

· 临床医学 ·

肺炎克雷伯菌分离株毒力基因分布与临床特征的相关性研究

沈旭晨¹, 蔡培泉^{1*}, 糜祖煌², 王春新³, 赵 琪³

¹南京医科大学附属无锡人民医院呼吸与危重症医学科, 江苏 无锡 214023; ²无锡市克隆遗传技术研究所, 江苏 无锡 214026; ³南京医科大学附属无锡人民医院医学检验科, 江苏 无锡 214023

[摘要] 目的:分析肺炎克雷伯菌8种毒力基因在肺炎克雷伯菌肺炎患者临床分离菌株中的分布和临床特征的关系。方法:收集2019年8—9月南京医科大学附属无锡人民医院分离的引起肺部感染的50株肺炎克雷伯菌,PCR法检测毒力基因,统计并分析肺炎克雷伯菌毒力基因阳性率及患者的临床分布特征。结果:50株菌株mrkD、ureA基因阳性率为100%,fimH、entB、ybtA基因阳性率分别为86%、96%、64%,未检测出wabG、uge、clbA基因。携带fimH基因肺炎克雷伯菌菌株的感染者较非携带该基因细菌的感染者更易出现咳嗽咳痰、胸闷气短的症状。最常见的组合为fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA,同时检出5种毒力基因的肺炎克雷伯菌感染者临床表现明显,但病死率低。结论:随着毒力基因种类的增加,咳嗽咳痰、胸闷气短症状的比例基本呈上升趋势,发热呈下降趋势。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;毒力基因;耐药性

[中图分类号] R563.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2021)07-1053-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20210719

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)通常存在于上呼吸道及肠道,是常见的条件致病菌。在近年的医院细菌耐药监测中,KP检出率居第2位^[1-2]。高毒力型肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)合并多重耐药在国内已有多次报道^[3-5],甚至新生儿也常有感染耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的报道^[6]。KP对各种年龄段人群造成威胁,使临床治疗面临艰巨挑战。尽管目前国内外有大量hvKP的研究报道^[7-9],但是缺乏肺炎克雷伯菌肺炎患者KP分离株的毒力基因分布与临床特征相关性研究。本研究选定了与KP主要毒力因子菌毛、荚膜、铁载体密切相关的fimH、mrkD、wabG、uge、ureA、entB、clbA、ybtA这8种毒力基因进行检测,并分析其与患者临床特征的相关性,现报道如下。

1 对象和方法

1.1 对象

选取2019年8—9月南京医科大学附属无锡人民医院住院患者各种临床标本中分离出KP菌株的50例肺部感染患者作为研究对象。本研究经医院

伦理委员会批准,所有患者均知情同意。

1.2 方法

1.2.1 细菌鉴定与药敏分析

细菌鉴定与药敏分析采用法国生物梅里埃公司VITEK-2全自动细菌鉴定及药敏分析仪。

1.2.2 靶基因检测

细菌DNA提取采用非离子去污剂Triton X-100裂解加蛋白酶K消化法。菌株先作纯培养,然后挑取单个菌落置入已预混好的Triton X-100与蛋白酶K溶液中,55℃温浴120 min,再95℃温浴10 min。-20℃保存待检。

PCR检测毒力基因。每种毒力基因检测PCR扩增的反应系统均为:耐热DNA聚合酶(TaKaRa公司,日本)1 U(0.2 μL),耐热DNA聚合酶匹配的10×缓冲液2 μL;P1引物2 μL(1.0 μmol/L),P2引物2 μL(1.0 μmol/L),dNTPs 2 μL(各种浓度均2 mmol/L),超纯水7 μL,菌株DNA提取液4.8 μL,合计总反应体积20 μL,引物序列见表1。PCR检测扩增热循环为:95℃预变性3 min,然后95℃变性0.5 min,55℃复性0.5 min,72℃延伸1.0 min,30个循环,最后一轮延伸72℃延长至5 min。经2%琼脂糖凝胶电泳20 min,紫外线下凝胶上出现与阳性对照分子量相同的条带即判别为阳性。

