

• 临床检验研究论著 •

临床分离肺炎克雷伯菌的分布、耐药性及生物被膜形成能力的分析*

朱冰, 刘媛[#], 邹自英[△], 刘霞, 曾平

(中国人民解放军成都军区总医院检验科, 四川成都 610083)

摘要:目的 探讨临床分离肺炎克雷伯菌的分布、耐药性及生物被膜形成能力。方法 分离临床送检标本的肺炎克雷伯菌, 采用 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪进行细菌鉴定及微生物敏感性试验, 采用半定量结晶紫染色法检测菌株的生物被膜形成能力。结果 共检出肺炎克雷伯菌 329 株, 其分布前 3 位的科室分别为呼吸科(33.13%)、神经外科(12.16%)和普外科(9.73%), 在痰液和血液中的构成比最高。329 株肺炎克雷伯菌菌株中, 产超广谱 β -内酰胺酶(ESBL)菌株 81 株(24.62%), ESBL 阴性菌株 248 株(75.38%), 对 3 类以上抗菌药物耐药 157 株(47.72%)。65.05% 的肺炎克雷伯菌菌株具有生物被膜形成能力, 临床分离的各类标本中肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。结论 临床分离的肺炎克雷伯菌具有较强的耐药性及生物被膜形成能力。

关键词:克雷伯菌, 肺炎; β 内酰胺酶; 抗药性, 细菌; 生物被膜

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.21.010

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)21-2811-03

Analysis of distribution, drug resistance and the ability of biofilm formation of clinically isolated *Klebsiella pneumoniae**Zhu Bing, Liu Yuan[#], Zou Ziyang[△], Liu Xia, Zeng Ping

(Department of Clinical Laboratory, Chinese People's Liberation Army General Hospital of Chengdu Military Region, Chengdu, Sichuan 610083, China)

Abstract: **Objective** To investigate the distribution, drug resistance and the ability of biofilm formation of clinically isolated *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** *Klebsiella pneumoniae* were isolated from clinical samples. VITEK 2 COMPACT automated microbial identification/susceptibility analyzer was employed to conduct bacterial identification and microbial sensitivity tests. Semi-quantitative crystal violet staining method was adopted to test the ability of biofilm formation of bacterial strains. **Results** A total of 329 strains of *Klebsiella pneumoniae* were detected. The top three department of its distribution were respiratory department (33.13%), neurosurgery department (12.16%) and general surgery department (9.73%) and the constituent ratios of *Klebsiella pneumoniae* in sputum and blood were the highest. Among 329 *Klebsiella pneumoniae* strains, 81 (24.62%) strains produced extended-spectrum β -lactamase (ESBL), 248 (75.38%) strains were ESBL negative and 157 (47.72%) strains showed drug-resistance toward three categories of antibacterial agents. 65.05% of *Klebsiella pneumoniae* strains possessed the ability of biofilm formation. When compared with the abilities of biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae* isolated from different kind of clinical samples, the differences were not statistically significant ($P > 0.05$). **Conclusion** Clinically isolated *Klebsiella pneumoniae* has strong drug resistance and ability of biofilm formation.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; beta-lactamases; drug resistance, bacterial; biofilm

肺炎克雷伯菌是临床各种标本类型最常检测出的机会致病菌之一, 产超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)是肺炎克雷伯菌的重要耐药机制之一, 产酶株往往携带多种耐药基因, 对多种抗菌药物交叉耐药, 给临床治疗带来较大的困难^[1-2]。细菌生物被膜以其独特的生存方式和对人类健康的不利影响越来越引人关注, 细菌生物被膜是细菌感染难以治愈和反复发作的重要原因^[3-4]。本研究收集 2010 年 10 月至 2011 年 12 月本院临床送检标本分离的全部肺炎克雷伯菌菌株, 分析其 ESBL 检出情况及菌株的耐药性, 并检测各菌株生物被膜的形成能力, 以期为医院肺炎克雷伯菌的感染控制和临床抗菌药物使用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 菌株分离自 2010 年 10 月至 2011 年 12 月本院临床送检的各类标本(痰液、血液、脓液、分泌物、胸腔积液、腹水、尿液、穿刺液、胆汁及支气管灌洗液等), 同一患者相同部

