 药敏试验结果显示,5 株肺炎克雷伯菌(1 株来自患者,4 株来自于患者所在的病房环境,分离自护工手、溶液瓶口、升降扶手、床栏杆)除对头霉素类、氨基糖苷类抗生素的药敏结果不一致外,对其他各类抗菌药物均表现为耐药。改良 Hodge 试验和 CIM 试验证实 5 株菌均产碳青霉烯酶;PFGE 结果显示,病房溶液瓶口、床栏杆、病床升降扶手同患者标本分离的 CRKP 电泳图谱一致,为同一菌株,而护工手同患者标本分离的 CRKP 电泳图谱有 2 条条带的差异,其菌株间有相近的关系。**结论** 患者及其周围环境检出同一种 CRKP,应严格执行医院感染控制制度,隔离感染患者,加强环境的清洁与消毒,避免医院感染暴发。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;碳青霉烯酶类抗生素;脉冲场凝胶电泳;同源性分析

[中图分类号] R181.3⁺2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2017)08-0693-05

Antimicrobial resistance profile and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients and related surroundings

YANG Zhu-lan¹, ZHANG Zhen², LIU Zhi-yong¹, WU Hao¹, ZHANG Bo¹ (1 Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China; 2 Chongqing People's Hospital, Chongqing 400014, China)

[Abstract] **Objective** To understand the homology of clinical isolates from patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) infection and isolates from environment in a medical institution. **Methods** One CRKP strain isolated from a patient in this hospital and 4 strains of *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) isolated from patient's surroundings were collected, susceptibility of 5 strains to commonly used antimicrobial agents was detected, production of carbapenems in 5 strains were detected by modified Hodge testing and carbapenem inactivation method (CIM), homology analysis was performed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Results** Antimicrobial susceptibility testing results showed that 5 strains of *K. pneumoniae* (1 from patient, 4 from the patient's ward surroundings, including hands of nursing aides, solution bottle opening, handle for lifting and dropping bed, and bedrail) were all resistant to other antimicrobial agents except to cephamycin and aminoglycosides. The modified Hodge testing and CIM confirmed that 5 strains all produced carbapenemases; PFGE results showed that electrophoretogram of CRKP isolated from solution bottle opening of ward, bedrail, and handle for lifting and dropping bed were the same as CRKP isolated from patient, while electrophoretogram of CRKP isolated from hands of nursing aides had 2 different bands, there was a close relationship between the strains. **Conclusion** The same type of CRKP were isolated from patient and his surroundings, it is necessary to implement healthcare-associated infec-

[收稿日期] 2017-01-24

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 71373280);第三军医大学临床创新基金项目(SWH2013LC08, SWH2014LC31)

[作者简介] 杨竹兰(1990-),女(苗族),贵州省凯里市人,检验技师,主要从事医疗机构相关性感染研究。

[通信作者] 张波 E-mail: zhangbocq@aliyun.com

tion(HAI) control system, isolate infected patient, and strengthen environmental cleaning and disinfection, so as to avoid the outbreak of HAI.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems; pulsed-field gel electrophoresis; homology analysis

[Chin J Infect Control, 2017, 16(8): 693-697]

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, K. pn)是医院和社区获得性感染的重要肠杆菌科病原菌,广泛分布于自然界,存在于土壤和水中,人和动物肠道内更常见。碳青霉烯类抗生素是目前治疗肠杆菌科细菌,尤其是产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)和 AmpC 酶等多重耐药菌引起的严重感染最有效的抗菌药物之一^[1]。近年来,随着此类抗生素的广泛应用,临床逐渐出现了耐碳青霉烯类抗生素的肠杆菌科细菌,特别是耐碳青霉烯类抗生素肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的报道逐年增多,涉及的国家 and 区域越来越广,所引起的医疗机构相关性感染(healthcare-associated infection, HAI)暴发流行逐年递增,给临床抗该菌感染治疗和医疗机构相关性感染控制带来极大的挑战^[2-3]。目前,脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)仍然是病原菌流行病学调查和分子分型的金标准^[4],通过分子分型确定菌株间流行病学相关性,对预防和监测肺炎克雷伯菌引起的医疗机构相关性感染具有积极作用。本研究采用 PFGE 技术,对医疗机构相关性感染患者临床分离株与该患者所住病房环境中分离的肺炎克雷伯菌进行同源性分析,探讨患者病原菌与其周围环境分离病原菌的关系,追踪医院感染来源,明确传播途径,为减少医院感染的发生提供理论依据,为其他医疗机构医院感染管理科工作人员控制医院感染提供参考案例。

