

无菌体液分离的肺炎克雷伯菌耐药及毒力因子研究

孙守栋 陈 烨 朱静轩 杨雪静

摘 要 **目的** 分析无菌体液分离的肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae* isolated from sterile body fluids, SBF-KP)的分布、耐药性及毒力因子的携带情况。**方法** 收集从无菌体液分离的 83 株肺炎克雷伯菌, MALDI-TOF 质谱仪进行菌株鉴定, Vitek-2compact 系统进行药敏试验, 黏液丝试验检测菌株高黏液表型, 对菌株荚膜型及毒力基因进行 PCR 扩增和基因测序。**结果** 无菌体液中, 脓液中的肺炎克雷伯菌的检出率最高, 其次是腹腔积液, 分别为 47.0% (39/83) 和 21.7% (18/83); SBF-KP 对复方新诺明、氨曲南、环丙沙星、头孢他啶、替卡西林/克拉维酸、左旋氧氟沙星耐药率较高, 大于 20%, 对替加环素、阿米卡星、碳青霉烯类药物仍有较高活性; SBF-KP 荚膜型以 K1、K2 型为主, 阳性率分别为 39.8% (33/83) 和 13.3% (11/83); SBF-KP 高黏液型阳性率为 57.9% (48/83), 高黏液型菌株中 K1、K2 型分别占 45.8% (22/48) 和 18.8% (9/48); *entB*、*fimH*、*uge*、*wabG*、*ureA*、*ycf* 毒力基因检出率最高, 均大于 98.0%; 脓液与其他无菌体液分离的肺炎克雷伯菌在高黏液表型、*rmpA*、*aerobactin*、*kfuB* 检出率方面比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** SBF-KP 对临床常用药物呈不同程度耐药, 对阿米卡星、替加环素、碳青霉烯类药物有较好的药物敏感度; 且 SBF-KP 菌株携带多种毒力因子, 荚膜型以 K1 型、K2 型为主, 提示临床应进一步加强耐药监测, 结合药敏合理选用抗生素, 以提高疗效及减少高毒力和高耐药菌株的传播和流行。

关键词 无菌体液 肺炎克雷伯菌 毒力基因 荚膜血清型 耐药性

中图分类号 R378.99

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2021.04.016

Study on Drug Resistance and Virulence Factors of *Klebsiella Pneumoniae* Isolated from Sterile Body Fluids. Sun Shoudong, Chen Ye, Zhu Jingxuan, et al. The First Clinical Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang 310053, China

Abstract **Objective** To analyze the clinical distribution, drug resistance and virulence factors of *Klebsiella pneumoniae* isolated from sterile body fluids (SBF-KP). **Methods** The 83 strains of *Klebsiella pneumoniae* were isolated from sterile body fluids. The strains were identified by MALDI-TOF, and antimicrobial susceptibility testing was carried out by Vitek-2 compact. The HM phenotype of *Klebsiella pneumoniae* was determined by string test. The capsular serotypes and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* were analyzed by PCR and sequence alignment. **Results** The detection rate of *Klebsiella pneumoniae* isolated from pus was the highest, and the next was ascites, accounting for 47.0% and 21.7%, respectively. The drug resistance rates of SBF-KP to compounds sulfamethoxazole, aztreonam, ciprofloxacin, ceftazidime, levofloxacin and ticarcillin/clavulanic acid were relatively high, all of which were more than 20%; SBF-KP still maintained high activity against tigecycline, amikacin and hydrocarbon enzytenes. The K1 and K2 were dominant among the capsular serotypes of SBF-KP, and the positive rates were 39.8% and 13.3%, respectively. The positive rate of the HM phenotype of SBF-KP was 57.9% (48/83), and most of the hypermucoviscous SBF-KP strains belonged to K1 (45.8%, 22/48) or K2 (18.8%, 9/48) capsular serotypes. The detection rates of *entB*, *fimH*, *uge*, *wabG*, *ureA*, *ycf*, were higher in virulence genes, all above 98.0%. There was a significant difference in the detection rate of HM phenotype, *rmpA*, *aerobactin* and *kfuB* between SBF-KP isolated from pus and other aseptic body fluids ($P < 0.05$). **Conclusion** SBF-KP showed varying degrees of drug resistance to antimicrobial agents, and the strains still maintained high activity against tigecycline, amikacin and hydrocarbon enzytenes. The strains carried a variety of virulence genes, and K1/K2 capsular serotypes were the predominant serotypes. It suggests that we should further strengthen the monitoring of drug resistance and rationally select antibiotics in combination with drug sensitivity in order to improve the efficacy and reduce the spread and prevalence of hypervirulent and resistant strains.

