

对比黏液型肺炎克雷伯菌超广谱β-内酰胺酶（ESBLs）表达和毒力基因分布的相关性并对其耐药性进行分析

韩进辉, 余秉贤, 周冰

(郑州市第一人民医院 检验科, 河南 郑州 450000)

摘要: **目的** 分析黏液型肺炎克雷伯菌 (MT-KPN) 的超广谱β-内酰胺酶 (ESBLs) 表达、耐药性、毒力基因分布情况。**方法** 收集郑州市第一人民医院 2021 年 3 月至 2022 年 3 月非重复性 KPN 725 株, 黏液丝试验分离出 123 株 MT-KPN, 对其 ESBLs 表达、耐药性使用 CITEK 2 Compact 系统分析, 毒力基因分布情况使用聚合酶链式反应 (PCR) 实验分析。**结果** 肺炎克雷伯菌 (KPN) 检出率最高的科室是重症医学科; 同一科室检出 KPN 类型差异较大的是重症医学科、全科医学科、神经外科, 肾内科只检出 cKPN; 123 株 MT-KPN 包括 ESBLs 阳性菌 34 株、ESBLs 阴性菌 89 株。ESBLs 阳性菌耐药性高达 100.00% 的 7 种药物 (头孢唑肟、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、氨曲南、阿莫西林/克拉维酸), ESBLs 阴性菌对上述药物耐药性显著低于 ESBLs 阳性菌 ($P<0.05$); 妥布霉素、亚胺培南、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦耐药性 ESBLs 阳性菌>ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$); 庆大霉素、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星耐药性 ESBLs 阳性菌>ESBLs 阴性菌 ($P>0.05$); MT-KPN 的荚膜血清型基因检出率 wzyK2 最高; 荚膜血清型基因检出率 ESBLs 阳性菌、ESBLs 阴性菌相比差异无统计学意义 ($P>0.05$); MT-KPN 毒力基因检出率最高的是 mrkD; aerobactin、iroN、wcaG 检出率相比 ESBLs 阳性菌<ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$); 其他毒力基因检出率 ESBLs 阳性菌、ESBLs 阴性菌相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。**结论** MT-KPN 携带毒力基因检出率较高, 临床需结合其耐药性和毒力基因分布情况合理用药。

关键词: 黏液型; 肺炎克雷伯菌; 超广谱β-内酰胺酶; 毒力基因分布; 耐药性
中图分类号: R446.5

Correlation between expression and distribution of virulence genes of ESBLs in mucous lung and their drug resistance

HAN Jinhui, YU Bingxian, ZHOU Bing

(Laboratory Department, Zhengzhou First People's Hospital, Zhengzhou, Henan 450000, China)

Abstract: **[Objective]** To analyze the expression, drug resistance and virulence gene distribution of ESBLs in mucous type *Klebsiella pneumoniae* (MT-KPN). **[Methods]** A total of 725 non-repeatable KPN strains from March 2021 to March 2022 were collected from Zhengzhou First People's Hospital. Totally 123 MT-KPN strains were isolated by mucus wire test. The expression of ESBLs and drug resistance were analyzed by CITEK 2 Compact system, and the distribution of virulence genes were analyzed by PCR. **[Results]** The department with the highest detection rate of KPN was intensive care medicine. In the same department, KPN types were significantly different in intensive care, general practice and neurosurgery, while cKPN was detected only in nephrology department. The 123 MT-KPN strains included 34 ESBLs-positive strains and 89 ESBLs-negative strains. The drug resistance of ESBLs-positive bacteria was as high as 100.00% of 7 drugs (cefuroxime, cefotaxime, ceftazime, cefepime, cefoxime, amtrannan, amoxicillin/clavulanate), and the drug resistance of ESBLs-negative bacteria was significantly lower than that of ESBLs-positive bacteria ($P<0.05$). The drug resistance of ESBLs-positive bacteria to tobramycin, imipenem, amikacin, piperacillin/tazobactam were higher than ESBLs-negative bacteria ($P<0.05$). ESBLs-positive bacteria were more resistant to gentamicin, meropenem, ciprofloxacin and levofloxacin than ESBLs-negative bacteria ($P>0.05$). wzyK2 gene detection rate of MT-KPN capsule serotype was the highest; there was no significant difference between ESBLs-positive bacteria and ESBLs-negative bacteria ($P>0.05$); mrkD gene detection rate of MT-KPN virulence was the highest; aerobactin, iroN and wcaG detection rates of ESBLs-positive bacteria were lower than ESBLs-negative bacteria ($P<0.05$); there was no significant difference between ESBLs-positive bacteria and ESBLs-

