

### 【临床研究】

阴性条件致病菌,可造成院内感染和社区获得性感染,免疫力低下和大量使用抗生素的患者对肺炎克雷伯菌易感<sup>[1]</sup>。随着抗菌药物广泛使用,肺炎克雷伯菌的耐药性逐年增高,甚至出现一些多重耐药菌和泛耐药菌株<sup>[2-3]</sup>,给临床治疗带来了巨大的挑战。肺炎克雷伯菌的致病性是由于其携带各种毒力因

子,这些毒力因子可表达为各种毒力表型,如荚膜 (capsule, CPS)、高黏液性 (hypermucoviscous, HMV)、脂多糖、黏附素、铁获取系统和生物膜 (biofilm, BF) 形成能力等。研究表明,携带有不同毒力因子的肺炎克雷伯菌的致病能力不同,引起的临床感染类型也不同<sup>[4]</sup>。国内外的一些研究已经针对对医院不同科室感染的肺炎克雷伯菌的耐药性进行报道<sup>[5-6]</sup>,对不同标本来源的肺炎克雷伯菌的分子特性进行研究<sup>[7-8]</sup>。然而,目前对于骨科患者创面感染的肺炎克雷伯菌的研究报道较少。因此,本研究对从郑州市第七人民医院骨科创面感染患者分离的肺炎克雷伯菌进行耐药性和毒力特性研究,以期了解骨科患者创面感染的肺炎克雷伯菌的分子特性和致病性,为防控此类细菌感染的传播、流行提供依据。

# 1 资料与方法

**1.1 菌株** 收集从 2017 年 2 月至 2019 年 10 月于郑州市第七人民医院骨科住院的创面感染患者分离的 32 株肺炎克雷伯菌,收集菌株时剔除同一患者相同部位分离的重复菌株,32 株肺炎克雷伯菌均经形态染色、生化试验初步鉴定,应用 Vitek-AMS 60 全自动细菌鉴定系统(法国梅里埃生物公司)进行菌种鉴定后进入后续试验。大肠杆菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603、肺炎克雷伯菌 ATCC27853 质控菌株购自卫生部临床检验中心。

**1.2 试剂与仪器** 营养肉汤干粉、哥伦比亚血琼脂购自青岛海博生物技术有限公司,结晶紫购自美国 Sigma 公司,无水乙醇购自天津科密欧试剂有限公司,聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) mixture、DNA Marker 购自宝生物工程(大连)有限公司;生物安全柜购自青岛海尔股份有限公司,隔水式恒温培养箱购自上海跃进医疗器械有限公司,DR100 型比浊仪购自法国梅里埃公司,自动立式压力蒸汽灭菌器购自上海博迅医疗生物仪器股份有限公司,PCR 仪、凝胶电泳成像仪购自美国 Bio-Rad 公司。

# 1.3 试验方法

**1.3.1 药物敏感性试验** 根据临床实验室标准化协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) 推荐的肉汤稀释法<sup>[9]</sup>测定 32 株肺炎克雷伯菌对 13 种常用抗菌药物的敏感性,包括氨苄西林 (ampicillin, AMP)、头孢哌酮 (cefoperazone, CFP)、头孢曲松 (ceftriaxone, CRO)、头孢他啶 (ceftazidime, CAZ)、亚胺培南 (imipenem, IPM)、复方磺胺甲噁唑 (sulfamethoxazole, SXT)、环丙沙星 (ciprofloxacin, CIP)、左氧氟沙星 (levofloxacin, LEV)、庆大霉素 (gentamicin, GEN)、阿米卡星 (amikacin, AMK)、加

替沙星 (gatifloxacin, GAT)、四环素 (tetracyclines, TET)、呋喃妥因 (nitrofurantoin, NIT)。具体方法:将 13 种抗菌药物以灭菌的肉汤培养基倍比稀释成不同的浓度,取 100  $\mu\text{L}$  依次加入 96 孔细胞培养板,再将 0.5 麦氏标准菌悬液按 1:10 稀释后每孔加入 5  $\mu\text{L}$ ,室孔内菌液的最终浓度为  $5 \times 10^8 \text{ CFU} \cdot \text{L}^{-1}$ ,将 96 孔板密封,于 37  $^{\circ}\text{C}$  下培养 20 h,观察孔中液体的浊度变化,无细菌生长的最小药物浓度即为该药物的最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentration, MIC)。药物敏感性试验结果根据 CLSI 2018 年版的标准判断结果<sup>[9]</sup>,如果 MIC 值达到以下标准时即判断为耐药:  $\text{AMP} \geq 32 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CFP} \geq 64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CRO} \geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CAZ} \geq 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{IPM} \geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{SXT} \geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{CIP} \geq 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{LEV} \geq 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{GEN} \geq 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{AMK} \geq 64 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{GAT} \geq 8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{TET} \geq 16 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{NIT} \geq 128 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,对 3 种以上药物产生耐药即可认为多重耐药。