Key words Sterile body fluids; *Klebsiella pneumoniae*; Virulence genes; Capsular serotypes; Drug resistance

基金项目: 浙江省医药卫生科技计划项目(2017KY117)

作者单位: 310053 杭州, 浙江中医药大学第一临床学院(孙守栋、陈烨、朱静轩); 310000 杭州, 浙江中医药大学附属第一医院检验科(杨雪静)

通讯作者: 杨雪静, 电子信箱: yxjyxj2006@126.com

肺炎克雷伯菌易定植于肠道、呼吸道等部位, 是目前临床院内感染及社区获得性感染的重要病原体之一。近年来, 随着诊疗技术增加及广谱抗菌药物的广泛使用, 肺炎克雷伯菌引起的无菌体腔感染越来越受到临床重视^[1-3]。现国内外有关分离自无菌体液

的肺炎克雷伯菌的毒力因子及耐药性综合分析报道较少,本研究对浙江中医药大学附属第一医院收集的 SBF - KP 菌株的临床分布、药敏状况、黏液表型、荚膜血清型及毒力基因携带情况进行分析,以期对临床诊治无菌体液肺炎克雷伯菌感染提供参考。

材料与方法

1. 菌株来源:收集浙江中医药大学附属第一医院 2017 年 8 月~2019 年 12 月无菌体液标本(胸腹腔积液、脓液、胆汁、脑脊液、关节腔积液、骨髓等,不包括血液及尿液)分离的肺炎克雷伯菌 83 株,剔除同一患者重复菌株。无菌体液:在标本采集、标本处理过程中严格无菌操作,分离出的细菌被认为是感染菌的液体标本。

2. 仪器与试剂: MALDI - TOF 质谱仪 (Bruker)、Vitek - 2 Compact 全自动微生物分析系统(法国梅里埃公司)、PCR 仪(美国 Bio - Rad 公司)、10 × AceTaq PCR Buffer(含 Mg^{+2})及 PCR 试剂购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司、电泳仪及紫外凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)、细菌核酸提取盒[天根生化科技(北京)有限公司]、PCR 扩增引物合成及产物测序由北京擎科新业生物技术有限公司完成。

3. 菌株鉴定及药敏试验:按照《全国临床检验操作规程》进行无菌体液标本采集与细菌分离培养,阳性菌株采用 MALDI - TOF 质谱仪及 Vitek - 2 Compact 系统进行细菌鉴定及药敏试验(质谱仪鉴定率需达到 2.0 以上)。质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922,药敏结果采用美国临床和实验室标准化协会 (CLIS) 推荐标准进行判断。

4. 高黏液型鉴定:用接种环挑取血平板待测菌株,挑起的黏液丝长度 $\geq 5\text{mm}$,为黏液丝试验阳性,重复 3 次以上确定为高黏液菌株。

5. PCR 扩增及序列分析:对无菌体液分离的肺炎克雷伯菌常见荚膜型 K1、K2、K57、K5、K20、K54 基因及 *uge*、*wabG*、*ycf*、*ureA*、*fimH*、*rmpA*、*rmpA2*、*aerobactin*、*iucA*、*magA*、*wcaG*、*ybtA*、*kfuB*、*iroB*、*alls*、*iutA*、*entB* 毒力基因进行 PCR 扩增及序列分析。反应条件、反应体系、引物合成参照文献[4~7]。PCR 扩增产物送北京擎科新业生物技术有限公司测序,序列与 GenBank 数据库在线比对。

6. 统计学方法:采用 WHONET 5.6 软件剔除重复株后进行药敏结果统计分析,采用 SPSS 25.0 统计学软件对数据进行统计分析,样本率的比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

结 果

1. 标本来源:共收集 SBF - KP 菌株 83 株,其中脓液的检出率最高,为 47.0% (39/83);其次为胸腔积液、胆汁、胸腔积液穿刺液、脑脊液、骨髓,分别为 21.7% (18/83)、16.9% (14/83)、7.2% (6/83)、6.0% (5/83) 和 1.2% (1/83)。

