

产 ESBLs肺炎克雷伯菌的致病性及头孢他啶疗效分析

余道军¹,李荣群²,范建中¹,周田美¹,董晓勤¹,汪涛¹,胡洁¹ (1. 杭州市第一人民医院,杭州 310006; 2. 浙江中医学院,杭州 310009)

摘要:目的 探讨产 ESBLs肺炎克雷伯菌不同感染途径的致病性差异及头孢他啶对产 ESBLs肺炎克雷伯菌腹腔感染小鼠的保护作用。方法 分别采用滴鼻途径建立小鼠呼吸道感染模型和腹腔注射途径建立小鼠腹腔感染模型,将小鼠分成 6 组,检测产 ESBLs肺炎克雷伯菌对小鼠的半数致死量。另将头孢他啶体外药敏试验敏感的产 ESBLs肺炎克雷伯菌腹腔感染小鼠分成 3 组,采用不同治疗方法考察头孢他啶的体内治疗作用,同时与亚胺培南/西司他丁钠疗效做对比分析。结果 产 ESBLs肺炎克雷伯菌经过滴鼻途径感染小鼠未见死亡,经腹腔感染途径的半数致死量为 10^5 ;头孢他啶预防给药组小鼠的死亡率为 10%,同时给药与感染 4h 后给药组小鼠的死亡率为 30%,头孢他啶对产 ESBLs肺炎克雷伯菌腹腔感染小鼠的保护作用与亚胺培南/西司他丁钠作用一致。结论 产 ESBLs肺炎克雷伯菌经呼吸道感染途径的致病性比腹腔感染途径弱,头孢他啶体外药敏试验敏感的产 ESBLs肺炎克雷伯菌感染可以采用头孢他啶治疗,但应尽早使用。

关键词:致病性;肺炎克雷伯菌;头孢他啶;超广谱 β -内酰胺酶

中图分类号: R517.053 **文献标识码:** B **文章编号:** 1007-7693(2006)05-0413-04

Pathogenicity of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* and analyse on therapeutic effect of ceftazidime

YU Dao-jun¹, LI Rong-qun², FAN Jian-zhong¹, ZHOU Tian-me¹, DONG Xiao-qin¹, WANG Tao¹, HU Jie¹
(1. The First People's Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310006, China; 2. The Traditional Chinese Medicine College of Zhejiang, Hangzhou 310009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the pathogenicity's difference of ESBLs-producing *Klebsiella pneumoniae* in different route of infection in mice and the protection of ceftazidime on mice infected by ESBLs-producing *K. pneumoniae* through abdominal cavity. **METHODS** The half lethal dose of ESBLs-producing *K. pneumoniae* to mice infected through nose and abdominal cavity were detected. The mice infected by ceftazidime-sensitive ESBLs-producing *K. pneumoniae* through abdominal cavity were divide into 3 groups and the therapeutical effect of ceftazidime were investigated through different therapeutical methods. **RESULTS** All mice infected ESBLs-producing *K. pneumoniae* through nose did not die. The half lethal dose of ESBLs-producing *K. pneumoniae* through abdominal cavity were 10^5 . The death rate of mice infected ceftazidime-sensitive ESBLs-producing *K. pneumoniae* through abdominal cavity in the ceftazidime medication administration groups of prophylaxis, simultaneous and infected 4 hours were 10%, 30%, 30%, re-

作者简介:余道军,男,1969年生,医学硕士,主管检验师,研究方向:医学微生物快速检测、细菌耐药性及感染免疫。Email: yudaojun98@163.com Tel: 0571-87065701-10575

spectively. The protection of ceftazidime on mice infected by ESBLs-producing *K. pneumoniae* was equal with Imipenem/Cilastatin (IPM). **CONCLUSION** The pathogenicity's of ESBLs-producing *K. pneumoniae* through respiratory infection in mice is weaker than abdominal cavity infection. Ceftazidime can treat the infection of ceftazidime-sensitive ESBLs-producing *K. pneumoniae*.