1 对象与方法

1.1 菌株来源 患者标本分离的 CRKP 来源于本院检验科微生物室,环境来源的 4 株 CRKP 来源于本院医院感染管理科。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、金黄色葡萄球菌 ATCC 25923、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA-1705 和 ATCC BAA-1706,均购于中国工业微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统及革兰阴性杆菌鉴定卡、革兰阴性杆菌药敏卡购于法国 Bio Merieux 公司,脉冲场凝胶电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,溶菌酶购自 Sigma

公司,蛋白酶 K 购自 Roche 公司, Apa I 限制性内切酶购自 TOYOBO 公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 本院医院感染管理科通过实时监控系统及检验科微生物检验报告得知,某科室 1 例患者多次检出 CRKP。为预防和控制 CRKP 医院感染暴发,医院感染管理科于该患者连续 3 次分离 CRKP 后开展医院感染调查,对患者周边环境进行了工作状态下的微生物采样(此时距该患者第一次分离 CRKP 仅一周时间),共采样 17 份标本,采样后微生物培养严格参照《医疗机构消毒技术规范》(WS/T 367-2012)^[5]及《全国临床检验操作规程》^[6]进行。

1.3.2 菌株鉴定和药敏试验 所有菌株均由 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析系统进行鉴定及药敏试验,药敏判断标准及质控按照 2016 年版美国临床实验室标准化协会(CLSI)标准^[7]执行。

1.3.3 改良 Hodge 试验 根据 2016 年版 CLSI 推荐,将 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌标准菌株 ATCC 25922 菌液稀释 10 倍后均匀涂布在 MH 平皿上,中间贴上 10 μ g/片厄他培南的纸片,将受试菌株以厄他培南纸片为起点,沿离心方向划线,35 $^{\circ}$ C 培养过夜,抑菌圈内呈现矢状者为阳性。以肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC BAA 1705 为阳性对照,以肺炎克雷伯菌 ATCC BAA 1706 为阴性对照。

1.3.4 CIM(carbapenem inactivation method) 试验 参考文献^[8],用 10 μ L 接种环刮取要检测细菌的菌落至满环,加入 400 μ L 的蒸馏水中,混匀后放入含量为 10 μ g 的美罗培南药敏纸片,35 $^{\circ}$ C 温育至少 2 h,在 MH 药敏平皿上均匀涂布 0.5 麦氏单位的大肠埃希菌标准菌株 ATCC 25922,将温育好的美罗培南药敏纸片贴到平皿板上,35 $^{\circ}$ C 温育至少 6 h,观察结果。如果药敏纸片周围无抑菌圈,则为产碳青霉烯酶,如果药敏纸片周围有抑菌圈,则为阴性。

1.3.5 PFGE 操作步骤参考文献^[9-10]描述的方法并略加改进。菌种复活后,挑取新鲜单个菌落用 3 mL CSB 溶液制备成约 4.0 麦氏单位的菌悬液,取 200 μ L 菌悬液于 50 $^{\circ}$ C 水浴中与 1 g/dL 低熔点

琼脂糖凝胶等体积混合,静置制成凝胶块。凝固后将凝胶块投入到 2 mL 含有 200 μ L 溶菌酶 (20 mg/mL) 的 CLB 溶液中,37 $^{\circ}$ C 120 r/min 干热振荡过夜,吸去 CLB 溶液,加入含 20 μ L 蛋白酶 K (20 mg/mL) 的 2 mL CLB 溶液中 55 $^{\circ}$ C 120 r/min 干热振荡过夜,吸去 CLB 溶液,用 50 $^{\circ}$ C TE 溶液洗胶 5 次,每次 50 $^{\circ}$ C,120 r/min 15 min。最后将胶块置于 TE 溶液中保存于 4 $^{\circ}$ C 备用。切下 2~3 mm 大小胶块,浸入 150 μ L 酶切体系中(其中含 Xba I 酶 30 U),37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切过夜。电泳参数为 6 V/cm,脉冲时间 5~20 s,14 $^{\circ}$ C,120 度夹角,电泳时间 15 h。电泳结束后,将凝胶取出,用 GeneGreen 液染色 30 min,去离子水脱色,凝胶成像系统观察并拍照。

