

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对 C57BL/6 小鼠肺部菌群的扰动

崔媛媛², 王淼³, 万唐江⁴, 王嘉琪², 位秀丽², 肖潇^{*2}, 李默然^{*1,2}

1 湖北医药学院附属人民医院, 湖北 十堰 442000

2 湖北医药学院基础医学院, 湖北 十堰 442000

3 湖北医药学院生物医学工程学院, 湖北 十堰 442000

4 湖北医药学院第一临床学院, 湖北 十堰 442000

崔媛媛, 王淼, 万唐江, 王嘉琪, 位秀丽, 肖潇, 李默然. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌对 C57BL/6 小鼠肺部菌群的扰动[J]. 微生物学通报, 2022, 49(12): 5194-5205

Cui Yuanyuan, Wang Miao, Wan Tangjiang, Wang Jiaqi, Wei Xiuli, Xiao Xiao, Li Moran. Perturbation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* on the pulmonary flora of C57BL/6 mice[J]. Microbiology China, 2022, 49(12): 5194-5205

摘要: 【背景】肺部菌群与宿主健康和呼吸道疾病密切相关, 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)是临床常见的条件致病菌, 感染后对肺部菌群的影响尚不清楚。【目的】探究耐碳青霉烯类肺炎克雷伯杆菌 CRKP2 对 C57BL/6 小鼠肺部菌群的扰动。【方法】将 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组, 分别用 CRKP2、碳青霉烯类敏感肺炎克雷伯菌 KP2044 和无菌 PBS 溶液滴鼻, 利用 16S rRNA 基因的高通量测序技术分析肺部菌群结构。【结果】与健康小鼠相比, 菌株 KP2044 和 CRKP2 感染后小鼠肺部菌群 α 多样性和 β 多样性均显著改变, 变形菌门相对丰度显著增加, 乳酸杆菌属相对丰度明显下降。与 KP2044 相比, CRKP2 生物膜形成能力较弱, 感染后小鼠死亡率较低, 对肺部菌群的扰动较小。【结论】虽然肺炎克雷伯菌是条件致病菌, 但高剂量耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 CRKP2 仍对健康小鼠肺部菌群造成显著影响; 尽管菌株 CRKP2 具有多重耐药性, 但与菌株 KP2044 相比对肺部菌群的扰动较小, 因此推测 KP 菌株感染对肺部菌群的扰动程度可能与菌株毒力有关。

关键词: 肺部菌群; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 16S rRNA 基因; 高通量测序

基金项目: 湖北医药学院人才启动金项目(2018QDJZR12); 国家自然科学基金(81902034); 湖北医药学院人才启动金项目(2021QDJZR021); 湖北省大学生创新创业训练计划(202110929008)

Supported by: Faculty Development Grants from Hubei University of Medicine (2018QDJZR12); National Natural Science Foundation of China (81902034); Faculty Development Grants from Hubei University of Medicine (2021QDJZR021); Innovation and Entrepreneurship Training Program for College Students in Hubei Province (202110929008)

*Corresponding authors: E-mail: XIAO Xiao: xiao910512@outlook.com; LI Moran: moranli@whu.edu.cn

Received: 2022-09-17; Accepted: 2022-10-17; Published online: 2022-11-08

Perturbation of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* on the pulmonary flora of C57BL/6 mice

CUI Yuanyuan², WANG Miao³, WAN Tangjiang⁴, WANG Jiaqi², WEI Xiuli², XIAO Xiao^{*2}, LI Moran^{*1,2}

1 Renmin Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

2 School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

3 School of Biomedical Engineering, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

4 The First Clinical School, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China

Abstract: [Background] Pulmonary flora is closely associated with host health and respiratory diseases. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is a common opportunistic pathogen in clinical practice, while its impact on pulmonary flora after infection remains unclear. [Objective] To explore the perturbation of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* CRKP2 on the pulmonary flora of C57BL/6 mice. [Methods] The C57BL/6 mice were randomly assigned into 3 groups which were intranasally inoculated with CRKP2, carbapenem-sensitive *K. pneumoniae* KP2044, and sterile PBS solution, respectively. The structure of pulmonary flora was analyzed via 16S rRNA high-throughput sequencing. [Results] Compared with those in healthy mice, the alpha diversity and beta diversity of the pulmonary flora in the mice after KP2044 and CRKP2 strain infection significantly changed. Specifically, the infection with strain CRKP2 and KP2044 significantly increased the relative abundance of *Proteobacteria* and decreased that of *Lactobacillus*. Compared with KP2044, CRKP2 showed decreased biofilm formation and caused low mortality of infected mice, which indicated that CRKP2 infection led to weaker alteration of pulmonary flora than KP2044 infection. [Conclusion] Although *K. pneumoniae* is an opportunistic pathogen, high-dose carbapenem-resistant *K. pneumoniae* CRKP2 significantly affects the pulmonary flora of healthy mice. Although strain CRKP2 has multi-drug resistance, it leads to lower disturbance on the pulmonary flora than strain KP2044. Therefore, we hypothesize that the degree of disturbance of the pulmonary flora by *K. pneumoniae* infection may be related to strain virulence.

Keywords: pulmonary flora; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; 16S rRNA gene; high-throughput sequencing

肺部菌群作为呼吸道内正常菌群, 不仅在呼吸道成熟过程中起结构性作用, 而且对维持呼吸道的生理和免疫平衡至关重要^[1]。呼吸道内的菌群平衡是人体保持微环境稳定的关键, 也是人体抵御致病菌侵袭的重要因素^[2]。呼吸道菌群组成的改变不仅与呼吸道疾病的产生有关^[3], 而且会增加呼吸道疾病发作的风险^[4]。近年来, 高通量测序技术的广泛应用使得呼吸道

菌群与宿主的关系得到更加深入的研究^[5], 越来越多的研究发现, 呼吸道疾病会导致呼吸道内相关菌群结构和组成的改变, 呼吸道菌群失衡能够影响机体的免疫和代谢等^[6]。例如, 慢性阻塞性肺疾病患者上呼吸道中革兰氏阴性厌氧菌的丰度降低^[7]; 条件致病菌耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌引起的呼吸道相关肺炎患者的肺部菌群发生动态演变, 物种丰富度和多样性减

