

• 首都医科大学专题 •

基于基因组学 CRKP 的 RND 外排泵分布及生物膜研究*

曹敬荣¹, 魏思雨^{1,2}, 杨文硕¹, 陈典典¹, 王 岩¹, 李 颖¹

1. 首都医科大学宣武医院检验科, 北京 100053; 2. 首都医科大学临床检验诊断学系, 北京 100070

摘 要: **目的** 探讨耐药结节细胞分化(RND)外排泵在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)中的分布情况及与生物膜形成的作用。 **方法** 收集该院临床分离的 CRKP 菌株, 采用 Whonet5.6 软件分析其标本来源、科室分布等; 采用生物膜形成试验观察不同培养时间生物膜形成情况; 采用二代测序数据分析 RND 外排泵基因、耐药基因、分子分型等; 采用 PCR 扩增 RND 外排泵基因。 **结果** 63 株 CRKP 中 87.3% 来源于痰液, 77.5% 分离自重症监护室(ICU)。二代测序显示, 多数菌株携带 10 余种耐药基因, 55.6% 菌株耐药基因与表型匹配; 携带 RND 外排泵基因的 61 株菌株中, PCR 扩增阳性 23 株(37.7%), 荚膜血清型主要为 KL64(95.7%); PCR 扩增阴性 38 株(62.3%), 荚膜血清型较分散, 包括 KL64(77.5%)、KL47(10.0%)、K50(7.5%)和 K20(5.0%)这 4 种; 24 h 生物膜阳性 31 株(49.2%), 36 h 生物膜阳性 48 株(76.2%); RND 阳性与阴性菌株的生物膜形成能力差异无统计学意义($P>0.05$)。 **结论** CRKP 主要分离自 ICU 老年患者, 多数菌株存在 RND 外排泵基因但未表达, 与生物膜形成无明显相关, 其在多重耐药中的作用有待进一步探讨。

关键词: 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 外排泵; 基因组学; 生物膜; 耐药机制

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2023.23.005

中图法分类号: R446.5

文章编号: 1673-4130(2023)23-2835-07

文献标志码: A

Distribution of RND efflux pumps and biofilm studies based on genomic CRKP*

CAO Jingrong¹, WEI Siyu^{1,2}, YANG Wenshuo¹, CHEN Diandian¹, WANG Yan¹, LI Ying¹

1. Department of Clinical Laboratory, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China; 2. Department of Clinical Laboratory Diagnosis, Capital Medical University, Beijing 100070, China

Abstract: **Objective** To investigate the distribution of drug-resistant nodular cell differentiation (RND) efflux pump in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) and its role in biofilm formation. **Methods** The clinical isolates of CRKP were collected from the hospital. Whonet5.6 software was used to analyze the specimen source and department distribution. Biofilm formation test was used to observe the biofilm formation at different culture times. The next generation sequencing data were used to analyze the RND efflux pump genes, drug resistance genes, molecular typing, etc. The RND efflux pump gene was amplified by PCR. **Results** Among the 63 CRKP strains, 87.3% were isolated from sputum, and 77.5% were isolated from intensive care unit (ICU). The results of next generation sequencing showed that most of the strains carried more than 10 drug resistance genes, and 55.6% of the strains had drug resistance genes matched with the phenotype. Among the 61 strains carrying RND efflux pump gene, 23 strains (37.7%) were positive by PCR, and the predominant capsule serotype was KL64 (95.7%). 38 strains (62.3%) were negative for PCR amplification, and the capsule serotypes were dispersed, including KL64 (77.5%), KL47 (10.0%), K50 (7.5%) and K20 (5.0%). Totally 31 strains (49.2%) were positive for biofilm at 24 h and 48 strains (76.2%) at 36 h. There was no significant difference in biofilm formation ability between RND positive and negative strains ($P>0.05$). **Conclusion** CRKP is mainly isolated from elderly patients in ICU. Most of the CRKP strains have RND efflux pump genes but do not express them. There is no significant correlation between RND efflux pump genes and biofilm formation, the role in multiple drug resistance remains to be further discussed.

