

# 利用脈衝電場電泳法和 莢膜血清分型法研究 二位血液腫瘤患者的復發性 *Klebsiella pneumoniae*菌血症

黃玉梅 馮長風<sup>2</sup> 胡伯賢<sup>1</sup> 劉有增<sup>1</sup> 廖旭方<sup>3</sup>

施智源<sup>1</sup> 林育蕙<sup>1</sup> 林明鋒<sup>1</sup> 王唯堯<sup>1</sup>

臺中榮民總醫院 感染管制委員會<sup>1</sup> 臺中榮民總醫院 內科部 感染科<sup>2</sup> 臺北榮民總醫院  
內科部 感染科<sup>3</sup> 省立旗山醫院 內科部

血液腫瘤患者常常有敗血症之併發症發生，其死亡率相當高。在臺灣，血液腫瘤患者的菌血症之中，*Klebsiella pneumoniae* 排名第二。然而有關復發性菌血症之文獻並不多。本文之目的在於討論復發性 *K. pneumoniae* 菌血症其菌株是否為再發性。自 1993 年 1 月至 1994 年 12 月，我們收集到二位患者計四次菌血症。以抗微生物製劑感受性、莢膜血清分型法和脈衝電場電泳法分析此四菌株。病患 A 之菌株 1 和 2 抗微生物製劑敏感性結果相同，莢膜血清型亦同為 K64 型。病患 B 的菌株 3 和 4 同為敏感性菌株，但莢膜血清型菌株 3 為 K54 型，菌株 4 則為 K57 型，兩者不同。以脈衝電場電泳法分析可判讀為，菌株 1 和 2 是相同的，菌株 3 和 4 是不同的菌株。綜合以上結果，病患 A 的復發性菌血症為再發性，病患 B 則是再次感染。（感控雜誌 1999;9:81-9）

關鍵字：脈衝電場電泳法、復發性菌血症、再發性、再次感染

## 前 言

血液腫瘤患者接受化學治療後，常常有敗血症發生，其死亡率相當高。在這類菌血症患者的致病菌當中，*Escherichia*

中華民國87年12月28日受理  
中華民國88年2月8日修正  
中華民國88年3月20日接受刊載  
聯絡人：胡伯賢  
聯絡地址：台中市中港路三段160號  
聯絡電話：(04)3592525-3081

*coli* 最多 [1-3]，然而 *Klebsiella pneumoniae* 之比率在逐年的增加中 [4,5]。de la Torre 等人報告，*Klebsiella* 是革蘭氏陰性菌菌血症之第二位 [6]。在臺灣，*K. pneumoniae* 的感染相當常見 [7,8]，王立信等人曾發表，*K. pneumoniae* 菌血症佔所有革蘭氏陰性菌菌血症之第三位 [7]。台北榮總王復德等人報告，於血液腫瘤患者的菌血症之中，*K. pneumoniae* 排名第二，僅次於 *E. coli* [3]。

復發性菌血症 (Recurrent bacteremia) 是指前一次菌血症經抗微生物製劑充分治療後，臨床上判定治癒；經一段時間之後，由同一種細菌再次引發菌血症者。此復發性感染可以是再發性 (relapse) 或是再次感染 (reinfection)。復發性革蘭氏陰性菌菌血症的機率不高，通常不到十分之一，也較少有文章探討此疾病。本文之目的在於以分子生物學角度，討論復發性 *K. pneumoniae* 菌血症其菌株是否為再發性。

## 材料與方法

### 一、病例和菌株收集

同一患者若重複有相同菌種的菌血症，且間隔時間二週以上，臨床症狀於此期間改善者，即定義為復發性菌血症。自 1993 年 1 月至 1994 年 12 月，在某教學醫院共有 235 次 *K. pneumoniae* 菌血症案例。我們發現其中二位患者計四次菌血症，他們的第二次菌血症符合復發性菌血症之定義，由此二病人的血液中共分離得到 4 株 *K. pneumoniae* 菌株。病