KEY WORDS: pathogenicity; *Klebsiella pneumoniae*; ceftazidime (CAZ); extended spectrum beta-lactamases (ESBLs)

肺炎克雷伯菌引起的医院内感染已占革兰阴性菌所致院内感染的第二、三位,是导致肺炎的主要病原菌,还可引起肺外其他部位感染^[1]。有关肺炎克雷伯菌感染研究较多,但对其致病性研究较少,尤其是有关该菌在不同感染部位的致病性的差异研究未见报道。笔者通过建立小鼠呼吸道(非无菌部位)和腹腔感染(无菌部位)模型,用于分析肺炎克雷伯菌感染非无菌部位和无菌部位的致病性是否有差异,同时对产超广谱 β -内酰胺酶(ESBLs)菌的腹腔感染小鼠进行不同方法治疗,分析了头孢他啶对感染小鼠的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 药敏纸片与药品 体外药敏试验确认纸片:头孢噻肟、头孢他啶、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸,均购自英国Oxoid公司。注射药品:注射用头孢噻肟钠,1.0g/支,华北集团凯瑞特药业有限公司生产,批号:B041206;注射用头孢他啶(ceftazidime, CAZ),1.5g/支,哈药集团制药总厂生产,批号:B20041003;注射用亚胺培南/西司他丁钠(imipenem/cilastatin, IPM),1.0g/支,Merck & Co., Inc.生产,批号:20041201。

1.1.2 菌株来源 动物实验用肺炎克雷伯菌取自我院住院病人痰液,经VITEK-AMS分析仪鉴定为产ESBLs菌株,并经K-B法检测确认,体外药敏结果显示该菌除对头孢他啶和亚胺培南敏感外,对其他多种抗菌药物耐药。质控菌株为肺炎克雷伯菌ATCC700603,由浙江省临检中心提供。

1.1.3 实验动物 昆明种小鼠,清洁级,体重18~20g,合格证号:SYXK(浙)2003-0003;正常饲养于杭州市第一人民医院动物中心;温度18~25℃,相对湿度50%~70%。

1.1.4 仪器与相关试剂 VITEK-AMS自动化微生物分析仪,GN1⁺鉴定卡和药敏卡片 GNS-143、121均由法国梅里埃公司提供。日立7600全自动生化分析仪。

1.2 方法

1.2.1 肺炎克雷伯菌(ESBLs+)经小鼠呼吸道感染的半数致死量试验^[2] ①分组:昆明小鼠70只,雌雄各半,分为7组:空白对照组10只、模型组10只、肺炎克雷伯菌菌液滴鼻组5组(每组10只)。②滴鼻感染:取培养18h的肺炎克雷伯菌,用生理盐水配成0.1麦氏单位、0.5麦氏单位、1麦氏单位、2麦氏单位、4麦氏单位菌液,各菌液均用微量注射器取0.01mL,经鼻腔缓慢滴进各组小鼠呼吸道,模型组小鼠同法滴进等量生理盐水,空白对照组不进行处理,各组小鼠正常饲养5d,观察每组小鼠的死亡数。

1.2.2 肺炎克雷伯菌(ESBLs+)经小鼠腹腔感染的半数致死量试验^[2] ①分组:同上分成7组。②菌液配制:取培养18h的肺炎克雷伯菌,首先用生理盐水配成1麦氏单位菌液,

然后再用生理盐水将菌液稀释成 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 浓度。

③腹腔感染:各组小鼠腹腔经75%乙醇消毒后,分别注射不同浓度的菌液0.2mL,模型组小鼠同法注射等量生理盐水,空白对照组不进行处理,各组小鼠正常饲养3d,观察每组小鼠的死亡数。

1.2.3 头孢他啶对产ESBLs肺炎克雷伯菌腹腔感染防治作用试验

①分组:昆明小鼠80只,雌雄各半,分为8组:空白对照组10只、模型组10只、头孢他啶3组:预防治疗组10只,同时治疗(感染与给药同时进行)组10只,感染4h后治疗组10只;亚胺培南/西司他丁钠组3组:预防治疗组10只,同时治疗(同前)组10只,感染4h后治疗组10只。②小鼠用量:根据成人临床治疗剂量,按成人与小鼠用药系数计算出小鼠等效剂量(按体表面积计算,系数0.0026),20g小鼠24h的头孢他啶、亚胺培南/西司他丁钠用量均为26mg。③感染与给药:除空白对照组外,其余各组小鼠均腹腔注射1麦氏单位肺炎克雷伯(ESBLs+)菌液0.2mL;其中头孢他啶预防治疗组和亚胺培南/西司他丁钠预防治疗组小鼠在感染前24h静脉注射药物,注射方法为每日2次,每次13mg/0.2mL,注射间隔时间为12h。同时治疗组小鼠在感染同时注射药物,感染治疗组小鼠在腹腔注射细菌4h后注射药物,模型组小鼠在感染细菌后注射生理盐水。各组小鼠给药方法相同,连续给药3d并正常饲养。小鼠感染后每4h记录小鼠活动状况及死亡数目,并在感染8h后取血进行血生化指标和常规指标检测。各组小鼠死亡后进行解剖,观察各脏器病理变化,存活小鼠在3d后处死解剖观察各脏器病理变化。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌(ESBLs+)呼吸道感染的致病性