Key words: carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; efflux pump; genomics; biofilm; mechanisms of drug resistance

* 基金项目: 北京市高层次公共卫生技术人才建设项目(学科骨干-01-023)。

作者简介: 曹敬荣, 女, 主任医师, 主要从事临床感染性疾病病原学诊断、微生物耐药性及分子流行病学相关研究。

中国细菌耐药监测网数据显示,我国的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的分离率呈逐年升高趋势^[1],因此对 CRKP 耐药机制的研究非常必要。肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物的耐药机制有多种,以往主要集中在产酶机制的研究^[2-3],而对于在基因组学基础上联合主动外排系统、生物膜等的多种机制相互作用研究较少。肺炎克雷伯菌中已经发现多种主动外排系统,研究认为外排泵基因的表达水平与肺炎克雷伯菌的多药耐药表型相关联,并表现为多重耐药性^[4]。生物膜中细菌在生理学、代谢、基质分解或利用,以及对环境的耐受性方面具有独特性,可导致慢性、持续性感染和耐药性增加。因此,本研究拟通过二代测序在基因组学基础上联合外排泵和生物膜形成试验,对首都医科大学宣武医院 2019—2020 年 CRKP 菌株的多重耐药机制进行分析,重点探讨耐药结节细胞分化(RND)外排泵和生物膜在 CRKP 中的分布情况及其对耐药的相互影响,以期临床预防和控制多重耐药肺炎克雷伯菌感染提供更多理论参考。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 选取首都医科大学宣武医院 2019—2020 年住院患者各类临床标本中分离的肺炎克雷伯菌,参照美国临床和实验室标准协会 2021 版^[5]标准,用 Whonet5.6 软件筛选药敏结果为碳青霉烯类药物耐药的肺炎克雷伯菌。保留同一患者多部位分离菌和非重复菌株。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则和首都医科大学宣武医院相关规定,研究方案通过医院医学伦理委员会批准(批件号:临研审 2020052 号),患者免知情同意。

1.2 仪器与试剂 电泳仪(北京六一仪器厂)、恒温金属浴锅(上海精密实验设备有限公司)、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)质谱仪(德国布鲁克公司)、VITEK 2 Compact 全自动微生物鉴定系统及配套 AST GN334 药敏卡片(法国生物梅里埃公司)、PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD 公司)。2×Dir PCR Master Mix、灭菌双蒸水、DNA 分子量标准(2 000 bp)、1 000×Gene Nuclead Acid Due 核酸染料、50×TAE 缓冲液(北京索莱宝科技有限公司)、Agarose 琼脂糖(BBI 生命科学公司)、哥伦比亚血琼脂培养基、LB 液体培养基、甲醇、1%结晶紫染液、95%乙醇。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 菌株复苏鉴定与药敏 入选菌株复苏后接种于哥伦比亚血琼脂平板,37℃过夜培养后分离单个菌落,细菌鉴定使用 MALDI-TOF MS 完成,药敏试验使用 VITEK2 Compact 及 AST GN334 药敏卡,美罗

培南采用 E-test 方法测定最小抑菌浓度。替加环素判读参考美国食品药品监督管理局标准^[6]。生物膜阳性质控菌^[7]为肺炎克雷伯菌 ATCC700603,药敏质控菌株为大肠埃希菌 ATCC25922。

1.3.2 二代基因测序及多位点序列分型(MLST)

采用 Hiseg2500 Illumina 高通量测序仪进行二代基因测序。拼接和装配数据采用 SOAP、Spades 和 Abyss 软件进行处理,与 CISA 软件集成优化后得到基因组序列,通过 RGI 软件和 Diamond 软件与综合抗菌药物耐药性数据库和毒力因子数据库中耐药基因和毒力基因比对,选择识别率均在 90%以上的基因进行分析。基因组数据提交 NCBI 数据库,获得 MLST 型别。

