

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2019. 05. 003

肺炎克雷伯菌生物膜形成的相关因素研究^{*}

程国平,常永超,赵崇高,江 涛,孙真真

(河南科技大学第一附属医院,河南洛阳 471003)

摘 要:**目的** 探讨毒力荚膜血清型、常见毒力基因、耐药基因、碳青霉烯类耐药以及生物膜培养时间等因素与肺炎克雷伯菌生物膜形成的关系。**方法** 比较结晶紫染色定量检测法检测耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌组(CRKP 组)和肺炎克雷伯菌组(KPN 组)的吸光度值(A 值),并在生物膜培养的不同时间进行 A 值比较。PCR 扩增 6 种常见高毒力荚膜血清型基因(K2、K5、K16、K20、K54、K57)、5 种常见毒力基因[magA(K1)、rmpA、mrkD、wabG、allS]以及 8 种耐药基因(blaTEM、blaSHV、blaCTX-M、blaKPC、blaIMP、blaNDM、blaVIM、blaOXA-M)。**结果** 两组肺炎克雷伯菌菌株生物膜形成能力 A 值为 0.454~0.936,在培养 12 h 时,两组生物膜形成能力差异无统计学意义($P>0.05$)。在培养 18 h 时,CRKP 组形成生物膜的能力较 KPN 组强($P<0.05$)。比较培养 12 h 和 18 h 两个时间段生物膜的 A 值,CRKP 组培养 18 h 的生物膜形成能力较 12 h 更强($P<0.05$);KPN 组结果相同。24 份标本均未检出毒力荚膜血清型基因(K2、K5、K16、K20、K54、K57),5 种常见毒力基因[magA(K1)、rmpA、mrkD、allS、wabG]仅检出 1 例(4%)。耐药基因 blaTEM 占 54%、blaSHV 占 42%、blaKPC 占 46%、blaIMP 占 4%。**结论** 培养时间影响结晶紫染色法在临床观察生物膜形成试验中的结果,影响生物膜形成的其他因素以及深层次的原因有待进一步研究和更多实验结果的支持。

关键词:生物膜; 肺炎克雷伯菌; 毒力基因; 耐药基因; 结晶紫染色

中图分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2019)05-0585-04

Study on factors related to biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*^{*}

CHENG Guoping, CHANG Yongchao, ZHAO Chonggao, JIANG Tao, SUN Zhenzhen

(First Affiliated Hospital, Henan University of Science and Technology,
Luoyang, Henan 471003, China)

Abstract: Objective To investigate the relationship between the capsular serotype, common virulence genes, drug resistance genes, carbapenem resistance and biofilm culture time with the biofilm formation of *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** The results of optical density (A) detected by the crystal violet staining quantitative method were compared between the carbapenem resistance *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) group and control group, the A value comparison was conducted at different times of biofilm culture. The six highly virulent capsule serotype genes (K2, K5, K16, K20, K54, K57) were amplified by PCR. At the same time, the five virulence genes: magA (K1), rmpA, mrkD, wabG, allS, and the eight drug-resistant genes (blaTEM, blaSHV, blaCTX-M, blaKPC, blaIMP, blaNDM, blaVIM, blaOXA-M) were amplified too. **Results** The A value range of biofilm formation capacity in the two groups of *Klebsiella pneumoniae* was 0.454—0.936, and there was no statistical difference in biofilm formation ability at 12 h between the two groups ($P>0.05$). The ability of biofilm formation at 18 h culture in the CRKP group was stronger than that in the KPN group ($P<0.05$). Comparing the A values of biofilm culture between 12 h and 18 h, the biofilm formation ability of the CRKP group at 18 h was stronger than that at 12 h ($P<0.05$). The results of the control group were the same as that of the CRKP group. The capsule serotype genes (K2, K5, K16, K20, K54, K57) were not detected out in 24 samples, and among the five type of common virulence genes [magA(K1), rmpA, mrkD, allS, wabG], only 1 case(4%) was detected out. The drug resistance gene blaTEM accounted for 54%, blaSHV 42%, blaKPC 46% and blaIMP 4%. **Conclusion** The culture time affects the results of biofilm formation experiment in clinical observation by crystal violet staining and other aspects of affecting biofilm formation as well as the underlying reasons need to be further studied and supported by more experimental results.