**1.3.2 菌株毒力表型的测定** (1) CPS 和黏液表型检测。采用常规 Hiss 荚膜染色法<sup>[10]</sup>检测肺炎克雷伯菌是否形成 CPS:按照常规方法进行细菌涂片后,在涂片区滴加结晶紫染液 1 滴,于火焰上加温染色 30 s,勿使染液沸腾,然后用硫酸铜溶液冲洗染液,自然干燥后进行镜检,菌体呈紫色,荚膜呈淡紫色。采用“拉丝试验”<sup>[11]</sup>检查菌株黏液表型:将肺炎克雷伯菌转接至哥伦比亚血平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  培养过夜,用接种环蘸取菌落,将接种环向上提起,若形成的黏丝长度大于 0.5 cm 则判定为阳性,反之则为阴性。拉丝试验阳性的菌株为 HMV 表型菌株。(2) BF 形成能力测定。参考文献[12]采用 96 孔板结晶紫染色法测定肺炎克雷伯菌 BF 形成能力,具体操作步骤为:将在血平板上活化的单菌落接种于 LB 培养基中,35  $^{\circ}\text{C}$ 、120  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  摇床培养 18~20 h,将获得的菌液用 LB 培养基调至 0.5 麦氏浊度,按 1:20 的比例稀释后加入 96 孔培养板中。35  $^{\circ}\text{C}$  恒温静置培养 6 h。弃去上层浮游菌,加入 200  $\mu\text{L}$  结晶紫染液,震荡混匀,染色 15 min,弃去染液,用无菌水冲掉染液。然后每孔各加 200  $\mu\text{L}$  无水乙醇,使 BF 均匀悬浮于无水乙醇中,应用酶标仪测定波长 590 nm 处吸光度值。参考文献[12]标准并结合实验过程中 BF 染色结果,将吸光度值  $\geq 0.200$  确定为 BF 形成。根据毒力表型将肺炎克雷伯菌分为 4 种毒力类型,分别是毒力 1 型 (virulence phenotype 1, VP1):能形成 BF 的 HMV 型;毒力 2 型 (virulence phenotype 2, VP2):能形成 BF 型;毒力 3 型 (virulence phenotype 3, VP3):HMV 型;毒力 4 型 (virulence phenotype 4, VP4):不能形成 BF 的非 HMV 型<sup>[12]</sup>。