1.3.3 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳 采用加热煮沸法提取细菌 DNA 作为模板,扩增体系:菌株 DNA 基因组 5.0 μL;正向引物(10 mmol/L)2.0 μL;反向引物(10 mmol/L)2.0 μL;2×Dir PCR Master Mix 12.5 μL;灭菌双蒸水补足 25 μL。参考文献[8]合成正向引物(RND-F: ATGAAGTCACGCAACGG-GAT)、反向引物(RND-R: ATCATGAGCCTGC-CCTCCCT),片段长度为 750 bp。扩增条件:98℃,5 min 预变性,98℃ 10 s,55℃ 15 s,72℃ 90 s 共 35 个循环,72℃ 10 min 延伸,4℃保存。选用 1%的琼脂糖凝胶,电泳仪参数(120 V、110 mA,40 min),凝胶成像根据条带位置初步判断有无阳性扩增产物及产物大小。

1.3.4 结晶紫生物膜形成试验^[7,9] 冻存菌株在血平板上复苏后分纯单个菌落,制备 0.5 麦氏浊度菌悬液。在 96 孔培养板内加入 190 μL LB 液体培养基,10 μL 0.5 麦氏浊度菌悬液(每个菌株加 3 个孔),加入 10 μL 0.5 麦氏浊度 ATCC700603 作为阳性对照孔,加入 10 μL LB 液体培养基作为阴性对照孔。将 96 孔培养板置于恒温 35℃培养箱中静置培养 24 h 和 36 h 观察结果。吸出上清液,双蒸水清洗 3 次以除去浮游细菌。加入甲醇溶液固定 10 min,弃去甲醇并用双蒸水清洗 1 次。加入 300 μL 0.1%结晶紫染液于室温浸染 5 min,弃去染液双蒸水清洗 3 次待自然风干后每孔加入 200 μL 95%乙醇充分溶解 20 min,使用酶标仪读取 590 nm 处吸光度值(A 值)。临界 A 值(AC)定义:以比阴性对照的平均 A 高出 3 个标准差为 AC,并建立以下标准:A≤AC,没有生物膜形成能力(-);AC<A≤2×AC,弱生物膜形成能力(+);2×AC<A≤4×AC,中度生物膜形成能力(++);A>4×AC,强生物膜形成能力(+++)。

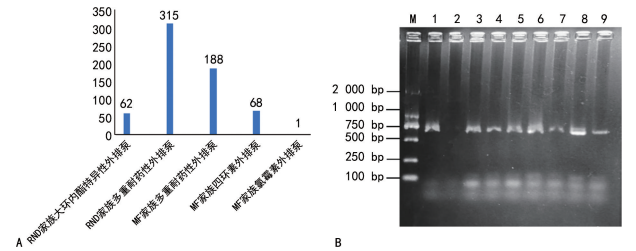
1.4 统计学处理 采用 Excel 软件进行患者数据录入,采用 IBM SPSS Statistics27.0 统计软件进行数据

分析,计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 CRKP 菌株信息 共收集非重复的 CRKP 菌株 63 株,来自 40 例患者,其中男性患者 22 例,女性患者 18 例;患者年龄 ≥ 60 岁 23 例;标本主要来源以痰液 (87.3%,55/63) 为主,其次为尿液 (4.8%,3/63)、脑脊液 (3.2%,2/63)、血液 (1.6%,1/63)、胆汁 (1.6%,1/63)、腹水 (1.6%,1/63);临床分布以神经外科 (42.5%,17/40) 和神经内科 (20.0%,8/40) 为主,其次为呼吸科 (17.5%,7/40) 和普通外科 (7.5%,3/40),31 例患者 (77.5%) 为重症监护室 (ICU) 患者。所有菌株均表现为多重耐药,对 β -内酰胺类、喹诺酮类 100.0% 耐药,对阿米卡星 (61.3%) 和复方磺胺甲噁唑 (46.7%) 耐药率较低,发现 7 株 (11.1%) 对替加环素中介的菌株。