少^[8]。因此,探究呼吸道菌群与呼吸道疾病的关系为相关疾病的预防和治疗奠定了科学基础。

抗生素的广泛使用导致耐药、多重耐药及广泛耐药菌株不断增加,给原发疾病的治疗带来极大的挑战。2019年,全球约有127万死亡病例可直接归因于抗生素耐药(antimicrobial resistance, AMR),另有495万死亡病例患有某种形式的AMR疾病,其中与耐药性相关的下呼吸道感染死亡人数超过150万^[9]。抗生素的滥用导致了临床多重耐药肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)感染激增,尤其是耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)^[10]。KP是临床上最为常见的革兰氏阴性杆菌,也是医院感染的主要条件致病菌,在机体免疫力低下时,容易造成呼吸系统、泌尿系统、伤口等部位的感染甚至产生败血症^[11-12]。截至目前,人们对耐药菌的治疗依然面临巨大挑战,针对呼吸道菌群的改善,可为多重耐药菌院内感染的防治提供新思路。然而,目前针对KP感染的多数研究围绕宿主肠道菌群展开^[13],对肺部菌群干扰的研究较少,感染后肺部菌群的具体改变还不十分清楚。

本研究通过CRKP呼吸道感染C57BL/6小鼠,利用16S rRNA基因高通量测序技术分析肺部菌群的变化,探究CRKP感染对肺部菌群的扰动,以期后续开发有效避免院内感染的方法提供前期数据及理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌CRKP2菌株分离自襄阳市某医院临床标本;肺炎克雷伯菌KP2044 [GenBank登录号为AP006725,野生株

(wild type, WT)]分离自肝脓肿患者,由军事医学科学院微生物流行病学研究所惠赠,已完成全基因组测序;大肠杆菌ATCC 25922和金黄色葡萄球菌ATCC 25923为药敏质控菌株,为本实验室保存菌株。

1.1.2 动物

选用8周龄无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级的C57BL/6小鼠,体重为18-22 g,由湖北医药学院动物中心提供。所有C57BL/6小鼠接受相同的食物和无菌蒸馏水,自由摄食、饮水,并保持相同的温度、湿度和噪声的环境条件下饲养。本研究实验过程符合动物伦理要求,通过湖北医药学院动物伦理委员会审批,审查批号:湖北医药学院动(福)第2020-申103号。

1.1.3 主要试剂和仪器

蛋白胨、酵母粉、MH培养基(OXOID)和2×Taq Plus Master Mix,北京康为世纪生物科技有限公司;Q5 high-fidelity DNA polymerase、5×Reaction Buffer、5×High GC Buffer和dNTPs, New England Biolabs公司;细菌DNA提取试剂盒, Omega Bio-Tek公司;DNeasy Power Soil Kit, Qiagen公司。PCR仪, Bio-Rad公司;酶标仪和紫外-可见分光光度计, Gene公司;荧光分光光度计, Promega公司;恒温培养箱和气浴恒温振荡器,常州时国旺仪器制造有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细菌培养

接种肺炎克雷伯菌(CRKP2, KP2044)于MH琼脂平板上,37℃培养过夜,然后挑取新鲜单菌落接种于液体培养基,37℃、200 r/min振荡培养,调整OD₆₀₀值约1.2后1:100稀释接种至新鲜液体培养基中,培养至对数期即OD₆₀₀约1.0-1.2时,12 000 r/min离心15 min,并用无菌PBS溶液重悬后收集菌液,获得细菌菌液的浓度约1×10¹⁰ CFU/mL,动物实验备用。

1.2.2 生物膜定量

接种对数期菌液于 48 孔板中的新鲜培养基中,各设 3 个复孔,37 °C 静置培养 48 h,检测菌液 OD_{600} 值;吸出培养基,加入甲醇固定后,结晶紫溶液染色,轻柔冲洗干净,完全干燥后,加入 33%冰乙酸溶液,使结晶紫染液完全溶解;吸取溶解液测定 OD_{590} 值。按照 OD_{590}/OD_{600} 计算生物膜相对形成量。

1.2.3 药敏试验

根据 2020 年美国临床和实验室标准协会 (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) (<https://www.techstreet.com/publishers/clsi>) 采用 K-B 纸片扩散法对 32 种抗菌药物进行药敏试验,依据 CLSI 和欧洲药敏试验委员会 (European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST) (<http://www.eucast.org>) 标准对药敏结果进行判读。

1.2.4 动物感染试验

9 只 C57BL/6 小鼠随机分为 3 组,每组 3 只。对照组(PBS): 50 μ L 无菌 PBS 滴鼻; KP2044 组: 50 μ L KP2044 (浓度为 1×10^{10} CFU/mL) 菌悬液滴鼻; CRKP2 组: 50 μ L CRKP2 (浓度为 1×10^{10} CFU/mL) 菌悬液滴鼻。小鼠感染后 48 h,处死后无菌条件下收集肺组织(中途死亡小鼠于死亡后迅速收集肺组织),液氮速冻后转 -80 °C 冰箱保存。

1.2.5 16S rRNA 基因序列测定及系统发育分析

参照细菌 DNA 提取试剂盒说明书提取细菌基因组 DNA,以其为模板,利用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1429R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 16S rRNA 基因的 PCR 扩增并测序。PCR 反应体系(50 μ L): 模板 3 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, 2 \times Taq Plus Master Mix 25 μ L,灭菌双蒸水 20 μ L。PCR 反应条件: 95 °C 5 min; 95 °C 1 min, 57 °C

1 min, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 6 min。

将测得的序列通过 NCBI 的 BLAST 进行序列相似性分析,选取与所测序列一致性为 99% 的已知 16S rRNA 基因,采用 Clustal X 软件进行多序列比对(multiple alignments),利用 MEGA-X 软件,采用邻接法(neighbor-joining method)构建系统发育树。