Key words: biofilm; *Klebsiella pneumoniae*; virulence gene; drug resistance gene; crystal violet

^{*} 基金项目:河南省中医药科学研究专项课题(2017ZY1005)。

作者简介:程国平,女,主治医师,主要从事临床微生物检验与感染性疾病方面研究。

staining

肺炎克雷伯菌(KPN)是临床患者分离的最常见的致病菌之一。它具有极强的生物膜形成能力,能够在塑料表面或覆盖有人类细胞外基质和宿主衍生蛋白的表面形成生物膜,从而定植于生物或非生物体表面^[1]。生物膜的形成使得其引起的感染呈现静止期与急性发作期交替,易复发、难根治^[2]。近些年,耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌(CRKP)在全球广泛流行。本文对 CRKP 组和 KPN 组分别采用结晶紫染色定量检测法进行检测,对比感染患者分离的致病菌 CRKP 与健康体检者体内定植的肺炎克雷伯菌(自患者大便中分离的)在生物膜形成能力方面的差异,以及不同的培养时间对两组肺炎克雷伯菌生物膜形成能力的影响。同时对生物膜形成相关表型(超黏表型)检测,并对 6 种常见高毒力荚膜血清型基因(K2、K5、K16、K20、K54、K57)、5 种常见毒力基因[magA(K1)、rmpA、mrkD、wabG、allS]以及 8 种耐药基因(blaTEM、blaSHV、blaCTX-M、blaKPC、blaIMP、blaNDM、blaVIM、blaOXA-M)进行检测,了解这些因素与肺炎克雷伯菌生物膜形成的关系。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2018 年 1—5 月本院住院患者分离的 CRKP(主要分离自痰液,CRKP 组)以及健康体检者大便分离到的肺炎克雷伯菌(KPN 组)。CRKP 组入选条件为对碳青霉烯类抗生素耐药的肺炎克雷伯菌,KPN 组入选条件为对碳青霉烯类抗生素敏感的肺炎克雷伯菌。CRKP 组标本编号 CRKP1~CRKP12,KPN 组标本编号 KPN1~KPN12。

1.2 仪器与试剂 全自动细菌鉴定仪 VITEK 2 Compact(法国生物梅里埃公司);凝胶成像仪及型脉冲场凝胶电泳仪(美国 Bio-Rad 公司);PCR 扩增仪(ABI Applied 公司);引物合成公司为上海生工。96 孔细胞培养板(美国美国康宁公司);K-B 法药敏纸片均购自 Oxoid 公司;结晶紫染液(法国生物梅里埃公司),测序委托上海博尚生物技术有限公司进行。

1.3 方法

1.3.1 细菌鉴定和药物敏感(药敏)试验 所有菌株鉴定及药敏试验采用法国生物梅里埃公司 VITEK 2 Compact 鉴定。采用纸片扩散法(K-B 法)确认菌株药敏结果。药敏结果的判读按照美国临床和实验室标准协会(CLSI)推荐标准进行^[3]。

1.3.2 PCR 方法扩增基因 模板制备采用煮沸法,-20 ℃保存待用。PCR 分别扩增 24 株肺炎克雷伯菌的 6 种高毒力荚膜血清型基因(K2、K5、K16、K20、K54、K57)、5 种常见毒力基因[magA(K1)、rmpA、mrkD、wabG、allS],PCR 引物、体系和扩增条件参照相关研究^[4-5]。扩增 8 种耐药基因(blaTEM、blaSHV、

blaCTX-M、blaKPC、blaIMP、blaNDM、blaVIM、blaOXA-M),PCR 扩增引物、体系和扩增条件参照相关研究^[6-7]。将阳性扩增产物送上海博尚生物技术有限公司测序并比对分析。

1.3.3 生物膜试验 采用 96 孔板结晶紫染色法检测细菌生物膜形成能力,方法参照文献^[8-9]。将菌液调至 1.5×10⁸ CFU/mL,接种于 96 孔细胞培养板,每株 3 个复孔,并作空白对照。将板置孵箱 35 ℃恒温静置培养 12 h 和 18 h。随后用结晶紫染色,无水乙醇洗脱,用酶标仪测定其在 A₅₉₀ 条件下的吸光度值(A 值),重复 3 次,取平均值。

1.3.4 超黏表型检测 将 24 株肺炎克雷伯菌三区划线,置孵箱中 35 ℃培养 18~24 h,用接种环在单个菌落表面轻轻接触并向侧面牵拉,如有黏液丝形成且长度大于 0.5 cm,判断为阳性^[5]。