患及菌株的背景資料列在表一。

病患 A 是 51 歲女性淋巴瘤病患，收集到菌株 1 及 2；病患 B 是 64 歲男性白血病患者，得到菌株 3 和 4。這四次菌血症都是住院接受化學治療後發生，符合院內感染定義，體溫都超過 38.3 °C；其中三次事件血中白血球數每毫升少於 500，另一次血中絕大多數是未成熟的癌細胞，正常的中性球數每毫升也低於 500。血小板數，在四次菌血症時每毫升都不足 20000。病患 A 第一次感染時，使用 cefoperazone 和 amikacin 治療約三週，臨床症狀緩解，出院返家；不幸因癌症復發合併發燒，故再次入院。病患 B 第一次入院後，接受 piperacillin 及 amikacin 治療四週以上，臨床症狀消失，予以出院。其後因接受化學治療，再次發燒而住院。兩次復發的菌血症侵入途徑都是下呼吸道。病患 A 之兩次感染間隔 1 個月，病患 B 則相隔 3 個月。病患 B 第一次菌血症是多重菌血症，血液同時培養出 *K. pneumoniae* 和 *Citrobacter freundii* 二株菌種。

### 二、菌株鑑定

所有的 4 株菌株都以全自動細菌鑑定儀 Vitek (Vitek AMS; BioMerieux Vitek, Inc., Hazelwood, Mo.) 鑑定為 *K. pneumoniae*，並且用 API 20E 系統 (API-BioMerieux, La Balme Les Grottes, France) 確認。

### 三、抗微生物製劑感受性測試

依據 NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) 之指引 [9]，在 Muller-Hinton 瓊脂



(Difco, Laboratories, Detroit, MI, USA) 上，使用紙錠瓊脂擴散法測試下列十二種抗生素的感受性：cephalothin、cefotaxime、ceftazidime、aztreonam、imipenem、ampicillin、piperacillin、ampicillin/sulbactam、gentamicin、amikacin、ofloxacin 和 sulfamethoxazole/trimethoprim。

#### 四、莢膜血清分型法 (serotyping)

*K. pneumoniae* 的外層有一由多醣體構成之莢膜 (K 抗原)，利用抗原抗體反應原理，加入抗血清與莢膜作用，可以將菌株分為 82 型，此法稱之為莢膜血清分型。我們先將菌株置於 MacConkey 培養基 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) 上培養，再採用 counter-current immunoelectrophoresis 方法分型 [10]。

#### 五、脈衝電場電泳法 (pulsed-field gel electrophoresis)

脈衝電場電泳法之操作請參考廖旭方及 Soldati 等之著作 [11,12]。菌株隔夜培養後，加入 saline-EDTA buffer

(75mM NaCl, 25mM EDTA, pH7.5)，調至適當濃度。將菌株懸浮液固化，與 lysis buffer (10mM Tris-HCl [pH7.6]，100 mM EDTA, 100mM NaCl, 0.5% Brij 58, 0.2% Sodium deoxycholate, 0.5% sodium lauryl sarcosine, 0.5% lysozyme per ml) 反應，使細胞溶解。再加入 proteinase K 作用後，洗去酵素，以 TE buffer (10mM Tris-HCl [pH7.5]，100mM EDTA) 沖洗，粹取 DNA。最後加上 endonuclease *XbaI*，在 37 °C 下作用 24 小時，將 DNA 切割成數段。於 14 °C、6V/cm 條件下，反應時間從 5 秒到 35 秒，用脈衝電場電泳法作用 24 小時，使 DNA 片段在瓊脂上分離開來，以紫外線將之顯現，並照相保存。

### 結 果

這四株 *Klebsiella* 菌株都不是多重抗藥性菌株，所有菌株的抗微生物製劑敏感性都相同，僅 ampicillin 呈抗藥性，其餘皆呈敏感性 (表一)。莢膜血清型的

