

多重耐药肺炎克雷伯菌耐药表型及医院感染控制研究^{*}

谢军花¹ 刘五高¹ 金晶¹

[摘要] 目的:研究临床分离的多重耐药肺炎克雷伯菌(MDRKP)的耐药表型及同源性,为有效预防及控制医院感染提供依据。方法:收集 44 株 MDRKP 临床分离株,用 MIC 法进行药敏试验;采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)技术对菌株进行分子分型,建立医院 PFGE 指纹图谱库,运用 Bionumerics 生物分析软件对菌株之间的亲缘关系及同源性进行分析。结果:44 株 MDRKP 对 16 种临床常见抗菌药物呈广泛耐药,其中对氨苄西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林他和喹诺酮类抗生素 100% 耐药,以呼吸科和 ICU 占比最高(分别占 27.2% 和 25.0%)。PFGE 分子分型共分为 16 个谱型,优势型分别为 K12 和 K13 型,菌株间相似性系数达 83.0% 以上。结论:同病区菌株呈高度同源性分布,且可能存在院内的同源暴发,应加强细菌耐药性监测和医院感染的监控。

[关键词] 多重耐药肺炎克雷伯菌;脉冲场凝胶电泳;医院感染

doi:10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.12.010

[中图分类号] R378 **[文献标志码]** A

Drug resistance phenotype and nosocomial infection control of multiple drug resistance *Klebsiella pneumoniae*

XIE Junhua LIU Wugao JIN Jing

(Longquan People's Hospital, Lishui, 323700, China)

Abstract Objective: To investigate the drug-resistant phenotype and homology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* (MDRKP) isolated from hospital as so to provide reference for the effective control of nosocomial infections. **Method:** A total of 44 clinical isolates of MDRKP were collected, and the drug sensitivity test was carried out by MIC method. The molecular typing of the strains was carried out by pulsed field gel electrophoresis (PFGE), and the PFGE fingerprint Library of the hospital was established. The Bionumerics genetic analysis software was used to analyze the phylogenetic relationship and homology between the strains. **Result:** 44 strains of MDRKP were extensively resistant to 16 common clinical antibiotics. PFGE molecular typing was divided into 16 spectrum types, the dominant types were K12 and K13, and the similarity coefficient between strains was more than 83.0%. **Conclusion:** The strains in the same ward are highly homologous, and there may be homologous outbreaks in the hospital. The surveillance of bacterial resistance and nosocomial infection should be strengthened.

Key words multi-drug resistant klebsiella pneumoniae; pulsed field gel electrophoresis; nosocomial infection

肺炎克雷伯菌是临床分离及医院感染的重要致病菌之一,随着 β -内酰胺类及碳青霉稀类等广谱抗菌素的广泛使用,其呈现出严重的多重耐药性,对亚胺培南和美罗培南的耐药率分别从 2005 年的 3.0% 和 2.9% 上升到了 2017 年的 20.9% 和 24.0%^[1],耐药率上升幅度高达 8 倍。另外因肺炎

克雷伯菌能在环境中存活,而 30% 的医院感染是通过医护人员的手或环境来传播的^[2]。因此,肺炎克雷伯菌每年的分离率亦呈稳步上升趋势,并迅速上升呈现出散播现象^[1,3]。明确肺炎克雷伯菌在病区环境中的传播特点和定植状态,对于感染的预防控制至关重要。本研究为了解医院肺炎克雷伯菌在环境中流行特点及菌株传播情况,选择了经常分离出肺炎克雷伯菌的 16 个科室 44 株多重耐药肺炎克雷伯菌(multi-drug resistant klebsiella pneu-

^{*}基金项目:龙泉市自然科学基金建设项目[No:龙财行(2018)385 号,KJ 社会发展(007)]

¹龙泉市人民医院(浙江丽水,323700)

- [2] 严明钧,刘蕴华.冰冻浓缩血小板对出血性疾病的临床疗效观察[J].医药论坛杂志,2011,32(10):176—177.
- [3] Nakastoev IM, Grachev AE, Gemdzhian EG, et al. Clinical efficiency of transfusion of pathogen-inactivated platelet concentrates[J]. Ter Arkh, 2013, 85: 77—80.
- [4] 伍燕,吴燕,邢益森.血小板输注有效剂量的调查及分析[J].实用临床医药杂志,2012,6(19):173—174.
- [5] 陈乐丹,卢晓远,李建道,等.温州地区机采血小板人群基本情况调查分析[J].临床血液学杂志,2018,

31(2):134—136.

