

8 株医院血流感染肺炎克雷伯菌的 PFGE 分型

罗璐¹, 宋诗铎¹, 吴晓妹¹, 王俊¹, 胡志东²

(1 天津医科大学第二医院感染性疾病研究所, 天津 300211; 2 天津医科大学总医院, 天津 300211)

[摘要] 目的 应用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术对某医院同一外科病房临床分离的 8 株肺炎克雷伯菌进行同源性分析, 为医院感染控制提供依据。方法 对此 8 株肺炎克雷伯菌, 采用微量肉汤稀释法和 K-B 法进行药物敏感试验, 并以 PFGE 技术进行基因分型。结果 药物敏感试验结果显示, 除菌株 Kp1 外, 菌株 Kp2 等其他 7 株肺炎克雷伯菌对 11 种抗菌药物具有相同的药敏谱, 且为多重耐药菌; PFGE 分析亦显示此 7 株菌为同一谱型。结论 此外科病房临床分离的 8 株肺炎克雷伯菌中有 7 株来源于同一克隆株, 提示可能是一次医院感染暴发流行。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; 血流感染; 医院感染; 脉冲场凝胶电泳; 微生物敏感性试验; 基因型; 同源性

[中图分类号] R378.99⁺6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2011)05-0348-03

PFGE typing of 8 *Klebsiella pneumoniae* strains causing nosocomial bloodstream infections

LUO Lu¹, SONG Shi-duo¹, WU Xiao-mei¹, WANG Jun¹, HU Zhi-dong² (1 Tianjin Institute of Infectious Diseases, Second Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211, China; 2 Tianjin General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300211)

[Abstract] **Objective** To analyze 8 strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from the surgical ward in a hospital by pulsed-field gel electrophoresis(PFGE), so as to provide scientific evidence for the control of nosocomial infection. **Methods** Antimicrobial susceptibility test of *Klebsiella pneumoniae* was performed by micro-broth dilution and Kirby-Bauer method, genotyping was performed with PFGE. **Results** Antimicrobial susceptibility test showed that except the strain Kp1, 7 clinical strains were the same sensitivity to 11 antimicrobial agents, and they were all multi-drug resistant; PFGE showed that 7 strains were the same pattern. **Conclusion** Seven of 8 *Klebsiella pneumoniae* strains came from the same clone, which suggesting it might be an outbreak of nosocomial infection.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; bloodstream infection; nosocomial infection; pulsed-field gel electrophoresis; antimicrobial susceptibility test; genotype; homology

[Chin Infect Control, 2011, 10(5): 348-350]

肺炎克雷伯菌是可引起人类各种感染性疾病的常见条件致病菌, 也是引起医院感染的重要病原菌之一, 常常引起医院感染的暴发流行^[1]。脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)是医院感染监测的有力工具。本研究采用 PFGE 技术对某医院外科病房 5 例感染患者分离的 8 株肺炎克雷伯菌进行分型, 为医院获得性肺炎克雷伯菌感染的局部流行提供诊断依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 试验菌株为 2010 年 7 月 16—28 日自某医院外科病房 5 例感染患者的临床标本中分离, 采用常规方法及 VITEK 仪器鉴定的 8 株肺炎克雷伯菌, 其临床资料见表 1。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922, 为本实验室保存。

1.2 试剂与仪器 M-H 琼脂培养基及氨苄西林(AMP)、头孢唑林(CFZ)、庆大霉素(GEN)、头孢哌酮(CFP)、环丙沙星(CIP)、头孢曲松(CRO)、阿莫

[收稿日期] 2011-03-30

[作者简介] 罗璐(1984-), 女(汉族), 宁夏固原市人, 研究生, 主要从事细菌耐药性研究。

[通讯作者] 宋诗铎 E-mail: shiduosong1@yahoo.com.cn

西林/克拉维酸(AMC)、美罗培南(MEM)、哌拉西林(PFP)、复方磺胺甲噁唑(SXT)、氨基曲南(ATM) 11 种抗菌药物,为中国药品生物制品检定所标准品。XbaI 酶购自大连宝生物公司。低熔点琼脂糖、PFGE 级琼脂糖均为 Bio-Rad 公司产品。蛋白酶 K 为上海生工生物工程技术有限公司产品。细菌鉴定仪为法国生物梅里埃公司的 VITEK 细菌鉴定系统。脉冲场凝胶电泳仪为 Bio-Rad 公司的 CHEF MAPPER XA 脉冲场凝胶电泳仪,凝胶成像系统为 Bio-Rad 公司的 GelDoc XR 凝胶成像系统。

1.3 药物敏感试验 采用微量肉汤稀释法和 K-B 法测定菌株对 11 种抗菌药物的最低抑菌浓度(MIC)值及抑菌圈大小。判定标准参照美国临床实验室标准化研究所(CLSI)2009 版标准^[2]执行。