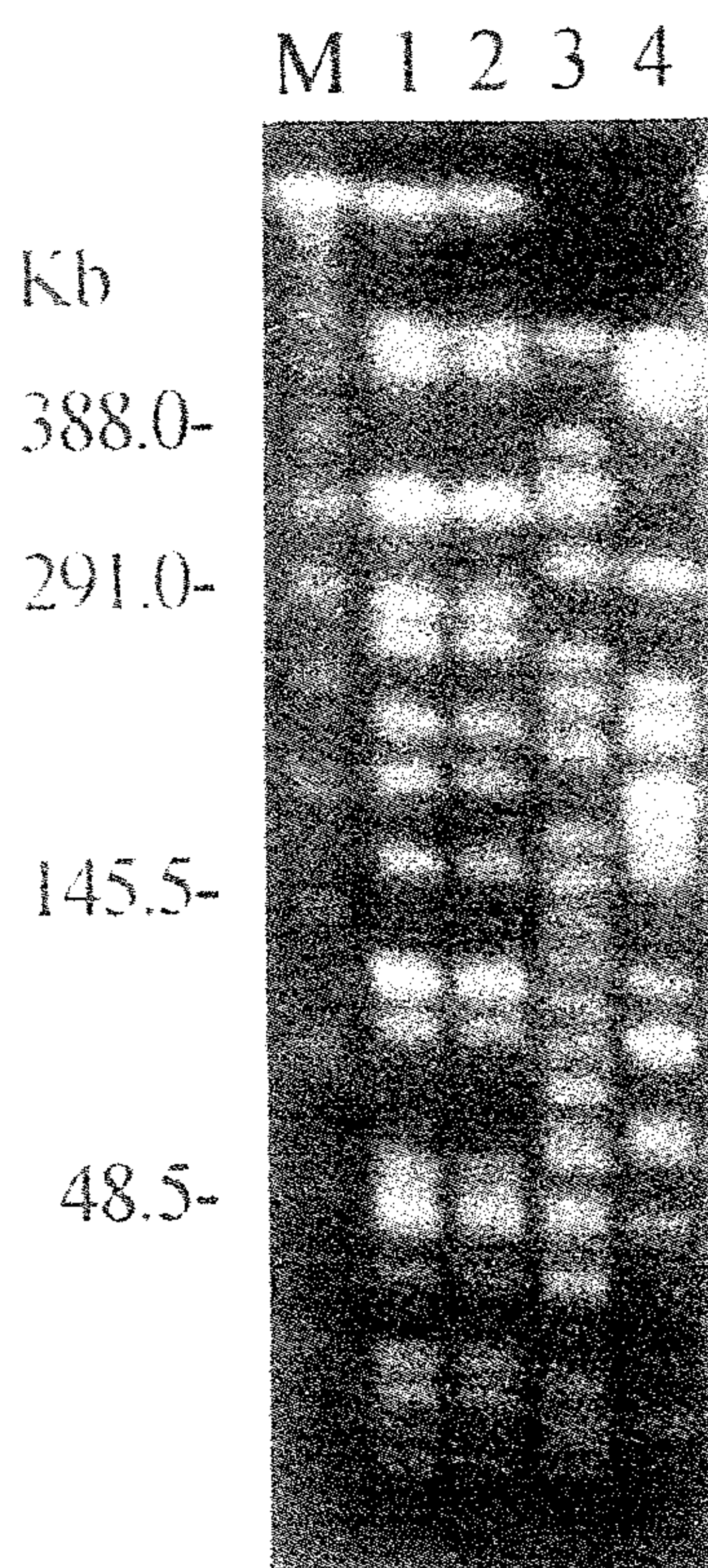
表一 抗微生物製劑感受性

| 菌 株 | AMP | CZ | CTX | CAZ | PIP | AZ | T | UNA | GM | AN | STX | OFL |
|-----|-----|----|-----|-----|-----|----|---|-----|----|----|-----|-----|
| 1   | R   | S  | S   | S   | S   | S  | S | S   | S  | S  | S   | S   |
| 2   | R   | S  | S   | S   | S   | S  | S | S   | S  | S  | S   | S   |
| 3   | R   | S  | S   | S   | S   | S  | S | S   | S  | S  | S   | S   |
| 4   | R   | S  | S   | S   | S   | S  | S | S   | S  | S  | S   | S   |

AMP: ampicillin, CZ: cephalothin, CTX: cefotaxime, CAZ: ceftazidime, PIP: piperacillin, AZ: aztreonam, T: imipenem, UNA: ampicillin/sulbactam, GM: gentamicin, AN: amkiacin, STX: sulfamethoxazole/trimethoprim, OFL: ofloxacin. S: susceptibility, I: intermediate, R: resistant.

