

探究碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌双组分系统对多粘菌素耐药的影响

黄小煌¹ 朱姿婧² 卜仕君³ 陈曦² 陈丽丹² (通讯作者)

1.邵阳市中心医院 血液肿瘤实验室

2.中国人民解放军南部战区总医院 检验科

3.广州医科大学 金域检验学院

DOI:10.12238/bmtr.v7i6.17069

[摘要] 目的：本研究旨在分析耐多粘菌素和耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (Polymyxin resistant and Carbapenemase - resistant *Klebsiella pneumoniae*, PR-CRKP) 的双组分系统对多粘菌素耐药的影响，为多粘菌素耐药机制研究基础提供参考。方法：收集 2019 年 6 月-2022 年 12 月南部战区总医院临床标本检出的 PR-CRKP 共 37 株，通过 PCR 扩增多粘菌素耐药相关的双组分系统调控基因 (*mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*) 并进行测序及比对；使用荧光实时定量 PCR (RT-qPCR) 比较其在多粘菌素耐药组及敏感组中表达量的差异。结果：PCR 检测结果显示 37 株 PR-CRKP *mgrB* 突变率为 100%，包括插入突变及点突变等 8 种突变类型，*pmrA*、*phoP* 和 *phoQ* 均为野生型，有 23 株 PR-CRKP 存在 *pmrB* R256G 突变，1 株为 A160T 突变。RT-qPCR 结果显示，多粘菌素敏感组与耐药组之间 *mgrB*、*phoP* 和 *phoQ* 整体表达量存在显著差异，但 *pmrB* 和 *pmrA* 基因的表达量两组间并无显著差异。结论：ISKpn26 的插入使 *mgrB* 的表达量显著下降，*phoP* 与 *phoQ* 基因相对表达量升高，*pmrA* 与 *pmrB* 升高不显著，表明该插入片段使 *mgrB* 对 *PhoP/PhoQ* 具有负调控作用，从而导致多粘菌素耐药；IS903B 插入对 *mgrB* 表达无显著影响，但 *phoP* 和 *phoQ* 的表达量升高，其他 *mgrB* 突变类型也存在 *mgrB* 相对表达活跃，说明双组分系统的表达未被抑制，提示可能存在其他通路或者影响因素影响多粘菌素耐药。

[关键词] 多粘菌素耐药；*mgrB*；耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌

中图分类号：R378 文献标识码：A

Exploring the Impact of Two-component Systems on Polymyxin Resistance in Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae*

Xiaohuang Huang¹, Zijing Zhu², Shijun Bu³, Xi Chen², Lidan Chen² ^{2(Corresponding Author)}

1 Hematology Oncology Laboratory, Shaoyang Central Hospital

2 Department of Laboratory Medicine, General Hospital of Southern Theater Command, People's Liberation Army

3 Guangzhou Medical University, Kingmed College of Laboratory Medicine

[Abstract] Objective: This study aims to analyze the impact of two-component systems on polymyxin resistance in polymyxin-resistant and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (PR-CRKP), providing a reference for the study of polymyxin resistance mechanisms. Methods A total of 37 strains of PR-CRKP were collected from clinical specimens at the General Hospital of Southern Theater Command from June 2019 to December 2022. The polymyxin resistance-related two-component system regulatory genes (*mgrB*, *phoP*, *phoQ*, *pmrA*, *pmrB*) were amplified by PCR and subjected to sequencing and comparison. Fluorescence real-time quantitative PCR (RT-qPCR) was used to compare the differences in expression levels between the polymyxin-resistant and sensitive groups. Results PCR detection results showed that the *mgrB* mutation rate of the 37 strains of PR-CRKP was 100%, including 8 types of mutations such as insertion mutations and point mutations. The *pmrA*, *phoP*, and *phoQ* genes were all wild-type, and 23 strains of PR-CRKP had the *pmrB* R256G mutation, while one strain had the A160T mutation. RT-qPCR results showed that there were significant

differences in the overall expression levels of mgrB, phoP, and phoQ between the polymyxin-sensitive and resistant groups, but there was no significant difference in the expression levels of the pmrB and pmrA genes between the two groups. Conclusion The insertion of ISKpn26 significantly reduced the expression of mgrB, and the relative expression levels of phoP and phoQ genes increased, while the increase of pmrA and pmrB was not significant, indicating that this insertion fragment has a negative regulatory effect on PhoP/PhoQ by mgrB, leading to polymyxin resistance; the insertion of IS903B had no significant effect on mgrB expression, but the expression levels of phoP and phoQ increased. Other types of mgrB mutations also showed relatively active mgrB expression, indicating that the expression of the two-component system was not inhibited, suggesting that there may be other pathways or factors affecting polymyxin resistance.