negative bacteria in detection rate of other virulence genes ($P>0.05$). **[Conclusion]** The detection rate of virulence genes carried by MT-KPN is high, and rational drug use should be combined with drug resistance and distribution of virulence genes.

Keywords: mucous type; pneumogram; ultra-broad spectrum beta-lactamase; virulence gene distribution; drug resistance

作为肠杆菌科克雷伯菌属的肺炎克雷伯菌 (KPN) 是导致发生院感的一种主要革兰阴性杆菌, 临床通过黏液丝试验结果将其分为 cKPN (经典 KPN)、MT-KPN (粘液型 KPN) 等类型^[1]。由于 MT-KPN 具有较强的毒力和侵袭力, 诱发获得性感染的概率更高, 且传播能力更强, 受到了越来越高的关注。临床调研数据显示, 中老年是感染 KPN 的主要群体, 可能和这些患者自身存在多种基础疾病、免疫系统功能异常、体质差等因素相关^[2-3]。感染 MT-KPN 患者血糖水平异常增高, 可能是由于患者降低糖利用率而导致机体供应细胞能量降低, 使中性粒细胞不能正常地发挥生理功能, 同时降低了吞噬细胞活性^[4-5]。目前临床广泛使用碳青霉烯类抗菌药物治疗感染 MT-KPN 的患者, 但是临床实践中发现 MT-KPN 耐药检出率日益提升。卫生部在 2015~2016 年度发布的监测数据显示, MT-KPN 耐药率: 亚胺培南 14.6%、比阿培南 15.8%、美罗培南 14.4%。因此临床迫切需要解决的一个问题是降低 MT-KPN 耐药性^[6]。鉴于此本研究分析了 MT-KPN 的超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 表达、耐药性、毒力基因分布情况, 阐述如下。

1 材料和方法

1.1 菌株来源

收集郑州市第一人民医院 2021 年 3 月至 2022 年 3 月非重复性 KPN 725 株, 黏液丝试验分离出 123 株 MT-KPN。

1.2 方法

①使用纸片扩散法及操作标准检测 ESBLs 活性、耐药性的方法; ②PCR 实验检测毒力基因。

1.3 指标观察

①检出 KPN 的病区分布情况; 统计每个病区检出 KPN 株数, 并对比该区 KPN 分类情况; ②分析 ESBLs 活性和耐药性; ③分析 MT-KPN 的荚膜血清型基因; ④分析 MT-KPN 的毒力基因分布情况。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 20.0 统计学软件处理数据。计量

资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 比较用 t 检验; 计数资料以百分率 (%) 表示, 比较用 χ^2 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 分析检出 KPN 的病区分布情况

KPN 检出率最高的科室是重症医学科, 其次是呼吸内科、神经内科; 同一科室检出 KPN 类型差异较大的是重症医学科、全科医学科、神经外科, 普遍外科, 肾内科只检出 cKPN, 见表 1。