位的重复分离菌株仅将第 1 次的结果纳入统计。

1.2 菌株的鉴定和微生物敏感性试验 采用法国生物梅里埃 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪及细菌鉴定药敏卡、GN 鉴定卡和 AST-GN13 药敏卡进行细菌鉴定及微生物敏感性试验。结果评价按 2012 年美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S22 判断。AST-GN13 药敏卡检测的抗菌药物包括: 氨苄西林、氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢吡肟、头孢唑啉、头孢曲松、头孢替坦、氨基曲南、厄他培南、亚胺培南、庆大霉素、妥布霉素、阿米卡星、环丙沙星、左氧氟沙星、呋喃妥因; 头孢噻肟、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶、头孢他啶/克拉维酸药的检测药敏纸片为英国 Oxoid 公司产品。

1.3 ESBL 确证试验 AST-GN13 药敏卡通过 VITEK 2 COMPACT 全自动微生物鉴定/药敏分析仪检测, 提示 ESBL 阳性的菌株均按 CLSI 推荐的方法, 将细菌浓度为 1×10^8

* 基金项目: 四川省卫生厅科研课题资助项目(130318)。 作者简介: 朱冰(1958~), 女, 副主任技师, 主要从事细菌耐药机制的研究工作。

共同第一作者。 [△] 通讯作者, E-mail: zouziying49@163.com。

CFU/mL 的菌液均匀涂布于 Mueller-Hinton 琼脂平板, 将头孢噻肟(30 μg)和头孢噻肟/克拉维酸(30 μg/10 μg)、头孢他啶(30 μg)和头孢他啶/克拉维酸(30 μg/10 μg)粘贴在涂布菌液的 Mueller-Hinton 琼脂平板上, 35 °C 培养 18 h, 测量抑菌圈直径, 两对纸片或其中任何一对纸片的直径相差大于或等于 5 mm, 即为产 ESBL 菌株。

1.4 质控菌株 质控菌株阴沟肠杆菌 ATCC700323、大肠埃希菌 ATCC25922、ESBL 阳性肺炎克雷伯菌 ATCC700603 购自卫生部临床检验中心。

1.5 细菌生物膜半定量检测 采用半定量结晶紫染色法进行细菌生物膜半定量检测, 将菌液培养至对数生长期, 用新鲜 Mueller-Hinton 培养液调节菌液浓度为 1×10^9 CFU/mL, 将其接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL, 每菌株设 3 个复孔, 37 °C 静止培养 48 h, 24 h 换液 1 次, 弃去上清液, 用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffered solution, PBS)轻柔洗涤 4 次, 弃去上清液; 每孔加入 Bouin's 固定液 50 μL, 固定 1 h, PBS 清洗 4 次; 每孔加入 50 μL 结晶紫, 染色 2 min, 弃去染色液, 用自来水轻轻冲洗 96 孔板, 直至阴性对照没有颜色; 室温晾干, 95% 乙醇脱色。酶标仪测定波长为 570 nm 处的光密度(optical density, OD)值, 阴性对照组为 Mueller-Hinton 培养液。生物膜形成量的判断标准: 将阴性对照的平均 OD₅₇₀ 值与标准差之和定义为 OD_c, 将 OD 平均值连续 3 次超过 OD_c 的待测菌株定义为产生物被膜菌株。

1.6 统计学处理 所有患者基本信息和微生物敏感性试验的最低抑菌浓度(minimal inhibitory concentration, MIC)值均采用细菌耐药监测 WHONET5.6 软件手工录入, 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 组间计数资料的比较采用 χ^2 检验, 以 $\alpha=0.05$ 为检验水准, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 肺炎克雷伯菌在临床科室中的分布 共检出肺炎克雷伯菌 329 株, 其分布科室前 3 位分别为呼吸科(33.13%)、神经外科(12.16%)和普外科(9.73%), 见表 1。