[Key words] Polymyxin resistance; mgrB; Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

引言

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 是导致社区获得性感染和院内感染的常见病原菌之一, 可引发多种感染包括肺炎、肝脓肿、尿路感染以及败血症^[1]等而危及生命。随着不断出现的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (Carbapenemase-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP), 多粘菌素成为治疗 CRKP 的最后一类类药物。近年来 PR-CRKP 不断检出, 其耐药率和耐药机制都值得持续监测和研究。现已有研究表明 mgrB 基因突变失活是引发肺炎克雷伯杆菌耐多粘菌素的常见原因, 其中报道较多的突变类型是不同类型的可移动原件的插入, 如 IS 5 家族 (包含 ISKpn26、IS903B 类型等)、IS 1 家族等的插入^[2]。双组分系统 (two-component regulatory systems, TCRS, phoP、phoQ、pmrA 及 pmrB 等) 对调节革兰阴性菌脂多糖修饰表达中起重要作用^[3]。mgrB 基因编码的小跨膜脂蛋白可对 TCRS 进行负调节, 目前研究表明导致肺炎克雷伯菌对多粘菌素耐药的主要机制为 mgrB 的基因突变失活时, phoPQ 操纵子上调, phoPQ 信号系统通过 pmrD 间接激活 pmrAB, pmrAB 的激活导致 pmrCAB 和 pmrHFIJKLM 操纵子的上调, 从而增强对肺炎克雷伯菌脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 修饰而导致耐药^[4]。目前国内外对于 PR-CRKP 的研究主要集中在 mgrB 基因突变和 mcr 质粒介导耐药方面, 而本研究基于 mgrB 不同突变类型研究不同双组分系统在 DNA 和 RNA 水平上的影响, 为 PR-CRKP 耐药机制研究提供相关实验数据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源

收集南部战区总医院 2019 年 6 月-2022 年 12 月期间临床菌株, 采用 VITEK MS 质谱仪和 Vitek-2 Compact 全自动微生物分析系统筛选 PR-CRKP, 采用微量肉汤稀释法复核多粘菌素最小抑菌浓度 (minimum inhibitory concentrations, MIC), 剔除同一患者同种标本来源的重复菌株后, 共 37 株, 于 -80℃ 保存。药敏结果参照 2023 年 CLSI 文件标准进行判读及结果解释。选用肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 及 2

株多粘菌素敏感的 CRKP 临床菌株 (LP46、PS, 多粘菌素 MIC ≤ 1 μg/ml) 为对照菌株。

1.2 仪器与试剂

VITEK MS 全自动快速微生物质谱检测系统 (法国 BioMérieux 公司); Vitek-2 Compact 全自动微生物分析系统及配套 (法国 BioMérieux 公司); 基因扩增仪 (伯乐 Bio-Rad CFX96); 核酸电泳仪 (上海培清公司); 凝胶成像分析仪 (上海培清公司); 电热恒温水槽 (上海一恒公司); 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (天根生化科技有限公司); 血平板、麦康凯平板、CAMHB 肉汤 (广州市迪景微生物科技有限公司); 多粘菌素 B 药敏试剂 (温州市康泰生物科技有限公司); 2×Rapid Tap Master Mix (南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.3 PCR 检测多粘菌素相关耐药基因

使用 Primer 5.0 参照 GenBank 基因序列 (pmrA: CP064174.1; pmrB: CP064851.1; phoP: CP063023.1; phoQ: CP061399.1; mgrB: CP063008.1) 设计引物, 并由上海生物工程公司合成及测序, 利用 SnapGene 软件与肺炎克雷伯菌各基因参考序列进行比对, 分析耐药基因相关突变情况。具体 PCR 引物序列见表 1。PCR 反应体系参照表 2, 反应条件: 95℃ 预变性 3min; 95℃ 变性 30s; 58℃ 退火 30s; 72℃ 延伸 1min; 共循环 32 次; 72℃ 延伸 3min。PCR 反应完毕后, 取 2 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析; 电泳条件为: 电压 120V、电流 100mA、时间 30min。