**1.3.3 耐药基因及毒力基因的检测** 采用煮沸法<sup>[13]</sup>提取 32 株待测菌的基因组 DNA,并以此为模版用 PCR 法扩增耐药基因和毒力基因,PCR 反应体系 25  $\mu$ L,包括 10  $\times$  PCR Buffer 2.5  $\mu$ L,  $Mg^{2+}$  溶液 1.5  $\mu$ L, dNTP Mixture 2.5  $\mu$ L, 上、下游引物 (10  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)各 0.5  $\mu$ L, rTaq 酶 (5  $\times$  10<sup>6</sup> U  $\cdot$  L<sup>-1</sup>) 0.1  $\mu$ L, 无菌水 15.4  $\mu$ L, DNA 模板 2.0  $\mu$ L; PCR 扩增条件为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 25 个循环, 最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。耐药基因包括编码超广谱  $\beta$  内酰胺 (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase, ESBLs) 酶的基因 (blaCTX-M、blaTEM、blaSHV)、碳青霉烯酶基因 (blaKPC、blaNDM、blaOXA-48)、喹诺酮类耐药基因 (qnrA、qnrB、gyrA); 毒力基因包括编码荚膜多糖基因 (magA)、黏附素基因 (fimH-1、markD)、肠毒素基因 (entB)、黏液表型相关基因 (rmpA)、铁载体蛋白基因 (iroNB)。blaCTX-M 上游引物: 5'-AAAAATCACTGCGTCAGTTTCAC-3', 下游引物: 5'-AAAAATCACTGCGTCAGTTTCAC-3', 长度 867 bp; blaTEM 上游引物: 5'-CAGAAACGCTGGTGAAAG-3', 下游引物: 5'-AACTACGATACGGGAGGG-3, 长度 1 183 bp; blaSHV 上游引物: 5'-GGTTATGCGTTATATTCGCC-3', 下游引物: 5'-TTAGCGTTGCCAGTGCTC-3', 长度 865 bp; blaKPC 上游引物: 5'-GCTACACCTAGCTCACCTTC-3', 下游引物: 5'-CTCCCTAACCCGCACTTG-3', 长度 912 bp; blaNDM 上游引物: 5'-GGTTTGCGCATCTGTTTTTC-3', 下游引物: 5'-CGGAATGGCTCACGATC-3', 长度 621 bp; blaOXA-48 上游引物: 5'-TTGGTGGCATCGATTATCGG-3', 下游引物: 5'-GAGCACTTCTTTTGTGATGGC-3', 长度 744 bp; qnrA 上游引物: 5'-TTCAGCAAGAGGATTTCTCA-3', 下游引物: 5'-GGCAGC ACTATTACTCCCAA-3', 长度 641 bp; qnrB 上游引物: 5'-CCTGAGCGGCACTGAATTTAT-3', 下游引物: 5'-GTTTGCTGCTCGC-

CAGTCGA-3', 长度 409 bp; gyrA 上游引物: 5'-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3', 下游引物: 5'-AAATCTGCCCCGTGTCGTTGGT-3', 长度 744 bp; magA 上游引物: 5'-GGTG CTCTTTACATCATTGC-3', 下游引物: 5'-GCAATGGCCATTTGCGTTAG-3', 长度 1 283 bp; entB 上游引物: 5'-ATTTCTCAACTTCTGGGGC-3', 下游引物: 5'- AGCATCGGTGGCGGTGGTCA-3', 长度 371 bp; rmpA 上游引物: 5'-ACTGGGCTACCTCTGCTTCA-3', 下游引物: 5'-CTTGCATGAGCCATCTTTCA-3', 长度 516 bp; iroNB 上游引物: 5'-GGC-TACTGATACTTGACTATTTC-3', 下游引物: 5'-CAG-GATACAATAGCCCATAG-3', 长度 992 bp; fimH-1 上游引物: 5'-GCTCTGGCCGATACCACCACGG-3', 下游引物: 5'-GCCAAGTAACGCGCCTGGAACGG-3', 长度 423 bp; markD 上游引物: 5'-CGGTAAAGTTACCGACGTATCTTGTA CTG-3', 下游引物: 5'-GCTGTTA-ACCACACCGGTGGTAAC-3', 长度 498 bp。引物由生工生物(上海)股份有限公司合成。

2 结果

**2.1 32 株肺炎克雷伯菌药物敏感性试验结果** 结果见表 1。AMP 的 MIC  $\geq$  32.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 有 26 株, CFP、AMK 的 MIC  $\geq$  64.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 分别有 20 株和 8 株, CRO、IPM、CIP、SXT 的 MIC  $\geq$  4.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 分别有 24 株、2 株、19 株和 14 株, CAZ、GEN 和 TET 的 MIC  $\geq$  16.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 分别有 16 株、11 株和 11 株; LEV 和 GAT 耐药折点是 8.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup>, 分别有 12 株和 3 株; NIT 的 MIC  $\geq$  128.00 mg  $\cdot$  L<sup>-1</sup> 有 7 株。32 株肺炎克雷伯菌对 13 种药物的耐药率为 6.25% ~ 81.25%, 其中对 AMP 的耐药率最高, 为 81.25%; 其次是 CRO 和 CFP, 分别为 75.00% 和 62.50%; 在喹诺酮类药物中, 对 CIP 的耐药率最高, 为 59.38%, 对第 4 代喹诺酮类耐药率最低为 9.38%, 仅有 2 株 (6.25%) 对 IPM 产生耐药。