2.2 外排泵基因分布与 PCR 电泳结果 63 株 CRKP 的二代测序基因组数据与标准基因比对显示,ardb-1113、ardb-1153、ardb-134、ardb-1690、ardb-1925、ardb-1975、ardb-2021、ardb-2595、ardb-2627、ardb-470 等基因高度表达,对应外排泵高度表达集中为 RND 家族和易化子 (MF) 家族^[10],其中 RND 家族基因数量 377 个,MF 家族基因数量 257 个。其中 61 株菌株 (96.8%) 存在 RND 外排泵基因,2 株仅存在 MF 外排基因。PCR 扩增 RND 外排泵通用基因,23 株 (37.7%) 在 750 bp 处有阳性条带,38 株 (62.3%) RND 扩增阴性。外排泵基因分布与 PCR 电泳结果见图 1。



注: A 为外排泵类型统计图; B 为 PCR 电泳图; M 为 DL2000 Marker, 2 泳道为阴性对照, 1、3~9 泳道为临床菌株扩增的 RND 基因 (片段长度约为 750 bp)。

图 1 外排泵基因分布与 RND 外排基因 PCR 电泳

2.3 CRKP 的耐药基因与耐药表型 基因组测序显示 62 株 (98.4%) CRKP 存在 bla_{KPC-2} 基因,存在涉及 8 类抗菌药物的 10 余种耐药基因,如 bla_{CTX-M-27}、bla_{TEM-1}、bla_{TEM-2}、bla_{SHV-1}、dfrA12、sul1 等。将药敏表型结果与携带的耐药基因进行匹配,尝试分析耐药表型与携带的相应耐药基因之间的关系,结果显示 35

株 CRKP 耐药表型与携带耐药基因匹配 (55.6%), 28 株 (44.4%) 表型与基因不符合,主要为替加环素敏感 CRKP 检出 tetA 耐药基因,替加环素中介的 CRKP 未检出耐药基因;复方磺胺甲噁唑耐药菌株携带磺胺类耐药基因 (dfrA12、sul1 等),见表 1。

表 1 耐药表型与耐药基因不匹配情况		
耐药表型	耐药基因	符合[n(%)]
碳青霉烯类耐药	未携带 bla _{KPC} 、bla _{COXA} 等	1(1.6)
复方磺胺甲噁唑耐药	携带 dfrA12、dfrA1、sul1、sul2	28(44.4)
替加环素敏感	携带 tetA 基因	4(6.3)
替加环素中介	未携带 tetA 基因	7(11.1)

2.4 生物膜结果及与 RND 外排泵的相关性 63 株菌株生物膜形成结果显示,24 h 生物膜阳性菌株有 31 株 (49.2%),其中以中度阳性 (++) 至强阳性 (+++) 为主; 36 h 生物膜阳性菌株有 48 株 (76.2%),培养时间延长,生物膜阳性率有所增加,增加的 17 株菌株生物膜均为弱阳性 (+) 至中度阳性 (++)。23 株菌株 RND 外排基因 PCR 阳性中 18 株 (78.3%) 的生物膜阳性在弱阳性 (+) 至强阳性 (+++), 5 株生物膜为阴性; 40 株 RND 阴性中有 30 株生物膜阳性, 10 株阴性,二者生物膜形成能力差异无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2。

23 株 RND 阳性菌中 22 例荚膜血清型为 KL64、1 例为 K50, ST 新型和 ST11 型分别为 12 株和 11 株; 40 株 RND 阴性菌中荚膜血清型包括 KL64、KL47、K50 和 K20,分别占 77.5% (31 株)、10.0% (4 株)、7.5% (3 株) 和 5.0% (2 株), ST 新型 17 株、ST11 型 22 株、ST15 型 1 株。23 株 RND 阳性菌均存在对四环素类、磺胺类、 β -内酰胺类、氨基糖苷类、氟喹诺酮类等抗菌药物耐药的多种耐药基因,如 bla_{KPC-2}、bla_{CTX-M-27}、bla_{TEM-1}、bla_{TEM-2}、bla_{SHV-1}、dfrA12、sul1 等; 耐药表型显示除对替加环素 100.0% 敏感外,对绝大部分药物耐药。此外,23 株检测到携带多种毒力基因,包括 I 型菌毛 (FimH)、III 型菌毛 (mrkA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Enterochelin 等。RND 基因 PCR 阳性菌株基因组分布见表 3。

