

以脈衝電泳法檢視同一病人不同部位培養出 *Klebsiella pneumoniae* 之臨床意義

以脈衝電泳法檢視同一病人不同部位培養出 *Klebsiella pneumoniae* 之臨床意義

余文良^{1,3} 陳奇祥¹ 陳欽明¹ 黃恆慶¹ 李青菁² 莊銀清² 鄭高珍¹

¹奇美醫院加護醫學部 ²奇美醫院醫學研究部 ³臺北醫學大學

Klebsiella pneumoniae 是台灣常見社區性或院內感染之致病菌。但臨床上分離之 *K. pneumoniae* 可能是移生菌，未必會引起感染症。本文應用脈衝電泳法來檢視同一病人其不同部位培養出 *K. pneumoniae* 之基因分型是否有同源相關性，以協助判定其臨床意義。收集某醫學中心加護病房 2004 年 3 月至 8 月，同一病人的不同部位之檢體長 *K. pneumoniae* 者。共有七位病患收集到 19 株 *K. pneumoniae*。這七位病患均無糖尿病，也無流行病學之相關性。以脈衝電泳法分析這 19 株細菌可分為 9 種基因分型。其中四位菌血症來源可判定為肺炎(2 人)、膽囊炎(1 人)和 1 個中央靜脈導管相關之感染。一位腹膜炎來自與痰液相同基因型之細菌，但此病人之肺炎後來證實有肺結核。一位腹腔膿瘍之胰臟膿液與腹腔膿液所培養之 *K. pneumoniae* 者基因型不同，前者有超黏性特徵，後者無超黏性，顯示兩株致病力不同。另一位病人痰液與尿液源自不同基因型，表示兩次不同院內感染。應用脈衝電泳法可協助判定病原菌之真正病灶。我們提醒臨床醫師面對 *K. pneumoniae* 菌血症，即使痰液或尿液同時培養出 *K. pneumoniae*，也可能分屬不同基因型，其因果關係未必確立。臨床醫師應仔細評估各種檢體所培養之 *K. pneumoniae* 為移生菌之可能性，把真正 *K. pneumoniae* 菌血症之病灶找出來。(感控雜誌 2005;15:221-9)

關鍵詞： *Klebsiella pneumoniae*、移生、脈衝電泳法

前 言

脈衝電泳法(pulsed-field gel electrophoresis; PFGE)為目前細菌基因分型公認的標準方法，擁有最佳分型能力，已被廣泛應用於院內感染群突發之調查，主要是提供判定傳播於病人間、醫護人員或醫院環境間之同種細菌是否源自同一基因型，也是建立細菌分子流行病學很重要的工具[1,2]。

PFGE 在臨床上也有其他功能，但較少被應用。如同一病人不同時段重覆感染同種細菌，到底是前次感染復發，還是另一次新感染？應用 PFGE，復發性感染應為相同基因型，而不同基因型之細菌應判為另一次新感染[3]。另外，菌血症病人同一次血液培養長一種細菌時，對於有些出現外觀型態不同時，以 PFGE 檢查，發現 31%屬於不同基因型。這些同種但多發性基因型之菌血症，容易發生於白血病病人，且比單一基因型菌血症者較快死亡[4]。

Klebsiella pneumoniae 是台灣常見社區性或院內感染之致病菌，國外也常有其引起群突發之調查報告[5,6]。國內已有與其相關之分子流行病學研究[7,8]。但 *K. pneumoniae* 也可以是移生狀態(colonization)，未必會引起感染症。故本文將進一步應用 PFGE 之功能，用來檢視同一病人其不同部位培養出 *K. pneumoniae* 之臨床意義。例如 *K. pneumoniae* 分別由同一病人之痰液、血液和尿液培養出來，我們以 PFGE 協助判定真正感染病灶。

材料與方法

病人資料與菌株收集

收集某醫學中心內、外科加護病房 2004 年 3 月至 8 月，由同一病人的不同部位之檢體長 *K. pneumoniae* 者。細菌由檢驗科進行分離、生化試驗和以 BDPhoenix™ System (Becton, Dickinson and Company, Sparks, Maryland, USA) 鑑定。病人臨床資料包括原本疾病、獲得感染之來源(社區性或院內感染)和 *K. pneumoniae* 引起之感染症。本研究定義社區性感染株為住院兩天(含)內採檢者；院內感染株為住院超過兩天採檢者，且入院時並無與 *K. pneumoniae* 相關之感染症存在。