表 1 32 株肺炎克雷伯菌对 13 种抗菌药物的 MIC 值  
Tab.1 MIC value of 32 strains of *Klebsiella pneumoniae* against 13 antimicrobials

抗菌药物	MIC/(mg $\cdot$ L <sup>-1</sup> )											耐药率/%
	$\leq$ 0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00	32.00	64.00	128.00	$\geq$ 256.00	
AMP	0	0	0	1	3	2	0	20	3	3	0	81.25 (26/32)
CFP	0	0	0	0	0	1	11	0	17	3	0	62.50 (20/32)
CRO	0	1	7	0	11	9	3	1	0	0	0	75.00 (24/32)
CAZ	0	0	0	5	11	0	10	2	3	1	0	50.00 (16/32)
IPM	1	8	19	2	2	0	0	0	0	0	0	6.25 (2/32)
SXT	0	1	4	13	8	2	4	0	0	0	0	43.75 (14/32)
CIP	0	1	11	1	10	9	0	0	0	0	0	59.38 (19/32)
LEV	0	0	7	12	1	8	4	0	0	0	0	37.50 (12/32)
GEN	0	0	2	8	11	0	8	2	1	0	0	34.38 (11/32)
AMK	0	0	0	0	3	11	8	2	6	2	0	25.00 (8/32)
GAT	0	0	4	19	6	2	1	0	0	0	0	9.38 (3/32)
TET	0	0	1	4	13	3	8	3	0	0	0	34.38 (11/32)
NIT	0	0	0	0	0	2	6	12	5	6	1	21.88 (7/32)

2.2 32 株肺炎克雷伯菌的毒力表型及毒力基因

32 株肺炎克雷伯菌均能形成 CPS, 其中 21 株 (65.63%) 能形成 BF, 12 株 (37.50%) 产生 HMV。32 株肺炎克雷伯菌均携带有编码 I 型菌毛的 fimH-1 基因, 31 株 (96.88%) 携带有编码肠毒素基因 entB, 30 株 (93.75%) 携带有编码 III 型菌毛基因 markD, 7 株 (21.88%) 携带有编码黏蛋白调控基因 rmpA, 6 株 (18.75%) 携带有 iroNB 基因, 3 株 (9.38%) 携带有 magA 基因。

2.3 毒力表型及耐药性、耐药基因的相关性 结果见表 2。32 株肺炎克雷伯菌中, 9 株 (28.13%) 属于表 2 32 株肺炎克雷伯菌的毒力类型及耐药性分布

Tab. 2 Virulence type and drug-resistance phenotype of 32 *Klebsiella pneumoniae*

毒力类型	n	耐药性		耐药基因	
		抗菌药物	菌株数	基因名称	菌株数
VP1	9	AMP、CFP、CRO、CAZ-SXT、CIP、LEV、GEN、AMK、TET	1	blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、gyrA、qnrA	1
		AMP、CFP、CRO、CAZ、SXT、IPM、AMK	1	blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、gyrA	1
		AMP、CFP、CRO、SXT、CIP、GEN、IMP、AMK、GAT、TET	1	blaTEM、blaSHV、blaKPC、blaOXA-48、qnrA、gyrA	1
		AMP、CFP、CRO、CAZ、SXT、GEN、AMK、GAT	1	blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、gyrA、	1
		AMP、CRO、CAZ、LEV、GEN、TET、NIT	1	blaSHV、blaKPC、gyrA、qnrA	1
		AMP、CFP、CRO、CIP、TET	2	blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、qnrA	2
		CFP、CRO、CAZ、CIP、LEV、AMK	1	blaSHV、blaKPC、gyrA、qnrA	1
		AMP、CFP、CAZ、SXT、CIP、LEV、GEN、TET	1	blaCTX-M、blaKPC、qnrA、gyrA	1
VP2	12	AMP、CFP、CRO、CAZ、SXT	4	blaCTX-M、blaKPC、gyrA	2
				blaCTX-M、blaKPC	2
		AMP、CFP、CRO、CAZ、CIP	3	blaKPC、qnrA、gyrA	3
		AMP、CFP、CRO、SXT、LEV、GEN、AMK、TET、NIT	2	blaCTX-M、blaKPC、qnrA、gyrA	1
				blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、qnrA、gyrA	1
		CIP、LEV	2	qnrA、gyrA	2
VP3	3	CIP、LEV	1	qnrA、gyrA	1
		AMP、CFP、CRO、CAZ、SXT、TET	1	blaCTX-M、blaTEM、blaKPC	1
		AMP、CFP、CRO、GEN、AMK、TET	1	blaSHV、blaKPC	1
VP4	8	CFP、CRO、CAZ、SXT、GAT、NIT	1	blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、qnrA	1
		AMP、CIP	2	blaCTX-M、qnrA	1
		AMP、CFP、CRO、CIP、NIT	2	blaCTX-M、blaKPC、qnrA、gyrA	2
		AMP、CRO、SXT、CIP、LEV、GEN	1	blaCTX-M、blaSHV、qnrA、gyrA	1
		SXT、CIP、LEV、GEN、NIT	1	blaTEM、blaKPC、qnrA、gyrA	1
		AMP、CFP、CRO、CAZ、CIP、LEV、GEN、TET	1	blaTEM、blaOXA-48、qnrA	1
		AMP	1	blaCTX-M	1