表二 病患的臨床資料和菌株的分離日期、莢膜血清型

| 病患 | 性別 | 年齡 | 潛在疾病 | 菌株 | 分離日期     | 發燒 | 白血球   | 院內感染 | 預後 | 血清型 |
|----|----|----|------|----|----------|----|-------|------|----|-----|
| A  | 女  | 51 | 淋巴瘤  | 1  | 19941118 | 有  | 360   | 是    | 存活 | K64 |
|    |    |    |      | 2  | 19941220 | 有  | 21500 | 是    | 死亡 | K64 |
| B  | 男  | 64 | 白血病  | 3  | 19940524 | 有  | 180   | 是    | 存活 | K54 |
|    |    |    |      | 4  | 19940829 | 有  | 260   | 是    | 存活 | K57 |



圖一 四株 *Klebsiella pneumoniae* 菌株之脈衝電場電泳基因圖。M 是標誌，1 到 4 是菌株編號，請參考表二。

結果為，菌株 1 和 2 同為 K64 型；菌株 3 為 K54 型，菌株 4 為 K57 型，兩者不同（表二）。脈衝電場電泳法之基因分析呈現，菌株 1 和 2 完全相同，菌株

3 和 4 有 12 個基因片斷不同（圖一）。由此可以判讀菌株 1 和 2 是同一菌株，菌株 3 和 4 是不同的菌株。

### 討 論

有關復發性菌血症之文獻並不多，Capdevila 等人報告其機率只有 9%，Mylotte 等人報告 9.8%，Altemeier 等人也只有 2.6%[13-15]。在復發性革蘭氏陰性菌菌血症之中，以 *E. coli* 最多[14]，原在性疾病以癌症最為常見[13, 14]，而泌尿道感染為其主要感染源[14]。愛滋病患者則常有復發性 *Salmonella* 或 *S. aureus* 菌血症[16-18]。復發性 *E. coli* 菌血症也有數篇文章專門討論之[19-21]，但是復發性 *K. pneumoniae* 菌血症少有單獨論述之著作。僅 Goetz 等人曾報告，在肝臟移植病房內，因點滴注射液污染而導致 *K. pneumoniae* 菌血症群突發事件[22]。其中一患者有兩次菌血症，間隔 13 日，這二次菌血症菌株並未以分子生物學方法研究。

在 Mylotte 等人所報告之 74 次復發性革蘭氏陰性菌菌血症裡，只有 34 次



菌血症前後兩次都是由同一種細菌感染 [14]。王立信等人發表之 100 次 *K. pneumoniae* 菌血症之中，有兩次是復發性 [6]。然而他們並未討論再發性或再次感染。我們的 255 次 *K. pneumoniae* 菌血症之中，只有兩次是復發性 [8]，復發性之機率，我們似乎遠較其他報告為低。我們的復發性感染侵入之途徑都是下呼吸道，不是泌尿道。*K. pneumoniae* 菌血症的死亡率相當的高，從 25% 到 47.7% [6-8]。另有報告指出復發性菌血症的死亡率約略相同 [14]，但以呼吸道為感染途徑的死亡率較高。我們的兩次復發性菌血症，一存活，一死亡。

這二次復發性菌血症的抗微生物製劑敏感性都相同，都是敏感性菌株。以往的 *K. pneumoniae* 菌血症報告顯示，絕大多數都是敏感性菌株 [6,8]。以往曾有報告指出，以抗微生物製劑敏感性做為評估再發的依據並不恰當 [19]，宜以分子生物學方法為之。

不同的分子生物學方法曾被用於探討再發性的問題 [19,20]，然而已有文獻指出脈衝電場電泳法較為優異 [20]。此法重複性高、可靠，已廣泛運用在各種細菌的研究。在群突發時，鑑定革蘭氏陰性菌菌株間的相關性，以脈衝電場電泳法最好。脈衝電場電泳法也曾被用於復發性 *E. coli*、*Enterococcus faecium* 和 *Pseudomonas aeruginosa* 等菌血症的分析 [23,24]，唯獨沒有復發性 *K. pneumoniae* 菌血症的報告。不過在 *K. pneumoniae* 院內感染的群突發及抗藥性菌株研究方面，脈衝電場電泳法已被證實

極為優異 [25,26]。

*K. pneumoniae* 菌莢膜血清分型在臺灣少有實驗室能執行之。國內有少數報告，於 *K. pneumoniae* 菌血症的菌株中以 K1 型最多 [27]；在 *K. pneumoniae* 肝膿瘍裡，K1 型的菌株也是最多 [28]。我們對 50 餘菌株菌種進行實驗，發現結果與上述相吻合，還是 K1 型最多 [29]；若只挑其中十餘株院內感染的 *K. pneumoniae* 菌株分析，則各型零散分布，K1 型並不是最多。我們也發現不同患者之 K1 型菌株，脈衝電場電泳法的指紋各不相同。同一患者不同感染部位之菌株，脈衝電場電泳法和莢膜血清型都是相同的。我們這四株 *K. pneumoniae* 都不是 K1 型，在判讀再發性方面與脈衝電場電泳法的結果吻合。

