

• 短篇论著 •

肺炎克雷伯菌强毒性血清型分型与 ESBLs 检测*

马 青, 刘 英, 王 月, 李世军[△]

(贵州省疾病预防控制中心, 贵州贵阳 550004)

摘要:目的 了解贵阳市肺炎克雷伯菌强毒性血清型及产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的情况及关系。方法 采用黏液丝试验确定肺炎克雷伯菌株的高黏液表型,多重 PCR 方法检测菌株主要流行的强毒性血清型 K1、K2、K5、K20、K54、K57,应用加克拉维酸复合药(头孢他啶/克拉维酸或头孢噻肟/克拉维酸)与单药(头孢他啶或头孢噻肟)的药敏纸片组合进行肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的表型确证试验。结果 17 株肺炎克雷伯菌全部分离自痰标本,高黏液表型检出率占 47.06%(8/17)。高致病性肺炎克雷伯菌检出率占 52.94%(9/17),其中 K1 是肺炎克雷伯菌主要流行毒力血清型,占 47.06%(8/17),其次为 K2 毒力血清型。17 株肺炎克雷伯菌仅有 1 株产 ESBLs。结论 临床病例痰液来源的高致病性肺炎克雷伯菌分离率较高,强毒性血清分型以 K1 型为主,其中有 1 株 K1 型肺炎克雷伯菌在不具有高黏液表型的条件下产 ESBLs。

关键词:肺炎克雷伯菌; 强毒性血清型; 产超广谱 β -内酰胺酶

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.024

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)10-1248-03

文献标识码:B

肺炎克雷伯菌是一种临床常见的条件致病菌之一,为革兰阴性菌,寄居于人体的呼吸道(鼻咽部)、肠道、皮肤等部位,可引起多种感染,在各类临床标本中均有较高的检出率。该菌在健康者口咽部的带菌率为 1%~6%,但在住院患者中可高达 20%。毒力与耐药性是影响细菌致病性的 2 个重要因素,在感染中发挥重要作用。本研究收集了从 2010 年 9 月至 2019 年 6 月“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项的贵阳市 5 家哨点医院(贵阳市第一人民医院、贵阳市第五人民医院、贵阳市肺科医院、清镇市人民医院和修文县人民医院)发热呼吸道综合征患者的痰标本分离到的 17 株肺炎克雷伯菌株,对其进行强毒性血清型分型及产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)检测,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 17 株肺炎克雷伯菌株分离自 2010 年 9 月至 2019 年 6 月“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”科技重大专项的贵阳市 5 家哨点医院的发热呼吸道综合征患者的痰标本。ESBLs 表型确证试验质控菌株:肺炎克雷伯菌菌株 ATCC 700603。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增引物购自中国北京天一辉远公司;PCR 扩增试剂 2×Taq Plus PCR Master Mix、DNA 标志物及琼脂糖等电泳试剂购自中国辽宁大连宝生物公司;标准抗菌药物药敏纸片购自英国 Oxoid 公司。

1.3 方法

1.3.1 黏液丝试验 平板培养物挑起的黏液丝长度 ≥ 5 mm 判为黏液丝试验阳性,需挑起 2~3 次以确认菌株是否为高黏液表型^[1]。

1.3.2 DNA 模板的制备 水煮法制备 DNA 模板,100℃煮 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液作为 PCR 模板,-20℃放置备用。

1.3.3 多重 PCR 扩增主要流行高毒力血清型 检测国内主要流行的 K1、K2、K5、K20、K54、K57 毒力血清型基因。多重 PCR 扩增反应体系 50 μ L,内含 Taqmix 25 μ L,12 条引物各 0.5 μ L,DNA 模板 1 μ L,去离子水 18 μ L。扩增参数:95℃预变性 15 min;94℃30 s、58℃90 s、72℃90 s,35 个循环;72℃延伸 10 min。扩增产物 1.5%琼脂糖凝胶电泳后根据电泳条带大小判断血清型^[2]。各血清型引物序列和产物大小见表 1。

