

• 临床探讨 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.037

高毒力肺炎克雷伯菌的血清荚膜分型菌株特点及耐药性分析

雷亚利, 潘俊均, 修宁宁, 邓沛汶, 张碧瑜, 隋洪[△]

东莞康华医院检验科, 广东东莞 523000

摘要:目的 探讨肺炎克雷伯菌中高毒力型菌株的血清荚膜分型构成和特点, 并对其耐药性进行分析, 为临床抗菌治疗提供参考依据。方法 收集 2016 年 1 月至 2019 年 1 月该院各种临床标本中分离出的肺炎克雷伯菌 592 株, 采用 VITEK 2 Compact 全自动细菌鉴定仪对高毒力菌株进行鉴定及药敏试验, 分析其耐药情况, 采用多重 PCR 检测高毒力型菌株的血清荚膜分型。结果 592 株来源不同的肺炎克雷伯菌中共检出 78 株高毒力肺炎克雷伯菌, 占 13.18%(78/592), 其中 K1、K2 是主要的血清荚膜分型, 分别占 46.15%(36/78)、28.21%(22/78); 高毒力菌株对大多数常用药物均敏感, 与普通肺炎克雷伯菌株比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 高毒力肺炎克雷伯菌对多数抗菌药物的耐药率均低于普通肺炎克雷伯菌; 鉴别出高毒力的肺炎克雷伯菌菌株, 对临床选择合适的抗菌药物治疗有重要意义。

关键词:高毒力; 肺炎克雷伯菌; 血清荚膜分型; 耐药性

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

文章编号: 1672-9455(2021)10-1473-04

肺炎克雷伯菌隶属于肠杆菌科克雷伯菌属, 是一种无动力、无芽孢、有荚膜、能够发酵乳糖的粗短革兰阴性杆菌, 是继大肠埃希菌之后临床分离率最高的致病菌。肺炎克雷伯菌是一种条件致病菌, 寄居于人体呼吸道和肠道, 通常情况下对人体不会致病, 当人体免疫力下降时, 通过呼吸道侵入肺部引起肺炎甚至肺脓肿, 且出现胸腔积液等并发症, 或者长期使用抗菌药物导致菌群失调时才会致病。肺炎克雷伯菌对外界环境具有较强的抵抗力, 对多数抗菌药物易产生耐药性。1958 年在我国台湾地区出现了引起多个部位脓肿, 尤其是肝脓肿的高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP), 之后在亚洲地区也常有报道^[1]。HvKP 在平板上经培养后常常出现黏液型菌落, 故又称为高黏液型肺炎克雷伯菌。HvKP 和普通肺炎克雷伯菌(cKP)的不同之处在于前者不仅引起免疫力低下人群的感染, 甚至还会引起健康人全身多个部位的感染, 从感染部位蔓延到非感染部位, 即形成“远处转移”, 一旦 HvKP 形成耐药, 后果不堪设想。因此, 鉴别肺炎克雷伯菌是否具有高毒力, 不仅有助于临床经验性选择抗菌药物, 便于个体化治疗, 而且对预防和控制 HvKP 引起的感染性暴发流行和院内感染有重要意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2016 年 1 月至 2019 年 1 月本院各种临床标本中分离出的 592 株肺炎克雷伯菌。同一患者的标本应来源于不同的感染部位, 同一患者的同一部位反复感染标本认定为同一个标本。

1.2 试剂与仪器

1.2.1 仪器 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定仪、Viia 7 型 PCR 扩增仪、DYY-6D 型电泳仪、电泳槽

和凝胶成像系统、HR003 型 DNA 提取仪。

1.2.2 试剂 GN 鉴定卡、AST-GN13 和 AST-GN334 药敏卡及配套生长培养基、dNTP、TaqDNA 聚合酶、1.0×PCR 缓冲液、DNA 标准带、引物。

1.3 方法和步骤

1.3.1 菌株的分离培养 取材接种于血平板, 经 37℃ 培养 18~24 h 后, 观察血平板上菌落的生长情况, 当有足够单个纯菌落时, 下一步进行高黏液型菌株的初步筛选; 当菌落密集无法观察到单个菌落时, 挑取少量菌再接种于血平板 37℃ 培养 18~24 h 再次观察; 当单个菌落过少无法检测时, 尽可能挑取多的菌在血平板上增菌, 37℃ 培养 18~24 h 再次观察。