1.2.6 肺部菌群 16S rRNA 基因的高通量测序

采用 DNeasy Power Soil Kit 提取肺组织样品总 DNA,采用荧光分光光度计和 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和质量。采用引物 F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和 R (5'-CG GACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 PCR 扩增目的基因。PCR 反应体系(25 μ L): 模板 DNA 2 μ L,正、反向引物(10 μ mol/L)各 1 μ L, Q5 high-fidelity DNA polymerase 0.25 μ L, 5 \times Reaction Buffer 5 μ L, 5 \times High GC Buffer 5 μ L, dNTPs (10 mmol/L) 2 μ L, 灭菌双蒸水 8.75 μ L。PCR 反应条件: 98 °C 5 min; 98 °C 30 min, 53 °C 30 s, 72 °C 45 s, 25 个循环; 72 °C 5 min。PCR 扩增 16S rRNA 基因 V3-V4 可变区后进行胶回收纯化和定量,采用标准的 Illumina TruSeq DNA 文库制备实验流程构建上机文库。将混合好的文库(10 nmol/L)逐步稀释定量至 4-5 pmol/L 后采用 Illumina MiSeq PE250 平台上机测序(上海派森诺生物科技股份有限公司)。

通过 QIIME2 (2019.4)^[14] 进行微生物组生物信息学分析,使用 cutadapt 去除引物片段^[15],调用 DADA2^[16] 进行质控、去噪、拼接和去嵌合体。合并扩增子序列变体(samplicon sequence variants, ASVs)特征序列和 ASV 表格。采用 QIIME2 的 classify-sklearn 算法^[17] 对每个 ASV 的特征序列使用 naive bayes 分类器进行物种注释(Greengenes 数据库)^[18]。使用 QIIME2 的 qiime feature-table rarefy 功能进行 ASV 抽平,

抽平深度设为最低样本序列量的 95%，后续所有分析基于抽平 ASV 表格。测序所得序列信息提交至 NCBI 中 sequence read archive (SRA) 数据库，其 BioProject ID 为 PRJNA855312 (<https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/subs/sra/SUB11738945/overview>)。

1.2.7 统计分析

使用 QIIME 分析和处理样本。使用 R (4.0.4)语言“vegan 2.3-0”软件包进行 α 多样性指数和相似性分析，采用“ape 5.5”软件包^[19]进行主坐标分析。使用“stats 4.0.4”软件包进行 Wilcoxon 秩和检验。对满足正态分布和方差齐性的多组数据在 SPSS 23.0 中进行单因素方差分析，多重组间比较采用 Fisher’s 最小显著性差异法 (least significant difference, LSD)，相关图表使用 R 语言、GraphPad Prism 8 或 Origin 2021 生成。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定、药敏及生物膜形成能力比较

通过 16S rRNA 基因序列构建系统发育树 (图 1A)，CRKP2 和 KP2044 与肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 在同一分支，为肺炎克雷伯菌。CRKP2 除对多粘菌素 B 高度敏感外，对四环素类(3 种)中度敏感，对其余药物呈现耐药 (表 1)；KP2044 对碳青霉烯类(2 种)、头孢菌素类(7 种)、氨基糖苷类(丁胺卡那，庆大霉素)、喹诺酮类(3 种)、脂肽类(1 种)、磺胺类(1 种)高度敏感，对青霉素(苯唑西林，哌拉西林)氨基糖苷类(卡那霉素，新霉素)中度敏感，对青霉素类(青霉素，氨苄西林，羧苄西林)、大环内酯类(2 种)、四环素类(多西环素，米诺环素)、糖肽类(1 种)、林可霉素类(2 种)呈现耐药。以上结

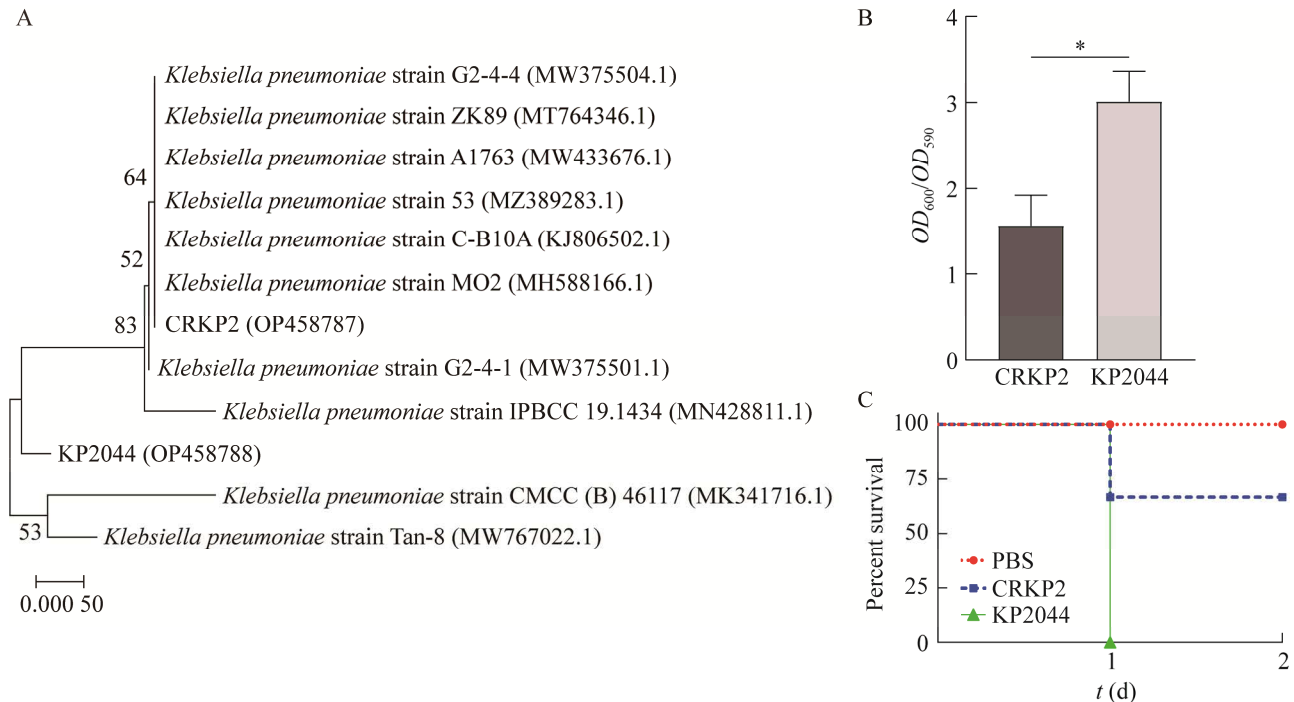


图 1 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树(A)、生物膜相对形成量(B)和肺炎克雷伯菌肺部感染小鼠的存活率(C)

Figure 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence (A), the relative amount of biofilm formation (B) and survival rate of *Klebsiella pneumoniae* lung infected mice (C).