2. 药敏结果:83 株 SBF - KP 对临床 14 种抗菌药物均有不同程度耐药,其中对复方新诺明、氨曲南、环丙沙星、头孢他啶、替卡西林/克拉维酸、左旋氧氟沙星耐药率较高,均大于 20%;对替加环素、阿米卡星、碳青霉烯类具有较好的药物敏感度,耐药率分别为 6.0% (5/83)、7.2% (6/83)、9.6% (8/83,表 1)。

表 1 无菌体液分离的肺炎克雷伯菌药敏试验结果

抗菌药物	耐药株数	比例 (%)
头孢哌酮/舒巴坦	16	19.3
替卡西林/克拉维酸	17	20.5
哌拉西林/他唑巴坦	12	14.5
头孢他啶	18	21.7
头孢吡肟	15	18.1
氨曲南	21	25.3
亚胺培南	8	9.6
美罗培南	8	9.6
妥布霉素	10	12.0
阿米卡星	6	7.2
环丙沙星	20	24.1
左旋氧氟沙星	17	20.5
复方新诺明	25	30.1
替加环素	5	6.0

3. 荚膜型及高黏液型分布:SBF - KP 菌株荚膜型以 K1、K2 型为主,阳性率分别为 39.8% (33/83)、13.3% (11/83),检测到 1 株 K5 荚膜型 SBF - KP 菌株。SBF - KP 高黏液型阳性率为 57.9% (48/83),高黏液型菌株 K1、K2 荚膜型阳性率分别为 45.8% (22/48)、18.8% (9/48)。

4. 毒力基因检测:17 种毒力基因中 *entB*、*fimH*、*uge*、*wabG*、*ureA*、*ycf* 基因检出率最高,均大于 98.0%;其余毒力基因均有检出,其中 *iroB* 检出率最低,为 9.6% (8/83,表 2,图 1)。

5. 无菌体液中脓液与其他无菌体液毒力因子差异:48 株高黏液型菌株中,脓液、其他无菌体液分离的菌株分别为 34、14 株;脓液标本与其他无菌体液在高黏液表型、*rmpA*、*aerobactin*、*kfuB* 检出率比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 无菌体液分离肺炎克雷伯菌毒力因子分布

毒力基因	其他无菌体液 (44 株)		脓液 (39 株)		P	总株数	阳性率 (%)
	株数	阳性率 (%)	株数	阳性率 (%)			
uge	44	100.0	38	97.4	0.470 [#]	82	98.8
wabG	44	100.0	38	97.4	0.470 [#]	82	98.8
ureA	44	100.0	38	97.4	0.470 [#]	82	98.8
entB	44	100.0	39	100.0	—	83	100.0
fimH	44	100.0	39	100.0	—	83	100.0
ycf	44	100.0	38	97.4	0.470 [#]	82	98.8
iutA	39	88.6	35	89.7	1.000 [*]	74	89.2
ybtA	36	81.8	31	79.5	0.788	67	80.7
rmpA2	34	77.3	30	76.9	0.970	64	77.1
iucA	33	75.0	35	89.7	0.145 [*]	68	81.9
rmpA	23	52.3	36	92.3	0.000 [*]	59	71.1
Aerobactin	23	52.3	35	89.7	0.001 [*]	58	69.9
wcaG	21	47.7	26	66.7	0.082	47	56.6
kfuB	18	40.9	25	64.1	0.035	43	51.8
magA	16	36.4	17	43.6	0.502	33	39.8
alls	13	29.5	14	35.9	0.538	27	32.5
iroB	5	11.4	3	7.7	0.847 [*]	8	9.6

^{*} 应用 χ^2 检验连续性校正; [#] 应用 Fisher 精确检验



图 1 rmpA2 基因电泳图

M. marker; 1、2. 为阴性、阳性对照; 4~5、9~10、12、16~19、21~22. rmpA2 基因扩增阳性; 3、6~8、11、13~15、20. rmpA2 基因扩增阴性

讨 论

2018CHINET 中国细菌耐药性监测显示肺炎克雷伯菌除对黏菌素类、替加环素、阿米卡星耐药率较低外,对其他抗菌药物耐药率均大于 25%,并且与 2005 年比较,碳青霉烯类耐药率上升幅度超过 8 倍^[8]。近年来,超广谱抗菌药物的使用,以及介入性检查及治疗手段的增加,导致无菌体腔肺炎克雷伯菌感染不断增加。充分了解 SBF-KP 的分布及药敏试验特点,对合理选择抗菌药物及控制菌株耐药性具有重要意义。国内研究报道 SBF-KP 除对碳青霉烯类药物较敏感外,对临床其他常用抗菌药物耐药率较高^[1]。钟敏等^[2]研究显示,SBF-KP 虽对碳青霉烯类、阿米卡星、替加环素仍有较好的药物敏感度,但