不同浓度的肺炎克雷伯菌经鼻腔感染小鼠后,各组小鼠均未见死亡,在感染10h后,只有2麦氏单位和4麦氏单位菌液组小鼠活动力下降,精神萎靡,大便稀软,余未见明显变化,且在24h逐渐恢复。

2.2 肺炎克雷伯菌(ESBLs+)腹腔感染的致病性

不同浓度的肺炎克雷伯菌经腹腔感染小鼠后,各组小鼠均见死亡,在感染4h后,小鼠活动力下降,精神萎靡,大便稀软,感染3d后,各组小鼠死亡数差异明显,未死亡小鼠逐渐恢复正常,见表1。

2.3 头孢他啶对产ESBLs肺炎克雷伯菌腹腔感染防治作用的试验结果

2.3.1 头孢他啶和亚胺培南/西司他丁钠对腹腔感染小鼠保护作用的试验结果 各组小鼠经不同方法治疗后,其存活数具有一定差异,见表2。

表 1 不同浓度菌液感染小鼠死亡率

Tab 1 Death rate of mice infected by different concentration of *Klebsiella Pneumoniae* liquid

组别	总鼠数 (n)	死亡数	死亡时间* (h)	死亡率 (%)
对照	10	0	-	0
模型	10	0	-	0
10 ³	10	4	48	40
10 ⁴	10	4	41	40
10 ⁵	10	6	33	60
10 ⁶	10	6	22	60
10 ⁷	10	10	18	90
1U [#]	10	10	18	100

注：#U表示麦氏单位；*指最后1只小鼠死亡时间

Note: #U—McFarland standard; * express the death time of the last mice.

表 2 不同治疗方法组小鼠死亡率

Tab 2 Death rate of mice using different treatment

组别	总鼠数 (n)	死亡数	死亡率 (%)
空白对照	10	0	0
模型组	10	10	100
CAZ预防	10	1	10
同时治疗	10	3	30
感染 4h治疗	10	3	30
IPM预防	10	1	10
同时治疗	10	2	20
感染 4h治疗	10	3	30

注：模型组与其他各组相比， $P < 0.01$ ，CAZ、IPM预防组与其同时治疗及感染 4h治疗相比， $P < 0.05$

Note: The model group compared with other groups, $P < 0.01$; preventing groups of CAZ and IPM compared with the treatment groups in 0h and 4h, $P < 0.05$

2.3.2 头孢他啶和亚胺培南/西司他丁钠对不同治疗方法组小鼠血液学指标的影响 各组小鼠经不同方法治疗后，头

表 4 不同治疗方法组小鼠生化指标 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 4 The mice's index of blood biochemistry using different treatment ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	ALT	AST	LDH	CK	BUN
空白对照	19 ± 5.0	76 ± 30.5	579 ± 89.6	668 ± 135.2	6.98 ± 1.21
模型	65 ± 10.1	199 ± 18.7	1184 ± 56.2	1172 ± 125.3	13.46 ± 3.25
CAZ预防	18 ± 6.1	88 ± 22.4	508 ± 92.3	779 ± 129.5	6.86 ± 1.25
同时治疗	25 ± 7.9	120 ± 18.5	675 ± 103.6	788 ± 122.4	10.23 ± 2.56
感染 4h治疗	38 ± 9.0	135 ± 15.7	521 ± 89.6	992 ± 129.6	11.98 ± 1.98
IPM预防	17 ± 5.8	78 ± 29.1	523 ± 90.3	725 ± 120.6	6.41 ± 1.18
同时治疗	27 ± 9.8	116 ± 17.6	653 ± 115.6	768 ± 118.7	10.10 ± 2.05
感染 4h治疗	40 ± 11.2	129 ± 10.6	556 ± 91.3	972 ± 126.9	11.96 ± 2.09