表 1 CRKP2 和 KP2044 对 32 种药物的敏感性

Table 1 Sensitivity of CRKP2 and KP2044 to 32 drugs

抗生素种类 Types of antibiotic	抗生素 Antibiotics	含药量 Contents ($\mu\text{g}/\text{piece}$)	敏感性 Sensitivity	
			CRKP2	KP2044
碳青霉烯类 Carbapenems	亚胺培南 Imipenem	10	R	S
	美罗培南 Meropenem	10	R	S
青霉素类 Penicillins	青霉素 Penicillin	10	R	R
	氨苄西林 Ampicillin	20	R	R
	苯唑西林 Oxacillin	1	R	I
	羧苄西林 Carbenicillin	100	R	R
	哌拉西林 Piperacillin	100	R	I
	头孢菌素类 Cephalosporins	头孢氨苄 Cephalexin	30	R
	头孢唑林 Cefazolin	30	R	S
	头孢拉定 Cefradine	30	R	S
	头孢呋辛 Cefuroxime	30	R	S
	头孢他啶 Ceftazidime	30	R	S
	头孢曲松 Ceftriaxone	30	R	S
	头孢哌酮 Cefoperazone	75	R	S
氨基糖苷类 Aminoglycosides	丁胺卡那 Amikacin	30	R	S
	庆大霉素 Gentamicin	10	R	S
	卡那霉素 Kanamycin	30	R	I
	新霉素 Neomycin	30	R	I
大环内酯类 Macrolides	红霉素 Erythromycin	15	R	R
	麦迪霉素 Midecamycin	30	R	R
四环素类 Tetracyclines	多西环素 Doxycycline	30	I	R
	米诺环素 Minocyclin	30	I	R
喹诺酮类 Quinolones	诺氟沙星 Norfloxacin	10	R	S
	氧氟沙星 Ofloxacin	5	R	S
	环丙沙星 Ciprofloxacin	5	R	S
糖肽类 Glycopeptides	万古霉素 Vancomycin	30	R	R
脂肽类 Lipopeptides	多粘菌素 B Polymyxin B	300	S	S
磺胺类 Sulfonamides	复方新诺明 Cotrimoxazole	25	R	S
林可霉素类 Lincomycins	克林霉素 Clindamycin	2	R	R

注: S: 高度敏感; I: 中度敏感; R: 不敏感(耐药)

Note: S: Highly sensitive; I: Medium sensitivity; R: Resistant.

果表明, CRKP2 为碳青霉烯类耐药菌, KP2044 为碳青霉烯类敏感菌。

CRKP2 菌株的生物膜形成量显著低于 KP2044 ($P < 0.05$, 图 1B), 因此, KP2044 形成生物膜的能力较强。对感染后小鼠连续观察, 结果显示 PBS 组取样前未出现死亡小鼠, CRKP2 组在第 2 天死亡 1 只小鼠, KP2044 组

小鼠在第 2 天全部死亡(图 1C)。

2.2 不同菌株对呼吸道菌群结构和组成的影响

在门水平上(图 2A), 肺部菌群优势菌(平均相对丰度 $> 1\%$) 主要是变形菌门(*Proteobacteria*, PBS: 14.44%; CRKP2: 28.01%; KP2044: 99.34%)、厚壁菌门(*Firmicutes*, PBS: 79.89%;

CRKP2: 56.91%; KP2044: 0.35%)、拟杆菌门 (*Bacteroidetes*, PBS: 1.45%; CRKP2: 6.34%; KP2044: 0.09%) 和放线菌门 (*Actinobacteria*, PBS: 3.03%; CRKP2: 2.89%; KP2044: 0.06%)。与 PBS 组相比, CRKP2 组的变形菌门、拟杆菌门相对丰度显著升高, 厚壁菌门显著减少

($P<0.05$)。KP2044 组中变形菌门占 99% 以上, 主要是肠杆菌科 (*Enterobacteriaceae*), 显著高于 PBS 组和 CRKP2 组, 厚壁菌门、拟杆菌门和放线菌门显著低于 CRKP2 组 ($P<0.05$)。

在属水平上(图 3), 与 PBS 组相比, CRKP2 组乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、片球菌属