抗生素的敏感性試驗

以紙錠擴散法常規測試抗生素紙錠[9]，包括：amikacin、ampicillin、ceftazidime、ceftriaxone、cefuroxime、ciprofloxacin、gentamicin、imipenem、moxalactam、piperacillin、piperacillin-tazobactam 和 trimethoprim/sulfamethoxazole。Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) 之檢定以雙紙錠協同試驗(double disc synergy test) 依美國 NCCLS 標準判讀，包括：cefotaxime ~90 分 clavulanic acid 和 ceftazidime ~90 分 clavulanic acid，在 clavulanic acid 影響下，cefotaxime 或 ceftazidime 抑制環擴大增加大於或等於 5mm 為 ESBL 陽性[9]。

菌株超黏性測驗

依 Fang 等人描述之方法[10]，以細棉棒將菌落挑起，若可拉長大於 5 mm 即判為陽性超黏性特徵。

脈衝電泳法(PFGE)

包括完整染色體製備、限制西每反應和脈衝式電泳等步驟[11]，簡述如下。取培養隔夜的菌株(菌液濃度為 1×10^9)，置於 40°C 保熱裝置中保溫。另一方面把 1% low melting temperature (LMP) agarose 於 70°C 溶解後，置於 40°C 保熱裝置中保溫。將菌液與 LMP agarose 注入模型中凝固後呈塊狀物，放入 EC (Tris-HCl, EDTA, lysozyme 等) 作用 24 小時去除細胞壁和 RNA，再以 proteinase K 作用 24 小時去除蛋白質，製成完整包埋之染色體。以適當西每緩衝液清洗三、四次，使之達西每反應最佳狀況，加入 10-20 單位之限制西每 (baI) 於適當溫度中作用過夜時間。將標準 lambda size marker 和限制西每反應後之 DNA 塊狀體，放入 agarose gel 樣品槽中，再以 1% LMP agarose 將之填滿，凝固後放入脈衝式電泳槽(CHEF DR IV, Bio-Rad, Richmond, Calif., USA)。另一方面把適量 0.5x TBE 緩衝液注入，並與冷卻系統連接使緩衝液保持 15°C，完成電泳。PF-GE 結果依 Tenover 等之方法判讀[12]，DNA 電泳圖形完全一致者，視為相同基因型；差異小於(含)三個條紋(band)，視為高度相關之基因型；差異超過三個條紋，視為不同之基因型。

結果

共由七位病患收集到 19 株 *K. pneumoniae*。這七位病患均無糖尿病。其中兩位病患(個案一和五)之 5 株細菌為 ESBL 陽性，均為院內感染株。其餘 14 株細菌抗生素敏感性均僅對 ampicillin 呈抗藥性。感染個案之原來疾病、臨床感染症與實驗數據詳列於表一。有三個病人(個案二、四和七)共 7 株屬於社區性感染株，有五個病人(個案一、二、三、五和六)共 12 株屬於院內感染株，其中個案二(4 株)第一株為社區性感染，之後 3 株判為院內感染。菌株超黏性測驗顯示 12 株呈陽性。PFGE 基因分型結果(圖一)與臨床症候(表一)分別依個案詳述於下。

個案一(3 株)

病人因車禍頭部外傷併呼吸衰竭住神經外科加護病房，院內感染 ESBL-K.pneumoniae 之廣泛性肺炎。經 imipenem 治療後，症狀改善，CXR 肺炎消散。Imipenem 停藥時，病人之 WBC 和 CRP 均已正常。轉呼吸照護中心後復發嚴重肺炎合併菌血症，最後因多重器官衰竭死亡。PFGE 結果顯示復發前後之痰液與最後菌血症之 3 株細菌為相同基因型-A。

個案二(4 株)

病人有心肌梗塞病史，因心衰竭與肺水腫住加護病房。住院時第一次痰液即長 K. pneumoniae，應為社區性感染株，但臨床研判並無肺炎。住院一週發生頸部中央靜脈導管相關之傷口感染與菌血症，中央靜脈導管尖端、傷口與血液均長 K. pneumoniae，應判為院內感染株。追蹤之 CXR 並無肺炎出現。PFGE 結果顯示導管、傷口與血液等 3 株細菌均為相同基因型-B，而痰液之 K. pneumoniae，為高度相關之 B1 型。

個案三(2 株)

病人因為自殺造成腐蝕性食道炎破裂而住加護病房。住院期間 CXR 出現右肺上葉與兩側肺下葉浸潤現象。痰液與腹水培養出 K. pneumoniae 與其它腸內菌。雖經適當抗生素治療，仍不幸死亡。兩個月後痰液培養出肺結核桿菌(Mycobacterium tuberculosis)。PFGE 結果顯示痰與腹水之 K. pneumoniae 屬於相同基因型-C。