表 2 RND 阳性与 RND 阴性生物膜形成能力比较[n(%)]

生物膜形成能力	RND 阴性 (n=40)	RND 阳性 (n=23)	χ^2	P
阴性(—)	10(25.0)	5(21.7)	0.09	0.23
弱阳性(+)	10(25.0)	4(17.4)	0.49	0.20
中等阳性(++)	18(45.0)	11(47.8)	0.14	0.20
强阳性(+++)	2(5.0)	3(13.0)	0.43	0.15

表 3 RND 基因 PCR 阳性菌株信息、生物膜和基因组分布

编号	性别/ 年龄 科室 (岁)	生物膜	ST 型/血 清型	耐药表型	耐药基因	毒力基因
1	M/88 ICU	+	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
2	F/84 呼吸 ICU	—	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-2)、氨基 糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
3	F/28 血管外科 ICU	+	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-2)、氨基 糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
4	M/60 神外 ICU	+++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
5	F/78 神外 ICU	—	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
6	F/78 神外 ICU	+++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Enterochelin
7	F/47 神外 ICU	++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA、Yersini- abactin
8	F/69 神外 ICU	++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Yersiniabactin
9	F/65 神外 ICU	++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、 Yersiniabactin
10	F/52 神外 ICU	++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-2)、氨基 糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA、Entero- chelin
11	M/57 神外 ICU	+++	ST 新型- KL64	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性,余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA、Yersini- abactin
12	M/57 神外 ICU	++	ST 新型- KL64	替加环素、复方磺胺甲 噁唑敏感,ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetC)、 β -内酰胺类 (CTX-M-65、CTX-M-14、KPC-2、SHV-11、 TEM-2)、氨基糖苷类(tolC,acrb)、喹诺酮类 (mdrk)	I型菌毛(FimH)、III型菌毛(mr- kA)、Aerobactin、rmpA、Yersini- abactin

续表 3 RND 基因 PCR 阳性菌株信息、生物膜和基因组分布

编号	性别/ 年龄 科室 (岁)	生物膜	ST 型/血 清型	耐药表型	耐药基因	毒力基因
13	M/88 急诊 ICU	—	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul1)、四环素类(tetc、teta)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-2)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk、qnrS)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、Enterochelin
14	M/85 老年综合科	—	ST11- KL64	替加环素、复方磺胺甲 噁唑敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul1、Sul2、dfra14)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk、qnrS)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Yersiniabactin
15	M/72 普外 ICU	++	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul1、Sul2、dfra14)、四环素类(tetc、teta)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk、qnrS)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Enterochelin
16	M/64 神内 ICU	—	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(dfra12)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Yersiniabactin
17	M/51 神内 ICU	++	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(dfra12)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA、Yersiniabactin
18	F/31 神内 ICU	++	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Yersiniabactin
19	M/45 神外 ICU	+	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(sul1、dfra12)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、Yersiniabactin
20	M/21 神内 ICU	++	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(dfra12)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA、Yersiniabactin
21	M/57 神外 ICU	+	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(dfra12)、四环素类(tetc)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、Yersiniabactin
22	M/89 呼吸 ICU	+	ST11- KL64	替加环素敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul2、dfra1)、四环素类(tetc、teta)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11、TEM-1)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、Yersiniabactin
23	F/86 呼吸 ICU	++	ST11- K50	替加环素、阿米卡星、 复方磺胺甲噁唑敏感, ESBL 阳性, 余耐药	磺胺类(Sul1、dfra1)、四环素类(tetc、teta、tetd)、β-内酰胺类(CTX-M-65、KPC-2、SHV-11)、氨基糖苷类(tolc、acrb)、喹诺酮类(mdrk)、乙酰氨基转移酶(aac3、aac6)	I型菌毛(FimH)、Ⅲ型菌毛(mr-kA)、Aerobactin、rmpA/rmpA2、Enterochelin

