

· 临床研究 ·

重庆两家三甲医院肺炎克雷伯菌菌毛变化分析*

方立超¹,程平¹,贺娟¹,李艳¹,黄辉¹,邓均¹,蒋丽莉¹,杨帆²,邱宗文³,郑峻松^{1△}(第三军医大学:1. 医学检验系药学院临床检验学教研室;2. 西南医院检验科;
3. 新桥医院检验科,重庆 400038)

摘要:目的 分析重庆两家三甲医院肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)菌毛变化及流行病学,以指导临床诊断及治疗。方法 2007 年 7 月至 2008 年 7 月共收集这两家医院检验科细菌室 158 株 *K. pneumoniae*,用 PCR 方法和血凝实验/血凝抑制实验对其菌毛进行分型。结果 145 株 *K. pneumoniae* 产生 III 型菌毛,7 株产生 I 型菌毛,其中 2 株两种菌毛都产生,还有 6 株不产生菌毛。结论 这两家医院主要感染的是产生 III 型菌毛的 *K. pneumoniae*,而且主要是引起呼吸道感染,这对于临床寻求针对 III 型菌毛 *K. pneumoniae* 感染的抗生素替代疗法具有指导意义。

关键词:肺炎克雷伯菌; I 型菌毛; III 型菌毛; 呼吸道

中图分类号:R378.996;R56

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2010)05-0551-02

Epidemiological analysis of *Klebsiella pneumoniae* in two tertiary hospitals from Chongqing*FANG Li-chao¹, CHENG Ping¹, HE Juan¹, et al.

(1. Department of Clinical Laboratory Medicine, College of Pharmacy and Laboratory Medicine;
2. Department of Laboratory Medicine, Southwest Hospital; 3. Department of Laboratory Sciences,
Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To analyse *Klebsiella pneumoniae* epidemiology in two tertiary hospitals from Chongqing so to direct clinical diagnosis and treatment. **Methods** 158 *Klebsiella pneumoniae* strains were collected in bacterial room of department of laboratory in the two hospitals from Chongqing from July 2007 to July 2008. The distribution of their fimbriae type was analyzed using PCR and MSH/MRSH methods. **Results** There were 145 *Klebsiella pneumoniae* strains produced type 3 fimbriae, 7 strains producing type 1 fimbriae, 2 strains producing both type 3 and type 1 fimbriae, another 6 strains producing no fimbriae. **Conclusion** The most infective *Klebsiella pneumoniae* in this two hospitals was the strain producing type 3 fimbriae and mainly causing respiratory tract infection, which will help seek alternative treatment of antibiotics on *Klebsiella pneumoniae* producing type 3 fimbriae.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; type 1 fimbriae; type 3 fimbriae; respiratory tract

近年来肺炎克雷伯菌(*K. pneumoniae*)感染有明显增加的趋势,并且成为革兰阴性杆菌和医院内感染的主要致病菌之一。由于各种抗菌药物的广泛使用导致 *K. pneumoniae* 对以 β-内酰胺类抗生素为主的多种抗菌药物产生耐药性,常可以引起各种难治性感染。越来越多的证据表明,菌毛在该菌致病过程中发挥了重要作用,与细菌的黏附定植相关。细菌可借助于菌毛尖端的黏附素对宿主黏膜上皮细胞的黏附作用黏附到宿主组织器官,通过这种黏附,细菌得以定居,从而获得侵袭的通道,这是机体致病的首要条件^[1]。该菌有两类菌毛,即 I 型和 III 型菌毛。I 型菌毛属于甘露糖敏感性(mannose-sensitive)菌毛,即在甘露糖存在时会阻断菌毛与红细胞的凝集现象,主要黏附在尿道上皮细胞;III 型菌毛具有甘露糖抵抗血凝特性(MRHA),故又称为甘露糖抵抗血凝特性菌毛,主要黏附在呼吸道上皮细胞^[2]。

为了探讨医院内 *K. pneumoniae* 感染发病情况、菌种分布特点,指导临床诊治、控制医院感染以及进行流行病学研究,2007 年 7 月至 2008 年 7 月共收集了重庆两家三甲医院(新桥医院和西南医院)检验科细菌室 158 株 *K. pneumoniae*,并运用 PCR 方法、血凝及血凝抑制实验对收集菌株产生 I 型、III 型菌毛的情况进行了分析,现报道如下。