3 讨论

近年来,从临床患者分离的肺炎克雷伯菌数呈增高趋势,感染的标本来源科室以重症监护室为最多,其次是呼吸科和血液科<sup>[14]</sup>。目前,对骨科患者分离的肺炎克雷伯菌的耐药性的研究报道较少且结果不尽相同。王学志等<sup>[15]</sup>对 224 例骨科伤口感染病原进行分析,结果发现,肺炎克雷伯菌对 AMP 的耐药率最高;游明园等<sup>[16]</sup>研究报道,骨科患者分离的肺炎克雷伯菌对部分头孢类抗菌药物耐药率超过 90%。本研究 32 株肺炎克雷伯菌对 AMP 的耐药率最高,达到 81.25%;对其他头孢类抗生素的耐药率

VP1 型,均为多重耐药,对 AMP、CFP、CRO、CAZ、AMK 等耐药,携带的耐药基因主要有 blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、gyrA、qnrA 基因,其中 1 株为 blaOXA-48 型;VP2 型有 12 株(占 37.50%),其中多重耐药菌有 9 株 (82.33%),携带的耐药基因主要为 blaCTX-M、blaKPC、gyrA,3 株携带 qnrA、gyrA 基因的菌株仅对 CIP、LEV 耐药;8 株 VP4 菌株中 5 株为多重耐药菌,携带的耐药基因为 blaCTX-M、blaTEM、blaKPC、qnrA、gyrA,其中 1 株为 blaOXA-48。32 株肺炎克雷伯菌中,75.0% (24/32)携带 blaKPC 基因,均为多重耐药。

也均超过 50.00%。本研究结果与王学志等<sup>[15]</sup>和游明园等<sup>[16]</sup>研究结果相似,说明从骨科患者分离的肺炎克雷伯菌对头孢类抗生素的耐药率较高。但张令博等<sup>[17]</sup>研究报道,骨科患者分离的肺炎克雷伯菌对头孢类抗生素的耐药率低于 10%,这与本研究不一致。这种肺炎克雷伯菌对头孢类抗生素耐药率不同的原因可能是不同地区流行的肺炎克雷伯菌的分子特性不同,也可能与本地区医院使用抗生素习惯有关。