1.3.2 高黏液型肺炎克雷伯菌的初步筛选 菌株分离培养后, 用接种环轻轻触及肺炎克雷伯菌菌落并往上提拉, 重复 2 次, 若观察到黏液丝形成并且长度大于 5 mm, 即可初步判断为高黏液型表型阳性, 初步筛选该菌株为高黏液型菌株, 冻存于-80℃ 冰箱。

1.3.3 PCR 检测血清荚膜分型 将初步筛选的 HvKP 送往深圳华大基因有限公司检测, 采用多重 PCR 技术扩增 HvKP 的荚膜血清型基因型(主要是 K1、K57、K54、K20、K2 和 K5 型), 根据参考文献[2]设计引物, 引物由上海生工生物有限公司合成, 各引物相关信息见表 1。

1.3.4 药敏试验 采用 VITEK 2 compact 全自动细菌鉴定仪进行药敏试验, 抗菌药物有阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢呋辛、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、氨曲南、头孢西丁、亚胺培南、厄他培南、妥布霉素、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、复方磺胺甲噁唑、替加环

[△] 通信作者, E-mail: 1511059224@qq.com.

素。对产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)的菌株,采用双纸片扩散法进行确证试验(试剂为 Oxoid 公司赠品),判定标准按美国临床和实验室标准协会 2016 版要求

进行。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922(阴性对照),肺炎克雷伯菌 ATCC 700603(阳性对照)。

表 1 荚膜血清型基因引物序列表

引物名称	引物序列	产物长度(bp)	退火温度(℃)
K1	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1 283	53
K57	CTCAGGGCTAGAAGTGTGCAT CACTAACCCAGAAAGTCGAG	1 037	55
K54	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT GCTTGACAAACACCATAGCAG	881	55
K20	CGGTGCTACAGTGCATCATT GTTATACGATGCTCAGTCGC	741	55
K2	GACCCGATATTCATACTTGACAGAG CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	641	57
K5	TGGTAGTGATGCTCGCGA CCTGAACCCACCCCAATC	280	55

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析处理。耐药监测数据由 WHONET5.6 导出统计。计数资料以例数或百分率表示,采用 χ^2 检验进行比较。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 菌株来源 从临床标本中分离出的 592 株肺炎克雷伯菌菌株来源见表 2。

表 2 592 株肺炎克雷伯菌菌株标本构成比[n(%)]		
标本来源	HvKP(n=78)	cKP(n=514)
血液	46(59.0)	269(52.3)
痰液	16(20.5)	101(19.6)
脓液	4(5.1)	49(9.5)
尿液	8(10.3)	77(15.0)
无菌体液	1(1.3)	10(1.9)
其他	3(3.8)	8(1.6)

2.2 HvKP 菌株的荚膜血清型 从临床分离的 78 株 HvKP 中经多重 PCR 鉴定的血清荚膜分型主要以 K1、K2 型为主,分别为 36 株(46.2%)和 22 株(28.2%),有 11 株(14.1%)菌株未鉴定出分型,其他荚膜分型分别为 K57 型 4 株(5.1%)、K20 型 3 株(3.8%)、K5 型 1 株(1.3%)、K54 型 1 株(1.3%)。

2.3 药敏试验 药敏试验结果显示,592 株肺炎克雷伯菌有 127 株产 ESBLs,具有多重耐药性,具体的 HvKP 和 cKP 对不同抗菌药物的耐药率见表 3。592 株肺炎克雷伯菌检测出 127 株多重耐药菌株,其中 78 株 HvKP 中检出多重耐药菌株 9 株,占 11.5%(9/78);而 514 株 cKP 中检出多重耐药菌株 118 株,占 23.0%(118/514)。HvKP 对多数抗菌药物的耐药率明显低于 cKP。碳青霉烯类药物亚胺培南和厄他培南对肺炎克雷伯菌有明显的抑菌效果,HvKP 和 cKP 对替加环素非常敏感,对其他抗菌药物则表现出不同程度的耐药。总的来说,HvKP 对抗菌药物的敏感性要比 cKP 好,K1、K2 血清型肺炎克雷伯菌的黏液表型与黏液表型调节基因 A(rmpA)密切相关,K1、K2 血清型菌株多与 rmpA 共存。K1、K2 血清型菌株是血流感染和肝脓肿的重要致病菌,在其他脓肿、尿路

感染、菌血症中比较常见,K1 型菌株多见于肝脓肿,K1 和 K2 型比率在其他感染中相近,黏液型菌株产 ESBLs 率及对多数抗菌药的耐药率低于非黏液型肺炎克雷伯菌。但值得注意的是,HvKP 已出现多重耐药菌株,并且耐药趋势有所上升。