1.4 统计学处理 用 SPSS 17.0 进行统计学处理。计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验;以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细菌鉴定和药敏试验 CRKP 组菌株对碳青霉烯类抗生素均耐药,KPN 组菌株对碳青霉烯类抗生素均敏感,两组详细的药敏情况见表 1。

表 1 CRKP 组与 KPN 组 24 株肺炎克雷伯菌对常用抗菌药物的药敏情况(%)

抗菌药物	CRKP 组		KPN 组	
	S	R	S	R
氨苄西林/舒巴坦	0	100	75	25
阿米卡星	17	83	100	0
氨基糖苷	8	92	67	33
头孢他啶	0	100	92	8
环丙沙星	0	100	67	33
头孢曲松	0	100	67	33
亚胺培南	0	100	100	0
美罗培南	0	100	100	0
左氧氟沙星	0	100	67	33
复方磺胺甲噁唑	0	100	92	8
头孢呋辛	0	100	67	33
哌拉西林/他唑巴坦	0	100	67	33
头孢哌酮/舒巴坦	0	100	75	25

注:S 为敏感;R 为耐药

2.2 相关基因检测结果 24 株肺炎克雷伯菌均未检出荚膜血清型基因(K2、K5、K16、K20、K54、K57);5 种常见毒力基因[magA(K1)、rmpA、mrkD、allS、wabG]仅检出 1 例(4%)。耐药基因 blaTEM 占

54%、blaSHV 占 42%、blaKPC 占 46%、blaIMP 占 4%。CRKP 组除 CRKP5 携带耐药基因 blaIMP 及 CRKP9 携带耐药基因 blaKPC、blaTEM 外,其余标本均携带耐药基因 blaKPC、blaSHV、blaTEM。KPN 组仅 KPN1 和 KPN2 这两株肺炎克雷伯菌检出耐药基因 blaTEM。

2.3 生物膜试验 CRKP 菌株生物膜形成能力 A 值为 0.454~0.936。在培养 12 h 时,两组生物膜的形成能力差异无统计学意义($P>0.05$)。在培养 18 h 时,CRKP 组生物膜的形成能力较 KPN 组强($P<0.05$)。比较培养 12 h 和 18 h 两个时间段生物膜的 A 值,CRKP 组、KPN 组培养 18 h 生物膜的形成能力均较 12 h 更强($P<0.05$),见表 2。

表 2 两组 12 h 与 18 h 生物膜形成能力分析
(A 值, $\bar{x} \pm s$)

项目	12 h	18 h
CRKP 组	0.67±0.09	0.81±0.10*
KPN 组	0.61±0.09	0.66±0.21*
<i>t</i>	1.632	3.991
<i>P</i>	0.117	0.001

注:与组内 12 h 相比,* $P<0.05$

2.4 超黏表型检测 仅 CRKP 组的 CRKP9 菌株形成黏液丝,且长度大于 0.5 cm,结果为阳性。

3 讨 论

CRKP 通常同时对头孢菌素类、喹诺酮类以及氨基糖苷类药物表现出耐药,具有多重耐药甚至是泛耐药的表型。本文将 CRKP 组与非碳青霉烯类抗生素耐药的 KPN 组在生物膜形成能力方面进行对比,CRKP 组菌株生物膜形成能力 A 值为 0.454~0.936,并未超出肺炎克雷伯菌形成生物膜能力的基本分布范围(A 值为 0.06~1.10)^[8],结果显示培养 12 h 时两组的生物膜形成能力差异无统计学意义($P>0.05$),在培养时间 18 h 时两组差异有统计学意义($P<0.05$),CRKP 组生物膜形成能力高于 KPN 组。有资料显示,只要条件允许,几乎所有的细菌都可以形成生物膜^[9]。本试验中肺炎克雷伯菌形成生物膜的能力在培养时间上存在差异,在预试验中培养时间 24 h 甚至更长的情况下则会出现较厚的生物膜在洗脱过程中整块脱落的现象,对试验结果造成很大的影响。以上现象分析原因与试验方法有一定的关系。96 孔板是筛选生物膜形成最常用的方法,操作简便,便于观察,不同种类细菌的生物膜培养在培养方法、温度、时间及培养液种类等方面有其最佳适合条件。结晶紫染色法是计算 A 值的改变,灵敏度较高(有时灵敏度可以达到 100%),在临床观察生物膜形成试验中可作为初筛试验^[10]。CRKP 组在培养 18 h 时生物膜的形成能力高于 KPN 组,其他方面的更深层次原