個案四(3 株)

病人因解黑便而就診。病人因頸椎受傷長期臥床併神經性膀胱症。腹部超音波發現膽結石併膽囊炎。電腦斷層掃描與經皮導管引流證實膽囊炎與腎膿瘍。尿液 WBC 40-50/HPF，培養長出 Pseudomonas aeruginosa。血液、膽汁與腎膿瘍均培養出 K. pneumoniae。PFGE 結果顯示 3 株 K. pneumoniae 屬於相同基因型-D。

個案五(2 株)

病人因車禍造成胰臟破裂而住加護病房。住院期間併發胰臟與腹腔內多處膿瘍，經多次手術清創引流。胰臟與腹腔膿瘍培養出 K. pneumoniae 與其它腸內菌。PFGE 結果兩株為不同基因分型。前者有超黏性特徵，後者無超黏性，顯示兩株致病力的不同。

個案六(2 株)

病人因腦出血而住加護病房。住院期間併發吸入性肺炎與泌尿道感染。痰液與尿液培養出 K. pneumoniae。PFGE 結果顯示 2 株 K. pneumoniae 屬於不同基因型。

個案七(3 株)

病人因發燒和休克而住加護病房。痰液、尿液與血液培養出 K. pneumoniae。病人發生嚴重代謝性酸中毒與骨髓抑制現象，住院未滿 24 小時即死亡。第一天 CXR 顯示右下葉輕微肺浸潤，第二天明顯擴散至兩側下葉肺野。PFGE 結果顯示痰液、尿液與血液之 K. pneumoniae 屬於相同基因型-I。

討 論

本研究以 PFGE 做為細菌基因分型的工具，應用於臨床多重部位培養出 *K. pneumoniae* (但未必真有感染)，輔助判斷其臨床意義，以期有助於診斷與治療。雖然文獻報導過同一種細菌發生菌血症可由不同基因型所引起，但多限於嚴重白血病人，且相關文獻也很稀少[4]。

不同感染部位可以由同種細菌且相同基因型所引起，如個案四。個案四的 PFGE 結果表示膽囊炎或腎臟膿瘍都有可能是菌血症之病源，因為 3 株 *K. pneumoniae* 屬於相同基因型。但因尿液長 *P. aeruginosa*，與腎臟膿瘍之培養菌不同，推論腎臟膿瘍是血行性感染，故主要病源應判為膽囊炎。

不同感染部位可以由同種細菌但不同基因型所引起，如個案五和六。

個案五胰臟膿瘍之 *K. pneumoniae*，與治療一週後外圍腹腔內膿液之 *K. pneumoniae* 分屬於不同基因型，表示非原先之細菌持續擴散至整個腹腔(非抗生素治療失敗)，而是持續有不同型細菌由腸內移行出來。且起初具超黏性之菌株已根除，後來培養之菌株並無超黏性。故治療上只要持續引流併續用原先抗生素即可，不必刻意更改抗生素。

個案六的 PFGE 結果表示病人發生不同基因型之 *K. pneumoniae* 院內肺炎與尿路感染，應判為兩次院內感染，應再加強平日感控措施。

痰液與血液培養出同種且相同基因型細菌，且胸部 X-光確有肺炎浸潤，其因果關係應可確立。如個案一和個案七。

個案一的 PFGE 結果表示原先 ESBL-*K. pneumoniae* 之肺炎雖有改善，但菌株未被 imipenem 根除，停藥後引起肺炎復發，同一菌株也是造成死亡之原兇。

個案七的 PFGE 結果無法分辨血液 *K. pneumoniae* 之來源，但起始尿液檢驗並無膿尿，推論尿液培養之 *K. pneumoniae* 應該是菌血症由腎臟濾過之細菌，而非真正尿路感染，病人於入院 24 小時內快速死亡，也較符合由肺炎引起之敗血症。

痰液與血液培養出同種細菌，無論基因型如何，只要胸部 X-光未有肺炎浸潤，其因果關係尚不能確立。如個案二。

如果基因型相同，一般臨床醫師均依經驗判定無肺炎，再查出血液 *K. pneumoniae* 原來由其他部位感染如肝膿瘍、腎盂炎和膽囊炎等引起。相反的，如果痰液與血液培養出不相同基因型細菌，則無論胸部 X-光有無肺炎浸潤，均應先查有無其他部位感染之可能。