2.2 分析 ESBLs 活性和耐药性

本次研究检出的 123 株 MT-KPN, 包括 ESBLs 阳性菌 34 株 (27.64%)、ESBLs 阴性菌 89 株 (72.36%)。ESBLs 阳性菌耐药性高达 100.00% 的药物: 头孢呋辛、头孢噻肟、头孢他啶、头孢吡肟、头孢西丁、氨曲南、阿莫西林/克拉维酸, ESBLs 阴性菌对上述药物耐药性显著低于 ESBLs 阳性菌 ($P<0.05$); 妥布霉素、亚胺培南、阿米卡星、哌拉西林/他唑巴坦耐药性 ESBLs 阳性菌>ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$); 庆大霉素、美罗培南、环丙沙星、左氧氟沙星耐药性 ESBLs 阳性菌>ESBLs 阴性菌 ($P>0.05$), 见表 2。

2.3 分析 MT-KPN 的荚膜血清型基因

MT-KPN 的荚膜血清型基因检出率占据前三位的是 wzyK2 (29.27%)、wzyK1 (14.63%)、wzyK57 (11.38%); 荚膜血清型基因检出率 ESBLs 阳性菌、ESBLs 阴性菌相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 3。

2.4 分析 MT-KPN 的毒力基因分布情况

MT-KPN 毒力基因检出率最高的是 mrkD (89.42%), 占据第二位和第三位的是 aerobactin (82.11%)、P-rmpA (78.86%), 检出率>70% 的还包括 fimH (70.73%)、iroN (78.05%)、wcaG (75.61%); aerobactin、iroN、wcaG 检出率相比 ESBLs 阳性菌<ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$); 其他毒力基因检出率 ESBLs 阳性菌、ESBLs 阴性菌相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 4。

表 1 检出 KPN 的病区分布情况 [n(%)]

科室	KPN(n=725)	eKPN(n=602)	MT-KPN(n=123)	χ^2	P
重症医学科	167(23.03)	128(21.26)	39(31.71)	6.284	0.012
呼吸内科	135(18.62)	107(17.77)	28(22.76)	1.678	0.195
神经内科	75(10.34)	66(10.96)	9(7.32)	1.464	0.226
肾内科	74(10.21)	74(12.29)	0(0.00)	-	-
全科医学科	55(7.59)	53(8.80)	2(1.63)	7.505	0.002
消化内科	46(6.34)	38(6.31)	8(6.50)	0.235	0.627
神经外科	45(6.21)	31(5.15)	14(11.38)	6.814	0.009
心内科	23(3.17)	18(2.99)	5(4.07)	0.384	0.535
内分泌科	19(2.62)	14(2.33)	5(4.07)	1.210	0.271
普通外科	18(2.48)	5(0.83)	13(10.57)	40.007	<0.001
其他	68(9.38)	68(11.29)	0(0.00)	-	-

表 2 MT-KPN 耐药性 [n(%)]

抗菌药物名称	MT-KPN(n=123)	ESBLs 阳性菌(n=34)	ESBLs 阴性菌(n=89)	χ^2	P
头孢呋辛	55(44.72)	34(100.00)	21(23.60)	58.095	<0.001
头孢他啶	51(41.46)	34(100.00)	17(19.10)	66.337	<0.001
头孢噻肟	61(49.59)	34(100.00)	27(30.34)	47.759	<0.001
头孢西丁	56(45.53)	34(100.00)	22(24.72)	56.218	<0.001
头孢吡肟	47(38.21)	34(100.00)	13(14.61)	75.981	<0.001
庆大霉素	21(17.07)	9(26.47)	12(13.48)	2.930	0.086
妥布霉素	20(16.26)	10(29.41)	10(11.24)	5.968	0.014
美罗培南	6(4.88)	3(8.82)	3(3.37)	1.576	0.209
氨曲南	47(38.21)	34(100.00)	13(14.61)	75.981	<0.001
亚胺培南	2(1.63)	2(5.88)	0(0.00)	5.321	0.021
环丙沙星	31(25.20)	12(35.29)	19(21.35)	2.538	0.111
左氧氟沙星	23(18.70)	9(26.47)	14(15.73)	1.866	0.171
阿米卡星	16(13.01)	12(35.29)	4(4.49)	20.623	<0.001
阿莫西林/克拉维酸	47(38.21)	34(100.00)	13(14.61)	75.981	<0.001
哌拉西林/他唑巴坦	25(20.33)	14(41.18)	11(12.36)	12.615	<0.001