表 3 HvKP 和 cKP 对临床常用抗菌药物的耐药率比较(%)

抗菌药物	HvKP (n=78)	cKP (n=514)	χ^2	P
替加环素	0.0	0.0	—	—
氨曲南	10.3	20.2	4.39	<0.05
庆大霉素	9.0	17.5	3.60	<0.05
妥布霉素	9.0	17.5	3.60	<0.05
阿米卡星	2.6	11.3	5.65	<0.05
环丙沙星	6.3	22.6	10.90	<0.05
左氧氟沙星	5.1	21.8	1.93	<0.05
复方磺胺甲噁唑	20.6	27.6	1.75	>0.05
头孢西丁	5.1	16.7	7.07	<0.05
头孢呋辛	11.5	23.5	5.69	<0.05
头孢曲松	11.5	23.0	5.24	<0.05
头孢吡肟	5.1	22.2	4.77	<0.05
头孢他啶	2.6	18.3	12.34	<0.05
阿莫西林/克拉维酸	1.3	9.3	5.79	<0.05
哌拉西林/他唑巴坦	1.3	11.7	7.91	<0.05
头孢哌酮/舒巴坦	1.3	10.9	7.19	<0.05
亚胺培南	0.0	1.9	0.59	<0.05
厄他培南	0.0	1.9	0.59	<0.05

注:—表示无数据。

3 讨 论

细菌的致病性不仅取决于其毒力的强弱,还与入侵部位、机体的免疫力强弱及侵入机体的细菌数量多少密切相关。细菌的毒力主要表现在 2 个方面:一是病原体突破宿主屏障侵入机体的能力,称为侵袭力;二是病原菌产生的毒素。侵袭力包括黏附素、侵袭性

物质和荚膜等。肺炎克雷伯菌的致病性主要是其本身的荚膜结构所造成的。因为荚膜具有抵抗吞噬细胞吞噬能力和抵抗有害物质的损伤作用,并且分泌一层黏性物质附着于菌体形成保护作用,使细菌彼此间粘连,也可黏附于组织或细胞表面引起感染,有利于发挥致病作用。荚膜的成分因不同菌种而异,主要是葡萄糖与葡萄糖醛酸组成的聚合物,也可含多肽与脂质。肺炎克雷伯菌的荚膜结构成分主要是多糖,包括荚膜多糖(K 抗原)和脂多糖(O 抗原)等。根据 K 抗原至少可将其分成 82 个血清型^[3]。而在血清荚膜分型中,造成人和动物严重侵袭性感染最为密切相关的血清荚膜分型主要是 K1、K2 和 K5 血清型^[4]。

78 株 HvKP 经多重 PCR 测定分型后得出 K1 和 K2 型分别为 36 株(46.2%)和 22 株(28.2%),有 11 例未鉴定出分型,未能鉴定出分型的可能原因是目前的引物未能完全匹配或可能存在新的分型,这与殷红莲等^[5]的报道较一致。有研究显示,K1、K2 是 HvKP 主要的血清荚膜分型,rmpA 是位于 180~220 kb 大小的毒力质粒上控制生成胞外荚膜多糖的毒力基因之一,而 K1 和 K2 血清型菌株上大部分存在 rmpA^[6]。由于荚膜多糖(K 抗原)是肺炎克雷伯菌最主要的毒力因子之一,具有抗吞噬、抗干燥及抵抗有害物质损伤的作用,因此,K1、K2 血清荚膜型的 HvKP 比其他类型菌株毒力更强。由于目前多重 PCR 鉴别毒力血清荚膜型需要较长时间和较多成本,未来需要有更好的方法鉴别 HvKP 以缩短鉴定时间,获得更好的治疗效果。

本研究选用的 18 种抗菌药物中,HvKP 对多数抗菌药的耐药率均低于 cKP,HvKP 仅对磺胺类药物复方磺胺甲噁唑的耐药率达到 20.6%,与 cKP 对复方磺胺甲噁唑的耐药率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HvKP 对其他抗菌药物的耐药率均在 20.0% 以下,可见 HvKP 目前对大多数抗菌药物的敏感性还是较好的,容易造成药物敏感株易治疗的假象,但是由于其具有的高毒力性质,常导致宿主病情进展恶化等。HvKP 常见的临床表现有:(1)易感人群及易感因素,与 cKP 比较,HvKP 可感染既往健康且年轻的社区居民,故 HvKP 血流感染和肝脓肿多见于医院门诊就诊者,男性多于女性。(2)转移并发症,HvKP 具有侵袭性,容易转移至其他部位引起新的感染。转移可造成各种严重的肝外脓肿,骨、关节、肌肉、筋膜、皮肤软组织、胸膜、前列腺、肾脏及脾脏均可受累,眼、脑膜、中枢神经系统和肺是最常见的转移部位。(3)辅助诊断特点,实验室病原学诊断方法可筛查出相应的病原体并进行相关分型,同时超声和 CT 检查用于临床诊断 HvKP 肝脓肿效果较明显。