個案二的 PFGE 結果表示原先痰液的 *K. pneumoniae* 與造成後來中央靜脈導管相關之感染菌，有高度基因相關性。推論是痰液的 *K. pneumoniae* 污染了頸部表面，之後才進一步造成中央靜脈導管相關之感染，其間已進行了些微基因改變。因為痰液與血液同時長 *K. pneumoniae*，如果沒有明確中央靜脈導管相關感染之證據(如注射處化膿)，臨床上很容易被診斷為肺炎合併菌血症。因為兩者疾病之處置明顯不同，有需要作鑑別診斷。國內學者曾報告 64 例 *K. pneumoniae* 之院內感染菌血症，有 58% 找不到感染源[16]。我們亦曾注意到很多 *K. pneumoniae* 之院內感染菌血症患者，其過久留置之中央靜脈導管未被拔除送檢[17]。因

此我們建議醫師對 *K. pneumoniae* 之院內感染菌血症，除了檢查各部位之可能感染源外，應及時拔中央靜脈導管作培養，以提高診斷率。

痰液與腹水培養出同種且相同基因型細菌，推論腹水細菌來自呼吸道再經腸胃移行而來。

個案三的痰液雖長 *K. pneumoniae*，未必是肺炎真正病原菌，因為後來證實有肺結核存在，但無法排除是否為混合性感染。腹水長相同基因型之 *K. pneumoniae*，可見腹膜炎可由來自呼吸道之菌株侵入而引起。

K. pneumoniae 是國人常見病原菌，但也經常是移生狀態。同一病人不同檢體同時或先後培養出 *K. pneumoniae*，其 PFGE 基因型不必然相同。基因型不同時，暗示其臨床因果之相關性並未確立。PFGE 並非實務上之診斷工具，但可輔助吾人對病因之推演。本文強調當病人之血液、尿液或痰液同時長 *K. pneumoniae*，醫師仍應仔細評估病情，如果尿液或痰液有移生之可能，應再尋找其他感染源。特別是院內感染菌血症，應包括中央靜脈導管相關之感染，以避免誤診為肺炎或泌尿道感染。



圖一 脈衝電泳法之結果，七個病人共 19 株 *K. pneumoniae* 可分為 9 種基因型 (A, B, C, D, E, F, G, H, I)。M : lamda marker ; 行 1-3 : 菌株 1-276, 1-284, 1-290 ; 行 4-7 : 菌株 2-280, 2-285, 2-286, 2-287 ; 行 8-9 : 菌株 3-288, 3-292 ; 行 10-12 : 菌株 4-294, 4-295, 4-296 ; 行 13-14 : 菌株 5-302, 5-307 ; 行 15-16 : 菌株 6-308, 6-309 ; 行 17-19 : 菌株 7-376, 7-377, 7-379 。

表一 *K. pneumoniae* 感染個案之原來疾病、臨床感染症與實驗數據

個案	菌株	檢體	採檢日期	感染來源	基因分型	原來疾病 / 臨床感染症
一	1-276 ^{a,b}	痰液	930320	院內	A	頭部外傷 / 肺炎
	1-284 ^{a,b}	痰液	930403	院內	A	肺炎復發
	1-290 ^{a,b}	血液	930407	院內	A	敗血症、多重器官衰竭
二	2-280	痰液	930331	社區	B ₁	心衰竭、肺水腫 / 無肺炎
	2-285	中央靜脈 傷口膿液	930406	院內	B	右頸中央靜脈注射部位傷口感染
	2-286	血液	930406	院內	B	菌血症
	2-287	中央靜脈 導管尖端	930406	院內	B	中央靜脈導管相關之感染
三	3-288	痰液	930407	院內	C	腐蝕性食道破裂 / 肺炎
	3-292	腹水	930412	院內	C	腹膜炎、敗血症
四	4-294 ^b	腎臟膿液	930409	社區	D	頸椎受傷 / 腎臟膿瘍
	4-295 ^b	膽汁	930409	社區	D	膽結石 / 膽囊炎
	4-296 ^b	血液	930409	社區	D	菌血症
五	5-302 ^{a,b}	胰臟膿液	930420	院內	E	胰臟破裂 / 胰臟膿瘍
	5-307 ^a	腹腔膿液	930428	院內	F	腹腔膿瘍
六	6-308 ^b	痰液	930503	院內	G	腦出血 / 吸入性肺炎
	6-309 ^b	尿液	930504	院內	H	膿尿
七	7-376 ^b	尿液	930812	社區	I	慢性 C 型肝炎 / 無膿尿
	7-377 ^b	痰液	930812	社區	I	肺炎
	7-379 ^b	血液	930812	社區	I	敗血症、代謝性酸中毒

^a ESBL 陽性

^b 超黏性陽性

參考文獻

1. Sader HS, Hollis RJ, Pfaller MA: The use of molecular techniques in the epidemiology and control of infectious diseases. Clin Lab Med 1995;15:407-31.