表 3 MT-KPN 的荚膜血清型基因 [n(%)]

荚膜血清型基因	MT-KPN(n=123)	ESBLs 阳性菌(n=34)	ESBLs 阴性菌(n=89)	χ^2	P
wzyK2	36(29.27)	7(20.59)	29(32.58)	1.710	0.190
wzyK1	18(14.63)	5(14.71)	13(14.61)	1.383	0.239
wzyK54	10(8.13)	3(8.82)	7(7.87)	0.030	0.861
wzyK57	14(11.38)	2(5.88)	12(13.48)	1.409	0.235
wzyK20	2(1.63)	1(2.94)	1(1.12)	0.508	0.475
wzyK5	2(1.63)	0(0.00)	2(2.25)	0.776	0.378
wzy16	1(0.81)	0(0.00)	1(1.12)	0.385	0.534
其他	40(32.52)	18(52.94)	22(24.72)	8.929	0.002

表 4 MT-KPN 的毒力基因分布情况 [n(%)]

毒力基因	MT-KPN(n=123)	ESBLs 阳性菌(n=34)	ESBLs 阴性菌(n=89)	χ^2	P
P-rmpA	97(78.86)	29(85.29)	68(76.40)	1.166	0.280
mrkD	110(89.43)	28(82.35)	82(92.13)	2.490	0.114
aerobactin	101(82.11)	24(70.59)	77(86.52)	4.250	0.039
fimH	87(70.73)	22(64.71)	65(73.03)	0.824	0.363
P-rmpA2	85(69.11)	21(61.76)	64(71.91)	1.186	0.276
iroN	96(78.05)	20(58.82)	76(85.39)	10.137	0.001
wcaG	93(75.61)	16(47.06)	77(86.52)	20.770	<0.001
iutA	15(12.20)	5(14.71)	10(11.24)	0.276	0.598
alls	9(7.32)	4(11.76)	5(5.62)	1.370	0.241
magA	13(10.57)	3(8.82)	10(11.24)	0.151	0.697
ureA	3(2.44)	1(2.94)	2(2.25)	0.049	0.823
entB	5(4.07)	1(2.94)	4(4.49)	0.152	0.696

3 讨论

人体中容易感染 KPN 的部位有体表、鼻咽部、肠道等，其是导致院感的一种主要条件致病菌。MT-KPN 产生荚膜的能力更强，从而具有更强的毒力和侵袭能力，极易导致患者出现侵袭性感染，随着其耐药性逐渐提升，受到了临床相关研究人员的高度重视^[7-8]。本次研究结果显示，本院重症医学科患者是发生 MT-KPN 感染最高的科室，和其他临床调研结果一致，可能是由于在重症医学科接受治疗的患者，普遍存在免疫和抵抗能力低、使用大量且多种抗生素、频繁进行侵袭性操作等现象^[9-10]。

导致 MT-KPN 出现耐药性的因素较多，目前临床发现的并经相关研究证实的 MT-KPN 主要耐药酶有 ESBLs 和碳青霉烯酶，临床试验结果显示，ESBLs 对头孢菌素和单环 β -内酰胺类抗菌药物具有较强的耐药性，碳青霉烯酶对所有 β 内酰胺类抗菌药物均有一定的耐药性。ESBLs 阳性菌相较于 ESBLs 阴性菌具有更强的耐药性^[11-12]。但是目前临床使用抗菌药物的实际情况和试验结果不相符，可能是由于药敏试验主要针对游离细菌进行检测，其结果不能体现生物膜作用以及细菌受到机体内环境和免疫系统的作用，这也是临床加强毒力基因检测研究的主要原因^[13-14]。