表 1 PCR 引物序列

Genes	Primer Sequences
mgrB	F: 5'-GAGRTAYTGRCACTTAAGACC-3' R: 5'-ACAACAGACCGACAAGCA-3'
phoP	F: 5'-GAAGGAGTTCCATGCAGTATGCGCA-3' R: 5'-TCGAAGCTAACGCTATAGCCCCAC-3'
phoQ	F: 5'-ATGCCGAAGTGCAGAAAGCCACAC-3' R: 5'-TCGATAAAGTCGGCCAGTTAAGCG-3'
pmrA	F: 5'-GACTACCAGCAGCGCTACGGCATT-3' R: 5'-TTCCCGTACCTCATGCTCCACATGT-3'
pmrB	F: 5'-TGATGATGAAAGCCGGTAGCCCGGT-3' R: 5'-CGCTTCTTTATCGTCTGCTTGCC-3'

Basic Medical Theory Research

表2 PCR 反应体系

Component	Final reaction concentration	Volume added
2× Rapid Tap Master Mix	1×	15 μl
PCR Forward Primer	10 μM	2 μl
PCR Reverse Primer	10 μM	2 μl
DNA template	-	2 μl
ddH ₂ O	-	Up to 30 μl

1.4 耐多粘菌素相关基因表达量检测

逆转录反应体系见表3, 逆转录反应条件: 37°C, 15min; 85°C, 5s; 4°C保存。RT-qPCR 检测基因表达量, 引物如表4所示; 具体 RT-qPCR 反应体系见表5; 扩增程序反应条件为 93°C 2min, 93°C 1min, 55°C 2min, 共 40 个循环。

表3 逆转录反应体系

Component	Volume added
gDNA Clean Reaction Mix Ver.2	2 μl
5 × Evo M-MLVRT Master Mix	4 μl
Total RNA	500 ng
RNase free water	up to 20 μl

表4 RT-qPCR 引物序列

Primer	Primer Sequence
q-mgrB	F: 5'- GTTGCTGTGGACTCAGATGCTT -3' R: 5'- TGCCGCTGAAAACTGAACA -3'
q-phoP	F: 5'- TGCCTCACCCCTCAAAGTTC -3' R: 5'- GAGATGTTCCGCCAGATAGTAGTC -3'
q-phoQ	F: 5'- GCGCAGACTCTGAGATGACC -3' R: 5'- GGTGTCGACCCACCAATGC -3'
q-pmrA	F: 5'- GCAGGGGTTAATTCTGGCGATGC -3' R: 5'- CGATAGCGCGGCTTCGTGC -3'
q-pmrB	F: 5'- GGCCGTCGTCTCTGCGCATG -3' R: 5'- GGGCTGTAGCGGTGAGCATTG -3'
q-rpoB	F: 5'- GCCAGCTGTCTCAGTTTATG -3' R: 5'- ACATACGCGACCGTAGTG -3'

表5 RT-qPCR 反应体系

Component	Final reaction concentration	Volume added
2×SYBR Green Pro Taq HS Premix	1×	10 μl
PCR Forward Primer (10 μM)	0.2 μM	0.4 μl
PCR Reverse Primer (10 μM)	0.2 μM	0.4 μl
RNA template (<100 ng)	-	2 μl
RNase free water	-	Up to 20 μl

1.5 数据处理与分析

以 *rpoB* 基因作为 RT-qPCR 内参, 以肺炎克雷伯菌 ATCC 700603 为参考菌株, 再随机选取 2 株多粘菌素敏感的 CRKP 作为对照, 用相对定量法计算基因的表达水平倍数, 即采用 2^{-ΔΔCT} 法进行计算。通过 GraphPad Prism 9.0 和 SPSS 26 等软件作图及数据分析。

2 结果

2.1 临床资料

收集 2019 年 6 月-2022 年 12 月本院临床标本检出的 PR-CRKP 共 37 株, 标本类型包括痰液 27.0% (10/37)、静

脉血 18.9% (7/37)、粪便 16.2% (6/37)、中段尿 13.5% (5/37)、引流液 6% (2/37)、脓液 6% (2/37)、静脉导管血 3% (1/37)、皮下积液 3% (1/37)、胆汁 3% (1/37)、脑脊液 3% (1/37) 及导管 3% (1/37)。来源科室为重症医学科内科 (17 株), 重症医学科 (9 株), 呼吸科 (3 株), 脑血管科病区 (2 株), 肝胆外科 (2 株), 神经外科 (2 株), 其他病区 (2 株)。其中男性占 78.4% (29/37), 女性占 21.6% (8/37), 平均年龄 68 岁。