1 材料与方 法

1.1 标本来源 2007 年 7 月至 2008 年 7 月分别从西南医院和新桥医院检验科细菌室收集 *K. pneumoniae* 共计 158 株,其中痰液 138 株,皮下积液 7 株,脑脊液 5 株,伤口分泌物 8 株。

1.2 试剂 D-甘露糖为上海化学试剂厂产品, Taq DNA 聚合酶和 Genomic DNA kit 为天根生物产品, DL2000 marker 为 Takara 产品。改良 Minka 培养基:酪蛋白胨 5.00 g, 酵母浸粉 1.00 g, KH₂PO₄ 1.36 g, Na₂HPO₄ 8.00 g, 甘油 5.00 mL, 微量盐溶液 1.00 mL, 蒸馏水定容至 1 000 mL, pH7.0~7.2。微量盐溶液配方: MgSO₄·2H₂O 10 g, MnCl₂·4H₂O 1 g, FeCl₂·6H₂O 0.135 g, CaCl₂·2H₂O 0.4 g, 定容至 1 L, 2~8 °C 保存。

1.3 细菌培养 将各菌株分别经改良 Minka 液体培养基 37 °C 静置培养 48 h, 同样培养条件下连续传代 3 次, 即为菌毛化菌体^[3]。

1.4 模板 DNA 的制备 各株菌经培养后, 用基因组提取试剂盒提取细菌基因组, 作为扩增菌毛主要结构基因的 DNA 模板。

1.5 引物设计与合成 针对 I 型和 III 型菌毛各设计 1 对引物^[3], 由上海英俊公司合成。两对引物序列如下, I 型(扩增长度 549bp)上游引物: 5'-ACG CGT CGA CAT GAT GAA AAA

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(2007BB5032)。 △ 通讯作者,电话:(023)68752310;E-mail:zhengalpha@yahoo.com。

表 1 K. pneumoniae I、III 型菌毛分析结果(株(%))

菌株来源	菌株数	PCR 扩增目的基因阳性率			血凝实验阳性率	甘露糖敏感血凝实验阳性率	甘露糖抗性血凝实验阳性率
		fimA	mrkA	fimA/mrkA			
痰液	138	6(4.35)	132(95.65)	2(1.45)	133(96.38)	6(4.51)	127(95.49)
脑脊液	5	0(0.00)	3(60.00)	0(0.00)	3(60.00)	0(0.00)	3(100.00)
皮下积液	7	0(0.00)	5(71.43)	0(0.00)	5(71.43)	0(0.00)	5(100.00)
伤口分泌物	8	1(12.50)	5(62.50)	0(0.00)	6(75.00)	1(16.67)	5(83.33)

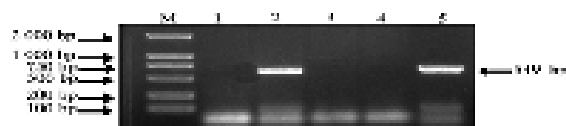
AAT AAT CCC CCT G-3', 下游引物: 5'-CCG CTC GAG CTA TCC CCT GCG CCG GCG AG-3'; III 型(扩增长度 609bp) 上游引物: 5'-CCG CTC GAG TTA CTG ATA AGT AAT TTC GTA AG-3', 下游引物: 5'-CGC GGA TCC ATG AAA AAG GTT CTT CTC TCT G-3'。

1.6 PCR 扩增 PCR 扩增体系: 模板 DNA 各 1 μ L, 正反向引物各 1 μ L, 2Master Mix 12.5 μ L, ddH₂O 9.5 μ L(体系为 25 μ L)。反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 60 $^{\circ}$ C 60 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 29 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 电压 120 V, 电泳时间 20 min。