2. Weber S, Pfaller MA, Herwaldt LA: Role of molecular epidemiology in infection control. *Infect Dis Clin North Am.* 1997;11:257-78.
3. Wendt C, Messer SA, Hollis RJ, et al: Molecular epidemiology of gram-negative bacteremia. *Clin Infect Dis* 1999;28:605-10.
4. Wendt C, Messer SA, Hollis RJ, et al: Epidemiology of polyclonal gram-negative bacteremia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998;32:9-13.
5. Gaillet O, Maruejols C, Abachin E, et al: Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. *J Clin Microbiol* 1998;36:1357-60.
6. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, et al: Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. *J Med Microbiol* 2003;52:427-33.
7. Liu PYF, Tung JC, Ke SC, et al: Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a district hospital in Taiwan. *J Clin Microbiol* 1998;36:2759-62.
8. Yu WL, Jones RN, Hollis RJ, et al: Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing, fluoroquinolone-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *J Clin Microbiol* 2002;40:4666-9.
9. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Supplemental tables, M100-S13. NCCLS, Wayne, PA., 2003.
10. Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al: A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and metastatic complications. *J Exp Med* 2004;199:697-705.
11. 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.
12. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV: How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. *Infect Control Hosp Epidemiol* 1997;18:426-39.
13. Paterson DL, Ko WC, Von Gottberg A, et al: Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis* 2004;39:31-7.
14. Yu WL, Chuang YC, Jones RN: A pragmatic approach to identify extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: in vitro activity of newer and established antimicrobial agents. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004;48:277-82.

15. Pattharachayakul S, Neuhauser MM, Quinn JP, et al: Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: activity of single versus combination agents. *J Antimicrob Chemother* 2003;51:737-9.

16. Tsay RW, Siu LK, Fung CP, et al: Characteristics of bacteremia between community-acquired and nosocomial *Klebsiella pneumoniae* infection. *Arch Intern Med* 2002;162:1021-7.

17. Yu WL, Lin CW, Wang JH, Cheng HS. Nosocomial *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates. *Mid Taiwan J Med* 1999;4:156-63.

Evaluating Clinical Significance of *Klebsiella pneumoniae* isolated from Various Specimens in the Same Patient Using Pulse Field Gel Electrophoresis

Wen Liang Yu^{1,3}, Khee-Siang Chan¹, Chin-Ming Chen¹, Ching-Chien Lee², Yin-Ching Chuang², Kuo-Chen Cheng¹

Departments of 1 Critical Care Medicine and 2 Medical Research, Chi-Mei Medical Center, Tainan, 3Taipei Medical University, Taipei, Taiwan

Klebsiella pneumoniae has been a common pathogen for community-acquired and nosocomial infections. However, clinical *K. pneumoniae* isolate may be merely a colonizer and not the causative agent of the infection in the patient. This study, using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), identified clonal relationship of DNA between *K. pneumoniae* strains isolated from various specimens from the same patient to delineate their clinical significances. From March to August in 2004, a total of 19 isolates from 7 non-diabetic patients without epidemiological linkage were collected from the intensive care units in a medical center in southern Taiwan. PFGE identified 9 genotypes among the 19 isolates. The sources of bacteremia in 4 of our patients were thought to be pneumonia (n=2), cholecystitis (n=1) and the central venous catheter infection (1). One patient with peritonitis was caused by a *K. pneumoniae* isolate with the same genotype as that isolated from the sputum. However, *Mycobacterium tuberculosis* was identified 2 months later in the same patient and the patient's pneumonia was thought to be caused by the *Mycobacterium* rather than the *K. pneumoniae*. One patient harbored two strains of the bacteria with different genotypes, from the pancreatic and peritoneal abscesses, respectively. The former strain exhibited hypermucoviscosity, while the latter did not, suggesting different pathogenetic roles of these two isolates. One patient contracted both *K. pneumoniae* pneumonia and urinary tract infections by different genotypes, implicating two different episodes of nosocomial infections. It is apparent that *K. pneumoniae* with different DNA genotypes may be isolated from blood, urine, or sputum of a patient, thus the causal relationship of isolates to the infection in the same patient may not be as clear-cut as it appears. We suggest detailed examination of genotypes of *K. pneumoniae* isolates from the same patient in order to determine the true infectious strain and clarify the pathogenetic role of the isolates. (*Infect Control J* 2005;15:221-9)

Key words: *Klebsiella pneumoniae*, colonization, pulse field gel electrophoresis