SBF-KP 对碳青霉烯类耐药率呈缓慢上升趋势,近 4 年来(2015~2018 年)上升幅度超过 3 倍。另外温伟洪等^[9]研究发现,SBF-KP 对氨苄西林/舒巴坦、氯霉素、四环素、复方磺胺甲噁唑、头孢唑啉、头孢吡肟耐药性低于非无菌体液,耐药率比较差异有统计学意义($P < 0.05$);非无菌体液分离的菌株大多为定植菌,定植菌的抗生素长期暴露史可能是此差异性的原因之一。本研究药敏试验显示 SBF-KP 对临床常用的抗菌药物均有不同程度耐药,其中替加环素、阿米卡星、碳青霉烯类耐药率较低,与国内报道相符,提示这 3 种对抗生素对无菌体腔肺炎克雷伯菌感染治疗具有重要意义,但为进一步控制肺炎克雷伯菌整体耐药率,临床医生应及时关注病原菌药敏结果,严格掌握药物适应证。

高黏液表型是高毒力肺炎克雷伯菌(HvKP)最主要的毒力特征之一,黏液表型调解因子 A(rmpA、rmpA2)对维持菌株高黏液型具有重要意义;rmpA、rmpA2 位于 180~220kb 的质粒上,可协同铁载体等其他毒力因子调控菌株毒力表达。本研究 SBF-KP 菌株 rmpA、rmpA2 基因阳性率较既往 HvKP 研究低,且菌株高黏液表型与 rmpA、rmpA2 基因阳性率不一致,部分携带黏液表型调解因子 A 菌株并不表达高黏液表型,考虑可能与气杆菌素(aerobactin)、wcaG、rfbP 等毒力因子基因缺失有关^[10,11]。另外本研究发现,无菌体液中脓液标本的高黏液表型阳性率高于其他无菌体液,差异有统计学意义($P < 0.05$),猜测可能与 rmpA 基因调控有关。荚膜多糖过度分泌可使肺

肺炎克雷伯菌呈高黏液表型,根据荚膜多糖可将肺炎克雷伯菌分为 82 种荚膜型,其中 K1、K2 型毒力较强且与 H₂VP 密切相关^[12,13]。magA 位于染色体上,与肺炎克雷伯菌 K1 荚膜型合成相关,allS 基因主要编码尿囊素调节因子激活剂,并且与气杆菌素的生成密切相关,wcaG 基因主要编码菌株荚膜中的岩藻糖成分,有助于逃避吞噬细胞的吞噬作用。本研究发现 SBF - KP 菌株荚膜型以 K1/K2 高毒型为主,比例大于 50%,且 allS、magA 基因仅存在于 K1 型肺炎克雷伯菌中,与相关报道一致^[14,15]。席健峰等^[16]研究发现 wcaG 基因仅存在于 K1 型肺炎克雷伯菌中,本研究中 wcaG 在 K1、K2 型以及未分型菌株均有检出,与其结果不符。