1.7 血凝/血凝抑制实验^[4] 采健康豚鼠血, 分离红细胞, 用 PBS 制成 2% 红细胞悬液。菌株经改良 Minka 液体培养基培养传代至第 3 代, 制成约 50×10^9 cfu/mL 细菌悬液, 每株菌分为两个样本, 一个不加 D-甘露糖, 另一个加 D-甘露糖至终浓度为 0.5%, 比较 D-甘露糖对血凝反应的抑制作用。首先在 96 孔 V 型板中加入上述制备的各 2 个供试样本的菌悬液 30 μ L, 同时设生理盐水阴性对照(观察有无自凝现象); 再加入等量(预冷)的 2% 豚鼠红细胞悬液, 在微量振荡器上混匀 30~60 s, 置 4 $^{\circ}$ C 1~2 h, 观察血凝反应和 D-甘露糖是否抑制凝集; 最后取甘露糖抵抗血凝试验阳性的菌株, 待 4 $^{\circ}$ C 下完全凝集后, 置 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中 30 min, 检查凝集现象是否被解脱。待凝集解脱后, 重新混匀, 置 4 $^{\circ}$ C 1 h, 观察是否再现凝集反应。若供试菌株对豚鼠红细胞的凝集反应不能抵抗 D-甘露糖的抑制作用, 该菌株产生的是 I 型菌毛抗原; 如果供试菌株对豚鼠红细胞的凝集反应能够抵抗 D-甘露糖的抑制作用, 37 $^{\circ}$ C 出现解脱, 4 $^{\circ}$ C 又重现凝集反应, 即判定为 MRHA 阳性菌株, 该菌株能够产生 III 型菌毛抗原。

2 结 果

2.1 PCR 产物电泳结果 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳, 158 株供试菌株中, 有 7 株菌针对 I 型菌毛主要结构亚单位基因(fimA)序列的引物扩增出 549 bp 目的片段, 145 株菌针对 III 型菌毛的主要结构亚单位基因(mrkA)序列的引物扩增出 609 bp 的目的片段, 与预期的大小完全相符, 2 株菌既扩增出了 fimA 又扩增出了 mrkA 目的片段, 还有 6 株菌未扩增出 fimA 或 mrkA 目的片段(表 1), 部分菌株 PCR 扩增结果, 见图 1、2。

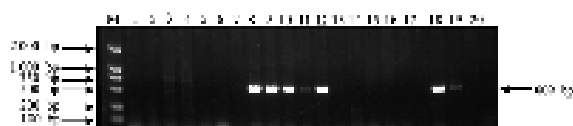


M: Marker; 1: 脑脊液标本; 2~5: 痰液标本。

图 1 fimA 扩增产物

2.2 血凝实验/血凝抑制实验 158 株供试细菌中, 除 11 株外, 其余 147 株均能凝集 2% 的豚鼠红细胞, 有 7 株不能抵抗

D-甘露糖的抑制作用, 140 株能抵抗 D-甘露糖的抑制作用, 且抗 D-甘露糖血凝反应在 37 $^{\circ}$ C 下均能被解脱, 在 4 $^{\circ}$ C 下重现完全凝集, 符合阳性判定标准, 即能够产生 III 型菌毛, 阴性对照组无自凝现象。



M: Marker; 1: 皮下积液标本; 2、8: 伤口分泌物标本; 3~7、9~20: 痰液标本。

图 2 mrkA 扩增产物

3 讨 论

158 株供试菌株中, 145 株扩增出了 mrkA 目的片段, 其中 7 株扩增出了 fimA 目的片段, 其中 2 株扩增出前述两个目的片段, 另 6 株菌未扩增出前述目的片段, 这些扩增出目的片段的菌株, 有 5 株菌无血凝特性。何礼洋等^[3]报道用 PCR 方法鉴定 K. pneumoniae I 型、III 型菌毛, 较之血凝实验、血凝抑制实验敏感。其原因为: (1) 菌毛表达与否和培养条件关系密切; (2) 与菌毛的血凝谱有一定关系。有的菌毛可凝集人、猪、羊、豚鼠及鸡等动物的红细胞, 而有的菌毛只凝集猪及鸡等少数动物的红细胞, 所以即使有菌毛, 也不一定可根据血凝特性划分类别。此外, 还可因出现红细胞非特异性凝集而产生假阳性。在 K. pneumoniae 所属的 I 型及 III 型菌毛中, I 型菌毛能与近曲小管细胞和尿中可溶性甘露糖蛋白结合, 表明 I 型菌毛介导泌尿生殖道的细菌移植^[4]。表达有 III 型菌毛的 K. pneumoniae 能黏附到内皮细胞和呼吸道、泌尿生殖道的上皮细胞上, 在肾脏 III 型菌毛能介导细菌黏附到肾小管基底膜、Bowman 囊和肾小管上^[5]。本实验说明供试菌株多数是产生 III 型菌毛的, 且多数是来于痰液标本, 大多数产生 III 型菌毛的菌株主要造成呼吸道感染。