因有待进一步研究和更多试验结果的支持。

荚膜多糖是肺炎克雷伯菌的主要毒力因子。根据荚膜多糖(K 抗原)分型,可将肺炎克雷伯菌分为 82 个 K 血清型,毒力较强的血清型为 K1、K2、K3、K5、K20、K54 和 K57 型,试验中 24 株菌株 K2、K5、K16、K20、K54、K57 荚膜血清型基因均未检出,推测本研究中肺炎克雷伯菌均属于其他血清型。KABHA 等^[11]认为肺部感染的肺炎克雷伯菌主要是 K2 型菌株,此类菌株缺少“甘露糖- α -2/3-甘露糖”结构,可以逃避肺表面主要蛋白、甘露糖受体相关的吞噬作用,更有利于其在肺部定植从而引起感染。本研究中 CRKP 组虽然主要分离自痰液,但未检出 K2 型菌株。5 种常见毒力基因 magA(K1)为荚膜血清型基因、rm-pA 为超黏表型调节基因,二者均与超黏特性有关,只检出了 1 株菌携带 magA(K1)基因,未发现此基因在两组中存在分布规律。在 CRKP 组中,耐药基因 bla-TEM、blaSHV 和 blaKPC 的检出率显著高于 KPN 组,12 h 时两组细菌生物膜形成能力差异无统计学意义($P>0.05$)。本研究结果表明 CRKP 细菌生物膜的形成与肺炎克雷伯菌固有的多种常见毒力因子相关性不大,而是由其他复杂多样的机制共同造成的,与相关研究结论一致^[9,12]。

生物膜生长的相关机制已经引起越来越多的关注。生物膜生长模式下细菌增长率的下降、饥饿反应的活跃以及基因表达量的改变等都与生物膜的耐药性相关^[13]。本研究未对其他耐药机制进行检测,可能存在一定的局限性。肺炎克雷伯菌生物膜形成过程存在错综复杂的基因网络,至今还没找到比较明确的规律,以后的研究方向应集中在生物膜形成调节机制与控制技术等领域,有利于生物膜的消除和减少生物膜相关感染的发生^[14]。

参考文献

[1] CORTES G,BORRELL N,DE ASTORZA B,et al. Molecular analysis of the contribution of the capsular polysaccharide and the lipopolysaccharide O side chain to the virulence of Klebsiella pneumoniae in a murine model of pneumonia[J]. Infect Immun,2002,70(5):2583-2590.

[2] SHARMA S,MOHAN H,SHARMA S,et al. A comparative study of induction of pneumonia in mice with planktonic and biofilm cells of Klebsiella pneumoniae[J]. Microbiol Immunol,2011,55(5):295-303.

[3] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100S [S]. Wayne,PA,USA:CLSI,2017.

[4] 沈定霞,李东冬,郭玲,等. 高黏液表型肺炎克雷伯菌的荚膜分型与毒力基因的检测[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(5):379-382.

[5] FERTAS-AISSANI F R,MESSAI Y,ALOUACHE S,et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility(下转第 591 页)

cAg 联合检测阳性率总体高于单独检测 HCV-RNA, CLIA 检测 HCV-cAg 与 HCV-RNA 检测灵敏度相近。CLIA 检测 HCV-cAg 能缩短 HCV 感染检测的窗口期,并且抗原量与 RNA 水平呈平行变化趋势。CLIA 联合检测 HCV-Ab 和 HCV-cAg,能够提高丙型肝炎检出率和诊断可靠性。

参考文献

[1] WU C C, HSU C S. Rescue for interferon failures in HCV genotype 1/HBV dually infection[J]. J Formos Med Assoc, 2018, 117(9): 859-860.

[2] XIANG Y, LAI X F, CHEN P, et al. The correlation of HCV RNA and HCV core antigen in different genotypes of HCV[J/OL]. J Clin Lab Anal, 2018: e22632[2018-07-20]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30069909>.

[3] MORIMOTO R, ONO Y, TEZUKA Y, et al. Rapid screening of primary aldosteronism by a novel chemiluminescent immunoassay[J]. Hypertension, 2017, 70(2): 334-341.

[4] 曾艳华, 孟存仁, 张朝霞. 化学发光法检测 HCV 抗体诊断丙型肝炎价值的 Meta 分析[J]. 中国循证医学杂志, 2014, 14(6): 707-715.