- [6] Darrell J. Triulzi. AABB contributions to plasma safety[J]. Transfusion, 2012, 52: 5S-8S.
- [7] 苏蔓,李茵,赵倩,等.937 人份石家庄地区血小板捐献者基因资料库的建立[J].临床血液学杂志,2018, 31(8):629—632.
- [8] 王爱红,毛雄伟,王孝芳.临床输血管理持续改进后医院相关输血质量评价[J].临床血液学杂志,2017, 30(6):456—458.

(收稿日期:2019-03-26)

moniae,MDRKP)作为研究对象,采用脉冲场凝胶电泳技术(pulse field gel electrophoresis,PFGE)进行分离菌株的同源性鉴定,追踪其传播途径,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株鉴定及药敏试验

收集 2018-03—2019-02 入住我院 ICU、呼吸科、感染科和血液科等 16 个科室感染患者的血、尿、痰和脓液等标本培养。分离出的细菌使用 BD 凤凰微生物鉴定和药敏试验。将耐三类或三类以上抗生素的 MDRKP^[4]放-80℃低温保存。

1.2 PFGE 及聚类分析

参照文献[5]进行实验操作,将-80℃保存的细菌培养过夜,制成 4 麦氏浊度菌悬液与 1%琼脂糖凝胶(SKG):1%十二烷基硫酸钠(SDS)混合,制成琼脂糖胶,将制备好的胶块放入加有蛋白酶 K 的细菌裂解液中消化裂解,54℃、130 r/min、孵育 3 h。Xba I 37℃酶切 24 h。制备 1%琼脂糖,冷却后上样,进行电泳 20 h。电泳完毕后胶块用 EB 染色 30 min,用水脱色 4 h 后拍照,PFGE 成像结果应用 Bionumerics 软件包进行检测分析。

1.3 判断标准

按照 Tenover 等^[6]的判断标准,Dice 相关系数 $\geq 80.00\%$ 可认为是相关的基因型,即提示为同源菌株,其谱型以 K1、K2、K3……进行编号。

1.4 统计学方法

采用 Excel 录入数据,计数资料采用例数或百分比表示。

2 结果

2.1 MDRKP 临床分布

研究期间共分离出 MDRKP 44 株。其中呼吸科和 ICU 分离到最多,占 52.2%,表明有局部流行现象。其他菌株来自另外的 14 个科室,表明其有呈散发状态,见表 1。

2.2 药敏试验结果

44 株 MDRKP 对氨苄西林、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林和左氧氟沙星等均 100.0%耐药,除对阿米卡星耐药率较低和多粘菌素均敏感外,对其余抗菌药物的耐药率均 $>88.0\%$,见表 2。

2.3 PFGE 及聚类结果

44 株 MDRKP 通过 PFGE 共得到 16 个谱型,其中以 K12 为优势谱型,其次为 K13、K4 和 K7,见表 3。通过聚类分析,发现同一菌株可在 ICU、呼吸科、神经监护中心、普外三病区、全科医疗科、血液科和康复医学科间传播。同源性 $\geq 80.00\%$ 在 ICU 为 58.3%(7/12),呼吸科为 38.5%(5/13),总 44 株菌为 79.5(35/44)。

表 1 MDRKP 检出科室分布及构成比

科室	菌株数	构成比/%
呼吸科	11	25.0
ICU	12	27.2
感染科	2	4.5
骨科	1	2.3
急诊科	1	2.3
康复医学科	4	9.1
泌尿外科	2	4.5
普外科	1	2.3
全科医学科	2	4.5
神经内科	3	6.8
脑外科	1	2.3
消化内科	1	2.3
血液科	3	6.8