由脈衝電場電泳法結果，我們可判讀病患 A 的復發性菌血症為再發性，病患 B 則是再次感染。病患 A 的第一次菌血症是在接受化學治療後發生，口腔有嚴重之齒齦炎，同時之咽喉拭子培養也得到 *K. pneumoniae*，給予抗生素治癒後出院。第二次感染也是因癌症復發，住院接受化學治療後菌血症再次發作，這次除了齒齦炎外，也有肺炎，痰液亦培養出 *K. pneumoniae*。所以病患 A 之再發，可能由於口腔之病灶未完全根除所致。由以上結果，似乎時間與是否為再發性有關，復發時間短者為再發性，長者為再次感染。不過我們只有兩次復發感染，數量太少，不能以此驟下結論說再發與否與時間有關。曾有報告指出，相隔 3 個月的復發性菌血症，仍證實為再發性 [30]。



## 參考文獻

1. Gunther G, Bjorkholm M, Bjorklind A, et al: Septicemia in patients with hematological disorders and neutropenia. A retrospective study of causative agents and their resistance profile. *Scand J Infect Dis* 1991;23:589-98.
2. Fredlund H, Bjoreman M, Kjellander J, et al: A 10-year survey of clinically significant blood cultures isolates and antibiotic susceptibilities from adult patients with hematological diseases at a major Swedish hospital. *Scand J Infect Dis* 1990;22:381-91.
3. Wang FD, Liu YM, Liu CY: Bacteremia in patients with hematological malignancies. *J Formos Med Assoc* 1998;97:405-9.
4. Umsawasdi T, Middleman EA, Luna M, et al: *Klebsiella* bacteremia in cancer patients. *Am J Med Sci* 1973;265:473-82.
5. Bodey GP, Elting LS, Rodriguez S, et al: *Klebsiella* bacteremia. A 10-year review in a cancer institution. *Cancer* 1989;64:2365-76.
6. de la Torre MG, Romero-Vivas J, Martinez-Beltran J, et al: *Klebsiella* bacteremia: an analysis of 100 episodes. *Rev Infect Dis* 1985;7:143-50.
7. Wang LS, Lee FY, Cheng DL, et al: *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: analysis of 100 episodes. *J Formos Med Assoc* 1990;89:756-63.
8. Hu BS, Lau YJ, Shi ZY, et al: Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *感控雜誌* 1997;7:286-92.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, 5th ed. (M2-A5). NCCLS, Villanova, Pa, 1993.
10. Palfreyman JM: *Klebsiella* serotyping by counter-current immunoelectrophoresis. *J Hygiene* 1978;81:219-25.
11. Liu PYF, Lau YJ, Hu BS, et al: Analysis of clonal relationships among isolates of *Shigella sonnei* by different molecular typing methods *J Clin Microbiol* 1995;33:1779-83.
12. Soldati L, Piffaretti JC: Molecular typing of *Shigella* strains using pulsed field gel electrophoresis and genome hybridization with insertion sequences. *Res Microbiol* 1991;142:489-98.
13. Capdevila JA, Almirante B, Pahissa A, et al: Incidence and risk factors of recurrent episodes of bacteremia in adults. *Arch Intern Med* 1994;154:411-5.
14. Mylotte JM, McDermott C: Recurrent gram-negative bacteremia. *Am J Med* 1988;85:159-63.
15. Altemeier WA, Todd JC, Inge WW: Gram negative septicemia: a growing threat. *Ann Surg* 1967;166:530-42.
16. Mayer KH, Hanson E: Recurrent salmonella infection with a single strain in the acquired immunodeficiency syndrome. Confirmation by plasmid fingerprinting. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1986;4:71-6.
17. Jacobson MA, Gellermann H, Chambers H: *Staphylococcus aureus* bacteremia and recurrent staphylococcal infection in patients with acquired immunodeficiency syndrome and AIDS-related complex. *Am J Med* 1988;85:172-6.
18. Jacobs JL, Gold JWM, Murray HW, et al: Salmonella infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome. *Ann Intern Med* 1985;102:186.
19. Brauner A, Kaijser B, Kuhn I: Recurrent *Escherichia coli* bacteremia-clinical characteristics and bacterial properties. *J Infect* 1994;28:49-57.
20. Maslow JN, Mulligan ME, Arbeit RD: Recurrent *Escherichia coli* bacteremia. *J Clin Microbiol* 1994;32:710-4.
21. Oslen B, Kolmos HJ, Ørskov F, et al: *Escherichia coli* bacteremia in patients with and without haematological malignancies: a study of strain characters and recurrent episodes. *J Infect* 1998;36:93-100.
22. Goetz AM, Rihs JD, Chow JW, et al: An outbreak of infusion-related *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in liver transplantation unit. *Clin Infect Dis* 1995;21:1501-3.
23. Pfaller MA, Wendt C, Hollis RJ, et al: Comparative evaluation of an automated ribotyping system versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological typing of clinical isolates of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* from patients with recurrent gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996;25:1-8.
24. Elsner HA, Drews D, Burdelski M, et al: Recurrent septicemias with *Enterococcus faecium*. *Infection* 1997;25:127-8.
25. Poh CL, Yap SC, Yeo M: Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect* 1993;24:123-8.
26. Gouby A, Neuwirth C, Bourg G, et al: Epidemiological study by pulsed-field gel electrophoresis of an outbreak of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Geriatric hospital. *J Clin Microbiol* 1994;32:301-5.
27. Peng HL, Wang PY, Wu JL, et al: Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*. *Chinese J Microbiol Immunol* 1991;24:264-71.