2.2 双组分调控系统基因突变情况

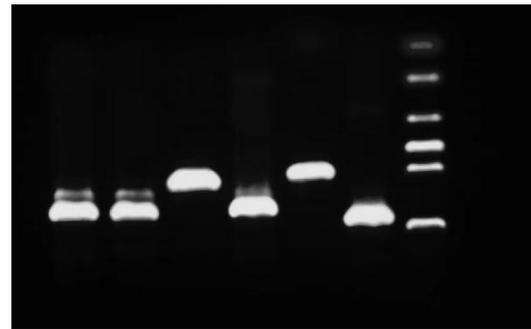


图1 部分样本电泳图

37 株 PR-CRKP 均存在 *mgrB* 的突变, 其中有 18 株出现 ISKpn26 (1200bp) 类型的插入序列, 13 株出现 IS903B (1066bp) 类型的插入序列, ISKpn28 插入、ISKpn14 插入、IS 5 家族 (1065bp) 插入、第 47 位色氨酸突变为半胱氨酸 (W47C)、第 33 位谷氨酰胺突变为终止密码子 (Q33 STOP)、-39 和 -129 位 G 突变为 T 各 1 株 (-39 G>T, -129 G>T), 突变位置不等。37 株 PR-CRKP 菌株的 *pmrA*、*phoP* 和 *phoQ* 中均未发现突变。在 *pmrB* 中, 有 1 株菌株中出现第 160 位丙氨酸突变为苏氨酸 (A160T), 23 株菌株中出现第 256 位精氨酸突变为甘氨酸 (R256G)。具体参见表 6。

表6 多粘菌素耐药基因 PCR 结果分析

Isolate number	Type of mgrB mutation	pmrA	pmrB	phoP	phoQ	Polymyxin MIC value (μg/ml)
LJX01	nt 74 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	16
LJX07	nt 74 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
HBS12	nt 74 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
HBS13	nt 74 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	64
HBS16	nt 74 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
CGZ18	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
ZXC19	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
CEH21	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
XZJ31	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	128

WAQ34	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
CXT40	nt 74 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	64
WAQ08	nt 71 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
G CJ22	nt 71 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
G CJ35	nt 71 Ins ISKpn26	WT	WT	WT	WT	32
FBL66	nt 73 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
CJH1018	nt 66 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	64
WHC1004	nt 66 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	32
CJH1008	nt 66 Ins ISKpn26	WT	R256G	WT	WT	64
XR X43	nt 69 Ins IS903B	WT	WT	WT	WT	32
CRY60	nt 69 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	16
ZS63	nt 82 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	32
HRG26	nt 3 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
LP36	nt 88 Ins IS903B	WT	A160T	WT	WT	64
YMS1006	nt 43 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
LYZ71	nt -26 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	32
WYS1007	nt -26 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
ZTC1005	nt -26 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
ZRP1016	nt -26 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
XR X1017	nt 76 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	16
XR X1002	nt 76 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	64
XR X1024	nt 76 Ins IS903B	WT	R256G	WT	WT	16
HCH44	nt 131 Ins ISKpn28	WT	WT	WT	WT	32
LH1015	-39 G>T, -129G>T	WT	WT	WT	WT	16
FYZ53	nt 51 Ins ISKpn14	WT	WT	WT	WT	32
TXZ42	W47C	WT	WT	WT	WT	8
ZLL65	nt 16 Ins IS5	WT	R256G	WT	WT	128
XZJ24	Q 33 STOP	WT	R256G	WT	WT	32
LP46	WT	WT	WT	WT	WT	≤1
PS	WT	WT	WT	WT	WT	≤1

nt: nucleotide base; Ins: insertion; W47C: Tryptophan at position 47 mutated to cysteine; Q33 STOP: Glutamine at position 33 mutated to a stop codon; -39 G>T, -129G>T: G mutated to T at positions -39 and -129; WT: wild type.