肺炎克雷伯菌铁摄取相关毒力因子(aerobactin、iutA、iucA、ybtA、entB、iroB、kfuB、ycf)对维持菌株定植、侵袭、高毒性具有重要作用,其中气杆菌素 aerobactin 因子是其最主要的毒力因子^[17]。Yu 等^[6]研究发现 K1、K2 荚膜型肺炎克雷伯菌 aerobactin 的检出率为 100%,本研究 K1、K2 荚膜型肺炎克雷伯菌均携带 aerobactin 基因,与其报道一致。iucABCD 是气杆菌素的基因编码簇,本研究 iucA 与 rmpA 基因阳性率稍有差别,与 iucABCD、rmpA 基因位于同一质粒报道不符^[18]。kfuB 是肺炎克雷伯菌铁离子转运受体,与菌株高毒力密切相关,本研究发现 K1 型肺炎克雷伯菌均携带 kfuB 基因,与 kfu 基因在 K1 型菌株检出率较高一致^[19]。rmpA、iucABCD - iutA 基因对菌株高毒力、高致死力具有重要作用,本研究发现高黏液 K1/K2 型菌株感染均携带 rmpA、iucA、iutA 毒力基因,且患者预后不佳,提示 rmpA、iucA、iutA 基因可能与 K1/K2 型菌株的高毒性、高致死性密切相关^[6,20]。本研究 SBF - KP 菌株 entB、fimH、uge、wabG、ureA、ycf 基因检出率大于 98.0%,且无菌体液脓液标本分离的肺炎克雷伯菌 aerobactin、kfuB 基因阳性率高于其他无菌体液,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,SBF - KP 菌株对临床常用抗菌药物具有不同程度耐药,对阿米卡星、替加环素、碳青霉烯类药物仍有较好的药物敏感度;另外 SBF - KP 菌株携带多种毒力因子,且荚膜血清型以 K1 型、K2 型为主,提示临床应进一步加强耐药监测,结合菌株药敏合理选用抗生素,以提高疗效及减少高毒力和高耐药菌株的传播和流行。

参考文献

- 1 刘爽,肖晓光,林琳. 2013 - 2015 年无菌体液病原菌分布及耐药性分析[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(14): 2038 - 2041
- 2 钟敏,龙姗姗,黄湘宁,等. 2015 ~ 2018 年四川地区无菌体液

- 细菌的分布及耐药性分析[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(10): 1181 - 1188
- 3 杜兰芳,刘桂花. 60 例细菌性肝脓肿临床诊治过程分析[J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27(11): 930 - 931
- 4 Turton JF, Perry C, Elgohari S, *et al.* PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type - specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets[J]. J Med Microbiol, 2010, 59(5): 541 - 547
- 5 Candan ED, Aksoz N. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors [J]. Acta Biochim Pol, 2015, 62(4): 867 - 874
- 6 Yu WL, Ko WC, Cheng KC, *et al.* Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non - K1/K2 serotypes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2008, 62(1): 1 - 6
- 7 Russo TA, Olson R, Fang CT, *et al.* Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00776 - 18
- 8 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(1): 1 - 10
- 9 温伟洪,徐令清,李介华,等. 无菌体液与非无菌体液细菌耐药监测对比分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 37(2): 189 - 191
- 10 王丽凤,沈定霞. 高毒力肺炎克雷伯菌的致病机制研究进展[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(6): 468 - 471
- 11 陈杨,刘嘉琳,瞿洪平. 铁载体对肺炎克雷伯菌毒力增强的机制研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2016, 16(6): 804 - 807
- 12 Prokesh BC, TeKippe M, Kim J, *et al.* Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(9): e190 - e195
- 13 Lee CR, Lee JH, Park KS, *et al.* Antimicrobial resistance of hypervirulent: epidemiology, hypervirulence - associated determinants, and resistance mechanisms[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 483
- 14 Guo YJ, Wang SS, Zhan LL, *et al.* Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous isolates associated with invasive infections in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 24
- 15 李喜红,魏丹丹,王莲慧,等. 临床分离碳青霉烯类耐药与非耐药肺炎克雷伯菌株的血清荚膜类型特征及毒力基因分布研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2018, 28(5): 654 - 658
- 16 席健峰,徐义,郭宇航,等. 引起肝脓肿的肺炎克雷伯菌毒力基因检测及同源性分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2020, 36(5): 1072 - 1076
- 17 张颖,李轶,郭思. 高毒力肺炎克雷伯菌分子致病机制研究进展[J]. 检验医学与临床, 2020, 17(9): 1298 - 1301
- 18 Russo TA, Olson R, MacDonald U, *et al.* Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enable the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo[J]. Infect Immun, 2015, 83(8): 3325 - 3333
- 19 孙凯莉,刘周,陈昊然,等. 安徽地区高黏液表型肺炎克雷伯菌的耐药基因型、荚膜血清型和毒力基因[J]. 中华传染病杂志, 2019, 7: 408 - 413
- 20 Siu LK, Fung CP, Chang FY, *et al.* Molecular typing and virulence analysis of serotype K1 *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from liver abscess patients and stool samples from noninfectious subjects in Hong Kong, Singapore, and Taiwan[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(11): 3761 - 3765

(收稿日期: 2020 - 10 - 14)

(修回日期: 2020 - 12 - 08)