

• 论 著 •

肺炎克雷伯菌荚膜血清型、毒力基因和耐药性研究*

施 瑜, 王 震[△], 张汉园, 李 莹

江苏省镇江市中西医结合医院检验科, 江苏镇江 212000

摘 要:目的 研究肺炎克雷伯菌(KPN)主要荚膜血清型、毒力基因的分布特点和细菌耐药特征,并初步探讨三者之间的相互关系。方法 收集 2019 年 1—9 月该院临床分离的 KPN,由 DL-96 II 细菌鉴定仪进行细菌鉴定和体外药敏试验;黏液丝试验检测黏液表型;聚合酶链式反应(PCR)法扩增 6 种主要荚膜血清型(K1、K2、K5、K20、K54 和 K57 型)和 6 种毒力基因(rmpA、magA、wcaG、fimH、kfu 和 Aero)。结果 93 株 KPN 中 6 种荚膜血清型均有检出,分别为 K2 型(21.50%)、K1 型(13.98%)、K57 型(8.60%)、K54 型(3.23%)、K20 型(3.23%)和 K5 型(1.08%)。毒力基因中 fimH 构成比最高(96.80%),其次是 rmpA(64.52%)和 Aero(64.52%);6 种毒力基因在 13 株 K1 型菌中全部都有检出;rmpA + fimH + Aero 的基因组合最为多见(33.33%)。高黏液表型菌(HvKP)检出率为 54.84%,非高黏液表型菌(cKP)为 45.16%;6 种荚膜血清型、毒力基因 rmpA、Aero、wcaG 在 HvKP 的检出率均明显高于 cKP 的检出率。细菌耐药方面,cKP 的耐药情况较 HvKP 严重;多重耐药菌在黏液表型、荚膜血清型、rmpA、magA、wcaG、Aero 的检出率明显低于敏感菌株。结论 K2、K1、K57 型是 KPN 常见的荚膜血清型,K1 型携带的毒力基因最多;HvKP 携带的荚膜血清型和毒力基因明显高于 cKP,但其耐药率低于 cKP;多重耐药菌携带的荚膜血清型和毒力基因明显低于敏感菌。

关键词:肺炎克雷伯菌; 荚膜血清型; 毒力基因; 耐药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.14.013

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)14-1720-06

文献标志码:A

Study on capsular serotypes, virulence genes and drug resistance of *Klebsiella pneumoniae**SHI Yu, WANG Zhen[△], ZHANG Hanyuan, LI Ying

Department of Clinical Laboratory, Zhenjiang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital, Zhenjiang, Jiangsu 212000, China

Abstract: Objective To analyze the distribution of major capsular serotypes, virulence genes and bacterial resistance of *Klebsiella pneumoniae* (KPN), and preliminarily discuss the relationship among them. **Methods** KPN strains were collected from January to September 2019 in Zhenjiang Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Hospital. The antibacterial susceptibility in vitro were identified by DL-96 II bacteria identification instrument; mucus phenotype were detected by string test. Six major capsular serotypes (K1, K2, K5, K20, K54 and K57) and six virulence genes (rmpA, MagA, wcaG, fimH, kfu and aero) were amplified by PCR. **Results** Six kinds of capsular serotypes were all detected among 93 strains of KPN, which were K2 (21.50%), K1 (13.98%), K57 (8.60%), K54 (3.23%), K20 (3.23%) and K5 (1.08%). Among the virulence genes, the detection rates of fimH was the highest (96.80%), followed by rmpA (64.52%) and aero (64.52%); all six virulence genes were detected in 13 strains of K1 serotypes; and the most common gene combination was rmpA + fimH + Aero (33.33%). The detection rates of HvKP and cKP were 54.84% and 45.16% respectively. The detection rates of six capsular serotypes, rmpA, Aero and wcaG in HvKP were significantly higher than those in cKP. The antibacterial resistance of cKP was more serious than that of HvKP; the detection rate of multidrug-resistant bacteria in mucus phenotype, capsular serotype, rmpA, MagA, wcaG and Aero was significantly lower than that of sensitive strains. **Conclusion** K1/K2/K57 were the common capsular serotypes of KPN, and K1 serotype carries the most virulence genes. Capsular serotype and virulence genes carried by HvKP were significantly higher than those carried by cKP, but the antibacterial resistance rate is lower

* 基金项目: 江苏大学 2018 年度临床医学科技发展基金(自然科学类)(JLY20180022)。

作者简介: 施瑜, 女, 副主任技师, 主要从事临床微生物方面的研究。 [△] 通信作者, E-mail: 903434811@qq.com。

本文引用格式: 施瑜, 王震, 张汉园, 等. 肺炎克雷伯菌荚膜血清型、毒力基因和耐药性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(14): 1720-

than that of cKP. The capsular serotypes and virulence genes carried by multidrug resistant bacteria were significantly lower than those of sensitive bacteria.