目前临床尚未精准定义毒力基因，普遍认为，MT-KPN 最主要的一种毒力因子是荚膜多糖，其通过将菌体包裹起来，降低机体免疫细胞对菌体的作用，同时阻碍药物作用于菌体，从而提高耐药性^[15-16]。目前临床以荚膜多糖血清分型为依据，KPN 分型>78 个，其中和 MT-KPN 相关的荚膜多糖血清分型有 wzyK1、wzyK2、wzyK5 等。本次研

究结果显示：MT-KPN 的荚膜血清型基因检出率占据前三位的是 wzyK2 (29.27%)、wzyK1 (14.63%)、wzyK57 (11.38%)，提示需要重点控制这些菌株的毒力和流行趋势。另外临床相关研究结果显示，ESBLs 阴性菌携带 wzyK1、wzyK2、wzyK57 等高毒力因子的检出率更高，和本次研究有所出入，可能是由于样本来源不同导致 MT-KPN 的荚膜血清分型分布趋势不同。因此在对 MT-KPN 毒力基因分布情况进行分析时，也需要考虑样本来源，这样才能提高临床用药的合理性和安全性^[17-18]。

MT-KPN 的侵袭能力不仅受到荚膜多糖的直接影响，同时可受到其他基因（有利于形成生物膜或菌毛、促进转运铁离子的基因等）的影响，这些基因也可以纳入 MT-KPN 的毒力基因^[19]。本次研究测试了 MT-KPN 相关的 12 个毒力基因，结果显示：MT-KPN 毒力基因检出率最高的是 mrkD (89.42%)，占据第二位和第三位的是 aerobactin (82.11%)、P-rmpA (78.86%)，检出率>70% 的还包括 fimH (70.73%)、iroN (78.05%)、wcaG (75.61%)；aerobactin、iroN、wcaG 检出率相比 ESBLs 阳性菌<ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$)；其他毒力基因检出率 ESBLs 阳性菌、ESBLs 阴性菌相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)，和临床相关研究具有一致性。MT-KPN 能提高作为黏液调控因子的 p-rm-pA 和 p-mpA2 表达，从而提高形成荚膜的能力。医院分离的 MT-KPN 主要毒力基因型是 p-mpA 和 wcaG^[20]。MT-KPN 形成荚膜的一个必备毒力基因是能将甘露糖向岩藻糖转化的 wcaG，如果 MT-KPN 无 wcaG 毒力基因，也就不能生成荚膜。MT-KPN 中普遍存在的毒力基因有能编码细菌菌毛

的 fimH、mrkD 以及能促进铁载体产生和铁离子转运的 aerobactin、iroN。本文结果 aerobactin、iroN、wcaG 检出率相比 ESBLs 阳性菌<ESBLs 阴性菌 ($P<0.05$)，提示这三种毒力基因在 ESBLs 阴性菌的携带率更高，因此高毒力基因的耐药率也可能较低。MT-KPN 耐药性受到 ESBLs 表达的直接影响，相较于 ESBLs 阴性菌，ESBLs 阳性菌耐药性普遍更高，但是对某些荚膜血清分型和毒力基因的携带率可能更低，因此临床针对感染 MT-KPN 患者用药时，需要综合考虑 MT-KPN 的耐药性和毒力基因分布情况。

综上所述，MT-KPN 携带毒力基因检出率较高，临床需结合其耐药性和毒力基因分布情况合理用药。

参 考 文 献

[1] MASON S, VORNHAGEN J, SMITH SN, et al. The *Klebsiella pneumoniae* ter operon enhances stress tolerance[J]. Infect Immun, 2023, 91(2): e0055922.

[2] FERNÁNDEZ VECILLA D, UNZAGA BARAÑANO MJ, GARCÍA DE ANDOIN SOJO C, et al. *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta ST23 Como causa de neumonía a cavitada y sepsis [J]. Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica (English Ed), 2023, 41(2): 129-131.