注: M 为男性; F 为女性; ESBL 为超广谱 β-内酰胺酶。

3 讨 论

碳青霉烯耐药机制有多种, 不同地域有所不同, 产碳青霉烯酶是世界范围内最常报道的 CRKP 耐药机制^[2-3], 既往大部分研究均是针对单一机制进行分析报道, 较少报道 CRKP 菌株多种耐药机制对耐药性的影响。本研究对 63 株临床分离 CRKP 菌株进行了

基因组鉴定, 在此基础上评估了基因组分布与耐药表型、生物膜形成和 RND 外排泵的相关性, 以期为多重耐药肺炎克雷伯菌不同耐药机制研究提供参考。本研究中 CRKP 菌株多分离自老年重症患者, 提示该人群感染的风险较高, 临床应高度重视并尽可能采取预防措施减少 CRKP 感染的发生和传播。从菌株来

源可见,研究菌株几乎涵盖了所有的感染途径,且有多例患者多部位分离出 CRKP 菌株,提示临床应重视多部位多系统感染标本送检和监测。

本研究基因组分析结果提示,CRKP 携带多种耐药基因和毒力基因,优势的分子型别为 CC258 克隆系中 ST11 和 ST 新型,荚膜血清型中 KL64 检出比例最高(84.1%),与既往研究结果一致^[2-3]。耐药表型与基因匹配结果显示,碳青霉烯类耐药未携带耐药基因,其外排泵的激活和生物膜可能是导致耐药表型产生的原因;而替加环素敏感菌株携带 teta 耐药基因,说明单独携带 teta 并未使 CRKP 表现对替加环素的耐药,该结果与之前报道^[11]结果一致;而替加环素中介菌株未检测到携带 teta 耐药基因,可能为其他耐药机制所致。近年来报道替加环素耐药率有所上升,主要表现为低水平耐药^[12],可能与染色体介导的 RND 主动外排系统 teta 基因激活相关,临床工作中需加强替加环素的药敏监测,延缓耐药发生。此外,基因组学分析发现多数菌株携带 I 型/III 型菌毛基因及 rpmA/rpmA2、Aero 等高毒力基因,使得 CRKP 菌株表现高毒力特点,尤其已引起越来越多关注的高毒力碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌 ST11-KL64 克隆菌株^[13-14],是一个潜在的威胁,其能够快速、多样地进化,从而阻碍替加环素和多黏菌素发挥有效治疗效果。

许多研究报道了外排泵在肺炎克雷伯菌耐药性形成中的关键作用^[8,15-17],如本研究数据所示,大多数 CRKP 分离菌株携带多种外排泵基因。为了解生物膜形成和外排泵参与肺炎克雷伯菌耐药性发展之间的相关性,本研究分析了它们之间的相互影响。本研究在测序基因组数据分析的基础上,采用 PCR 扩增 RND 外排基因高特异性片段,验证其是否有外排泵表达,发现 23 株 CRKP(37.7%,23/61)存在 RND 外排基因高表达,而 62.3%菌株存在 RND 基因但扩增阴性,可能是这些菌株核苷酸序列存在的遗传信息并未经过转录翻译转变成具有生物活性的蛋白分子,或者受体内调控因子及外界环境的影响而未能发挥外排作用,后续将采用逆转录 PCR 及蛋白质印迹法等方法检测信使 RNA 和外排泵连接蛋白等,进一步分析外排泵基因的表达及在耐药中的作用。另外,基因组学分析发现 23 株 RND 阳性菌中荚膜血清型主要为 KL64(95.7%),而 40 株 RND 阴性菌中荚膜血清型较为分散,包括 KL64(77.5%)、KL47(10.0%)、K50(7.5%)和 K20(5.0%)4 种,荚膜血清型与外排泵的相关性将在后期研究中增大菌株量进一步分析。