Key words: *Klebsiella pneumoniae*; capsular serotype; virulence genes; bacterial resistance

肺炎克雷伯菌(KPN)是人和动物消化道及呼吸道的正常菌群,也是临床重要的机会致病菌。近 3 年来 CHINET 细菌耐药监测网的数据显示,KPN 已经成为临床占比第二位的致病菌,对碳青霉烯类抗菌药物的耐药率在肠杆菌科中为最高,在 25.00% 以上^[1-3]。根据 KPN 在琼脂平板上的黏液性质可分为典型肺炎克雷伯菌(cKP)和高黏液肺炎克雷伯菌(HvKP),HvKP 因其携带更多的毒力基因,具有比 cKP 更高的毒力,往往会引起较为严重的肺炎、败血症、眼内炎、坏死性筋膜炎和各脏器的脓肿等多部位的感染,严重者可导致死亡^[4-5],呈现出高毒力、高致病特性。KPN 的毒力因子包括荚膜多糖抗原、铁摄入系统,菌毛的黏附作用等,包括有 *rmpA*、*magA*、*wcaG*、*fimH*、*kfu*、*Aero* 等毒力基因,这些毒力基因的表达都大大增加了 KPN 的侵袭力。本次研究重点对本院 2019 年 1—9 月临床分离的 KPN 的黏液表型、荚膜血清型、毒力基因和耐药性的相互关系进行分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集本院 2019 年 1—9 月临床分离的非重复菌株。所有菌株均经珠海迪尔的 DL-96 II 细菌鉴定系统鉴定为 KPN,菌种保存于-80℃超低温医用冰箱中。药敏结果参照美国临床和实验室标准化协会(CLSI)提供的(M100-S28)的标准来判读。

1.2 仪器与试剂 3110 型 CO₂ 恒温培养箱(美国 Thermo 公司),-80℃超低温医用冰箱(海尔公司)、高速低温离心机(湖南湘仪公司),金属干式加热仪(Labnet 公司),mini 1610 PCR 扩增仪(杭州朗基公司),EPS-600 电泳仪(上海天能公司),紫外线凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);哥伦比亚血平板和中国蓝平板(上海科玛嘉公司),Premix TaqTM Version 2.0 plus dye、DL2000 DNA 标志物、琼脂糖均购自日本 Taraka 公司,Goldview I 型核酸染色剂(北京索莱宝

科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株复苏、转种、分纯和鉴定 将保存于一80℃超低温冰箱的菌种复苏,转种于血平板,35℃培养 18 h,挑取血平板上单个菌落进行纯培养,分纯后的菌落经 DL-96 II 细菌鉴定仪鉴定为 KPN,并进行药敏试验。所有鉴定均严格按照《全国临床检验操作规程》第四版操作。

1.3.2 质控菌株 大肠埃希菌(ATCC25922)、肺炎克雷伯菌(ATCC700603)均购自江苏省临床检验中心。

1.3.3 黏液丝试验(ST) 用接种环蘸取菌落向上挑起,重复两次。如黏液丝不能挑起或长度小于 5 mm,判定为 ST 阴性;如黏液丝长度等于或超过 5 mm 则判定为 ST 阳性,即高黏液表型菌(HvKP)^[6]。

1.3.4 DNA 模板制备 1.5 mL 的 EP 管中加入 400 μL SDS 裂解液,用接种环挑取适量菌落于裂解液中混匀。置于金属干式加热仪中 100℃加热 20 min,12 000 r/min,4℃高速离心 10 min,上清液即为 DNA 模板,置于-20℃备用。

1.3.5 荚膜血清型和毒力基因检测 采用 PCR 法扩增 K1、K2、K5、K20、K54、K57 6 种主要荚膜血清型和 *rmpA*、*magA*、*wcaG*、*fimH*、*kfu*、*Aero* 6 种毒力基因。引物委托宝日医生物技术(北京)有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μL: Premix Taq plus 酶 25 μL,上、下游引物(10 μmol/L)各 1 μL, DNA 模板 5 μL, ddH₂O 18 μL。扩增条件: 95℃, 预变性 3 min、94℃变性 40 s、50~59℃退火 40 s、72℃延伸 60 s、经 35 个循环,最后 72℃延伸 10 min。引物序列参考文献[6-9]、退火温度和产物长度见表 1。取 PCR 扩增产物 10 μL 进行 1.50% 琼脂糖凝胶电泳 120 V 80 min,在紫外凝胶成像仪上观察结果。