表 2 44 株 MDRKP 对 16 种抗生素的耐药率 %

抗生素种类	耐药株数	耐药率/%
氨苄西林	44	100.0
哌拉西林/他唑巴坦	44	100.0
头孢唑林	44	100.0
头孢噻肟	43	97.7
头孢他啶	43	97.7
头孢西丁	42	95.5
庆大霉素	41	93.2
亚胺培南	39	88.6
环丙沙星	43	100.0
多粘菌素 E	0	0.0
米诺环素	41	93.2
阿米卡星	10	22.7
氨基糖苷	42	95.5
头孢吡肟	44	100.0
美罗培南	40	90.1
左氧氟沙星	44	100.0

表 3 44 株 PFGE 谱型分布

PFGE	菌株(n=44)	分型构成比/%
K1	1	2.3
K2	1	2.3
K3	1	2.3
K4	4	9.1
K5	1	2.3
K6	1	2.3
K7	4	9.1
K8	1	2.3
K9	1	2.3
K10	3	6.8
K11	1	2.3
K12	13	29.5
K13	8	18.2
K14	1	2.3
K15	1	2.3
K16	2	4.5

3 讨论

近年来肺炎克雷伯菌在医院耐药现象越来越严重,据 CHINET 监测其对碳青霉稀类药物的耐药率从 2005 到 2017 年间上升了 8 倍^[1],已成为导致院内病死率较高的病原菌之一。本研究的 44 株 MDRKP 对 15 种临床常用抗菌药物呈广泛耐药,只对多粘菌素还保持敏感,但即使是作为人类的最后一道防的多粘菌素也出现了耐药现象^[7],因此加强临床药物的合理使用和对肺炎克雷伯菌感染源的监测尤为重要。PFGE 能够准确的从分子角度分析菌株相关性与调查暴发的原因,在流行病学调查中发挥着重要作用。本研究 PFGE 分型结果显示,在同一病区存在多个克隆(ICU, K1、K4、K5、K12、K13 和 K15),提示来源不同;而同一克隆又可存在于不同病区中(如 K4、K7、K12 和 K13),这可能由科室间患者的相互转诊所导致。

由于医院感染的普遍存在,本研究的 44 株 MDRKP 主要发生在各类侵入性操作较多的科室,提示医务工作者在进行此类侵入式操作时,需严格执行无菌操作,包括执行严格的手卫生制度,隔离预防措施的落实,环境和设备消毒的落实,以及感染暴发的控制等方面^[8],尽可能降低患者感染的概率。近年来肺炎克雷伯菌对各类抗菌药物的耐药率均出现提升,特别是多重耐药株的出现,为临床医生的用药选择带来了挑战,因此加强细菌耐药监测,在出现感染后根据本地区或者本院的抗菌药物监测结果或药敏试验结果使用合理的抗菌药物进行病情控制,才能或减少多重耐药菌的产生。

参考文献

- [1] 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.

- [2] Ayatollahi AA, Amini A, Rahimi S, et al. Prevalence of Gram-Negative Bacilli Isolated from the Equipment and Surfaces in Hospital Wards of Golestan Province, North of Iran[J]. Eur J Microbiol Immunol (Bp), 2017,7:261—266.
- [3] Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, et al. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections[J]. J Infect, 2018, 76:438—448.
- [4] 卫生部. 发布多重耐药菌医院感染预防与控制技术指南[J]. 医院管理论坛,2011,23(3):5—5.
- [5] Guo Y, Zhou H, Qin L, et al. Frequency, Antimicrobial Resistance and Genetic Diversity of *Klebsiella pneumoniae* in Food Samples [J]. PLoS One, 2016, 11: e0153561.
- [6] Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33: 2233—2239.
- [7] Tian GB, Doi Y, Shen J, et al. MCR-1-producing, *Klebsiella pneumoniae*, outbreak in China[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17: 577.
- [8] 黄勋,邓子德,倪语星,等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. 中国感染控制杂志,2015, 14(1):1—9.
- [9] 黄艳. ICU 患者感染多重耐药肺炎克雷伯菌的耐药性分析[J]. 中外医疗,2018,25(21):169—170,181.
- [10] 王薇,张薇,刘磊. 耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌的耐药机制[J]. 医学综述,2018,24(6):1195—1199.

(收稿日期:2019-09-25)