[基金项目] 无锡市人民医院后备学科带头人

*通信作者(Corresponding author),E-mail:cpq6868@163.com

表1 8种靶毒力基因PCR扩增引物序列

相关毒力因子	毒力基因	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)
菌毛	fimH	P1:GCCAACGTCTACGTTAACCTG;P2:GCTCACCGGCGTCAGATACAG	287
菌毛	mrkD	P1:ATGTCGCTGAGGAAATTACTAACG;P2:GACGTCGGGATAGACGATAT	360
荚膜	wabG	P1:TCAGGCTGGCTCTGCTGCGG;P2:CGCCATCTCTAGCGTCGGCC	290
荚膜	uge	P1:CTGATAGTAATCCTTATACCACTC;P2:GACTTCACCTACATCGACGAC	354
尿素酶	ureA	P1:TCAGATAATCGGGTTGTGAACGGT;P2:CGTCGCCTGGCCCCGGCCCT	240
铁载体	entB	P1:AAAGTCAACTGGGCCTTTGAG;P2:CACGGTATGGTCTTCATCCGG	300
铁载体	clbA	P1:TTCCTTCACTATCTCAATGAG;P2:TATGTTAGTAGCTTCCTGTGG	360
铁载体	ybtA	P1:CCGCAAACGCAATCTGAAATC;P2:GTGGGAGTCGATCTTATTCTT	420

1.2.3 临床特征分析

回顾性分析菌株来源患者的临床资料,包括性别、年龄、科室分布、住院时间、菌株来源、基础疾病、临床症状、侵入性操作、肺炎严重指数(PSI)评分、预后情况、耐药情况,并根据毒力基因检测结果进行分组比较。

2 结果

2.1 患者临床资料

KP菌株来自50例肺部感染患者,其中男36例,女14例。年龄分布在1~4岁及33~103岁,平均年龄(63.72±19.49)岁,60岁以上的老年患者占72%。标本来源为痰液48份,血液1份,肺泡灌洗液1份。29例社区获得性感染,21例医院获得性感染。总住院时间分布在5~185 d,平均为(31.86±37.27) d。患有乳腺癌、肺癌、食管癌等肿瘤疾病7例,糖尿病9例。34例进行气管内插管,19例进行深静脉置管,18例留置尿管,23例留置胃管。根据药敏结果,40%分离株为多重耐药菌株。抗菌药物耐药率分别为碳青霉烯类14%,青霉素类+酶抑制剂12%~40%,三代头孢10%~38%,四代头孢24%,氨基糖苷类8%~18%,喹诺酮类36%,超广谱β内酰胺酶阳性率30%。患者所在科室中,呼吸科、ICU患者共占50%,各外科及其余内科占比均在10%以下(图1)。

26例因感染相关症状(如咳嗽咳痰发热等)入院,19例因其他主诉入院。病程中,37例(74%)出现咳嗽、咳痰,29例(58%)出现发热,27例(54%)出现胸闷、气短。

2.2 靶基因检测阳性率及电泳图

本研究分离自肺炎患者的50株KP菌株对fimH、mrkD、wabG、uge、ureA、entB、ybtA、clbA这8种毒力基因进行检测,其中wabG、uge、clbA基因未检出,fimH、mrkD、ureA、entB、ybtA均有检出(表2)。同时检测出2种及以上毒力基因的菌株占100%,3

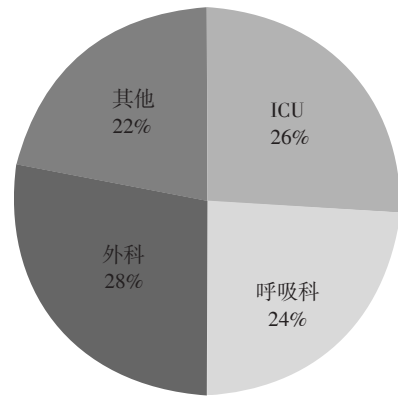


图1 50例肺炎克雷伯菌肺炎患者的临床科室分布

表2 50株肺炎克雷伯菌8种靶基因检测的阳性率

相关毒力因子	毒力基因	阳性株数	阳性率(%)
菌毛	fimH	43	86
菌毛	mrkD	50	100
尿素酶	ureA	50	100
铁载体	entB	48	96
铁载体	ybtA	32	64
铁载体	clbA	0	0
荚膜	wabG	0	0
荚膜	uge	0	0

种及以上占98%,4种及以上92%,5种及以上56%。

2.3 毒力基因分布与临床特征比较

如表3所示,根据毒力基因检测阳性的结果进行分组比较,共计6组,在各组内分别计算各比例。fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA组合例数达28例,明显多于其余各组。比较发现,携带fimH基因分组的患者更常出现咳嗽咳痰、胸闷气短的症状。fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA组合的患者临床表现(咳嗽咳痰、胸闷气短)明显,但病死率并不高,仅14.29%。携带mrkD+ureA+entB及fimH+mrkD+ureA+entB组合的患者病死率高,同时多重耐药菌比例也较高。