2.3 多粘菌素耐药基因及双组分调控系统基因相对表达量及比较结果

将 LP46、PS 这 2 株多粘菌素敏感的 CRKP 归为敏感(S)组与其他组分进行比较,将 ATCC 700603 的表达作为参照株。

从表 7 和图 2 中可发现在 pmrA 基因的表达中除了 WHC1004、ZTC 1005 和 HBS13 的表达量略低于敏感组外,其他样本的表达量均高于敏感组;在 pmrB 中,我们从图 3 发现,除了样本 WHC1004、ZTC1005、HBS13 和 YMS1006 的表达量略低于敏感组外,其他样本表达量均高于敏感组,但 pmrA 和 pmrB 表达量升高均不具有统计学意义。

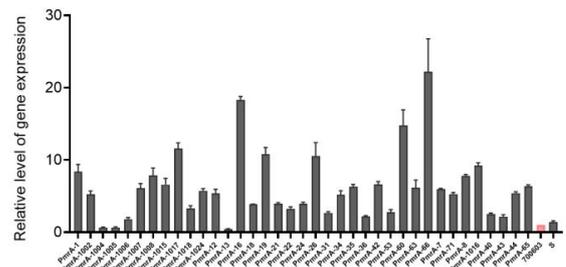


图 2 37 株菌株 pmrA 相对表达量

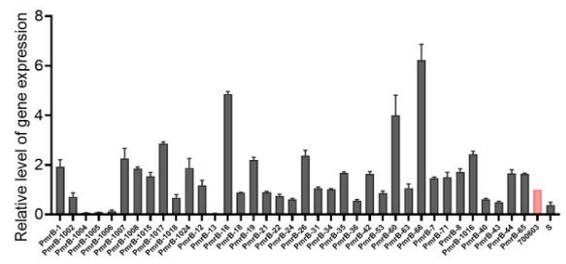


图 3 37 株菌株 pmrB 相对表达量

表 7 双组分调控系统相关基因表达量结果 (mean ± SD)

Isolate number	Expression levels of mgrB	Expression levels of pmrA	Expression levels of pmrB	Expression levels of phoP	Expression levels of phoQ
700603	1	1	1	1	1
Ins ISKpn26					
LJX01	0.00±0.00	8.36±1.75	1.92±0.50	8.01±1.94	25.51±7.76
LJX07	0.01±0.01	6.00±0.15	1.46±0.10	2.38±0.11	17.87±2.40
WAQ08	0.00±0.00	7.81±0.33	1.72±0.22	3.26±0.41	28.11±4.55
HBS12	0.00±0.00	5.37±1.02	1.17±0.36	3.24±1.47	18.37±3.96
HBS13	0.00±0.00	0.44±0.09	0.05±0.01	2.30±0.10	7.74±0.32
HBS16	0.00±0.00	18.32±0.80	4.87±0.17	11.81±0.41	43.06±1.46
CGZ18	0.01±0.01	3.88±0.06	0.88±0.04	6.86±1.39	15.23±0.90
ZXC19	0.00±0.00	10.81±1.59	2.20±0.19	4.28±0.68	31.21±3.20
CEH21	0.00±0.00	3.98±0.23	0.90±0.05	10.51±0.80	25.91±3.66
G CJ22	0.00±0.01	3.26±0.44	0.75±0.12	5.85±1.23	17.22±1.41
XZJ31	0.00±0.00	2.68±0.32	1.06±0.09	1.99±0.59	17.58±1.56
WAQ34	0.27±0.11	5.17±1.00	1.02±0.04	14.37±3.98	20.24±1.52
G CJ35	0.28±0.03	6.29±0.58	1.68±0.07	8.55±0.75	14.54±2.30
CXT40	0.00±0.01	2.50±0.30	0.62±0.07	22.74±5.57	39.17±7.91
FBL66	0.00±0.00	22.21±7.90	6.23±1.10	7.96±1.45	36.06±9.60
WHC1004	0.02±0.01	0.66±0.10	0.07±0.01	8.59±3.47	14.11±5.51
CJH1008	0.01±0.00	7.86±1.77	1.86±0.11	4.29±0.40	26.23±3.63