注：ALT的空白对照组、CAZ预防、CAZ同时治疗、IPM预防、IPM同时治疗 5组相比， $P > 0.05$ ，这 5组与其他 3组相比， $P < 0.01$ ；模型组、CAZ感染 4h治疗、IPM感染 4h治疗 3组相比， $P > 0.05$ ，这 3组与其他 5组相比， $P < 0.01$ ；CAZ的 3组与 IPM的对应 3组之间相比， $P > 0.05$ 。BUN的各组之间比较同 ALT相同。AST、LDH、CK各组间相比， $P > 0.05$ 。

Note: Control compared with CAZ preventing, CAZ simultaneous treatment, IPM preventing, IPM simultaneous treatment, $P > 0.05$ (ALT, BUN), the previous five groups compared with other groups, $P < 0.01$ (ALT, BUN); Model compared with CAZ treatment in 4h and IPM treatment in 4h, $P > 0.05$ (ALT, BUN), the previous three groups compared with other groups, $P < 0.01$ (ALT, BUN); The three groups of CAZ treatment compared with the three groups of IPM treatment correspondingly, $P > 0.05$ (ALT, BUN). Three were no different in all groups of AST, LDH and CK ($P > 0.05$).

3 讨论

肺炎克雷伯菌的确切发病机制尚未完全阐明，一般认为其荚膜抗原可以与其他含荚膜细菌（如肺炎球菌、流感杆菌）的多糖抗原交叉反应，通常荚膜被认为可以增加肺炎克雷

伯他啶和亚胺培南/西司他丁钠的预防组和细菌感染 4h治疗血常规指标中的白细胞总数差异显著，见表 3；头孢他啶和亚胺培南/西司他丁钠的预防组中反映肝脏受损的敏感指标丙氨酸氨基转移酶（ALT）和反映肾脏受损的敏感指标尿素氮（BUN）与两药的同时治疗组和感染 4h治疗组的差异显著；各组间的其余各项生化指标差异无统计学意义，见表 4。

表 3 不同治疗方法组小鼠血常规指标 ($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab 3 The mice's index of blood routing using different treatment ($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	白细胞计数 ($\times 10^9$)	淋巴细胞 (%)	血小板数
空白对照	2.4 ± 0.2	70.9 ± 12.5	512 ± 104.5
模型	4.2 ± 0.4	52.4 ± 15.6	237 ± 12.1
CAZ预防	2.5 ± 0.2	70.5 ± 9.5	445 ± 88.3
同时治疗	3.0 ± 0.3	68.2 ± 13.5	339 ± 98.6
感染 4h治疗	3.9 ± 0.4	58.6 ± 16.2	287 ± 110.2
IPM预防	2.6 ± 0.3	72.5 ± 11.8	498 ± 84.3
同时治疗	3.1 ± 0.3	67.9 ± 9.9	387 ± 68.2
感染 4h治疗	4.0 ± 0.4	55.8 ± 13.2	271 ± 103.5

注：WBC的空白对照组、CAZ预防、IPM预防 3组相比， $P > 0.05$ ，这 3组与其他组相比， $P < 0.01$ ；模型组、CAZ感染 4h治疗、IPM感染 4h治疗 3组相比， $P > 0.05$ ，这 3组与其他组相比， $P < 0.01$ ；CAZ的 3组与 IPM的对应 3组之间相比， $P > 0.05$ 。淋巴细胞和血小板各组间相比， $P > 0.05$ 。

Note: Control compared with CAZ preventing and IPM preventing, $P > 0.05$ (WBC), the previous groups compared with other groups, $P < 0.01$ (WBC); Model compared with CAZ treatment in 4h and IPM treatment in 4h, $P > 0.05$ (WBC), the previous groups compared with other groups, $P < 0.01$ (WBC), the three groups of CAZ treatment compared with the three groups of IPM treatment correspondingly, $P > 0.05$ (WBC). The groups of lymphocyte compared with the groups of platelet, $P > 0.05$.

伯菌的毒力，荚膜成分中的酸性多糖可以减慢或抑制巨噬细胞向感染病灶移动，机体免疫系统对其清除力减弱，使得该菌在机体内大量繁殖，释放毒素而致病。肺炎克雷伯菌感染的病理特点是细菌生长繁殖快，在各脏器可形成单发或多发