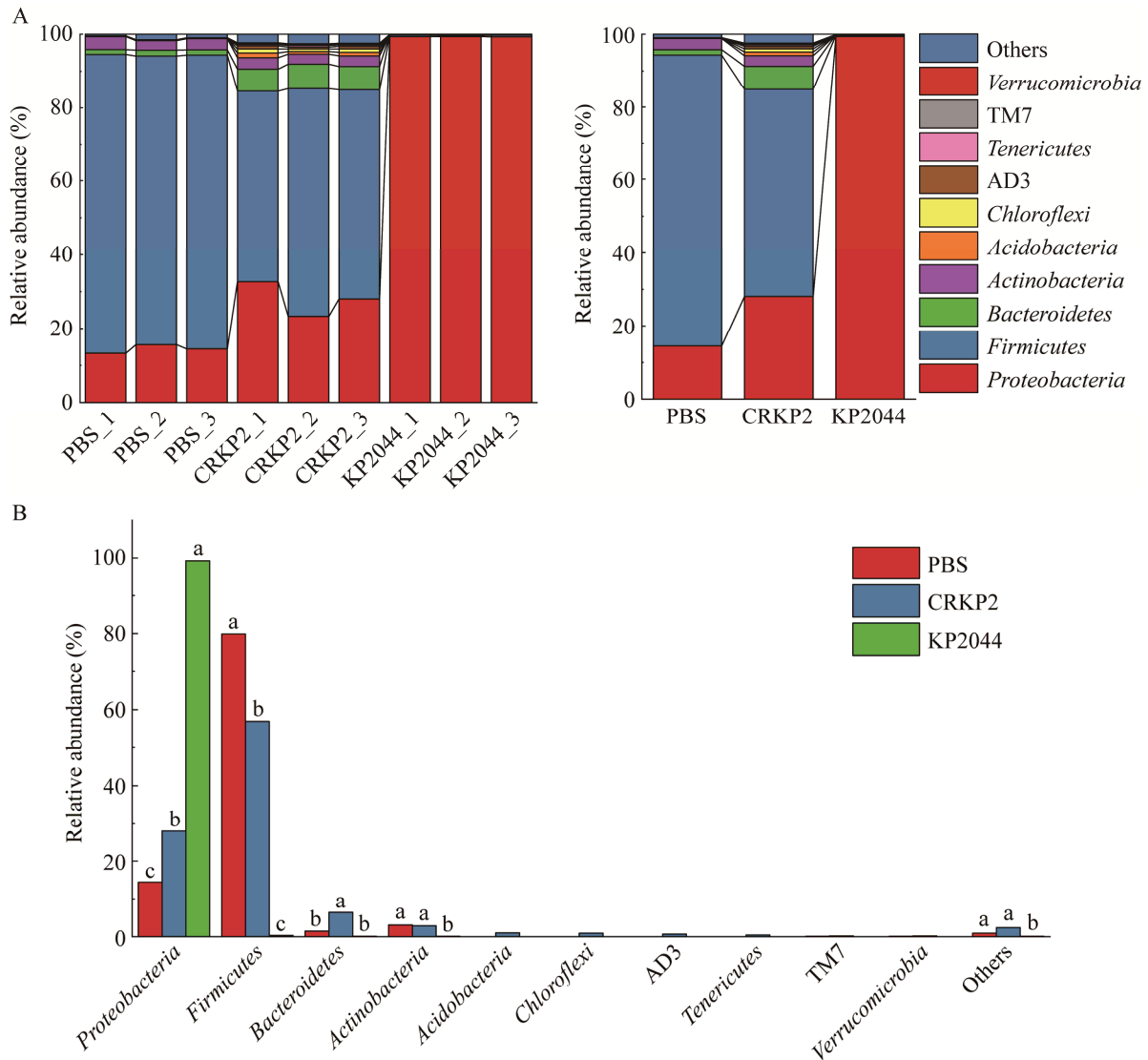


图 2 肺部菌群门水平相对丰度分布(A)和优势菌差异性分析(B) 相同标记字母代表差异不显著; 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Figure 2 Relative abundance distribution of pulmonary flora at phylum level (A) and difference analysis of dominant bacteria (B). Same marker letters represent no significant difference; Different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$).

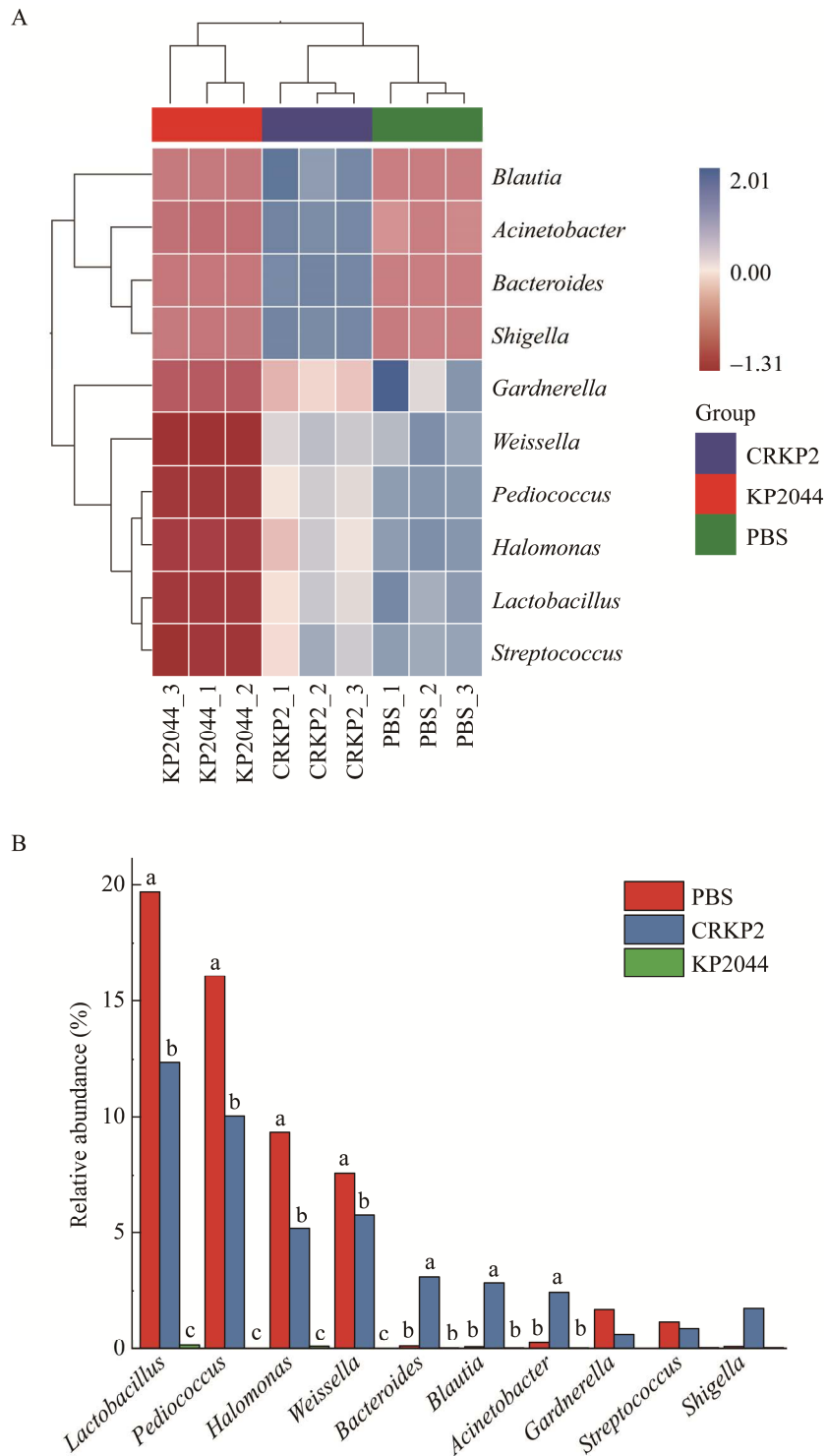


图 3 肺部菌群属水平相对丰度交互热图(A)和差异性分析(B) 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)
 Figure 3 Heat map of the relative abundance of pulmonary flora at genus level (A) and difference analysis (B). Different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$).