表 1 KPN 的荚膜血清型和毒力基因引物序列

检测基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(℃)
K1	F:GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC	1 283	50
	R:GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG		
K2	F:GAC CCG ATA TTC ATA CTT GAC AGA G	641	52
	R:CCT GAA GTA AAA TCG TAA ATA GAT GGC		
K5	F:TGG TAG TGA TGC TCG CGA	280	53
	R:CCT GAA CCC ACC CCA ATC		
K20	F:CGG TGC TAC AGT GCA TCA TT	741	54
	R:GTT ATA CGA TGC TCA GTC GC		

续表 1 KPN 的荚膜血清型和毒力基因引物序列

检测基因	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)	退火温度(℃)
K54	F:CAT TAG CTC AGT GGT TGG CT	881	52
	R:GCT TGA CAA ACA CCA TAG CAG		
K57	F:CTC AGG GCT AGA AGT GTC AT	1 037	54
	R:CAC TAA CCC AGA AAG TCG AC		
rmpA	F:ACT GGG CTA CCT CTG CTT CA	536	53
	R:CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA		
magA	F:GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC	1 283	59
	R:GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG		
wcaG	F:GGT TGG GTC AGC AAT CGT A	169	53
	R:ACT ATT CCG CCA ACT TTT GC		
fimH	F:ATG AAC GCC TGG TCC TTT GC	688	58
	R:GCT GAA CGC CTA TCC CCT GC		
kfu	F:GAA GTG ACG CTG TTT CTG GC	797	59
	R:TTT CGT GTG GCC AGT GAC TC		
Aero	F:GCA TAG GCG GAT ACG AAC AT	556	55
	R:CAC AGG GCA ATT GCT TAC CT		

1.4 统计学处理 采用 Whonet 5.6 软件对细菌耐药进行统计,采用 SPSS25.0 软件进行统计分析。计数资料采用菌株数和百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

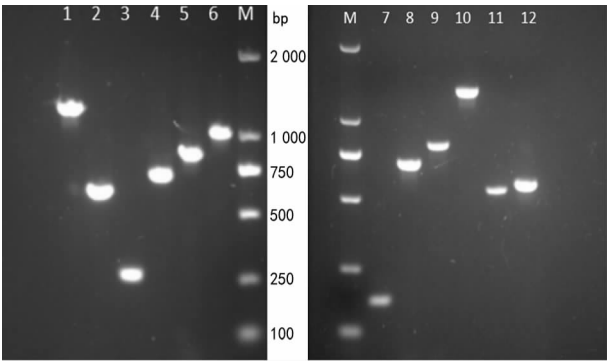
2 结 果

2.1 荚膜血清型和毒力基因分布 93 株 KPN 中 6 种荚膜血清型和 6 种毒力基因均有检出。其中 K2 型检出率最高,为 21.50%(20/93),其次是 K1 型占 13.98%(13/93),K57 型占 8.60%(8/93),K20 型和 K54 型均占 3.24%(3/93),K5 型占 1.08%(1/93)。毒力基因中 fimH 占比最高,为 96.80%(90/93);其次是 rmpA 和 Aero,均为 64.52%(60/93);magA 仅在 K1 型中检出;wcaG 仅在 K1 和 K54 型中检出。同时检测到 6 种毒力基因的 KPN 菌株为 13.98%(13/93),全部出现在 K1 型中;同时检出 4 种和 3 种毒力基因的分别为 11.83%(11/93)和 33.33%(31/93),主要见于 K2、K20、K54、K57 型中;rmpA + fimH + Aero 的组合最为多见,占 33.33%(31/93),有 22 株 KPN 只检出 1 种毒力基因 fimH。有 2 株 KPN 未检测到上述 6 种荚膜血清型和 6 个毒力基因。见表 2。PCR 扩增产物见图 1。

2.2 不同黏液表型 KPN 的荚膜血清型与毒力基因比较 ST 阳性株,即 HvKP 占 51 株(54.84%),6 种荚膜血清型在 HvKP 中均有检出,为 78.43%(40/51);ST 阴性株(cKP)为 42 株(45.16%),除了 K5 和 K57 型,其余 4 种血清型在 cKP 中均有检出,为 19.05%(8/42),主要荚膜血清型在不同黏液表型的检出率比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。毒力

基因 rmpA、wcaG 和 Aero 在 HvKP 的检出率明显高于 cKP,差异有统计学意义($P<0.05$),magA、fimH 和 kfu 在二者的构成比比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。HvKP 中同时携带 3 种以上毒力基因者为 86.27%(44/51),高于 cKP 的 26.19%(11/42),差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.3 不同黏液表型菌的药敏比较 除氨苄西林对 KPN 的耐药率为 100.00%外,HvKP 对常见抗菌药物的耐药率均低于 cKP,没有发现对亚胺培南、美罗培南、派拉西林/他唑巴坦、庆大霉素和阿米卡星耐药的菌株。除亚胺培南和美罗培南外,其他 12 种常见抗菌药物在两者之间差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 4。