肺炎克雷伯菌主要致病因子包括 CPS、产生黏液性、形成 BF 等,研究表明,编码这些毒力特性的毒力因子种类很多,包括 Khe、magA、wzy、rmpA、

allS、kfuBC、ybtA、iucB、iroNB、fimH-1、ureA、uge、wabG 及 markA 等<sup>[8]</sup>。目前,针对骨科患者分离的肺炎克雷伯菌的分子特性尤其是毒力类型的研究尚未见报道。因此,本研究选择 6 种毒力基因进行扩增,结果表明,fimH-1 和 markD 基因的携带率分别为 100.00% 和 93.75%。fimH-1 和 markD 基因主要编码 I 型菌门和 III 型菌毛,I 型菌毛利用其顶端的黏附素结合到宿主上皮细胞的糖蛋白上,介导细菌侵入到细胞内;III 型菌毛能牢固地黏附于机体黏膜上皮细胞,从而促使 BF 的形成。entB 编码肠毒素,肠毒素可与血浆载体蛋白中的铁结合,促进细菌生长,当 entB 基因表达上调时,能使细菌内环境铁元素增加,从而促进 BF 的形成<sup>[18]</sup>。本研究 32 株肺炎克雷伯菌 entB 基因的携带率为 96.88%,这与 WALKER 等<sup>[19]</sup>研究报道一致。一般认为 HMV 菌株为高毒力菌株,在本研究中,12 株(37.5%)表现为 HMV 表型,而表达黏液表型的基因 rmpA 和 magA 的携带率分别为 21.88% 和 9.38%,说明 HMV 表型肺炎克雷伯菌可同时携带 rmpA 和 magA 基因。YANG 等<sup>[20]</sup>对不同来源的肺炎克雷伯菌分子特性研究发现,携带有 magA、rmpA 毒力基因的菌株表型不一定表现出高黏液特征。推测可能还有其他因素参与了肺炎克雷伯菌 HMV 表型的形成,这有待进一步研究。

本研究结果还显示,9 株 VP1 型肺炎克雷伯菌均为多重耐药菌,且大部分对 AMP、CFP、CAZ、AMK 耐药;VP2 型肺炎克雷伯菌的多重耐药率为 83.33%。推测这种高多重耐药率可能与细菌 BF 形成能力有关。有研究显示,BF 可通过物理屏障阻止药物作用于 BF 内的肺炎克雷伯菌,从而提高肺炎克雷伯菌的耐药性<sup>[21]</sup>,这可能也是导致临床上肺炎克雷伯菌感染率升高的原因之一。研究表明,超广谱  $\beta$ -内酰胺酶是肺炎克雷伯菌对  $\beta$ -内酰胺类抗菌药物耐药的重要机制,产 ESBLs 菌株多呈多重耐药<sup>[22]</sup>,而此多重耐药是由质粒携带的多种耐药基因介导。本研究 32 株肺炎克雷伯菌携带的耐药基因主要为 blaCTX-M、blaSHV、blaKPC、gyrA、qnrA,表明本院流行的产 ESBLs 菌株多为 CTX-M 型。碳青霉烯类药物被认为是人类抗感染性治疗的最后一道防线,然而关于耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染的报道逐渐增多,尤其产碳青霉烯酶(*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, KPC)被认为是目前引起肺炎克雷伯菌对碳青霉烯类抗菌药物耐药的主要原因<sup>[23]</sup>。本研究结果显示,75.0% 的菌株携带有 blaKPC 基因,且这些菌株均为多重耐药菌;这与 BASSETTI 等<sup>[24]</sup>研究结果一致。喹诺酮类药物主要作用于 DNA 旋转酶和拓扑异构酶 IV,这 2 种酶对细菌的生长和增殖起关键作用。研究表明,肺炎克雷伯菌 gyrA 基因突变可导致酶的结构和构象发生变化,阻止 DNA 的

复制、转录及其他功能,从而引起耐药<sup>[25]</sup>。此外,qnrA 阳性细菌在经过氟喹诺酮药物治疗后可促进细菌体内染色体介导的喹诺酮耐药基因发生突变<sup>[26]</sup>。本研究 32 株肺炎克雷伯菌中普遍存在 gyrA、qnrA 基因,而这 2 个基因极易发生突变;因此,推测肺炎克雷伯菌对喹诺酮耐药的主要机制是由基因突变引起,但还有待进一步进行研究。

综上所述,从本院骨科创面感染患者分离的肺炎克雷伯菌对多种抗菌药物的耐药率较高,其中对 AMP、头孢菌素的耐药率最高;HMV 且能形成 BF 的肺炎克雷伯菌均为多重耐药菌;携带不同耐药基因的肺炎克雷伯菌的耐药性不同。因此,在临床上治疗骨科患者创面感染的肺炎克雷伯菌应选择敏感药物。由于本研究的样本量有限,今后还需扩大样本量进行研究,以进一步确定本地区骨科患者创面感染的肺炎克雷伯菌的耐药性和毒力特性,并加强分子流行病学的监测,从而制定合理的用药措施来减少该类菌株的流行。

