

DOI:10.3969/j.issn.1671-9638.2015.12.010

· 论 著 ·

## 重症监护病房耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌同源性分析

潘慧琼, 袁雪峰, 周敏, 厉晓玲, 李露池

(长沙市第一医院, 湖南长沙 410005)

**[摘要]** 目的 了解重症监护病房(ICU)分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的药敏结果及同源性。方法 对 2014 年 4—5 月某院 ICU 患者和环境分离的 11 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌进行药敏试验, 以及采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)扩增法进行同源性分析。结果 11 株肺炎克雷伯菌 8 株分离自患者, 3 株分离自环境, 标本分布以痰为主(6 株, 占 54.55%)。药敏试验结果显示: 10 株(90.91%)对环丙沙星耐药; 11 株对复方磺胺甲噁唑均敏感, 对亚胺培南均为中介, 对其余抗菌药物耐药率均为 100%。11 株肺炎克雷伯菌均有 3 个条带, 可以分为 2 型: I 型 10 株(1~5 号、7~11 号菌株), II 型 1 株(6 号菌株)。结论 医院 ICU 肺炎克雷伯菌耐药严重, ICU 患者和环境分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌为同一克隆株。加强 ICU 环境清洁、消毒及监测, 有利于减少和及时预警多重耐药菌, 降低医院感染。

**[关键词]** 肺炎克雷伯菌; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 同源性; 重症监护病房; 医院感染

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2 R378 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)12-0827-03

## Homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit

PAN Hui-qiong, YUAN Xue-feng, ZHOU Min, LI Xiao-ling, LI Lu-chi (The First Hospital of Changsha, Changsha 410005, China)

**[Abstract]** **Objective** To understand antimicrobial resistance and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) from an intensive care unit (ICU). **Methods** 11 CRKP isolates from patients and environment of an ICU in a hospital were performed antimicrobial susceptibility testing, the homology of CRKP was analyzed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) method. **Results** Of 11 CRKP isolates, 8 were from patients, and 3 from environment, the main specimen was sputum ( $n = 6, 54.55\%$ ). Antimicrobial susceptibility testing results revealed that 10 (90.91%) CRKP isolates were resistant to ciprofloxacin; 11 isolates were susceptible to compound sulfamethoxazole, intermediate to imipenem, and resistant to other antimicrobial agents (100%). All 11 CRKP isolates had 3 bands, and were divided into two types: (type I,  $n = 10$ ; type II,  $n = 1$ ). **Conclusion** Antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* in ICU is serious, CRKP isolated from ICU patients and environment are of the same clone. Cleaning, disinfection, and monitoring of ICU environment should be strengthened, which is helpful for reducing, timely warning of multidrug-resistant organisms, and reducing healthcare-associated infection.

**[Key words]** *Klebsiella pneumoniae*; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; homology; intensive care unit; healthcare-associated infection

[Chin Infect Control, 2015, 14(12): 827-829]

医院重症监护病房(intensive care unit, ICU)是救治危重患者的场所, 患者常进行各种侵入性操作, 接受大量抗菌药物治疗, 伴有严重基础疾病, 免

疫功能低下, 常导致医院感染的发生, 成为多重耐药菌产生和传播的高发区域。肺炎克雷伯菌是最常见的医院感染病原菌, 可引起下呼吸道、泌尿生殖道、

[收稿日期] 2015-01-22

[作者简介] 潘慧琼(1966-), 女(汉族), 湖南省岳阳市人, 副主任医师, 主要从事医院感染管理研究。

[通信作者] 潘慧琼 E-mail: 747378759@qq.com

血液、伤口及颅内等部位感染。随着碳青霉烯类抗生素的大量使用,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌逐渐增多<sup>[1]</sup>,已成为全球性问题,ICU 多重耐药菌管理面临着严峻挑战。本研究对某一时间段内某院 ICU 患者和环境分离的 11 株肺炎克雷伯菌进行药敏检测和同源性分析,探讨多重耐药菌感染患者病房环境消毒和环境监测的必要性。

## 1 材料与方 法

1.1 菌株来源 收集 2014 年 4—5 月某院 ICU 患者和环境分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌。