CJH1018	0.28±0.01	3.30±0.67	0.68±0.22	7.65±2.04	24.16±2.46
Ins IS903B					
HRG26	3.44±0.11	10.53±3.24	2.37±0.38	5.85±0.27	13.37±1.39
LP36	0.00±0.00	2.20±0.20	0.56±0.09	2.43±0.30	4.98±0.64
XRX43	0.14±0.03	2.17±0.42	0.50±0.06	15.47±2.30	23.31±0.56
CRY60	0.03±0.01	14.78±3.73	4.00±1.41	4.19±2.08	31.44±18.97
ZS63	0.90±0.60	6.18±1.84	1.07±0.29	3.46±1.29	21.31±12.14
LYZ71	1.42±0.55	5.29±0.35	1.51±0.34	4.58±0.10	16.00±1.14
XRXI002	0.19±0.03	5.27±0.80	0.72±0.27	3.44±0.21	17.78±1.68
ZTC1005	0.58±0.06	0.67±0.16	0.08±0.02	12.23±0.44	18.85±1.83
YMS1006	0.82±0.06	1.84±0.34	0.13±0.08	39.22±0.86	27.77±4.99
WYS1007	2.49±0.28	6.10±1.09	2.26±0.71	14.26±3.43	28.83±5.91
ZRP1016	2.95±0.15	9.24±0.65	2.43±0.22	7.52±0.34	23.70±2.65
XRXI017	0.12±0.03	11.59±1.34	2.85±0.13	6.75±0.35	35.73±2.32
XRXI024	0.41±0.03	5.75±0.52	1.88±0.66	9.91±1.18	30.58±2.13
Q33 STOP					
XZJ24	1.16±0.04	3.97±0.32	0.62±0.06	2.29±0.35	10.94±1.21
W47C					
TXZ42	2.29±0.12	6.63±0.66	1.63±0.18	4.99±1.89	20.96±10.39
Ins ISKpn28					
HCH44	5.16±0.25	5.42±0.34	1.66±0.26	4.76±1.62	20.69±5.67
Ins ISKpn14					
FYZ53	1.77±0.70	2.78±0.62	0.86±0.16	11.78±0.96	36.04±11.84
Ins IS5					
ZLL65	1.96±0.03	6.39±0.31	1.64±0.06	3.04±0.12	20.64±1.11
-39 G>T, -129G>T					
LH1015	1.85±0.61	6.60±1.48	1.54±0.27	4.76±0.42	20.55±7.69
Sensitive	1.29±0.72	1.43±0.23	0.38±0.16	3.83±0.28	0.85±0.06
Group					

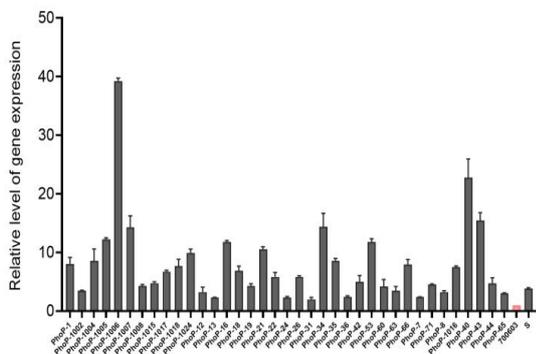


图 4 37 株菌株 phoP 相对表达量

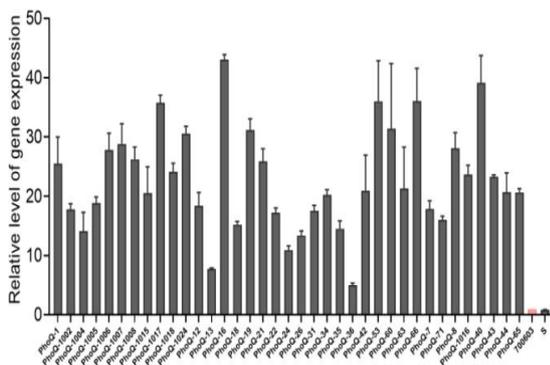
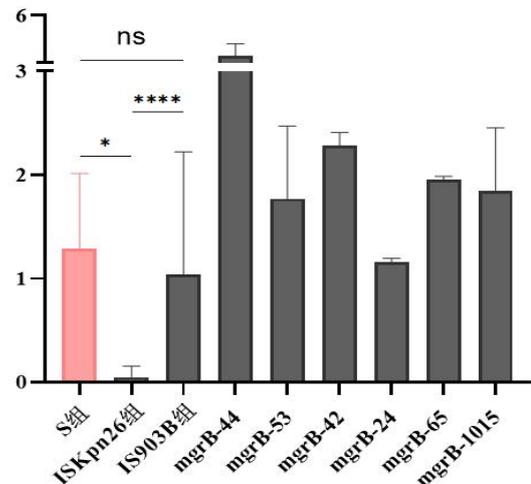