## 参考文献:

- [1] MARTIN R M, BACHMAN M A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 4.
- [2] CHOBY J E, HOWARD-ANDERSON J, WEISS D S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-clinical and molecular perspectives [J]. *J Intern Med*, 2020, 287 (3): 283-300.
- [3] VASILYEV I Y, NIKOLAEVA I V, SINIAGINA M N, et al. Multi-drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* found persisting silently in infant gut microbiota [J]. *Int J Microbiol*, 2020, 2020: 4054393.
- [4] WANG G, ZHAO G, CHAO X, et al. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17 (17): 6278.
- [5] 谢朝云,熊芸,蒙桂鸾,等. 2011-2018 年临床分离高黏液表型肺炎克雷伯菌临床分布与耐药率研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30 (1): 10-14.
- [6] MORADIGARAVAND D, MARTIN V, PEACOCK S J, et al. Evolution and epidemiology of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United Kingdom and Ireland [J]. *mBio*, 2017, 8 (1): e01976-16.
- [7] CANEIRAS C, LITO L, MAYORALAS-ALISES S, et al. Virulence and resistance determinants of *Klebsiella pneumoniae* isolated from a Portuguese tertiary university hospital centre over a 31-year period [J]. *Enferm Infect Microbiol Clin*, 2019, 37 (6): 387-393.
- [8] EL FERTAS-AISSANI R, MESSAI Y, ALOUACHE S, et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens [J]. *Pathol Biol (Paris)*, 2013, 61 (5): 209-216.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing [M]. 27<sup>th</sup> ed. CLSI supplement. M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018: 32-42.
- [10] BREAKWELL D P, MOYES R B, REYNOLDS J. Differential staining of bacteria: capsule stain [J]. *Curr Protoc Microbiol*, 2009, 15 (1): 1-4.

[11] SHON A S,BAIWA R P,RUSSO T A. Hypervirulent ( hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*; a new and dangerous breed [J]. *Virulence*,2013,4(2):107-118.

[12] SURGERS L,BOYD A,GIRARD P M,*et al.* Biofilm formation by ESBL-producing strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Int J Med Microbiol*,2019,309(1):13-18.

[13] ZHU K,JIN H,HE Z,*et al.* A continuous method for the large-scale extraction of plasmid DNA by modified boiling lysis[J]. *Nat Protoc*,2006,1(6):3088-3093.

[14] 田李均,王晓丽,肖淑珍,等. 医院内高黏液性肺炎克雷伯菌的流行分布、毒力基因及临床特征分析[J]. 上海交通大学学报(医学版),2017,37(1):43-48.

[15] 王学志,王金华,孙旭东,等. 骨科患者医院感染病原学和耐药性分析[J]. 中华医院感染学杂志,2019,29(14):2185-2188.

[16] 游明园,周小梅,廖小平,等. 骨科住院患者医院感染多重耐药菌分布及耐药性分析[J]. 中国消毒学杂志,2017,34(1):55-57.

[17] 张令博,袁英泽,何素瑞,等. 某骨科医院 2016 - 2017 年临床分离病原菌流行病学与耐药特征分析[J]. 中华医院感染学杂志,2018,28(22):115-118.

[18] WILLSEY G G,VENTRONE S,SCHUTZ K C,*et al.* Pulmonary surfactant promotes virulence gene expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Infect Immun*,2018,86(7):e00135-18.

[19] WALKER K A,MIILLER V L. The intersection of capsule gene expression, hypermucoviscosity and hypervirulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Curr Opin Microbiol*,2020,54:95-102.

[20] YANG F,DENG B,LIAO W,*et al.* High rate of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from human and animal origin[J]. *Infect Drug Resis*,2019,12:2729-2737

[21] RAHDAR H A,MALEKABAD E S,DADASHI A R,*et al.* Correlation between biofilm formation and carbapenem resistance among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Ethiop J Health Sci*,2019,29(6):745-750.

[22] MOYA B,BARCELO I M,CABOT G,*et al.* *In vitro* and *in vivo* activities of  $\beta$ -lactams in combination with the novel  $\beta$ -lactam enhancers Zidebactam and WCK 5153 against multidrug-resistant metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2019,63(5):e00128-19.

[23] NATH S,MOUSSAVI F,ABRAHAM D,*et al.* *In vitro* and *in vivo* activity of single and dual antimicrobial agents against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *J Antimicrob Chemother*,2018,73(2):431-436.