50例患者总体病死率为20%。将患者根据毒力基因阳性的数目分为4组,分析显示,随着毒力基

因种类数目的增加,检测出3种、4种、5种毒力基因阳性患者的病死率分别为33.33%、27.78%、14.29%,呈现下降趋势(表4)。

3 讨论

KP作为条件致病菌,易导致危重症和免疫缺陷患者的肺部感染、泌尿道感染、血流感染、肝脓

肿等^[7],hvKP甚至引起眼内炎、脑膜炎,导致患者的高致死率、高致残率。近年来KP感染率显著提高^[10]。本研究中fimH、mrkD、ureA、entB、ybtA基因均有不同程度的检出,clbA、wabG、uge基因未检出。

将患者根据检测毒力基因阳性的情况进行分组,性别、年龄、科室分布、住院时间、菌株来源等基础情况未见明显差异,但患者以中老年人为主要群

表3 按毒力基因检测阳性结果分组患者的临床特征比较

临床特征	mrkD+ureA	fimH+mrkD+ureA	mrkD+ureA+entB	mrkD+ureA+entB+ybtA	fimH+mrkD+ureA+entB	fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA
例数	1	1	2	4	14	28
年龄(岁)	91	1	65.5 ± 40.3	68.0 ± 12.9	65.0 ± 10.9	63.6 ± 19.4
ICU[n(%)]	0(0)	0(0)	1(50.00)	2(50.00)	4(28.57)	6(21.43)
恶性肿瘤[n(%)]	0(0)	0(0)	1(50.00)	0(0)	4(28.57)	3(10.71)
糖尿病[n(%)]	0(0)	0(0)	0(0)	1(50.00)	3(21.43)	5(17.86)
症状[n(%)]						
咳嗽、咳痰	1(100.00)	1(100.00)	1(50.00)	2(50.00)	12(85.71)	20(71.43)
胸闷、气短	1(100.00)	1(100.00)	0(0)	1(50.00)	8(57.14)	16(57.14)
发热	1(100.00)	1(100.00)	2(100.00)	2(50.00)	8(57.14)	15(53.57)
感染类型[n(%)]						
社区感染	1(100.00)	1(100.00)	0(0)	3(75.00)	7(50.00)	17(60.71)
院内感染	0(0)	0(0)	2(100.00)	1(25.00)	7(50.00)	11(39.29)
多重耐药菌	1(100.00)	0(0)	1(50.00)	1(25.00)	5(35.71)	12(42.86)
侵入性操作[n(%)]						
气管内插管	0(0)	0(0)	0(0)	1(25.00)	7(50.00)	9(32.14)
深静脉置管	0(0)	0(0)	1(50.00)	2(50.00)	6(42.86)	10(35.71)
尿管	0(0)	0(0)	1(50.00)	2(50.00)	6(42.86)	9(32.14)
胃管	0(0)	0(0)	2(100.00)	2(50.00)	8(57.14)	11(39.29)
病死率[n(%)]	0(0)	0(0)	1(50.00)	0(0)	5(35.71)	4(14.29)
PSI评分(分)	111	21	120.50 ± 75.66	113.00 ± 31.84	93.57 ± 31.56	89.39 ± 29.07
总住院时间(d)	12	10	25.50 ± 6.36	22.75 ± 28.24	30.36 ± 27.46	35.86 ± 44.75

表4 毒力基因种类与临床特征 [n(%)]

毒力基因种类	临床症状			病死率
	咳嗽、咳痰	胸闷、气短	发热	
2种(n=1)	1(100.00)	1(100.00)	1(100.00)	0(0)
3种(n=3)	2(66.67)	1(33.33)	3(100.00)	1(33.33)
4种(n=18)	14(77.78)	9(50.00)	10(55.56)	5(27.78)
5种(n=28)	20(71.43)	16(57.14)	15(53.57)	4(14.29)

体。34%菌株来自进行气管内插管的患者,符合既往研究机械通气是KP感染的高危因素的结论^[11-13]。26%菌株来自ICU,24%来自呼吸科,与相关文献报道ICU、呼吸科易检出KP^[14]的结果一致。fimH、mrkD、entB、ureA均高表达,阳性率>85%,提示这些基因可能是KP引起感染所必备的。咳嗽、咳痰