(*Pediococcus*)、韦斯氏菌属(*Weissella*)、盐单胞菌属(*Halomonas*)相对丰度显著减少($P<0.05$), 拟杆菌属(*Bacteroides*)、布劳特氏菌属(*Blautia*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)相对丰度显著增加($P<0.05$), KP2044组的乳酸杆菌属、片球菌属、韦斯氏菌属、盐单胞菌属、加德纳菌属(*Gardnerella*)和链球菌属(*Streptococcus*)相对丰度显著下降($P<0.05$)。

由图4A可知, 与PBS组相比, CRKP2组肺

部菌群 α 多样性指数显著升高($P<0.05$), 表明CRKP2感染后小鼠肺部菌群的丰富度和多样性增加, KP2044组丰富度和多样性显著降低($P<0.05$)。基于Bray-Curtis距离进行主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA) (图4B), 3组沿PCo1和PCo2明显分开, 同构主坐标分析发现各组间 β 多样性的差异显著($R^2=0.72$, $P=0.006$)。上述结果说明CRKP2和KP2044感染均显著影响了小鼠肺部菌群的 α 多样性和 β 多样性。

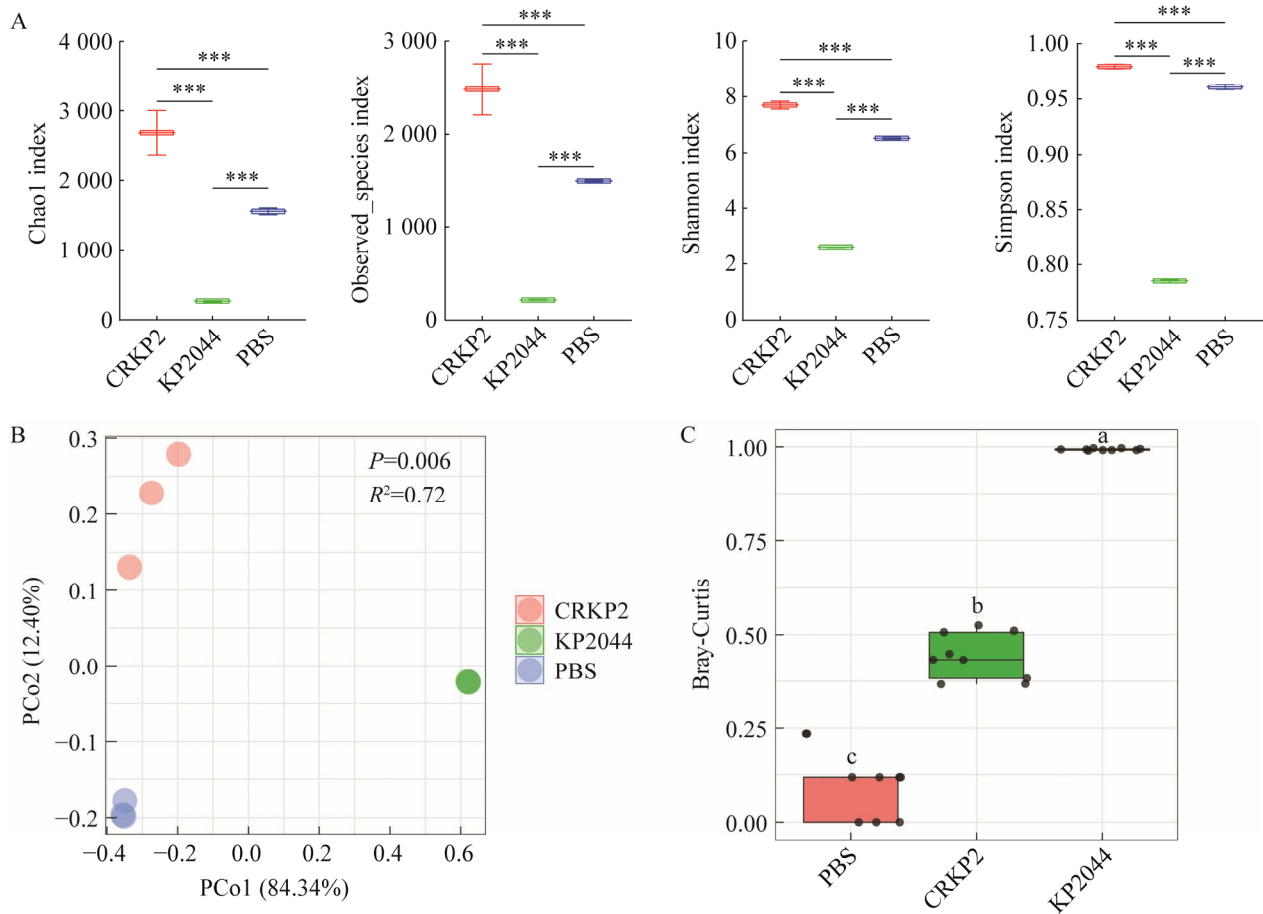


图 4 肺部菌群的 α 多样性指数(A)、PCoA 分析(B)和 Bray-Curtis 距离差异分析(C) ***: $P<0.001$; PBS: PBS 组内 Bray-Curtis 距离; CRKP2: CRKP2 与 PBS 组间 Bray-Curtis 距离; KP2044: KP2044 与 PBS 组间 Bray-Curtis 距离; 不同小写字母代表差异显著($P<0.05$)

Figure 4 Alpha diversity indexes (A), PCoA analysis of pulmonary flora (B) and Bray-curtis distance difference analysis (C). ***: $P<0.001$; PBS: Bray-curtis distance in PBS group; CRKP2: Bray-curtis distance between CRKP2 and PBS group; KP2044: Bray-curtis distance between KP2044 and PBS group; Different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$).