1.3.4 ESBLs 检测 应用美国临床和实验室标准协会推荐的 ESBLs 表型确证试验对肺炎克雷伯菌株进行检测,同时用大肠埃希菌 ATCC 25922 进行质控。将待测菌制成浊度为 0.5 麦氏单位的菌悬液,用无菌棉棒均匀涂布于 M-H 平皿上,把头孢他啶(30 μ g)、头孢他啶/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)、头孢噻肟(30 μ g)、头孢噻肟/克拉维酸(30 μ g/10 μ g)药敏纸片贴在平皿上 35℃孵育 18~24 h 后观察结果。检测结果按美国临床和实验室标准协会判定标准进行判定各平

* 基金项目:贵州省重要传染病实验诊断及分子流行病学研究科技创新人才团队专项资金项目(2018-5606);贵州省高层次创新型人才培养项目(2016-4021);贵州省疾病预防控制中心科学技术基金项目(2017-E1-1)。

[△] 通信作者, E-mail: zjumedjun@163.com。

本文引用格式:马青,刘英,王月,等.肺炎克雷伯菌强毒性血清型分型与 ESBLs 检测[J].国际检验医学杂志,2020,41(10):1248-1250.

皿上的抑圈直径,抑菌圈直径≥5 mm 为产酶株,即ESBLs 阳性^[3]。

表 1肺炎克雷伯菌高毒力血清型 PCR 血清分型引物序列和引物大小

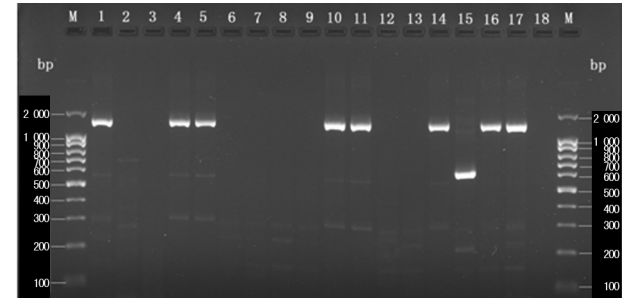
血清型	目的基因	引物序列	引物大小(bp)
Serotype K1	wzy_K1	F:GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC	1 283
		R:GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG	
Serotype K2	wzy_K2	F:GAC CCG ATA TTC ATA CTT GAC AGA G	641
		R:CTG AAG TAA AAT CGT AAA TAG ATG GC	
Serotype K5	wzx_K5	F:TGG TAG TGA TGC TCG CGA	280
		R:CCT GAA CCC ACC CCA ATC	
Serotype K20	wzy_K20	F:CGG TGC TAC AGT GCA TCA TT	741
		R:GTT ATA CGA TGC TCA GTC GC	
Serotype K54	wzx_K54	F:CAT TAG CTC AGT GGT TGG CT	881
		R:GCT TGA CAA ACA CCA TAG CAG	
Serotype K57	wzx_K57	F:CTC AGG GCT AGA AGT GTC AT	1 037
		R:CAC TAA CCC AGA AAG TCG AG	

2 结 果

2.1 黏液丝试验 17 株肺炎克雷伯菌株中有 8 株黏液丝试验阳性,为高黏液表型。

2.2 强毒性血清型肺炎克雷伯菌的检出结果 强毒性血清型肺炎克雷伯菌检出率占 52.94%(9/17),其中 K1 型是主要的流行型别,占 47.06%(8/17); K2 型有 1 株。17 株肺炎克雷伯菌各血清型 DNA 扩增结果见图 1。