1.4 PFGE 方法 参照文献^[1,3]的方法并略加改进:挑取新鲜单个菌落至 2.5 mL 生理盐水中至 4 麦氏单位,取 1 mL 菌液离心 1 min,弃上清集菌。1 mL 细胞悬浮液悬菌洗涤,离心 3 min,洗 3 次。最

后 200 μ L 蛋白酶 K 溶液,54 $^{\circ}$ C 水浴轻摇过夜。弃液,加 500 μ L 50 $^{\circ}$ C 预热的去离子水,50 $^{\circ}$ C 水浴轻摇 10 min,洗 2 次,重复用 TE 洗 3 次,每次 15 min。将样本胶块取出,切下约 2 mm 胶块,浸入含有 XbaI 的 150 μ L 酶切体系中,置 37 $^{\circ}$ C 水浴中酶切过夜。将样本胶块塞入 PFGE 级琼脂糖凝胶中进行电泳,电泳参数为:电压 6 V/cm,温度 14 $^{\circ}$ C,夹角 120 $^{\circ}$,时间 22 h。最后用溴化乙锭染色,VersaDoc 凝胶成像系统读胶分析。

1.5 PFGE 分型标准 按照 Tenover 等^[4]提出的分型标准,(1)同一株:酶切图谱间有同样的条带数,且相应条带大小相同,被认为是同一型(主流型);(2)紧密相关型:由于突变、插入、缺失或倒置的遗传改变导致 1~3 条条带有差异,定为亚型;(3)可能相关:带型中有 4~6 条条带有差异,被认为是不同型别;(4)不相关:有 7 条或更多的条带有差异,认为在流行病学上无相关性。

表 1 8 株肺炎克雷伯菌的临床资料

Table 1 Clinical data of 8 *Klebsiella pneumoniae* strains

Strains	Patients' code	Admission date	Diagnosis	Doctors' code	Diagnosis of infection	Specimen	Collection time
Kp1	A	Apr. 27	Pancreatic cancer	a	Bloodstream infection	Drainage of abdominal cavity	Jul. 16
Kp2	A	Apr. 27	Pancreatic cancer	a	Bloodstream infection	Sputum	Jul. 16
Kp3	A	Apr. 27	Pancreatic cancer	a	Bloodstream infection	Blood	Jul. 16
Kp4	B	Jun. 24	Carcinoma of head of pancreas	a	Bloodstream infection	Blood	Jul. 19
Kp5	C	Jun. 30	Pancreaticoduodenectomy	a	Bloodstream infection	Blood	Jul. 19
Kp6	A	Apr. 27	Pancreatic cancer	a	Bloodstream infection	Blood	Jul. 27
Kp7	D	Jul. 16	Carcinoma of duodenal papilla	a	Bloodstream infection	Central venous catheter	Jul. 27
Kp8	E	Jul. 26	Colon cancer after surgery	b	Bloodstream infection	Blood	Jul. 28

2 结果

2.1 药物敏感试验 8 株肺炎克雷伯菌中,菌株 Kp1 与其他 7 株肺炎克雷伯菌的药敏谱不尽相同。

菌株 Kp1 对 CFP、CRO、GEN 敏感,对 PFP 耐药;菌株 Kp2 等其他 7 株肺炎克雷伯菌均为多重耐药菌,且具有一致的药敏谱,对 CFP、CRO、GEN 耐药,对 PFP 敏感。药物敏感试验结果详见表 2。

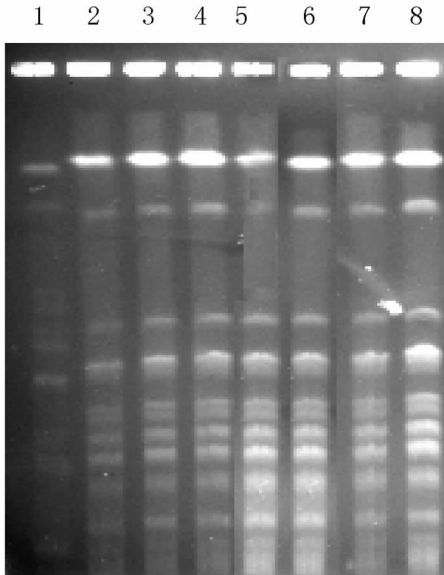
表 2 8 株肺炎克雷伯菌对 11 种抗菌药物敏感试验结果

Table 2 Antimicrobial susceptibility test results of 8 *Klebsiella pneumoniae* strains to 11 antimicrobial agents