为进一步分析 CRKP2 和 KP2044 感染后与健康小鼠肺部菌群的差异,分别计算各组与 PBS 组的 Bray-Curtis 距离,比较后发现 KP2044 组与 PBS 组的距离显著大于 CRKP2 组与 PBS 组的距离,有明显差异(图 4C, $P < 0.05$),说明与 CRKP2 相比, KP2044 感染后对肺部菌群扰动程度更大。

3 讨论与结论

呼吸道作为人体与外界相通的主要器官,其内部菌群在维护机体健康中发挥重要作用^[20]。呼吸道内正常菌群数量和结构的改变能够导致菌群失调,甚至引发多种临床疾病,增加呼吸道感染风险^[21-22]。本研究用 CRKP 和碳青霉烯类敏感 KP 呼吸道感染 C57BL/6 小鼠,经 16S rRNA 基因高通量测序,发现正常小鼠肺部优势菌群主要是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门和放线菌门,与之前研究结果^[22]一致;感染后小鼠肺部菌群的组成和结构均与对照组存在显著差异,说明 CRKP 和碳青霉烯类敏感 KP 干扰了正常小鼠的肺部菌群结构。有研究发现,呼吸道菌群失调会进一步导致呼吸道功能紊乱,引起呼吸道系统疾病^[23],结合本文研究结果,说明虽然 KP 属于条件致病菌,但是高浓度 KP 仍会导致肺部菌群失调,可能与后续疾病的发生发展有关。

KP2044 感染后导致小鼠正常肺部菌群结构被严重破坏,菌群的丰富度和多样性显著下降,变形菌门相对丰度达到 99%。研究发现,变形菌门的增加与呼吸道疾病密切相关,与正常情况相比,哮喘、慢性阻塞性肺疾病、肺结核、鼻病毒感染的肺炎、肺癌和空气污染物 PM_{2.5} 暴露均导致呼吸道变形菌门比例上升^[24-27]。CRKP2 虽然是耐药菌,但与 KP2044 相比,对

小鼠肺部菌群扰动较小(图 3 和图 4),研究发现 KP2044 具有较高的毒力^[28],而且本研究中 KP2044 形成生物膜的能力和致死率均高于 CRKP2,因此推测 KP 对肺部菌群的扰动程度主要与菌株毒力有关。

在属水平上,CRKP2 和 KP2044 均导致肺部乳酸杆菌属相对丰度显著下降。虽然目前关于 KP 对肺部菌群扰动相关的研究较少,但有报道^[13]显示小鼠感染 KP 后肠道菌群中产生短链脂肪酸的罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)相对丰度显著降低,补充短链脂肪酸等相关代谢产物可以降低 KP 感染的易感性,说明肠道益生菌罗伊氏乳杆菌和相关代谢物在 KP 肺炎中起到保护作用。有研究发现,口服热灭活的乳酸杆菌可以提高感染流感病毒小鼠的存活率,减少感染小鼠肺部的病毒复制^[29];此外,补充单一的约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)可以减轻过敏原对呼吸道的损伤^[30];气管插管时,呼吸道内乳酸杆菌属的相对丰度与呼吸机相关肺炎的发生呈负相关^[31],以上研究结果提示,乳酸杆菌属也可能在肺部菌群平衡和呼吸道疾病治疗中发挥作用。本研究中, KP 感染导致肺部乳酸杆菌属显著减少,进一步说明乳酸杆菌属作为广泛认可的益生菌^[32],可能在修复呼吸道受损和缓解微生态失衡等方面起到积极作用^[33]。但目前仍缺乏乳酸杆菌属与肺部感染和菌群失衡的直接证据,下一步还需通过分离培养的方法来进一步确定。

综上所述, KP2044 和 CRKP2 感染对肺部菌群结构造成不同程度的扰动, KP2044 毒力较强,肺部菌群多样性显著下降, β 多样性显著改变, CRKP2 虽然具有多重耐药性,但毒力较弱,对肺部菌群扰动相对于 KP2044 较小。2 种肺炎克雷伯菌均导致肺部变形菌门增加、乳酸