为最主要表现(74%),其次为发热(58%)、胸闷气短(54%)。

所检测的基因组合中,fimH+mrkD+ureA+entB、fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA组合患者出现咳嗽咳痰、胸闷气短症状的比例高于mrkD+ureA+entB、mrkD+ureA+entB+ybtA组合,且住院天数更长。fimH基因编码的FimH是I型菌毛尖端的黏附素,能与宿主细胞表面含甘露醇的糖蛋白特异性结合,使细菌黏附在气道上皮,通过TLR4/NF-κB途径诱导巨噬细胞分泌白细胞介素(IL)-1β、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)和IL-6,产生炎症刺激^[15-16],使患者受刺激后产生咳嗽,气道分泌更多痰液,具有fimH基因的菌株更易使患者出现咳嗽咳痰。

fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA 组合为本次研究最常见的组合,咳嗽、咳痰症状比例较高,病死率较低,PSI 评分均值为Ⅲ级。随着毒力基因种类的增多,其表达的各种毒力因子也增多,使得患者临床症状增多并且明显。但毒力基因的种类增加,并未引起病死率的增加,毒力基因之间可能会相互影响,毒力基因种类增多引起各基因表达下降,导致其相应的毒力因子表达下降,病死率下降。既往研究发现免疫抑制状态的患者更易感染经典型肺炎克雷伯菌(cKP),免疫功能正常的患者更易感染 hvKP^[11]。随着毒力基因种类增多,各组检出例数增加,患有肿瘤及糖尿病的比例却降低了;毒力基因种类较少的菌株更易感染肿瘤及糖尿病患者,病死率更高。毒力基因种类的数目、相互作用及其与 hvKP 的产生之间的关系仍待进一步探讨。

具有较少种类毒力基因的组合患者常出现发热,本研究中检出率在95%以上的 mrkD、ureA、entB 基因在这一过程中也许具有较重要作用,特别是 entB 基因。铁离子对细菌和宿主都是至关重要的,当宿主处于炎症反应中时,患者吸收铁能力减弱,因此通过铁调素减少细胞内的铁离子外流,使得患者体内的铁稳态出现异常,引起贫血并且免疫力减弱^[16]。entB 作为铁载体肠杆菌素相关基因,能够帮助菌株竞争性结合血清中的游离铁,增强菌株毒性。同时,铁代谢与炎症反应的关系较为复杂,但近年来的研究发现,调节全身铁稳态重要因子的铁调素对于炎症的反应极为剧烈,而强烈的炎症反应常引起发热。

mrkD+ureA+entB、mrkD+ureA+entB+ybtA 组合患者 PSI 评分均值都达到Ⅳ级,入住 ICU 比例最高。mrkD+ureA+entB 组合在各组合中病死率最高(50%),以发热为共有特征,有侵入性操作史。mrkD+ureA+entB+ybtA 组合出现咳嗽咳痰、胸闷气短、发热等症状的比例较低,病死率为0%。mrkD+ureA+entB 组合均为医院获得性感染,mrkD+ureA+entB+ybtA 组合增加了 ybtA 基因,以社区获得性感染为主。相似的是, fimH+mrkD+ureA+entB 组合与 fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA 组合相比,后者毒力基因多了 ybtA,社区感染比例更高。由此可知, ybt 基因可能与社区获得性肺炎相关。

以往认为细菌会为了获得耐药基因而丢弃一些毒力基因^[17],以获得更好的适应性,但是本次研究中检测出带有3种、4种、5种毒力基因的菌株其多重耐药比例分别为33.33%、33.33%、42.86%,随着

毒力基因数目的增加,多重耐药比例也呈上升趋势。这提示所选取菌株中很可能存在高毒力高耐药的“超级细菌”。死亡患者感染菌株检出的毒力基因组合分别为 mrkD+ureA+entB、fimH+mrkD+ureA+entB、fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA,临床需对带有这些毒力基因组合的菌株提高警惕。