表 1 肺炎克雷伯菌的科室分布

科室	例数 (n)	构成比 (%)	科室	例数 (n)	构成比 (%)
呼吸科	109	33.13	骨科	5	1.52
神经外科	40	12.16	泌尿外科	5	1.52
普外科	32	9.73	烧伤科	5	1.52
神经内科	31	9.42	消化科	4	1.22
干部病房	17	5.17	小儿科	4	1.22
肿瘤科	15	4.56	感染消化科	3	0.91
心内科	13	3.95	妇产科	2	0.61
内分泌科	10	3.04	康复科	2	0.61
血液科	9	2.74	口腔科	1	0.30
肾内科	8	2.43	皮肤科	1	0.30
门诊	6	1.82	胸外科	1	0.30
重症监护病房	5	1.52	中医科	1	0.30

2.2 肺炎克雷伯菌在临床标本中的分布 肺炎克雷伯菌在痰液和血液中的构成比最高, 见表 2。

2.3 肺炎克雷伯菌的耐药性分析 329 株肺炎克雷伯菌菌株

中, 产 ESBLs 菌株 81 株(24.62%), ESBLs 阴性菌株 248 株(75.38%); 对 3 类以上抗菌药物耐药 157 株(47.72%), 其中, 产 ESBLs 菌株 79 株, 占总菌株数的 24.01%, 占产 ESBL 菌株数的 97.53%。临床分离的肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药性见表 3。

表 2 肺炎克雷伯菌在临床各类标本中的构成比

标本类型	例数 (n)	构成比 (%)	标本类型	例数 (n)	构成比 (%)
痰液	246	74.77	尿液	7	2.13
血液	34	10.33	穿刺液	4	1.22
脓液	12	3.65	胆汁	3	0.91
分泌物	10	3.04	支气管灌洗液	3	0.91
胸腔积液、腹水	10	3.04	—	—	—

—: 此项目无数据。

表 3 临床分离肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的耐药性

抗菌药物	肺炎克雷伯菌 (%, n=329)	肺炎克雷伯菌		P
		ESBLs 阴性 (%, n=248)	ESBLs 阳性 (%, n=81)	
氨苄西林	57.45	43.55	100.00	0.000
头孢唑啉	36.17	15.32	100.00	0.000
氨苄西林/舒巴坦	33.74	17.34	85.95	0.000
复方磺胺甲噁唑	30.09	13.71	80.25	0.000
头孢曲松	29.79	8.87	93.83	0.000
庆大霉素	25.84	11.29	70.37	0.000
呋喃妥因	22.80	13.31	51.85	0.000
氨基曲南	21.58	6.85	66.67	0.000
环丙沙星	19.45	6.85	58.02	0.000
左氧氟沙星	18.84	6.45	56.79	0.000
头孢他啶	16.41	7.66	43.21	0.000
妥布霉素	15.81	8.06	39.51	0.000
阿米卡星	6.99	6.45	8.64	0.439
头孢吡肟	3.95	0.00	16.05	—
头孢替坦	2.43	2.02	3.70	0.414
厄他培南	1.82	0.81	4.94	0.102
哌拉西林/他唑巴坦	1.82	0.00	7.41	—
亚胺培南	0.30	0.00	1.23	—

—: 此项目无数据。

2.4 肺炎克雷伯菌的生物被膜 65.05% 的肺炎克雷伯菌株具有生物被膜形成能力, 临床分离的各类标本中肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力比较, 差异无统计学意义($P>0.05$), 见表 4。

表 4 肺炎克雷伯菌的生物被膜形成能力

标本类型	n	产生物被膜菌株数[n(%)]
痰液	246	164(66.67)
血液	34	21(61.76)
其他	49	29(59.18)
合计	329	214(65.05)

3 讨 论

肺炎克雷伯菌广泛分布于临床,引起呼吸系统、血液、泌尿系统等感染^[5-7],其 ESBL 的产生和播散是导致多药耐药和医院内源性感染的重要原因,造成患者医疗费用增加,平均住院日延长,病死率增加。