杆菌属减少, 说明两者具有作为 KP 感染标志性评估指标的潜力, 或调节肺部菌群失衡的潜在靶标, 但仍需进一步研究。

REFERENCES

- [1] Huffnagle GB, Dickson RP, Lukacs NW. The respiratory tract microbiome and lung inflammation: a two-way street[J]. *Mucosal Immunology*, 2017, 10(2): 299-306
- [2] Man WH, De Steenhuijsen P, WAA, Bogaert D. The microbiota of the respiratory tract: gatekeeper to respiratory health[J]. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15(5): 259-270
- [3] Xiao CL, Li SY, Zhou WQ, Shang DZ, Zhao S, Zhu XM, Chen KM, Wang RQ. The effect of air pollutants on the microecology of the respiratory tract of rats[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2013, 36(2): 588-594
- [4] He M, Ichinose T, Yoshida S, Shiba F, Arashidani K, Takano H, Sun GF, Shibamoto T. Differences in allergic inflammatory responses in murine lungs: comparison of PM_{2.5} and coarse PM collected during the hazy events in a Chinese city[J]. *Inhalation Toxicology*, 2016, 28(14): 706-718
- [5] Hakansson AP, Orihuela CJ, Bogaert D. Bacterial-host interactions: physiology and pathophysiology of respiratory infection[J]. *Physiological Reviews*, 2018, 98(2): 781-811
- [6] Huang YJ, Nariya S, Harris JM, Lynch SV, Choy DF, Arron JR, Boushey H. The airway microbiome in patients with severe asthma: associations with disease features and severity[J]. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, 136(4): 874-884
- [7] De Steenhuijsen P, WAA, Huijskens EGW, Wyllie AL, Biesbroek G, Van Den Bergh MR, Veenhoven RH, Wang XH, Trzciński K, Bonten MJ, Rossen JWA, et al. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients[J]. *The ISME Journal*, 2016, 10(1): 97-108
- [8] Xiao TT, Guo Q, Zhou YZ, Shen P, Wang Y, Fang Q, Li M, Zhang ST, Guo LH, Yu X, et al. Comparative respiratory tract microbiome between carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* colonization and ventilator associated pneumonia[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 782210
- [9] Wagenlehner FME, Dittmar F. Re: global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis[J]. *European Urology*, 2022: S0302-2838(22)02614
- [10] Hu FP, Guo Y, Zhu DM, Wang F, Jiang XF, Xu YC, Zhang XJ, Zhang CX, Ji P, Xie Y, et al. Resistance trends among clinical isolates in China reported from CHINET surveillance of bacterial resistance, 2005–2014[J]. *Clinical Microbiology and Infection: the Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 2016, 22(suppl 1): S9-S14
- [11] Daikos GL, Markogiannakis A, Souli M, Tzouveleki LS. Bloodstream infections caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a clinical perspective[J]. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2012, 10(12): 1393-1404
- [12] 耿波, 邓毅, 陈晓梅. 综合 ICU 医院感染病原菌分布及耐药性分析[J]. *现代医药卫生*, 2021, 37(19): 3335-3337
- [12] Geng B, Deng Y, Chen XM. Distribution and drug-resistance analysis of nosocomial infection pathogens in ICU[J]. *Journal of Modern Medicine & Health*, 2021, 37(19): 3335-3337 (in Chinese)
- [13] Wu T, Xu FM, Su C, Li HR, Lyu N, Liu YY, Gao YF, Lan YH, Li JB. Alterations in the gut microbiome and cecal metabolome during *Klebsiella pneumoniae*-induced pneumosepsis[J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11: 1331
- [14] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Peña AG, Goodrich JK, Gordon JI, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. *Nature Methods*, 2010, 7(5): 335-336
- [15] Kechin A, Boyarskikh U, Kel A, Filipenko M. cutPrimers: a new tool for accurate cutting of primers from reads of targeted next generation sequencing[J]. *Journal of Computational Biology: a Journal of Computational Molecular Cell Biology*, 2017, 24(11): 1138-1143
- [16] Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583
- [17] Bokulich NA, Kaehler BD, Rideout JR, Dillon M, Bolyen E, Knight R, Huttley GA, Gregory Caporaso J. Optimizing taxonomic classification of marker-gene amplicon sequences with QIIME 2's q2-feature-classifier plugin[J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 90
- [18] DeSantis TZ, Hugenholtz P, Larsen N, Rojas M, Brodie

- EL, Keller K, Huber T, Dalevi D, Hu P, Andersen GL. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 5069-5072
- [19] Paradis E, Schliep K. Ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R[J]. *Bioinformatics*, 2019, 35(3): 526-528
- [20] Budden KF, Shukla SD, Rehman SF, Bowerman KL, Keely S, Hugenholtz P, Armstrong-James DPH, Adcock IM, Chotirmall SH, Chung KF, et al. Functional effects of the microbiota in chronic respiratory disease[J]. *The Lancet Respiratory Medicine*, 2019, 7(10): 907-920
- [21] 王晖, 康迪, 周学东, 李雨庆. 微生物调节技术在感染性疾病预防中的应用[J]. *华西口腔医学杂志*, 2018, 36(5): 564-567
- Wang H, Kang D, Zhou XD, Li YQ. Prevention of infectious diseases through microecology modulation techniques[J]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 2018, 36(5): 564-567
- [22] Shah T, Shah Z, Baloch Z, Cui XM. The role of microbiota in respiratory health and diseases, particularly in tuberculosis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 143: 112108
- [23] Esposito S, Principi N. Impact of nasopharyngeal microbiota on the development of respiratory tract diseases[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2018, 37(1): 1-7
- [24] Cardenas PA, Cooper PJ, Cox MJ, Chico M, Arias C, Moffatt MF, Cookson WO. Upper airways microbiota in antibiotic-naïve wheezing and healthy infants from the tropics of rural Ecuador[J]. *PLoS One*, 2012, 7(10): e46803
- [25] Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, Davies J, Ervine A, Poulter L, Pachter L, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways[J]. *PLoS One*, 2010, 5(1): e8578
- [26] Erb-Downward JR, Thompson DL, Han MK, Freeman CM, McCloskey L, Schmidt LA, Young VB, Toews GB, Curtis JL, Sundaram B, et al. Analysis of the lung microbiome in the healthy smoker and in COPD[J]. *PLoS One*, 2011, 6(2): e16384
- [27] Krishna P, Jain A, Bisen PS. Microbiome diversity in the sputum of patients with pulmonary tuberculosis[J]. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2016, 35(7): 1205-1210
- [28] Xu L, Wang M, Yuan J, Wang H, Li MR, Zhang FS, Tian YJ, Yang J, Wang JJ, Li B. The KbvR regulator contributes to capsule production, outer membrane protein biosynthesis, antiphagocytosis, and virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Infection and Immunity*, 2021, 89(5): e00016-e00021
- [29] Park S, Kim JI, Bae JY, Yoo K, Kim H, Kim IH, Park MS, Lee I. Effects of heat-killed *Lactobacillus plantarum* against influenza viruses in mice[J]. *Journal of Microbiology*, 2018, 56(2): 145-149
- [30] Fujimura KE, Demoor T, Rauch M, Faruqi AA, Jang S, Johnson CC, Boushey HA, Zoratti E, Ownby D, Lukacs NW, et al. House dust exposure mediates gut microbiome *Lactobacillus* enrichment and airway immune defense against allergens and virus infection[J]. *PNAS*, 2014, 111(2): 805-810
- [31] Emonet S, Lazarevic V, Leemann Refondini C, Gaïa N, Leo S, Girard M, Nocquet Boyer V, Wozniak H, Després L, Renzi G, et al. Identification of respiratory microbiota markers in ventilator-associated pneumonia[J]. *Intensive Care Medicine*, 2019, 45(8): 1082-1092
- [32] Molyneaux PL, Mallia P, Cox MJ, Footitt J, Willis-Owen SAG, Homola D, Trujillo-Torralbo MB, Elkin S, Kon OM, Cookson WOC, et al. Outgrowth of the bacterial airway microbiome after rhinovirus exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2013, 188(10): 1224-1231
- [33] Ojekunle O, Banwo K, Sanni AI. *In vitro* and *in vivo* evaluation of *Weissella cibaria* and *Lactobacillus plantarum* for their protective effect against cadmium and lead toxicities[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2017, 64(5): 379-385