综上所述, KP 容易引起老年群体的肺部感染,特别是合并肿瘤或糖尿病的群体,当这些易患人群感染带有毒力基因并多重耐药的菌株,抗感染治疗变得困难,可导致呼吸衰竭、全身多脏器衰竭等严重并发症,即使采取呼吸机辅助呼吸,但患者的基础肺功能差,最后有可能脱机困难,总体预后欠佳。在本研究中患者总体病死率达20%,1例罹患肺间质纤维化而行右肺移植术后患者,所感染的 KP 分离株检出基因为 fimH+mrkD+ureA+entB+ybtA,且药敏结果为多重耐药菌,予以气管内插管,反复调整抗感染治疗方案,最终在住院111 d后好转出院。因此,携带多种毒力基因的多重耐药 KP 引起的感染对患者和医院都提出了很大挑战,建议临床科室尤其是 ICU、呼吸科注重病原学检测及耐药机制的研究,密切关注患者病原菌感染情况,并加强院感监控。对于重症肺炎患者,感染、凝血及免疫功能相关指标均与病情和预后密切相关,需及早进行监测,帮助改善患者预后^[18]。本研究在国内首次就肺炎克雷伯菌肺炎患者分离株进行了 fimH、mrkD、wabG、uge、ureA、entB、ybtA、clbA 等8种毒力基因检测,且对其分布及临床特征的相关性进行分析,为国内同行提供了基础数据作为参考。由于本研究的样本量较小,此次研究中 wabG、uge、clbA 基因均未检出,且 mrkD+ureA、fimH+mrkD+ureA 组合毒力基因检测阳性的人数偏少,关于毒力基因与临床症状的进一步对应关系仍需要进行更多的研究。

[参考文献]

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2019年CHINET三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2020,20(3): 233-243
- [2] 郑永贵,胡付品,朱德妹,等. 2019年CHINET细菌耐药监测网二级医院监测结果[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020,20(6):585-593
- [3] 魏泽庆,陈亚岗,俞云松,等. 多重耐药肺炎克雷伯菌分子流行病学及β内酰胺酶基因型研究[J]. 中华检验医学杂志,2002,25(6):329-332
- [4] 范厚臻,孙运芳. 临沂地区高毒力肺炎克雷伯菌分型及其耐药表型检测的研究[J]. 重庆医学,2019,48(10):

- 1774-1776,1780
- [5] ZHANG R, LIN D, CHAN E W, et al. Emergence of carbapenem - resistant serotype K1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(1): 709-711
- [6] 管亚飞,郭丽敏,缪晓林,等.碳青霉烯类抗菌药物联合头孢哌酮钠舒巴坦钠治疗新生儿CRKP感染的临床效果分析[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2020, 40(6): 933-936
- [7] MARTIN R M, BACHMAN M. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 4
- [8] CHEW K L, LIN R T, TEO J W. *Klebsiella pneumoniae* in Singapore: hypervirulent infections and the carbapenemase threat [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 515
- [9] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence - associated determinants, and resistance mechanisms [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 483
- [10] 曹敬荣,王欣蕊,陈典典,等.致多部位感染肺炎克雷伯菌的毒力分析[J].*国际检验医学杂志*, 2019, 40(24): 2958-2961, 2965
- [11] 李家扬.高毒力肺炎克雷伯菌血流感染的危险因素、临床预后以及分子流行病学研究[D].南京:南京大学, 2018
- [12] 曹敬荣,翁晓璇,陈典典,等.高黏液表型多重耐药肺炎克雷伯菌的临床分布及感染的危险因素分析[J].*国际检验医学杂志*, 2020, 41(18): 2181-2185
- [13] 陈蕾,田俊华,贾磊,等.重症监护室内医院获得性耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌肺炎的危险因素分析[J].*国际流行病学传染病学杂志*, 2020, 47(3): 231-234
- [14] 程科萍,孔庆芳,王长娴,等.2017—2018年分离肺炎克雷伯菌的临床分布与耐药性分析[J].*中华医院感染学杂志*, 2019, 29(20): 3068-3072
- [15] KRAMMER E M, DE R J, ROOS G, et al. Targeting dynamical binding processes in the design of non-antibiotic anti - adhesives by molecular simulation - the example of FimH [J]. *Molecules*, 2018, 23(7): 1641
- [16] 李焱剑,高鑫迪,孟杨,等.铜、铁离子代谢调节隐球菌致病力及宿主免疫的研究进展[J].*菌物学报*, 2018, 37(10): 1337-1348
- [17] MONTANARI S, OLIVER A, SALERNO P, et al. Biological cost of hypermutation in *Pseudomonas aeruginosa* strains from patients with cystic fibrosis [J]. *Microbiology*, 2007, 153(Pt 5): 1445-1454
- [18] 张黎蕾,夏永泉,王贤,等.重症肺炎患者炎症指标、免疫功能及凝血功能变化对预后的影响[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*, 2021, 41(2): 234-237
- [收稿日期] 2020-11-02