本研究通过生物膜试验,在 24 h 和 36 h 分别有 49.2%和 76.2%的菌株形成生物膜,提示随着培养时间延长,生物膜阳性率会增加,也提示临床对于易形成生物膜的细菌可能导致的感染,例如导管、插管、植

人物等在体内的时间尽量缩短,以减少生物膜形成所导致治疗失败的发生。分析外排泵与生物膜相关性发现,无论 RND 扩增阳性或阴性菌株,生物膜形成能力未见明显差异。而既往研究认为外排系统除了导致耐药外,还与其他细菌生存和适应环境的特性密切相关,如参与生物膜的形成和维持、致病因子的分泌及对外界环境的应激反应等,RND 外排系统可促进生物膜的形成或生物膜促进外排泵基因表达,从而增加了多重耐药性^[18-20]。显然,本研究结果与上述发现并不一致,可能与研究对象、入组菌株不同相关。今后需增加检测菌株数量或菌种类,参考相关研究^[21]采用实时荧光定量 PCR 研究基因表达水平或使用抑制剂后观测外排泵表达及与生物膜形成的相关性,进一步确认二者的相互影响及在多重耐药中的作用。

综上所述,CRKP 分离率呈逐年升高趋势,大部分来自于老年重症患者。RND 外排泵、生物膜与多种耐药基因并存导致多重耐药发生。但本研究有不足之处,尚未覆盖所有可能的耐药机制,如膜孔蛋白缺失,单中心研究入组的样本数量相对较少,结果可能存在一定偏差。CRKP 的耐药机制往往不是孤立存在的,有必要开展多地域、多中心联合研究,以全面掌握其分子流行病学特征,为制订规范治疗方案奠定基础。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2021 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2022,22(5):521-530.
- [2] 陈典典,曹敬荣,白向荣,等. 基于二代测序的碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌的分子特征分析[J]. 国际检验医学杂志,2021,42(24):2971-2976.
- [3] ZHANG Y, JIN L, OUYANG P, et al. China Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) network. evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75 (2):327-336.
- [4] LV L, WAN M, WANG C, et al. Emergence of a plasmid encoded resistance-nodulation-division efflux pump conferring resistance to multiple drugs, including tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae* [J]. mBio, 2020, 11: e02930-19.
- [5] HUMPHRIES R, BOBENCHIK A M, HINDLER J A, et al. Overview of changes to the Clinical and Laboratory Standards Institute Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing, M100, 31st edition [J]. J Clin Microbiol, 2021, 59: e0021321.
- [7] SHARMA A, RISHI P, SINGH R. In vitro and in vivo evaluation of DNase I in reinstating antibiotic efficacy against *Klebsiella pneumoniae* biofilms [J]. Pathog Dis, 2023, 81: ftad001.
- [8] 冷非凡,魏清伟,王永刚,等. 嗜酸氧化亚铁硫杆菌 RND

家族转运蛋白基因(rnd-1)的克隆及生物信息学分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(6): 2410-2416.

[9] SHADKAM S, GOLI H R, MIRZAEI B, et al. Correlation between antimicrobial resistance and biofilm formation capability among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from hospitalized patients in Iran[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrobials, 2021, 20(1): 13.

[10] SHARMA A, GUPTA V K, RANJANA P. Efflux pump inhibitors for bacterial pathogens: from bench to bedside [J]. Indian J Med Res, 2019, 149(2): 129-145.

[11] 张天翼, 周永年, 栗子洋, 等. 广泛耐药肺炎克雷伯菌耐药表型分析及耐药机制研究[J]. 中华检验医学杂志, 2022, 45(9): 936-942

[12] SUN C L, YU Y S, HUA X T. Resistance mechanisms of tigecycline in *Acinetobacter baumannii*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1141490

[13] PU D N, ZHAO J K, LU B H, et al. Within-host resistance evolution of a fatal ST11 hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Int J Antimicrob Agents, 2023, 61(4): 106747.

[14] YANG X M, SUN Q L, LI J P, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 841-849.