1.2 仪器与试剂 主要包括 Vitek-32 型全自动微生物分析仪及配套鉴定卡(法国生物梅里埃公司)、Real-Time PCR(美国 Applied Biosystems)、DYY-II 型电泳仪(北京君意东方设备有限公司)、数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)、DNA 提取试剂盒(北京天根生物科技有限公司)、琼脂糖(GENE COMPANY LED)。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 细菌鉴定采用法国生物梅里埃公司 ATB 细菌鉴定仪和相应的鉴定卡。抗菌药物敏感试验为微量肉汤法,按美国临床实验室标准化协会(CLSI)2012 年版标准操作及判断结果,抗菌药物包括哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、替卡西林/克拉维酸、头孢噻吩、头孢拉啶、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢西丁、亚胺培南、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、奈替米星、环丙沙星、复方磺胺甲噁唑。

1.4 同源性分析 DNA 的提取:取 -20℃ 保存的肺炎克雷伯菌菌种接种于血平板,转种 3 次,挑取单个菌落接种于肉汤培养基。取 3 mL 培养液,离心后采用缓冲液和蛋白酶 K 处理,吸附柱进行过滤,用洗脱液对吸附柱进行洗脱,12 000 r/min 离心 3 min,提取 DNA 置 -20℃ 保存。基因同源性分析:采用随机扩增多态性 DNA(RAPD)扩增 DNA 模板,引物序列为(5'-3'):5-AAGTAAGTGACT-GGGGTGAGCG-3<sup>[2]</sup>,引物均由上海生工生物工程有限公司合成。总反应体系 25 μL:7.5 μL 灭菌双蒸水,12.5 μL 2×Master MIX,2 μL 引物 ERIC 2,模板 3 μL。RAPD 反应条件<sup>[2]</sup>:94℃ 预变性 1 min,94℃ 变性 1 min,36℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 2 min,共 35 个循环,72℃ 最后延伸 5 min。将 RAPD 产物置于 2% 的琼脂糖凝胶中进行电泳;每孔加 DNA 产物 7 μL。电泳条件为电压 70 V,电流 60 mA,时间 120 min。

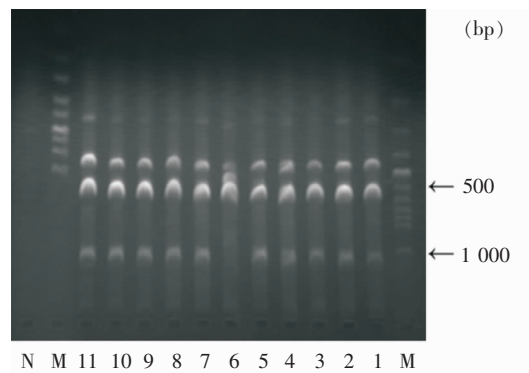
1.5 DNA 同源性判定标准 DNA 条带位置完全相同者,为同一型;相差一条者,密切相关,为亚型;不满足上述条件者为不同基因型<sup>[2]</sup>。

## 2 结果

2.1 一般资料 2014 年 4—5 月该院 ICU 共检出耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 11 株,其中 8 株来源于 ICU 患者送检标本,3 株来源于 ICU 环境采样。标本分布为痰(6 株),清洁后呼吸机出口(2 株),血、分泌物、呼吸机面板各 1 株。

2.2 药敏结果 11 株肺炎克雷伯菌对哌拉西林、哌拉西林/他唑巴坦、阿莫西林、阿莫西林/克拉维酸、替卡西林/克拉维酸、头孢噻吩、头孢拉啶、头孢呋辛、头孢噻肟、头孢吡肟、头孢西丁、美罗培南、阿米卡星、庆大霉素、妥布霉素、奈替米星均 100% 耐药;对复方磺胺甲噁唑均敏感,对亚胺培南均为中介。10 株对环丙沙星耐药,耐药率 90.91%。

2.3 细菌同源性鉴定 电泳结果显示,11 株肺炎克雷伯菌均有 3 个条带,可以分为 2 型:I 型 10 株(1~5 号、7~11 号菌株),II 型 1 株(6 号菌株)。见图 1。



M: marker;1—11 泳道:11 株碳青霉烯类肺炎克雷伯菌标本;N:阴性对照

图 1 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 RAPD 电泳图

Figure 1 RAPD electrophoresis map of CRKP

## 3 讨论

肺炎克雷伯菌作为一种条件致病菌所导致的感染在细菌感染学疾病中的所占比重日渐增加,Ama-zian 等<sup>[3]</sup>对地中海地区 27 所医院调查显示,肺炎克雷伯菌占医院感染的 9.20%;我国肺炎克雷伯菌是医院感染的主要致病菌之一,占 9.03%<sup>[4]</sup>。随着 β-