ESBL 是由质粒介导的一类 β -内酰胺酶,能水解含氧亚氨基的 β -内酰胺类抗菌药物,并可被 β -内酰胺酶抑制剂克拉维酸抑制。本研究结果显示,329 株肺炎克雷伯菌临床分离菌株中,产 ESBL 菌株 81 株 (24.62%),ESBL 阴性菌株 248 株 (75.38%)。ESBL 的产生给临床抗感染治疗带来很大困难,由于当前抗菌药物的不合理使用,产 ESBL 菌株的检出率势必持续升高。本研究的 329 株肺炎克雷伯菌分离株中,已出现 10 株亚胺培南耐药菌株,已采用 Hodge 试验验证,有待进一步进行分子流行病学的调查。81 株 ESBL 菌株对亚胺培南、厄他培南、头孢替坦、哌拉西林/他唑巴坦和阿米卡星较敏感,耐药率低于 10%,与 ESBL 阴性菌株的耐药率比较,差异无统计学意义;对氨苄西林和头孢唑啉的耐药率达到 100.00%,而氨苄西林/舒巴坦的耐药率也达到 85.95%;按 2008 年 CLSI M100-S18 标准,产 ESBL 菌株对所有 β -内酰胺类抗菌药物均应判定为耐药,自 2010 年 CLSI 对折点进行修正后,提出不必常规进行 ESBL 检验,2012 年 CLSI M100-S22 明确指出,采用更新后的折点,无需将头孢菌素类、青霉素类和氨基糖苷类的微生物敏感性试验结果从敏感修正为耐药,实验室检测 ESBL 的主要目的在于流行病学调查和医院感染控制,因此,新标准增加了这几类抗菌药物用于临床治疗肠杆菌科细菌的机会,虽然这在临床治疗中还存在一定的争议。本研究提示,ESBL 仍然是临床抗菌药物选择的一个不容忽视的限制性因素,临床若选择 β -内酰胺类抗菌药物治疗产 ESBL 的肺炎克雷伯菌感染,则需根据 MIC 值慎重选择此类敏感抗菌药物,且治疗失败的风险加大。为便于感染监控,仍应常规检测和报告 ESBL。氟喹诺酮类环丙沙星和左氧氟沙星对产 ESBL 的肺炎克雷伯菌菌株的耐药率均超过 50%,这可能与 ESBL 基因常与质粒介导的喹诺酮耐药基因共存有关,在产 ESBL 的大肠埃希菌中,同时检测到 *qnr* 基因携带及 *gyrA* 基因、*parC* 基因的变异,而这些基因的存在和变异使细菌对喹诺酮类药物高度耐药^[8-9]。由于氨基糖苷类的肝、肾毒性,限制了该类药物在临床的应用,它们常作为联合用药的部分^[10]。呋喃妥因通常用于尿路感染。本研究结果显示,产 ESBL 的肺炎克雷伯菌呈现对青霉素类、头孢菌素类、氟喹诺酮类等多种药物的耐药性。ESBL 阴性的肺炎克雷伯菌对大部分抗菌药物均有较高的敏感性,检测的抗菌药物敏感率均超过 50%。ESBL 为质粒介导的可通过结合、转化、转导等方式在同种病原菌间,甚至不同种病原菌间进行耐药性传播,携带 ESBL 的菌株可引起医院感染的爆发流行。因此,规范抗菌药物的合理应用和监测产 ESBL 耐药菌的传播和流行应当作为医院感染控制的一个常规性工作。

生物被膜是细菌在自然界的一种普遍存在方式。在感染过程中,与游离态的细菌比较,具有生物被膜的细菌生长较缓慢且基因表达发生改变,从而提高了细菌抵抗人体免疫系统和抗菌药物的能力,成为不断产生游离细菌的储藏所。研究报道,生物被膜菌与游离态细菌相比,耐药性大幅度提高,因此,生物被膜是细菌感染难以治愈和反复发作的重要原因^[6]。本研究提示,65.05%的肺炎克雷伯菌可形成生物被膜,肺炎克雷伯菌被膜菌的耐药性升高与 *rpoS* 基因的表达增加密切相关,