临床研究分析表明, K. pneumoniae 分布广泛, 在痰及咽拭物、脓汁、尿、血、脑脊液、腹腔液、胆汁、白带、前列腺液、骨髓液、眼分泌液都可分离到产 ESBLs 的克雷伯菌。K. pneumoniae 是目前革兰阴性菌中除大肠杆菌外重要的条件致病菌。已成为医院感染的高危菌^[6]。近年来 K. pneumoniae 耐药率显著增高, 尤其是产 ESBLs 菌株明显增加, 直接导致老年患者肺炎死亡率增高^[7]。由于 K. pneumoniae 对以 β -内酰胺类抗生素为主的多种抗菌药物产生耐药性, 使得医院 K. pneumoniae 感染的控制成为烫手山芋^[8]。就医院感染 K. pneumoniae 菌毛类型的分类, 对研究 K. pneumoniae 的致病机制及诊断与防治均有重要意义。这两家三甲医院分布的 K. pneumoniae 主要是产生 III 型菌毛的菌株, 主要是造成呼吸道感染, 这对于寻求抗生素替代疗法, 研发针对性的疫苗和药(下转第 554 页)

本组处于急性期的胆囊炎经积极手术治疗,大部分达到 I 期手术切除,切除率为 96.2%,其并发症发生率为 3.8%,亦低于报道的急性期胆囊炎手术各种并发症发生率(15.0%)^[8]。康开庆和李绍银^[9]报道,对病程大于 72 h 但小于 1 周的急性胆囊炎病例,根据 B 超等影像学检查,也可选择 LC 手术。所以胆囊炎急性期(特别是发病大于 72 h)不应成为胆囊切除术的禁忌证,反而有必要于急性期施行胆囊切除术。

3.2 手术指征 (1)胆囊炎经积极抗炎对症治疗超过急性期但炎症控制不满意,特别是结石性梗阻性胆囊炎于急性炎症期,抗炎治疗往往疗效不佳,此时虽经积极抗炎治疗仍无明确好转,甚至有加重趋势者,应行胆囊切除术,此时多可行 LC。(2)胆囊炎短期内反复发作,不能过渡至慢性炎症期。胆囊炎一经发作,绝大多数患者炎症暂时得到控制后,由于饮食控制不当或其他原因造成胆囊炎反复发作,不能有效地由急性期过渡到慢性期,亦应在急性期内手术治疗。(3)胆囊颈结石嵌顿,胆囊肿大明显者。胆囊内结石嵌顿于胆囊颈管处,造成胆囊出口梗阻,以致胆囊充血肿大、甚至化脓性感染、胆囊穿孔等,且此时抗炎治疗往往效果较差,只有切除胆囊,才能有效地缓解炎症,本组 92 例,取得了较好的效果。何沛友和左其明^[10]报道,急性胆囊炎合并胆囊结石嵌顿的患者应正确地选择手术时机,采用 LC 手术是可行的。

3.3 LC 方式的选择 (1)单纯 LC:对于胆囊三角解剖结构尚清楚,胆囊与周围组织粘连较轻,可直接行 LC,本组 38 例施行此术式。(2)中路法 LC:对于胆囊炎症水肿重,Calot 三角解剖困难者,可采用中路法胆囊切除术式^[1],本组 87 例施行此术式,效果良好。