2.3 ESBLs 检测 17 株肺炎克雷伯菌的 ESBLs 检出率不高,仅有 1 株检出 ESBLs 表型确证试验阳性,此菌株强毒性血清分型结果为 K1 型,且黏液丝试验为阴性。见图 1。



注:M 表示 DNA 标准带;1~17 表示 17 株肺炎克雷伯菌各血清型 DNA 扩增结果;18 表示阴性对照。

图 1肺炎克雷伯菌强毒性血清分型多重 PCR 电泳结果

3 讨 论

肺炎克雷伯菌作为一种人畜共患的病原菌,广泛分布于自然界,是人和动物呼吸道、肠道的致病菌。肺炎克雷伯菌具有 K 抗原(荚膜多糖)和 O 抗原(脂多糖),其中荚膜多糖是肺炎克雷伯菌的主要毒力因子之一,根据荚膜多糖结构及其抗原性不同,可将肺炎克雷伯菌分为 82 个荚膜血清型^[4]。其中 K1、K2、K5、K20、K54、K57 等与人类各种侵袭性感染密切相

关,为强毒性血清型肺炎克雷伯菌^[5-7]。高毒力肺炎克雷伯菌的生物学特征及临床致病能力与普通肺炎克雷伯菌不同,可引起肺炎、泌尿感染、败血症、肝脓肿等一系列社区获得性疾病。相关报道显示,肺炎克雷伯菌 K1、K2 型菌株与社区获得性肝脓肿的发生有密切联系^[8]。一项研究发现,K1 型是导致肺炎克雷伯菌菌血症最常见的血清型,K2 型是呼吸道标本中最常见的血清型^[9]。但本研究发现痰标本中强毒性肺炎克雷伯菌最多的血清型别为 K1 型而非 K2 型,可能存在地区差异。

高毒力和耐药在过去的三十年间被认为不会在同一株肺炎克雷伯菌上表达,但目前在全球范围内强毒性肺炎克雷伯菌获得性耐药的情况日益增加^[10]。本研究中有 1 株 K1 型肺炎克雷伯菌在不具高黏液表型的条件下产 ESBLs,提示对临床症状符合强毒性肺炎克雷伯菌感染特性但黏液丝实验阴性的菌株也应警惕,避免根据黏液表型对肺炎克雷伯菌进行分类,可能会出现强毒性肺炎克雷伯菌漏检的情况。此株产 ESBLs 的 K1 型肺炎克雷伯菌分离自一位临床诊断为重症肺炎的死亡病例,提示对既产 ESBLs 同时又具高毒力的肺炎克雷伯菌在临床上应高度重视。本研究发现 8 株黏液丝试验阳性的肺炎克雷伯菌株中有 1 株不属于强毒性血清型,9 株强毒性血清型菌株中有 2 株不具有高黏性,这表明并非所有的强毒性肺炎克雷伯菌都具有高黏性,也并非所有高黏性的肺炎克雷伯菌都具有高毒力。

本研究分析了肺炎克雷伯菌临床分离株的生化 and 分子特征,提示实验室应注意检测肺炎克雷伯菌黏液性状、荚膜血清型和产 ESBLs 情况,从而帮助临床医生正确识别高致病性肺炎克雷伯菌导致的感染。目前高致病性肺炎克雷伯菌分离率较高,其耐药株的

暴发可能会导致极高的病死率,因此临床上应及时进行监控和干预。虽然本研究检出产 ESBLs 肺炎克雷伯菌株只有 1 株,但随着抗菌药物的广泛应用,临床上检出产 ESBLs 的细菌呈逐年上升趋势的情况不容忽视。

参考文献

[1] 吴华,周晓君,李天娇,等. 2016 年海南省高毒力肺炎克雷伯菌的临床分布、毒力基因和分子流行病学特点[J]. 中国感染控制杂志,2018,17(1):10-15.

[2] 邱炳峰,王选,池丹,等. K1 型肺炎克雷伯菌毒力基因及分子分型研究[J]. 浙江预防医学,2015,27(12):1244-1246.