1.4 结果判定 参考《实用临床微生物学检验与图谱》^[11]及文献^[12];PFGE 图谱一致说明为相同菌株,1~3 条带有差异说明菌株间有相近关系,且只有单基因的改变;4~6 条带有差异说明菌株间可能有相近关系,表示有两个独立基因的差异;如果菌株间有 6 条或更多条带差异,说明有 3 个或更多基因变化,被视为无相关性。

2 结果

2.1 临床资料 患者男性,74 岁,因左侧顶枕叶脑出血入院,入院前 2 年有过两次开颅手术史,术后生活基本能自理。本次入院后第 5 天出现低热,胸片提示肺部感染,行气管插管切开术,同时送检合格痰培养,检出鲍曼不动杆菌。之后每隔 2 d 送检 1 次痰培养,第 14 天痰培养检出 CRKP(菌株缩写:K. pn 1)。

2.2 患者病房环境微生物采样结果 医院感染管理科工作人员从检验科微生物报告中发现该患者 3 次分离出 CPKP,遂对此菌株进行了重新鉴定和药敏试验,结果与检验科微生物室报告结果相同。感染管理科工作人员对该患者病房环境多位点进行了工作状态下的微生物采样,培养结果显示,患者周围环境带菌量较高,除呼吸机 Savina 3 接口以及护

士手带菌量在合格范围(≤ 10 CFU/cm²)之内,其他环境采样标本含菌量均远 > 10 CFU/cm²。对其中的常见病原菌进行鉴定,发现流量表、柜子表面环境中检出鲍曼不动杆菌,护工手、溶液瓶口、升降扶手、床栏杆均检出 CRKP。具体环境各位点采样微生物检测结果见表 1。

2.3 病原菌药物敏感试验结果 医院感染管理科工作人员对分离的 5 株肺炎克雷伯菌(1 株来自患者,4 株来自于患者所在的病房环境)进行药敏试验,结果显示,5 株肺炎克雷伯菌除对头霉素类、氨基糖苷类抗生素的药敏结果不一致外,对其他各类抗菌药物均表现为耐药。见表 2。

2.4 改良 Hodge 试验 5 株肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验均呈阳性,证明 5 株肺炎克雷伯菌均产生碳青霉烯酶。见图 1。

2.5 CIM 试验结果 5 株肺炎克雷伯菌的抑菌圈均为 6 mm,证明 5 株肺炎克雷伯菌均产碳青霉烯酶,水解美罗培南,使大肠埃希菌 ATCC 25922 对美罗培南呈现耐药结果。见图 2。

表 1 患者病房环境中微生物采样菌落计数及肺炎克雷伯菌检出情况

Table 1 Colony forming units and isolation of *K. pneumoniae* from patient's ward surrounding

采样部位	菌落数 (CFU/cm ²)	分离菌株	菌株缩写
呼吸机 Savina 3 接口	0.00	-	-
护士手	4.67	-	-
输液牌	36.40	-	-
隔帘	37.20	-	-
流量表	62.50	鲍曼不动杆菌	-
保洁人员手	63.33	-	-
保洁阿姨手	77.67	-	-
监护仪按钮	86.00	-	-
病历夹	96.00	-	-
床头栏	146.80	-	-
呼吸机 Savina 3 按钮	182.00	-	-
柜子表面	192.70	鲍曼不动杆菌	-
柜子把手	1 060.00	-	-
溶液瓶口	1 060.00	CRKP	K. pn 2
床栏杆	$> 5 000.00$	CRKP	K. pn 3
护工手	172.33	CRKP	K. pn 4
升降扶手	$> 5 000.00$	CRKP	K. pn 5

表 2 5 株肺炎克雷伯菌对抗菌药物的 MIC 值及药敏试验结果

Table 2 Minimal inhibitory concentration values and antimicrobial susceptibility testing results of 5 strains of *K. pneumoniae*