28. Fung CP: Serotyping survey of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess. “克雷伯氏肺炎桿菌化膿性肝膿瘍”學術研討會 臺北 臺灣 1998
29. Hu BS: Use of PCR and serotyping to study epidemiology of endogenous *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. “克雷伯氏肺炎桿菌化膿性肝膿瘍”學術研討會 臺北 臺灣 1998
30. Bert F, Lambert-Zechovsky N: Analysis of a case of recurrent bacteremia due to Group A *Streptococcus equisimilis* by pulsed-field gel electrophoresis. *Infection* 1997;25:250-1.

# Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis and Serotyping of *Klebsiella pneumoniae* in Two Hematologic Malignancy Patients with Recurrent Bacteremia

Yu - Mei Huang, Chang - Phone Fung<sup>2</sup>, Bor - Shen Hu<sup>1</sup>,  
Yeu - Jun Lau<sup>1</sup>, Peter Yuk - Fong Liu<sup>3</sup>, Zhi - Yuan Shi<sup>1</sup>,  
Yu - Hui Lin<sup>1</sup>, Ming - Fong Lin<sup>1</sup>, Wei - Yung Wang<sup>1</sup>

Infection Control Committee,

<sup>1</sup>Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine,  
Taichung Veterans General Hospital, Taichung,

<sup>2</sup>Section of Infectious Diseases, Department of Internal Medicine,  
Veterans General Hospital-Taipei, Taipei,

<sup>3</sup>Department of Internal Medicine, Provincial Chi-Shan Hospital,  
Kao-Shung, Taiwan

Septicemia is a common sequela in patients with hematologic malignancies, and has a high mortality rate. In Taiwan, *Klebsiella pneumoniae* was the second commonly isolated organism in these patients. The literature associated with recurrent bacteremia is uncommon. The purpose of this study was to distinguish relapses due to the original infecting strains from new infections caused by different strains of *K. pneumoniae*. Between January 1993 and December 1994, two patients who experienced 4 episodes of *K. pneumoniae* bacteremia were studied. The antimicrobial susceptibility testing with disk diffusion method, capsular serotyping, and pulsed-field gel electrophoresis were performed. The susceptibility testing in isolates 1 and 2 was identical, and the serotype was the same (K64). In patient B, the susceptibility in isolates 3 and 4 was similar, but the serotype was different. Isolate 3 was K54, and isolate 4 was K57. The similarity of PFGE patterns in isolates 1 and 2 indicates that the second episode in patient A was



due to relapse. The different PFGE patterns in isolates 3 and 4 indicates that the second episode in patient B was due to reinfection by another strain and not relapse. (Nosocom Infect Control J 1999;9:81-9)

**Keywords:** pulsed-field gel electrophoresis, recurrent bacteremia, relapse, reinfection.