[3] FOSTER-NYARKO E, COTTINGHAM H, WICK RR, et al. Nanopore-only assemblies for genomic surveillance of the global priority drug-resistant pathogen, *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Genom, 2023, 9(2): 143-148.

[4] 孙守栋, 陈焯, 朱静轩, 等. 无菌体液分离的肺炎克雷伯菌耐药及毒力因子研究[J]. 医学研究杂志, 2021, 50(4): 65-68.

[5] 吴旻, 陈琼, 许湘飞, 等. 碳青霉烯类耐药高黏液型肺炎克雷伯菌分子流行病学和患者临床特征研究[J]. 实用预防医学, 2020, 27(12): 1525-1528.

[6] SETIAWAN A, WIDODO ADW, ENDRASWARI PD. Comparison of ciprofloxacin, cotrimoxazole, and doxycycline on *Klebsiella pneumoniae*: time-kill curve analysis[J]. Ann Med Surg, 2022, 84: 104841.

[7] PALUSIAK A. *Proteus mirabilis* and *Klebsiella pneumoniae* as pathogens capable of causing co-infections and exhibiting similarities in their virulence factors[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022, 12: 991657.

[8] PANPETCH W, PHUENGMAUNG P, HIENGRACH P, et al.

Candida warsens Klebsiella pneumoniae induced-sepsis in a mouse model with low dose dextran sulfate solution through gut dysbiosis and enhanced inflammation[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(13): 7050.

[9] CHANG EK, MILLER M, SHAHIN K, et al. Genetics and pathology associated with *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella* spp. isolates from North American Pacific coastal marine mammals [J]. Vet Microbiol, 2022, 265: 109307.

[10] 吴旻, 丁洁霞, 邹菁, 等. 高黏液型肺炎克雷伯菌耐药性和感染患者临床特征研究[J]. 健康研究, 2020, 40(5): 558-563.

[11] PEKTEZEL MY, ISIKAY I, GOCMEN R, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* meningitis and abscess treated with ceftazidime-avibactam[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 2022, 40(6): 332-333.

[12] SPYRAKIS F, SANTUCCI M, MASO L, et al. Virtual screening identifies broad-spectrum β -lactamase inhibitors with activity on clinically relevant serine- and metallo-carbapenemases[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 12763.

[13] 雷亚利, 潘俊均, 修宁宁, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌的血清荚膜分型菌株特点及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(10): 1473-1476.

[14] 胡久丽, 肖旭, 朱孝芹, 等. 痰液分离的高黏液型肺炎克雷伯菌耐药性及毒力基因检测[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(5): 982-985.

[15] HUYNH BT, PASSET V, RAKOTONDRA SOA A, et al. *Klebsiella pneumoniae* carriage in low-income countries: antimicrobial resistance, genomic diversity and risk factors[J]. Gut Microbes, 2020, 11(5): 1287-1299.

[16] YANG YB, CHEN YH, LIU YT, et al. *Klebsiella pneumoniae*: a pathogenic bacteria transmitted through *Hirudo nipponia* that may cause illness in humans[J]. Transbound Emerg Dis, 2021, 68(4): 2051-2058.

[17] FURLAN JPR, SAVAZZI EA, STEHLING EG. Genomic insights into multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* co-harboring metal resistance genes in aquatic environments[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2020, 201: 110782.

[18] 牛琰, 廖卫, 梁鑫, 等. 高黏液型肺炎克雷伯菌感染的临床分析及耐药性分析[J]. 中国热带医学, 2021, 21(8): 748-752.

[19] 毕建蝶, 刘淑敏, 何秋月, 等. 高毒力肺炎克雷伯菌毒力特性及其对 RAW_{264.7} 细胞炎症反应的影响[J]. 中国抗生素杂志, 2023, 48(4): 438-444.

[20] MORALES-LEÓN F, OPAZO-CAPURRO A, CARO C, et al. Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in Chile[J]. Virulence, 2021, 12(1): 35-44.

(方丽蓉 编辑)