抗菌药物	K. pn 1		K. pn 2		K. pn 3		K. pn 4		K. pn 5	
	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药敏 结果	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	药敏 结果
氨苄西林/舒巴坦	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R	≥ 32	R
哌拉西林/他唑巴坦	≥ 128	R	≥ 128	R	≥ 128	R	≥ 128	R	≥ 128	R
头孢唑林	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
头孢他啶	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
头孢曲松	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
头孢吡肟	16	R	16	R	32	R	32	R	16	R
头孢替坦	16	R	16	S	16	S	16	S	16	S
氟康唑	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R	≥ 64	R
亚胺培南	8	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R	8	R
厄他培南	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R
阿米卡星	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S	≤ 2	S
庆大霉素	≥ 16	R	≥ 16	R	≥ 16	R	≤ 1	S	≥ 16	R
妥布霉素	8	I	8	I	8	I	≤ 1	S	8	I
环丙沙星	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R	≥ 4	R
左氧氟沙星	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R	≥ 8	R
呋喃妥因	≥ 512	R	256	R	256	R	≥ 512	R	256	R
复方磺胺甲噁唑	80	R	80	R	≥ 320	R	≤ 20	S	≥ 320	R

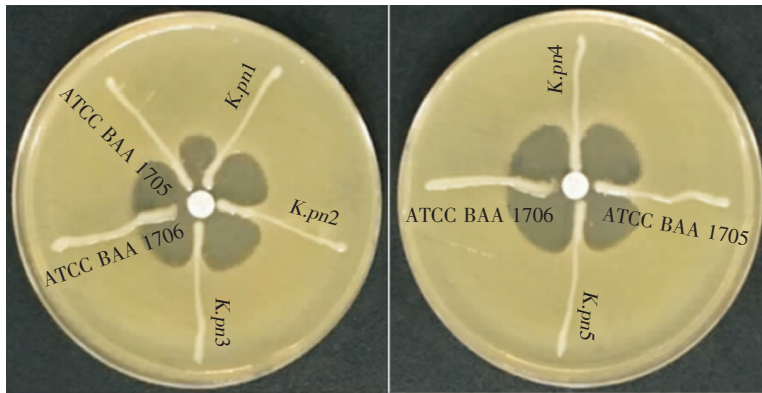


图 1 5 株肺炎克雷伯菌改良 Hodge 试验阳性

Figure 1 Positive results of modified Hodge testing of 5 strains of *K. pneumoniae*

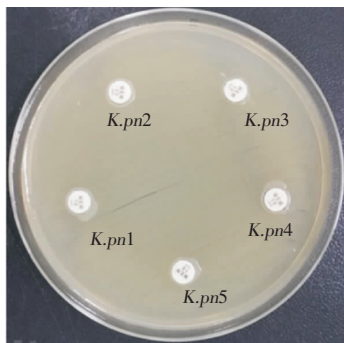
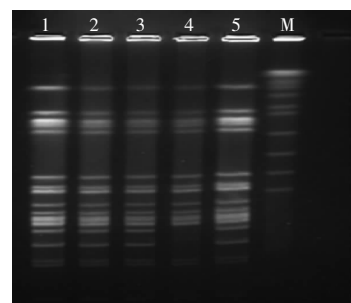