图 5 37 株菌株 phoQ 相对表达量

从图 4 中发现不管是哪种类型的 mgrB 突变，其 phoP、phoQ 表达量均高于 ATCC 700603，但在 phoP 基因的相对表达量中，小部分样本略低于敏感组；而在图 5 中可发现，phoQ 基因的相对表达中均高于敏感组。

基于不同 mgrB 突变类型组对 phoP 和 phoQ 表达情况进行分析，ISKpn26 突变组 phoP 基因 (23.46 ± 9.43) 相较于敏感组 (3.83 ± 0.28) 表达上升且具有统计学意义 ($P < 0.05$)。IS903B 突变组 phoP 基因 (22.59 ± 8.46) 相较于敏感组 (3.83 ± 0.28) 表达上升具有统计学意义 ($P < 0.05$)。ISKpn26 突变组 phoQ 基因 (7.48 ± 5.16) 相较于敏感组 (0.85 ± 0.06) 表达上升具有统计学意义 ($P < 0.05$)。IS903B 突变组 phoQ 基因 (9.95 ± 9.78) 相较于敏感组 (3.83 ± 0.28) 表达上升具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

mgrB-ISKpn26 突变组中 (0.05 ± 0.11) 其 mgrB 相对表达量低于 ($P < 0.05$) 敏感组 (1.29 ± 0.72) 与 IS903B 组 (1.04 ± 1.18)，具有统计学意义；而 IS903B 组与敏感组 (1.29 ± 0.72) 无统计学意义。mgrB-Q33STOP 突变 (样本为 XZJ24) 的 mgrB 表达量相较于敏感组略低，剩余 5 株的 5 种突变：ISKpn28 插入、ISKpn14 插入、IS 5 家族插入、W47C、-39 G>T、-129G>T 均稍高于敏感组 mgrB 表达量。



注：“S”代表敏感组；纵轴表示相对表达水平的平均值；“*”表示 $P < 0.05$ ；“****”表示 $P < 0.001$ 。

图 6 不同 mgrB 突变类型的 mgrB 表达量

同时在 IS903B 突变组中发现 4 株 (HRG26、LYZ71、WYS1007 和 ZRP1016) 的 mgrB 表达量高于敏感组。

3 讨论

革兰阴性菌的耐药性问题日趋严重，CRKP 作为临床最常见的碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌，其在全球范围的广泛播散，已成为抗感染治疗的重大威胁。根据 2021 年 CHINET 监测结果^[5]显示，肺炎克雷伯菌临床分离率为 24.4%，且临床分离率呈每年逐渐上升趋势，如此高的分离率和 CRKP 的

泛耐药性给临床诊治和公共卫生安全带来巨大压力和负担。本院 PR-CRKP 菌株主要分离自痰液、静脉血和粪便,老年及重症患者更易感染此类多重耐药菌,患者主要来自重症医学科内科及重症医学科。

在国外研究中有报道通过 *phoP*、*phoQ*、*pmrA* 或 *pmrB* 基因的特异性突变从而使肺炎克雷伯菌获得性多粘菌素耐药性。一项台湾的耐多粘菌素菌株的研究中观察到 *mgrB* (Stop48Tyr) 和 *phoQ* (Leu26Pro) 中新的单个氨基酸的变化导致多粘菌素耐药性^[6];同时还存在着由于片段的缺失导致的耐药:复旦大学附属华山医院的1例多粘菌素敏感的肺炎克雷伯菌中,对多粘菌素耐药机制研究发现其 *phoQ* 序列出现了一个 42 bp 的片段缺失导致 *phoQ* 蛋白质结构域氨基酸缺失,这可能是 *mgrB* 编码的蛋白与 *phoQ* 蛋白相互作用并负向调控 *phoP/phoQ* 系统的区域,从而导致 *pmrCAB* 和 *pmrHFIJKLM* 操纵子过表达,导致多粘菌素耐药^[7]。而在本研究所测得的 *pmrA*、*phoP* 和 *phoQ* 基因中未发现突变情况,结合 RT-qPCR 结果均有上调情况,推测 *mgrB* 在其中起到负反馈作用,并非 *pmrA*、*phoP* 和 *phoQ* 基因突变引起的耐药。