[15] TANG M, WEI X, WAN X, et al. The role and relationship with efflux pump of biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microb Pathog, 2020, 147: 104244.

[16] 李子尧, 鲁炳怀. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的耐药机制及其分子检测[J]. 中国临床新医学, 2021, 14(3): 256-261.

[17] DONG N, ZENG Y, WANG Y, et al. Distribution and spread of the mobilised RND efflux pump gene cluster *tmxCD-toprJ* in clinical Gram-negative bacteria: a molecular epidemiological study[J]. Lancet Microbe, 2022, 3(11): e846-e856.

[18] MEA H J, YONG P V C, WONG E H. An overview of *Acinetobacter baumannii* pathogenesis: motility, adherence and biofilm formation[J]. Microbiol Res, 2021, 247: 126722.

[19] LI X F, SHI H Q, LIANG Y, et al. Interaction of biofilm and efflux pump in clinical isolates of carbapenem resistant *P. aeruginosa*[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2022, 26(5): 1729-1737.

[20] AHMED H A, IBRAHIM E H S, ABDELHALIEM E, et al. Biotyping, virulotyping and biofilm formation ability of ESBL-*Klebsiella pneumoniae* isolates from nosocomial infections[J]. J Appl Microbiol, 2022, 132(6): 4555-4568.

[21] ALBARRI O, ALMATAR M, VAR I, et al. Antimicrobial Resistance of clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates: involvement of AcrAB and OqxAB efflux pumps[J]. Curr Mol Pharmacol, 2023, 31: 22.

(收稿日期: 2023-01-10 修回日期: 2023-08-25)

(上接第 2834 页)

脑卒中诊治指南 2018》解读[J]. 中国现代神经疾病杂志, 2019, 19(11): 897-901.

[8] XU M, HE X Y, HUANG P. The relationship between the mean platelet volume and carotid atherosclerosis and prognosis in patients with acute cerebral infarction[J]. Biomed Res Int, 2020, 2020: 6685740.

[9] HAN Y, ZHOU A H, LI F Y, et al. Apolipoprotein E ε4 allele is associated with vascular cognitive impairment no dementia in Chinese population[J]. J Neurol Sci, 2020, 409: 116606.

[10] GORABI A M, KIAIE N, KHOSROJERDI A, et al. Implications for the role of lipopolysaccharide in the development of atherosclerosis [J]. Trends Cardiovasc Med, 2022, 32(8): 525-533.

[11] 罗伏钢, 陈梅芳, 章隆, 等. ApoE 基因多态性与脑梗死后血管性痴呆的关联性研究[J]. 中华全科医学, 2018, 16(6): 874-877.

[12] 刘国栋, 王桦, 汪琦, 等. APOE 基因多态性与血脂异常相关性分析[J]. 武汉大学学报(医学版), 2017, 38(2): 267-270.

[13] 韩勇军, 张亚威, 高伟, 等. 郑州地区 SLCO1B1 和 ApoE 基因多态性分布情况[J]. 心脏杂志, 2022, 34(1): 44-48.

[14] 刘婷婷, 史海峰, 刘静. 急性脑血管病患者 ApoE 基因多态性临床分布特征及与血脂水平的相关性研究[J]. 现代检验医学杂志, 2019, 34(3): 25-29.

[15] HU M, TOMLINSON B. Lipid-lowering pharmacogenomics in Chinese patients[J]. Expert Rev Cardiovasc Ther, 2013, 11(8): 985-997.

[16] HOPEWELL J C, PARISH S, OFFER A, et al. Impact of common genetic variation on response to simvastatin therapy among 18 705 participants in the Heart Protection Study[J]. Eur Heart J, 2013, 34(13): 982-992.

[17] GERDES L U, GERDES C, KERVINEN K, et al. The apolipoprotein epsilon4 allele determines prognosis and the effect on prognosis of simvastatin in survivors of myocardial infarction: a substudy of the Scandinavian simvastatin survival study [J]. Circulation, 2000, 101(12): 1366-1371.

(收稿日期: 2023-04-02 修回日期: 2023-09-20)