性脓肿,渗出液中含有大量带有荚膜的革兰阴性杆菌,单个存在或成簇状。

肺炎克雷伯菌是常见的引起呼吸道感染的革兰阴性杆菌,在肺部感染的病原中占第3位^[1],该易产生超广谱 β -内酰胺酶而导致对多种抗菌药物耐药。产ESBLs可导致肺炎克雷伯菌对第三代头孢头孢菌素、单环酰胺类以及第四代头孢菌素等氧亚氨基 β -内酰胺类抗生素耐药,而对碳青霉烯类以及头霉素敏感,且这种耐药性可被 β -内酰胺酶抑制剂如克拉维酸所抑制。肺炎克雷伯菌产ESBLs率较高,国外报道^[2]其产酶率约10%~40%,最近有报道^[3]黎巴嫩一家大型医院临床分离出的1248株肺炎克雷伯菌中20%产ESBLs,以ICU分离出的菌株产ESBLs率最高,为38.4%;国内华山医院报道^[4],ICU等科室分离出的肺炎克雷伯菌产ESBLs率高达51%。与欧美国家明显不同的是,国内研究报道肺炎克雷伯菌临床分离菌株中ESBLs以CTX-M基因型为主,其主要水解底物为头孢噻肟,但对头孢他啶水解率很低。产ESBLs肺炎克雷伯菌致院内感染流行的报道也较多。

但是,本实验研究发现:感染部位不同,产ESBLs肺炎克雷伯菌的致病性差异很大。该菌经呼吸道感染小鼠后,临床表现不典型,致病力不强,这一点与上述文献报道不一致;但是该菌腹腔感染小鼠后,小鼠在4h内即发病,且临床症状典型,死亡率极高,这与很多文献报道一致^[5]。就其原因,实验误差可能是主要方面,细菌经滴鼻途径感染小鼠,菌量难以控制,部分细菌未能进入小鼠呼吸道而入消化道,部分细菌因小鼠气道反应而喷出体外,使得真正进入小鼠体内的细菌有限,不能反映该菌的真正呼吸道致病性;该菌腹腔感染实验操作可控,误差小,因此,经腹腔途径感染的小鼠致病性能够反映该菌的毒力,可以采用该途径进一步研究产ESBLs肺炎克雷伯菌的致病性。

本实验根据产ESBLs肺炎克雷伯菌的体外药敏试验结果,分析了头孢他啶对小鼠腹腔感染该菌的保护作用^[6-7],发现治疗方法不同其疗效差异较大:经预防给药后,在小鼠感染之前,其体内的血药浓度已经基本达到平衡,感染同时再次给药,小鼠体内血药浓度已经平衡。这样细菌刚进入体内,药物就充分发挥作用而将细菌杀灭,细菌不能在体内繁殖致病,因此,经预防给药后,头孢他啶的对产ESBLs肺炎克雷伯菌感染小鼠保护作用强。在感染同时给药,小鼠体内血

药浓度不稳定,还未达到平衡,而肺炎克雷伯菌繁殖速度极快,小鼠对肺炎克雷伯菌感染特别敏感,产生一系列的生理病理变化,因此,头孢他啶对产ESBLs肺炎克雷伯菌小鼠的保护作用不如预防给药效果好,各生化指标和血常规指标变化比预防组小鼠明显。感染后给药,细菌迅速繁殖,在药物发挥作用前,小鼠各脏器均已受累,产生强烈的生理病理变化,表现为各项生化指标和血常规指标变化显著,死亡率高。

总之,产ESBLs肺炎克雷伯菌感染不同部位,所表现出来的临床症状和预后有一定的差异,具体原因有待进一步深入研究,体外敏感的头孢他啶对产ESBLs肺炎克雷伯菌感染具有保护作用,但应该尽早用药。

参考文献

- [1] Pena C, Pujol M, Ardanuy C, et al. An outbreak of hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae*, including strains producing extended spectrum beta-lactamase [J]. J Hosp Infect, 2001, 47(1): 53-59.
- [2] Kariuki S, Corkill JE, Revathi G, et al. Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2001, 45(7): 2141.
- [3] Poirel X, Naas T, Guibert M, et al. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1999, 43(3): 573.
- [4] Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment [J]. Drugs, 2003, 63: 353.
- [5] Daoud Z, Hakime N. Prevalence and susceptibility patterns of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a general university hospital in Beirut, Lebanon [J]. Rev Esp Quimioter, 2003, 16(2): 33.
- [6] Xiong Z, Zhu D, Zhang Y, et al. Extended-spectrum beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates [J]. Chin med J, 2002, 82(21): 1476.
- [7] 余道军,周田美,董晓勤,等.产ESBLs细菌体外药敏试验结果报告探讨[J].江西医学检验杂志, 2005, 23: 56-57.

收稿日期: 2005-12-19