而 *rpoS* 基因又调节一系列与生物被膜形成、黏附、增殖、成熟等各个阶段相关基因的表达,使生物被膜菌对抗菌药物的耐药性增强^[11]。传统微生物敏感性试验测得的 MIC 是针对单个游离的细菌,据文献报导,采用被膜菌测得的最低杀菌浓度 (minimal bacteriocidal concentration, MBC) 与传统的 MIC 存在很大差异,两类微生物敏感性试验筛选出的敏感抗菌药物也存在很大差异,因此,仅仅根据 MIC 指导临床抗菌药物的使用,对生物被膜菌感染的治疗难以达到满意的效果^[12]。由于大多数肺炎克雷伯菌菌株均能形成生物被膜,在临床依据传统微生物敏感性试验结果治疗相关感染而疗效不佳时,可选择生物被膜敏感的抗菌药物以提高抗感染治疗的效果。

作为机会致病菌,对肺炎克雷伯菌,特别是产 ESBL 的肺炎克雷伯菌的感染重在预防。高龄、低免疫力和长期住院患者是产 ESBL 的肺炎克雷伯菌的易感对象,长期使用激素,接受放、化疗和介入治疗是产 ESBL 的肺炎克雷伯菌感染的高危因素^[1]。因此,合理使用抗菌药物,减少激素的使用,加强医务人员的无菌观念和严格消毒隔离措施,及时更换或拔除各类导管和合理使用呼吸机等,均有利于预防和减少产 ESBL 的肺炎克雷伯菌的感染和传播。

参考文献

- [1] 蒋冬香,陈刚,王玉春,等.产 ESBLs 大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性[J].中华医院感染学杂志,2011,21(2):371-373.
- [2] 钱海根,张林强.肺炎克雷伯菌 β -内酰胺酶检测及耐药性分析[J].中国微生态学杂志,2013,25(3):325-327.
- [3] 刘晓峰,迟秀文,黄震,等.大肠埃希菌临床菌株生物被膜形成的分析[J].中华医院感染学杂志,2011,21(9):1732-1734.
- [4] 邹自英,杨继勇,朱冰,等.大肠埃希菌耐药性分析及生物被膜形成能力研究[J].中华医院感染学杂志,2012,22(18):3934-3937.
- [5] 王顺,王永涛,贾征夫.肺炎克雷伯菌临床分离株的流行病学及耐药特性[J].中华医院感染学杂志,2012,22(19):4346-4347.
- [6] 夏涵,刘智勇,任章银,等.24 141 份血培养病原菌的分布及耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(20):4607-4610.
- [7] 陈刚,糜祖煌,翁幸璧,等.多药耐药肺炎克雷伯菌尿液分离株检出 *gyrA* 基因新亚型[J].中华医院感染学杂志,2011,21(21):4426-4430.
- [8] 梁海军,崔艳慧,杨道坤.产 ESBLs 大肠埃希菌耐药性分析及 *qnr*、*gyrA*、*parC* 基因变异的检测[J].中华医院感染学杂志,2011,21(6):1068-1071.
- [9] 饶冠利,周文聪,季青,等.耐头孢他啶大肠埃希菌与肺炎克雷伯菌对氟喹诺酮类药物的耐药性分析[J].中华医院感染学杂志,2013,23(8):1908-1910.
- [10] 梁彩倩,张永标,杨晓燕,等.肺炎克雷伯菌中氨基糖苷类修饰酶基因流行特征的研究[J].中华医院感染学杂志,2013,23(14):3308-3313.
- [11] Ito A, Taniuchi A, May T, et al. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms[J]. Appl Environ Microbiol, 2009,75(12):4093-4100.
- [12] Moskowitz SM, Foster JM, Emerson JC, et al. Use of *Pseudomonas* biofilm susceptibilities to assign simulated antibiotic regimens for cystic fibrosis airway infection[J]. J Antimicrob Chemother, 2005,56(5):879-886.