本院目前累积的病例显示,在血流感染和肝脓肿等疾病分离出 HvKP 的患者病情恶化迅速、凶险,严重影响临床治疗和预后判断。HvKP 产 ESBLs 率低于 cKP,造成这种差异的原因仍然不明确,有可能是

因为耐药基因在转变为高毒力菌株时丢失或者 HvKP 菌株不能获得药物耐药质粒^[7],这种推论尚需进一步研究证实。同时,HvKP 对碳青霉烯类药物,如亚胺培南和厄他培南及四环素类药物替加环素全部敏感,对 β -内酰胺酶抑制药物头孢哌酮/舒巴坦、阿莫西林/克拉维酸和哌拉西林/他唑巴坦的敏感性较好,临床用药可以优先考虑。但由于近年来抗菌药物的滥用,造成耐药率不断上升,尽管目前 HvKP 对抗菌药物的耐药率还比较低,但因其具有的高毒力性,在临床治疗上还是不容乐观^[8-15]。虽然有些药敏试验结果显示肺炎克雷伯菌对所有抗菌药物全都敏感,但未考虑其可能具有的高毒力性,可能会误导临床上进行单种敏感药物治疗而影响治疗效果和病情的预后及转归。

目前对已鉴定为 HvKP 的菌株一般给予三联用药或者考虑选择新药头孢他啶/阿维巴坦,有较好的治疗效果。因此,精确鉴别 HvKP 菌株,对临床选择合适的抗菌药物治疗有重要意义。

参考文献

- [1] 罗可人,唐军.肺炎克雷伯菌抗生素耐药性的研究进展[J].中国抗生素杂志,2020,45(6):540-544.
- [2] LIN J C,KOH T H,LEE N,et al. Genotypes and virulence in serotype K2 Klebsiella pneumoniae from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong,Singapore and Taiwan[J]. Gut Pathogens,2014,6(1):1-7.
- [3] 叶李铭,麦丽婷,黄静.高毒力肺炎克雷伯杆菌的临床特征和高毒力机制[J].国际呼吸杂志,2017,37(3):221-226.
- [4] 陈苗,李玉,张洁,等.呼吸系统感染高毒力肺炎克雷伯菌的分子基因特点[J].中华医院感染学杂志,2020,30(1):6-9.
- [5] 殷红莲,汤国宁,郭丽红.肺炎克雷伯菌的分布及耐药性分析[J].当代医学,2020,26(14):104-106.
- [6] 魏丹丹,万腊根,刘洋,等.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.
- [7] LI W,SUN G,YU Y,et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) klebsiella pneumoniae isolates in China [J]. Clin Infect Dis,2014,58(3):225-232.
- [8] 叶李铭,黄静,吴本权,等.呼吸系统感染高毒力肺炎克雷伯杆菌的临床和分子特征[J].热带医学杂志,2018,18(3):321-325.
- [9] 陈辞言,杜艳.高毒力肺炎克雷伯菌研究进展[J/CD].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2019,13(2):89-92.
- [10] 苏桂新,王怡杨,王强,等.多重耐药 HvKP 菌株临床感染分布及耐药机制[J].中国老年学杂志,2017,37(12):3048-3050.
- [11] 田李均,王晓丽,肖淑珍,等.医院内高黏液性肺炎克雷伯菌的流行分布、毒力基因及临床特征分析[J].上海交通大学学报(医学版),2017,37(1):43-48.
- [12] 余倩,李静,李妍婷,等.血流感染患者分离的肺炎克雷伯

菌高毒力荚膜型和毒力基因分析[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(10): 785-788.

[13] 程莉, 曹小利, 沈瀚, 等. 产 KPC-2 肺炎克雷伯菌的基因分型、毒力基因和血清型特征研究[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(8): 591-595.

[14] 黎斌斌, 刘颖梅, 王春雷, 等. 肺炎克雷伯菌血流感染的临

床及分子特征[J]. 中华检验医学杂志, 2015, 38(9): 627-631.