3.4 术后处理 由于急性期胆囊炎炎症较重,腹腔粘连重,创面渗出较多,本研究常规放置引流,既可引流渗出液,又可观察术后胆漏及出血情况,取得了很好的效果。

综上所述,胆囊炎急性期不应成为腹腔镜胆囊切除术的禁忌证,只要掌握好手术指征,就能为患者解除痛苦,达到治愈的目的。对于胆囊炎合并胆囊结石者,在急性期,胆囊虽然水肿较重,但大多解剖关系尚清楚,此时手术损伤小,并发症少,可

以选择腹腔镜手术。本组中有 125 例采取了腹腔镜手术,效果良好。对于单纯性胆囊炎一般统称为非结石性胆囊炎,其发病原因有胆道蛔虫、胆囊息肉、胆囊管狭窄等。若炎症反复发作,则应行胆囊切除术,由于一般无结石嵌顿,多可行腹腔镜手术,本组 19 例,术后效果良好。

参考文献:

- [1] 洪明,全蜀生,潘金国,等.腹腔镜下中路法胆囊切除术 18 例报告[J].中华肝胆外科杂志,2003,9(7):432.
- [2] 朱江,辛磊,陆贵民,等.结石性急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术 286 例治疗体会[J].新疆医科大学学报,2008,31(3):298.
- [3] 吴玉江.急性胆囊炎腹腔镜胆囊切除术适应证与术式研究[J].中国微创外科杂志,2005,5(4):290.
- [4] Serralta AS, Bueno JL, Planells MR, et al. Prospective evaluation of emergency versus delayed laparoscopic cholecystectomy for early cholecystitis[J]. Surg Laparosc Endosc Percutan Tech, 2003, 13(2):71.
- [5] 吴阶平,裘法祖.黄家驹外科学[M].6 版,北京:人民卫生出版社,2002:1276.
- [6] 陈训如,田伏洲,黄大熔.微创胆道外科手术学[M].北京:军事医学科学出版社,2004:347.
- [7] 张耘.急性胆囊炎手术时机与方式探讨[J].临床外科杂志,2002,10(5):314.
- [8] 黄志强.黄志强胆道外科学[M].济南:山东科学技术出版社,2000:319.
- [9] 康开庆,李绍银.急性胆囊炎腹腔镜手术 55 例临床体会[J].重庆医学,2008,37(15):1668.
- [10] 何沛友,左其明.急性胆囊炎合并胆囊结石嵌顿的腹腔镜处理[J].重庆医学,2008,37(18):2075.

(收稿日期:2009-05-27 修回日期:2009-09-08)

(上接第 552 页)

品无疑具有指导意义。

(志谢:感谢吉林大学畜牧兽医学院韩文瑜老师提供改良 Minka 液体培养基配方。)

参考文献:

- [1] Regue M, Hita B, Pique N, et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence[J]. Infect Immun, 2004, 72(1):54.
- [2] Witkowska D, Mieszala M, Gamian A, et al. Major structural proteins of type 1 and type 3 *Klebsiella* fimbriae are effective protein carriers and immunogens in conjugates as revealed from their immunochemical characterization[J]. FEMS Immunol Med Microbiol, 2005, 45(2):221.
- [3] 何礼洋,韩文瑜,贾艳,等.鸡源肺炎克雷伯菌菌毛的分型[J].中国生物制品学杂志,2007,20(8):575.
- [4] Purcell BK, Clegg S. Construction and expression of re-

combinant plasmids encoding type 1 fimbriae of a urinary *Klebsiella pneumoniae* isolate[J]. Infect Immun, 1983, 39(3):1122.

- [5] Tarkkanen AM, Virkola R, Clegg S, et al. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells[J]. Infect Immun, 1997, 65(4):1546.
- [6] 熊一平,余显书,曹何,等.147 株肺炎克雷伯菌引起医院感染调查和药敏结果分析[J].重庆医学,2004,33(2):283.
- [7] 胡波,刘威,王芹.肺炎克雷伯菌肺炎耐药性检测与分析[J].重庆医学,2004,33(9):1354.
- [8] 周安宇.746 例痰标本中的病原菌分布及耐药性分析[J].重庆医学,2008,37(11):1239.

(收稿日期:2009-07-22 修回日期:2009-09-09)