[24] BASSETTI M,GIACOBBE D R,GIAMARELLOU H,*et al.* Management of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections[J]. *Clin Microbiol Infect*,2018,24(2):133-144.

[25] POIREL L,PITOUT J D,CALVO L,*et al.* *In vivo* selection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid-mediated quinolone resistance and expanded-spectrum beta-lactamase[J]. *Antimicrob Agents Chemother*,2006,50(4):1525-1527.

[26] SZABO D,KOCISIS B,ROKUSZ L,*et al.* First detection of plasmid-mediated, quinolone resistance determinants qnrA, qnrB, qnrS and aac(6')-Ib-cr in extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae in Budapest, Hungary[J]. *J Antimicrob Chemother*,2008,62(3):630-632.

( 本文编辑:周二强 )

( 上接第 533 页 )

[2] ARONSOHN R S,WHITMORE H,VAN CAUTER E,*et al.* Impact of untreated obstructive sleep apnea on glucose control in type 2 diabetes[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2010,181(5):507-513.

[3] PEPPARD P E,YOUNG T,PALTA M,*et al.* Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension[J]. *N Engl J Med*,2000,342(19):1378-1384.

[4] JIA Q,LIU L,WANG Y. Risk factors and prevention of stroke in the Chinese population[J]. *Stroke Cerebrovasc Dis*,2011,20(5):395-400.

[5] PALACIO-LACAMBRA M E,COMAS-REIXACH I,BLANCO-GRAU A,*et al.* Comparison of the Cockcroft-Gault, MDRD and CKD-EPI equations for estimating ganciclovir clearance[J]. *Br J Clin Pharmacol*,2018,84(9):2120-2128.

[6] 侯凡凡,马志刚,梅长林,等. 中国五省市自治区慢性肾脏病患者心血管疾病的患病率调查[J]. 中华医学杂志,2005,85(7):458-463。

[7] DAMIANI M F,ZITO A,CARRATÙ P,*et al.* Obstructive sleep apnea,hypertension,and their additive effects on atherosclerosis[J]. *Biochem Res Int*,2015,2015:984193.

[8] PUNJABI N M. The epidemiology of adult obstructive sleep apnea [J]. *Proc Am Thorac Soc*,2008,5(2):136-143.

[9] MAHMOOD K,AKHTER N,ELDEIRAWI K,*et al.* Prevalence of type 2 diabetes in patients with obstructive sleep apnea in a multiethnic sample[J]. *J Clin Sleep Med*,2009,5(3):215-221.

[10] RICE T B,FOSTER G D,SANDERS M H. The relationship between obstructive sleep apnea and self-reported stroke or coronary heart disease in overweight and obese adults with type 2 diabetes mellitus[J]. *Sleep*,2012,35(9):1293-1298.

[11] SEICEAN S,STROHL K P,SEICEAN A,*et al.* Sleep disordered breathing as a risk of cardiac events in subjects with diabetes mellitus and normal exercise echocardiographic findings[J]. *Am J Cardiol*,2013,111(8):1214-1220.

[12] LAVIE L. Oxidative stress in obstructive sleep apnea and intermittent hypoxia--revisited--the bad ugly and good; implications to the heart and brain[J]. *Sleep Med Rev*,2015,20(1):27-45.

[13] SIWASARANOND N,NIMITPHONG H,MANODPITIPONG A,*et al.* The relationship between diabetes-related complications and obstructive sleep apnea in type 2 diabetes [J]. *J Diabetes Res*,2018,12(1):1-9.

[14] SCHULZ R,HUMMEL C,HEINEMANN S,*et al.* Serum levels of vascular endothelial growth factor are elevated in patients with obstructive sleep apnea and severe nighttime hypoxias[J]. *Am J Respir Crit Care Med*,2002,165(1):67-70.

[15] WYKOFF C C. Impact of intravitreal pharmacotherapies including antivascular endothelial growth factor and cortico-steroid agents on diabetic retinopathy [J]. *Curr Opin Ophthalmol*,2017,28(3):213-218.

[16] RÅNGEMARK C,HEDNER J A,CARLSON J T,*et al.* Platelet function and fibrinolytic activity in hypertensive and normotensive sleep apnea patients[J]. *Sleep*,1995,18(3):188-194.

( 本文编辑:孟 月 )