[15] 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.

(收稿日期: 2020-09-12 修回日期: 2021-01-12)

• 临床探讨 • DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2021.10.038

重庆市表观健康人群血清 I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列参考区间的分组建立

张富贵¹, 赵清^{2△}

1. 四川省绵阳市三台县人民医院检验科, 四川绵阳 621100; 2. 重庆医科大学附属第二医院检验科, 重庆 400010

摘要:目的 分组建立重庆医科大学附属第二医院实验室电化学发光法检测血清 I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列(β -CTx)的参考区间。方法 根据美国临床和实验室标准协会 C48-A 文件要求, 收集 2019 年 1 月至 2020 年 7 月采用 Cobas 6000 全自动电化学发光仪检测的 β -CTx 结果。结果 符合纳入标准的体检人群共 4 918 例, 分为男性青年组(19~44 岁)2 835 例, 男性中年组(>44~59 岁)336 例, 女性青年组(19~44 岁)1 544 例, 女性中年组(>44~59 岁)203 例。男性青年组血清 β -CTx 检测结果为 0.549 0(0.436 0, 0.694 0) $\mu\text{g/L}$, 男性中年组为 0.515 0(0.392 5, 0.684 5) $\mu\text{g/L}$, 女性青年组为 0.409 5(0.336 8, 0.533 5) $\mu\text{g/L}$, 女性中年组为 0.418 0(0.285 5, 0.581 5) $\mu\text{g/L}$ 。各组人群的 95% 置信区间为: 男性青年组为 0.273 0~0.978 2 $\mu\text{g/L}$, 男性中年组为 0.211 8~1.036 3 $\mu\text{g/L}$, 女性青年组为 0.216 8~0.709 6 $\mu\text{g/L}$, 女性中年组为 0.137 7~0.882 8 $\mu\text{g/L}$ 。结论 β -CTx 的参考区间不仅在不同年龄、性别间存在差异, 同时还存在地区差异, 各实验室应建立符合本地区的参考区间。

关键词:参考区间; I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列; 电化学发光法

中图法分类号:R581.9

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2021)10-1476-03

骨骼是一种特殊的结缔组织, 能够通过破骨细胞吸收旧骨, 成骨细胞形成新骨, 二者相互配合以完成骨骼的重塑, 这一过程被称为骨转换。在骨转换过程中, 骨基质的主要成分 I 型胶原蛋白在降解和形成过程中会产生多种代谢产物, 这一类可以在血液、尿液和其他体液中检测到的生化物质被称为骨转换标志物。I 型胶原羧基端肽 β 特殊序列(β -CTx)就是其中一种国际上公认的反映骨吸收的标志物, 可以反映破骨细胞的活性, 其水平的高低可反映骨重塑过程中溶骨性骨代谢指标的转变, 增高时说明骨吸收程度增加, 骨质流失增加。本研究拟通过收集表观健康体检人群的 β -CTx 结果进行相应的统计分析, 按性别、年龄建立其在重庆地区的参考区间。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取重庆医科大学附属第二医院 2019 年 1 月至 2020 年 7 月的健康体检人群共 4 918 例, 按性别和年龄分为 4 组, 男性青年组(19~44 岁)2 835 例, 男性中年组(>44~59 岁)336 例, 女性青年组(19~44 岁)1 544 例, 女性中年组(>44~59 岁)

203 例。所选人群经查阅其相应的体检项目均无影响骨代谢的相应疾病, 如: 肝脏疾病、肾脏疾病、甲状腺疾病等。清晨采集所有研究对象空腹静脉血 3 mL, 及时分离血清, 3 h 内完成检测。

1.2 仪器与试剂 Roche Cobas6000 全自动电化学发光仪及配套试剂、校准品, 质控品选用伯乐液体质控。

1.3 方法 β -CTx 检测方法为电化学发光法。检测前对仪器按要求完成相应的每日保养及质控; 试剂更换批号时进行校准并完成质控。各校准及质控均符合要求, 详细记录检验结果, 并查阅其相应的体检项目, 剔除不符合纳入标准的样本数据。

1.4 统计学处理 采用 SPSS26.0 统计软件进行数据分析处理。不符合正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 采用多个独立样本的非参数检验 (Mann-Whitney 检验)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组数据 按《临床实验室如何确定和建立生物参考区间-核准指南第 2 版》要求, 采用 SPSS 中的 ex-

[△] 通信作者, E-mail: 485914293@qq.com。