内酰胺类、喹诺酮类、氨基糖苷类和碳青霉烯类等抗菌药物的广泛使用,多重耐药菌迅速出现,多重耐药菌的分离率逐年上升。同一克隆株在医院内的播散容易导致多重耐药菌的暴发流行,国外曾报道一起因多重耐药肺炎克雷伯菌引起的医院感染暴发流行,感染患者病死率高达 40%<sup>[5]</sup>。

预防与控制多重耐药菌的传播和流行是迫切需要解决的问题。菌株基因同源性分析对医院感染暴发流行的来源,以及传播途径的追踪具有重要意义。常用的同源性分析方法有质粒指纹图谱分析、限制性核酸内切酶分析、RAPD、脉冲场凝胶电泳(PFGE)、重复序列分析<sup>[6-7]</sup>。RAPD 具有快速、简便、经济的特点,有助于查找医院感染源,切断感染途径,是一种值得推广的方法。

本研究药敏试验结果显示,11 株耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药谱基本相同,对大部分抗菌药物均耐药,说明医院 ICU 肺炎克雷伯菌耐药严重,药敏结果相同表明菌株可能来自同一个克隆株。基因同源性分析显示,除 6 号痰标本分离株外,其余 7 株临床分离株与 3 株环境标本分离株基因型相同,证实 10 株菌均来自同一克隆菌株。药敏和基因分析结果表明,肺炎克雷伯菌能从患者扩散到周围环境,并且在环境中存活,潜在可能通过环境途径进行传播,导致肺炎克雷伯菌在 ICU 内传播。因此,有必要加强对环境的清洁与消毒,减少环境中多重耐药菌;定期对环境卫生进行采样分析,对环境消毒效果进行评价;对多重耐药菌的暴发进行预警,有效降低多重耐药菌在 ICU 内的传播。研究<sup>[8]</sup>报道,加强环境监测,使其卫生清洁质量保持在较高水平,可有效防控 ICU 多重耐药菌医院感染,降低医院感染发病率。

多重耐药菌感染增加患者疾病的治疗难度,影响抢救成功率和预后。环境因素作为外源性危险因素应重点控制,通过对环境进行及时的清洁与消毒,有效避免了因交叉感染造成的耐药菌株传播,对遏

止医院感染的蔓延能发挥重要作用。通过采取有效的消毒隔离措施,可最大程度减少医院感染的发生。常规环境卫生学检测是对消毒效果的监测,针对性检测是有重点的过程监控,有利于找出工作中的薄弱环节或存在的隐患,是防止医院感染暴发流行有效的监测方式。

#### [参 考 文 献]

- [1] 肖素香. 外科重症监护病房医院感染原因分析及预防对策[J]. 中华医院感染学杂志, 2008, 18(2):178-180.
- [2] Bou G, Cerveró G, Domínguez MA, et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem-hydrolyzing enzyme; high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of beta-lactamases[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38: 3299-3305.
- [3] Amazian K, Rossello J, Castella A, et al. Prevalence of nosocomial infections in 27 hospitals in the Mediterranean region [J]. East Mediterr Health, 2010, 16(10):1070-1078.
- [4] 文细毛, 任南, 吴安华, 等. 全国医院感染监控网医院感染病原菌分布及变化趋势[J]. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(2): 350-355.
- [5] Lithgow AE, Kilalang C. Outbreak of nosocomial sepsis in the Special Care Nursery at Port Moresby General Hospital due to multiresistant *Klebsiella pneumoniae*; high impact on mortality[J]. PNG Med J, 2009, 52(1-2):28.
- [6] Bergeron MG, Oullette M. Preventing antibiotic resistance using rapid DNA-based diagnostic tests[J]. Infect Control Hosp Epidemiol, 1998, 19(8):560-564.
- [7] 李丹, 吴安华, 冯丽, 等. 重症监护室患者与环境分离的多重耐药不动杆菌属细菌同源性研究[J]. 中国感染控制杂志, 2008, 7(5):306-309.
- [8] 陈惠清, 林晨曦, 周春莲. 环境卫生质量对预防 ICU 多重耐药菌医院感染作用的研究[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(5): 493-497.

(本文编辑:陈玉华)