[3] 林敏,黄式文,李志方,等. 肺炎克雷伯菌产 ESBLs 的检测与耐药情况分析[J]. 热带医学杂志,2016,16(4):514-516.

[4] TURTON J F, PERRY C, ELGOHARI S, et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets[J]. J Med Microbiol, 2010,59(5):541-547.

[5] SHON A S, BAJWA R P, RUSSO T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed [J]. Virulence, 2013,4(1):107-118.

[6] 邱世洁,余广超,温旺荣. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 国外医药(抗菌药物分册),2018,39(2):129-134.

[7] PAN Y J, LIN T L, CHEN C T, et al. Genetic analysis of capsular polysaccharide synthesis gene clusters in 79 capsular types of *Klebsiella* spp[J]. Sci Rep, 2015, 23(5): 15573-15590.

[8] 魏丹丹,万腊根,刘洋. 强毒性血清型肺炎克雷伯菌的临床分布及耐药性分析[J]. 重庆医学,2016,45(11):1558-1560.

[9] FUNG C P, CHANG F Y, LEE S C, et al. A global emerging disease of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: is serotype K1 an important factor for complicated endophthalmitis[J]. Gut, 2002,50(3):420-424.

[10] KIM Y J, KIM S I, KIM Y R, et al. Virulence factors and clinical patterns of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolated from urine[J]. Infect Dis, 2017, 49(3): 178-184.

(收稿日期:2019-12-24 修回日期:2020-02-06)

• 短篇论著 •

碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析*

宋 静¹, 戎建荣^{2△}

(1. 山西医科大学, 山西太原 030051; 2. 山西大医院检验科, 山西太原 030032)

摘要:目的 研究山西大医院碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)分离株的临床分布,主要耐药表型和耐药基因,评估 CRKP 菌株在改良碳青霉烯类灭活实验(mCIM)中的诊断能力。**方法** 以 41 株 CRKP 菌株为研究对象,采用 VITEK-2 全自动微生物分析仪进行鉴定和药敏试验。使用 mCIM 进行产酶菌株筛选。使用 PCR 方法检测 KPC、NDM 等基因。**结果** 41 株临床分离株主要来自重症医学科,占 24.39%。标本类型主要为痰标本,占 31.71%。41 株对 90% 以上的常用药物具有耐药性,其中 40 株携带 KPC 基因,1 株携带 KPC 和 NDM 基因,1 株携带 NDM 基因。mCIM 可以准确的检测出碳青霉烯酶。**结论** KPC 型碳青霉烯酶是临床分离的 CRKP 株中的主要酶,通过使用 mCIM 可以有效地发现产生耐碳青霉烯酶的菌株。

关键词:肺炎克雷伯菌; 改良碳青霉烯类灭活实验; 碳青霉烯类抗菌药物

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.025

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2020)10-1250-04

文献标识码:B

肺炎克雷伯菌是一种常见的肠杆菌科细菌,可引起医院感染,是一种条件性病原体。当身体的免疫功能下降时,细菌会在肺部、泌尿道等许多部位引起感染^[1]。碳青霉烯类抗菌药物作为临床治疗肠杆菌科细菌引起感染的重要药物,近年来,随着这些药物的广泛使用,碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌(CRKP)已经出现在世界各地,检出量逐年上升,引起医疗界的

广泛关注^[2]。

本研究以山西大医院临床分离的 CRKP 菌株为研究对象,探讨其临床分布及耐药性。为临床针对不同酶型用药,控制产酶菌株提供理论依据。同时,采用 2017 年美国临床和实验室标准协会推荐的改良碳青霉烯类灭活实验(mCIM)对碳青霉烯酶进行筛选^[3],并探讨其在检测 CRKP 中的应用价值。

* 基金项目:山西省应用基础研究项目(201601D011116)。

△ 通信作者, E-mail:13593181596@163.com。

本文引用格式:宋静,戎建荣. 碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10):1250-1253.