目前临床上发现较多 IS 家族(主要是 IS 1、IS 5 家族)的插入导致其 *mgrB* 基因失活从而出现耐药情况^[8]。

本研究 *mgrB* 为 ISKpn26 插入突变的样本中,其 *phoP*、*phoQ* 和 *pmrA* 均为野生型,在 *pmrB* 中大部分为野生型,虽有部分为 R256G 突变但已有文献报道其并不是多粘菌素耐药的原因^[6],同时根据 RT-qPCR 结果显示,相比于敏感组,它们的 *mgrB* 基因相对表达量有下降,且它们各自的下游基因 *phoP*、*phoQ*、*pmrA* 和 *pmrB* 表达量均相应升高,考虑 ISKpn26 序列的插入与这 18 株 CRKP 对多粘菌素耐药相关。

在 *mgrB* 为 IS903B 插入突变的分组中,检出一株未在其他文献中报道过的 *pmrB* 基因 A160T 突变,目前仅在部分文献中报道过有 *pmrB* 的 A246T^[9]、A223T^[10] 突变非导致肺炎克雷伯菌耐多粘菌素的原因,而此处 A160T 突变的样本为 *mgrB* 基因低表达而双组分基因相对表达量升高,极大可能该菌株的耐药仍是由 *mgrB* 突变主导的,但是否该类 *pmrB* 突变有影响到其上下游的表达和作用位点,每个位点是否发挥作用和具体作用机制还需进一步实验探究。

4 株 *mgrB* 为 IS903B 插入以及 ISKpn28 插入、ISKpn14 插入、IS 5 家族插入、W47C、-39 G>T、-129G>T 这 5 株的突变存在 *mgrB* 表达量相对于敏感组升高的情况,这与目前所报道的关于 *mgrB* 失活从而 *phoPQ* 基因表达上调的耐药机制有所出入,虽然其双组分系统相对敏感组和本身 *mgrB* 的表达量上升,但不像 ISKpn26 插入或其他报道的插入一样出现 *mgrB* 不表达或低表达的情况。在一项关于 CRKP 多粘菌

素耐药的研究中 *mgrB* 上检测到一个位于 88 位(C88T)的过早停止密码子,导致谷氨酰胺在蛋白质的 30 位(Gln30*)停止的氨基酸序列发生无意义突变,但其 *mgrB* 的 RT-qPCR 结果显示相对是升高的^[11],同时相关文献报道耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐多粘菌素的主要机制的研究中,其不同的 *mgrB* 插入也出现相对于敏感组表达量升高的情况^[10]。

综上所述分析表明,极大可能存在其他耐药机制影响多粘菌素耐药,需要进行下一步试验去确认和筛选,从而为预防 PR-CRKP 广泛耐药提供新的思路和治疗方案。

【参考文献】

[1]Jayol A, Nordmann P, Brink A, et al. Heteroresistance to Colistin in *Klebsiella pneumoniae* Associated with Alterations in the PhoPQ Regulatory System[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(5): 2780-2784.

[2]Cannatelli A, Giani T, D' Andrea M M, et al. MgrB Inactivation Is a Common Mechanism of Colistin Resistance in KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* of Clinical Origin[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2014, 58(10): 5696-5703.

[3]Huang J, Li C, Song J, et al. Regulating polymyxin resistance in Gram-negative bacteria: roles of two-component systems PhoPQ and PmrAB[J]. *Future Microbiology*, 2020, 15(6): 445-459.

[4]Poirel L, Jayol A, Bontron S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70(1): 75-80.

[5]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.

[6]Cheng Y-H, Lin T-L, Pan Y-J, et al. Colistin Resistance Mechanisms in *Klebsiella pneumoniae* Strains from Taiwan[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015, 59(5): 2909-2913.

[7]Xu Q, Xu T, Zhuang Y, et al. In Vivo Development of Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to a 42 bp Deletion in the Sequence of *phoQ*[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020: 1-6.

[8]Uz Zaman T, Albladi M, Siddique M I, et al. Insertion element mediated *mgrB* disruption and presence of ISKpn28 in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from Saudi Arabia[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2018, 11: 1183-1187.

[9]胡黄都.浙江省碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌多粘菌素

耐药机制研究[D].浙江大学,2020.

[10]Chen X, Li P, Sun Z, et al. Insertion sequence mediating mrgB disruption is the major mechanism of polymyxin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from China[J]. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2022, 30: 357–362.

[11]Kong Y, Li C, Chen H, et al. In vivo Emergence of

Colistin Resistance in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Mediated by Premature Termination of the mgrB Gene Regulator[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2021, 12: 656610.

作者简介：

黄小煌（1979-），男，苗族，湖南人，本科，湖南省邵阳市中心医院，副主任技师，研究方向为临床检验诊断学。