[5] 陈红松, 都晓光, 段钟平, 等. 丙型肝炎防治指南(2015 年更新版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2015, 19(4): 1961-1979.

[6] PAPADOPOULOS N, GRIVEAS I, SVERONI E, et al. HCV viraemia in anti-HCV-negative haemodialysis patients: do we need HCV RNA detection test[J]. Int J Artif Organs, 2018, 41(3): 168-170.

[7] 侯健. 丙型肝炎病毒抗体与核心抗原联合检测的诊断效能研究[J]. 标记免疫分析与临床, 2015, 22(9): 853-855.

[8] 黄鹏. 抗原加工递呈相关基因多态性与 HCV 感染转归的关系研究[D]. 南京: 南京医科大学, 2016.

[9] 莫平征. 人类免疫缺陷病毒与分枝杆菌合并感染的临床研究[D]. 武汉: 武汉大学, 2014.

[10] 周珍娟. HCV 抗原、HCV 抗体及 HCV-RNA 联合检测与 ALT 的相关性分析[J]. 泰山医学院学报, 2016, 37(4): 380-382.

[11] CALVARUSO V, CRAIXÌ A. Immunological alterations in hepatitis C virus infection Immunological alterations in hepatitis C virus infection[J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(47): 8916-8923.

[12] CETINER S, CETIN DURAN A, KIBAR F, et al. Performance comparison of new generation HCV core antigen test versus HCV RNA test in management of hepatitis C virus infection[J]. Transfus Apher Sci, 2017, 56(3): 362-366.

[13] SALMA N, JULIE L, BOUTAHAR B, et al. Thrombotic risk assessment and analytical performance of the chemiluminescent analyzer IDS-iSYS for the detection of anti-cardiolipin and anti-beta 2 glycoprotein I autoantibodies[J]. Clin Immunol, 2018, 194: 92-99.

[14] GLORIA A, CONTRI A, CARLUCCIO A, et al. Blood periovulatory progesterone quantification using different techniques in the dog[J]. Anim Reprod Sci, 2018, 192: 179-184.

[15] 陆绍花, 李娅. 酶联免疫法测抗-HCV-IgG 的 S/CO 比值与 HCV-RNA 及肝功能的相关性研究[J]. 中国民族民间医药, 2016, 25(9): 82-83.

[16] 葛咏梅, 冯晓朦, 周劲松, 等. 荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA、HCV-RNA 室内质控物的制备及评估[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(12): 2024-2026.

(收稿日期: 2018-07-29 修回日期: 2018-10-31)

(上接第 587 页)

patterns of Klebsiella pneumoniae strains isolated from different clinical specimens [J]. Pathol Biol (Paris), 2013, 61(5): 209-216.

[6] DU X X, WANG J F, FU Y, et al. Genetic characteristics of bla(NDM-1)-positive plasmid in Citrobacter freundii isolate separated from a clinical infectious patient[J]. J Med Microbiol, 2013, 62(9): 1332-1337.

[7] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.

[8] 侯渊博, 张亚培, 吴庆, 等. 肺炎克雷伯菌生物膜形成能力及其与多黏菌素 B 耐药相关性研究[J]. 中国抗生素杂志, 2016, 41(6): 473-477.

[9] CHICUREL M. Bacterial biofilms and infections. Slime-busters[J]. Nature, 2000, 408(6810): 284-286.

[10] 杨朵, 张正. 两种检测肺炎克雷伯菌生物膜方法的比较

[J]. 中国实验诊断学, 2008, 12(10): 1297-1298

[11] KABHA K, NISSIMOV L, ATHAMNA A, et al. Relationships among capsular structure, phagocytosis and mouse virulence in Klebsiella pneumonia [J]. Infect Immun, 1995, 63(3): 847-852.

[12] NAPARSTEK L, CARMELI Y, NAVON-VENEZIA S, et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing Klebsiella pneumoniae [J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(4): 1027-1034.

[13] ZHANG L, MAH T F. Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics[J]. J Bacteriol, 2008, 190(13): 4447-4452.

[14] 徐丽, 李蓓. 肺炎克雷伯菌生物膜形成机制的研究进展[J]. 中国病原生物学杂志, 2016, 11(11): 1056-1059.

(收稿日期: 2018-08-19 修回日期: 2018-12-23)