Strains	AMP	CFZ	SXT	CFP	CRO	GEN	PFP	CIP	AMC	MEM	ATM
Kp1	R	R	R	S	S	S	R	S	S	S	S
Kp2	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp3	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp4	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp5	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp6	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp7	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
Kp8	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S
ATCC 25922	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

S: Sensitive; R: Resistant

2.2 PFGE 分析 8 株肺炎克雷伯菌临床株染色体 DNA 经 XbaI 酶酶切后进行 PFGE,均产生了 11~15 条片段,结果见图 1。其中菌株 Kp2 等 7 株肺炎克雷伯菌谱型完全一致,为同一型;菌株 Kp1 与其他 7 株肺炎克雷伯菌有 7 条条带以上的差异,与其他 7 株菌无相关性,独自为另一型。



Lane 1—8;Kp1—8

图 1 8 株肺炎克雷伯菌 PFGE 图谱

Figure 1 PFGE results of 8 *Klebsiella pneumoniae* strains

3 讨论

肺炎克雷伯菌是常见的医院感染革兰阴性菌,为条件致病菌,储菌库为肠道。当患者机体免疫力低下时,易引起定植部位发生变化,加之在住院期间接受药物治疗和各种侵袭性操作,在医院环境中容易引起医院感染。为确定感染是否为医院感染,追踪感染源,了解传播途径,有必要对分离菌株进行流行病学研究。靠细菌药敏谱表型分型具有一定的临床意义,但有时细菌药敏谱较复杂,确定其来源一致具有局限性。近年来,分子生物学技术为分型提供了依据。PFGE 是目前国内外流行病学研究广泛接受的方法之一,它可以用于大分子 DNA 的分离,其分辨范围达到 10 Mb。通过分型可以鉴定比较菌株是否一致,对于细菌性疾病的监测、传染源的追踪、传播途径的调查和识别等有着非常重要的意义。

本实验研究的 8 株肺炎克雷伯菌分别分离自外科同一病房 7 月 16—28 日半个月期间 5 例感染患

者的血液、腹腔引流液和痰标本。药物敏感试验显示,8 株肺炎克雷伯菌中, Kp2 等 7 株菌对 11 种抗菌药物具有相同的药敏谱,PFGE 亦显示了这 7 株菌具有相同的 PFGE 谱型,此次感染可能为医院感染暴发。7 月 16—27 日分离自患者 A 的 4 株肺炎克雷伯菌中,来自腹腔引流液的 Kp1 与其他 3 株肺炎克雷伯菌药敏谱不同,并且其 PFGE 图谱显示无明显相关,为不同的肺炎克雷伯菌克隆株感染。分离自患者 A 7 月 16 日和 17 日的 2 株肺炎克雷伯菌 Kp2 和 Kp3 与分离自 10 d 后 7 月 27 日的 Kp6 具有相同的药敏谱型和 PFGE 谱型,说明患者 A 的感染可能没有治愈。根据 5 例患者感染的时间先后及 PFGE 图谱分析发现,患者 A 最先感染,且与随后感染的 B、C、D、E 4 例患者分离出的肺炎克雷伯菌同源性一致,患者 A 可能为此次医院感染暴发的传染源,通过外源途径感染传染给 B、C、D、E 4 例患者。通过流行病学调查,对医务人员手、隔离衣进行细菌培养,未分离出肺炎克雷伯菌。A、B、C、D、E 5 例患者均为手术患者,因此医务人员应严格遵守消毒隔离制度,对医疗器械彻底消毒,各种操作按规程严格执行,尤其是手卫生,以避免医院感染暴发流行。

本研究显示,药物敏感试验对初步判断医院感染暴发有一定价值,尤其适用于基层医院。而 PFGE 分型重复性好、分辨率高、结果稳定^[5],能在细菌基因组很庞大的情况下,尽可能反映较多的变异信息。PFGE 是一种稳定、准确的基因分型方法,适合用于医院感染的同源性分析。

[参考文献]

- [1] 金春光,林辉,徐景野,等. 脉冲场凝胶电泳对铜绿假单胞菌的分子检测与相关性分析[J]. 中华微生物杂志, 2007, 19(2): 148 - 150.
- [2] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-Nineteenth informational supplement, M02-A10 and M07-A8[M]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009:34 - 38.
- [3] 龚文胜,刘厚明,何林,等. 肺炎克雷伯菌 25 株的 PFGE 基因分型和药敏表型的比较分析[J]. 实用医学杂志, 2005, 21(10): 1103 - 1105.
- [4] Tenover F C, Arbeit R D, Goering R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(9): 2233 - 2239.
- [5] 叶杨芹,马佳毓,付英梅,等. 脉冲凝胶电泳技术在肺炎克雷伯菌分型中的应用[J]. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(4): 499 - 500.