图 2 5 株肺炎克雷伯菌 CIM 试验阳性结果

Figure 2 Positive results of CIM of 5 strains of *K. pneumoniae*

肺炎克雷伯菌电泳图谱一致,为同一菌株,而护工手同患者标本分离的肺炎克雷伯菌电泳图谱有 2 条条带的差异,其菌株间有相近的关系。见图 3。



M: 为 Marker,泳道 1—5 分别为 *K. pn* 1—*K. pn* 5

图 3 5 株肺炎克雷伯菌 PFGE 图

Figure 3 PFGE results of 5 strains of *K. pneumoniae*

2.6 PFGE 结果 根据 PFGE 图谱判读标准,病房溶液瓶口、床栏杆、病床升降扶手同患者标本分离的

3 讨论

肺炎克雷伯菌已成为医院感染和免疫缺陷患者感染的重要机会致病菌,可通过患者之间交叉感染或呼吸机等医疗器械传播^[13];碳青霉烯类抗生素是目前治疗肺炎克雷伯菌感染最有效的抗生素^[14],随着此类药物在临床上的广泛应用,对其耐药的肺炎克雷伯菌日益增多。本研究中从患者痰标本多次检出了耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌,为预防和控制该菌株引起的医院感染暴发,医院感染管理科立刻对患者周边环境进行环境卫生学采样监测,从周围环境中分离出4株CRKP。经改良Hodge试验和CIM试验证实,本组肺炎克雷伯菌产碳青霉烯酶,与文献报道我国泛耐药肠杆菌科细菌耐药机制主要为产生碳青霉烯酶的报告一致^[15]。为进一步明确菌株的同源关系,我们采用目前病原菌分子分型的“金标准”PFGE对其进行分子分型,结果证实5株肺炎克雷伯菌有高度同源性,证明患者分离CRKP极大可能来自于医院环境,或许与医务人员未严格执行相关医院感染控制制度有关。

据世界卫生组织(World Health Organization)报告,在中低收入的国家,医疗机构相关性感染发生率在5.7%~19.1%^[16],可见全球医疗机构相关性感染控制形式仍然严峻,我国作为发展中的中等收入大国,医疗机构相关性感染的控制任务仍然任重道远。本文作者在日常工作中通过实时监测系统发现CRKP,并及时关注和追踪,通过对患者和医务人员密切接触的环境进行采样,寻找患者CRKP可能的来源,并对患者及时进行隔离,从源头上阻止了医疗机构相关性感染暴发的可能,为其他医疗机构医院感染管理科工作人员在日常工作中及时发现多重耐药,尤其是泛耐药菌,控制医疗机构相关性感染的暴发提供了一个很好的案例。

[参考文献]

[1] 刘瑛,俞静,张良.同一患者不同部位的4株肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗生素耐药机制研究和同源性分析[J].中国感染与化疗杂志,2013,13(6):460-464.

[2] 胡瑛,文飞球,梁静.新生儿重症监护病房医院感染肺炎克雷

伯菌耐药性与同源性分析[J].儿科科学杂志,2013,19(11):7-10.

- [3] 陈杨,俞松山,胡庆丰.69株碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药基因检测分析[J].中国卫生产业,2013,(10):28-30.
- [4] Hallin M, Deplano A, Denis O, et al. Validation of pulsed-field gel electrophoresis and spa typing for long-term, nationwide epidemiological surveillance studies of *Staphylococcus aureus* infections[J]. J Clin Microbiol, 2007, 45(1): 127-133.
- [5] 中华人民共和国卫生部.医疗机构消毒技术规范 WS/T 367[S].北京,2012.
- [6] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:736-753.
- [7] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing[J]. CLSI, 2016, M100-S26.
- [8] van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods[J]. Plos One, 2015, 10(3): e0123690.
- [9] 毛璞,傅威,杨淳.ICU分离的多重耐药鲍曼不动杆菌PFGE分型及I型整合子介导的耐药研究[J].中国感染控制杂志,2012,11(6):417-421.
- [10] 龚文胜,刘厚明,何林.肺炎克雷伯菌25株的PFGE基因分型和药敏表型的比较[J].实用医学杂志,2005,21(11):1103-1105.
- [11] 陈东科.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011.
- [12] 李永丽,应春妹.耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌分子流行病学及耐药机制研究[J].上海交通大学学报(医学版),2012,32(11):1430-1435.
- [13] 王敏.医院临床分离的肺炎克雷伯菌耐药现状探讨[J].中华医院感染学杂志,2010,20(14):2156-2157.
- [14] 叶智颖,吕火祥.耐碳青霉烯类抗生素的肺炎克雷伯菌KPC酶检测分析[G].中华医学会第四次全国感染性疾病中青年学术会议论文汇编,2011.
- [15] Chinese XDR Consensus Working Group, Guan X, He L, et al. Laboratory diagnosis, clinical management and infection control of the infections caused by extensively drug-resistant Gram-negative bacilli: a Chinese consensus statement[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(Suppl 1): S15-S25.
- [16] World Health Organization. Healthcare-associated infections. Fact sheet [EB/OL]. (2017-1) [2017-2]. http://www.who.int/gpsc/country_work/gpsc_ccisc_fact_sheet_en.pdf.

(本文编辑:左双燕)