注:M 为 DL2000 DNA 标志物;1~6 泳道分别为 K1、K2、K5、K20、K54、K57 血清型,片段长度分别是 1 283、641、280、741、881、1 037 bp;7~12 泳道分别是毒力基因 wcaG、fimH、kfu、magA、rmpA 和 Aero,片段长度分别是 169、688、797、1 283、536、556 bp。

图 1 KPN 荚膜血清型和毒力基因的 PCR 产物琼脂糖电泳图谱

表 2 93 株 KPN 的荚膜血清型和毒力基因的检测结果[n(%)]

血清型	构成情况	毒力基因					
		rmpA	magA	wcaG	fimH	kfu	Aero
K1	13(13.98)	13(13.98)	13(13.98)	13(13.98)	13(13.98)	13(13.98)	13(13.98)
K2	20(21.50)	18(19.35)	0(0.00)	0(0.00)	20(21.51)	5(5.38)	18(19.35)
K5	1(1.08)	1(1.08)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.08)	1(1.08)	1(1.08)
K20	3(3.23)	3(3.23)	0(0.00)	0(0.00)	3(3.23)	1(1.08)	3(3.23)
K54	3(3.23)	3(3.23)	0(0.00)	3(3.23)	3(3.23)	0(0.00)	3(3.23)
K57	8(8.60)	8(8.60)	0(0.00)	0(0.00)	7(7.53)	0(0.00)	8(8.60)
未分型	45(48.38)	14(15.05)	0(0.00)	0(0.00)	43(46.24)	9(9.68)	14(15.05)
合计	93(100.00)	60(64.52)	13(13.98)	16(17.21)	90(96.80)	29(31.18)	60(64.52)

表 3 不同黏液表型 KPN 的荚膜血清型与毒力基因检测结果[n(%)]

血清型	构成情况	毒力基因					
		rmpA	magA	wcaG	fimH	kfu	Aero
HvKP	51(100.00)	49(96.08)	10(19.61)	12(23.53)	50(98.04)	17(33.33)	49(96.08)
K1	10(19.61)	10(19.61)	10(19.61)	10(19.61)	10(19.61)	10(19.61)	10(19.61)
K2	18(35.29)	18(35.29)	0(0.00)	0(0.00)	18(35.29)	4(7.84)	18(35.29)
K5	1(1.96)	1(1.96)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.96)	1(1.96)	1(1.96)
K20	1(1.96)	1(1.96)	0(0.00)	0(0.00)	1(1.96)	0(0.00)	1(1.96)
K54	2(3.92)	2(3.92)	0(0.00)	2(3.92)	2(3.92)	0(0.00)	2(3.92)
K57	8(15.69)	8(15.69)	0(0.00)	0(0.00)	7(13.73)	0(0.00)	8(15.69)
未分型	11(21.57)	9(17.65)	0(0.00)	11(21.57)	11(21.57)	2(3.92)	9(17.65)
cKP	42(100.00)	11(26.19)	3(7.14)	3(7.14)	40(95.24)	12(28.57)	11(26.19)
K1	3(7.14)	3(7.14)	3(7.14)	3(7.14)	3(7.14)	3(7.14)	3(7.14)
K2	2(4.76)	0(0.00)	0(0.00)	0(0.00)	2(4.76)	1(2.38)	0(0.00)
K20	2(4.76)	2(4.76)	0(0.00)	0(0.00)	2(4.76)	1(2.38)	2(4.76)
K54	1(2.38)	1(2.38)	0(0.00)	1(2.38)	1(2.38)	0(0.00)	1(2.38)
未分型	34(80.96)	5(11.90)	0(0.00)	0(0.00)	32(96.19)	7(16.67)	5(11.90)
P	0.00	0.00	0.08	0.03	0.45	0.62	0.00

表 4 不同黏液表型 KPN 对抗菌药物的耐药情况[n(%)]

抗菌药物	株数 (n=93)	组别		P
		HvKP	cKP	
		(n=51)	(n=42)	
氨苄西林	93(100.00)	51(100.00)	42(100.00)	—
头孢呋辛	22(23.60)	2(3.90)	20(47.60)	<0.000 1
头孢曲松	22(23.60)	2(3.90)	20(47.60)	<0.000 1
头孢他啶	18(19.30)	2(3.90)	16(38.10)	<0.000 1
头孢吡肟	21(22.50)	2(3.90)	19(45.20)	<0.000 1
头孢西丁	9(9.60)	1(1.90)	8(19.00)	0.005 5
派拉西林/他唑巴坦	8(8.60)	0(0.00)	8(19.00)	0.001 1
庆大霉素	10(10.70)	0(0.00)	10(23.80)	0.000 2
阿米卡星	4(4.30)	0(0.00)	4(9.50)	0.020 0
复方磺胺甲噁唑	18(19.30)	1(1.90)	17(40.40)	<0.000 1

续表 4 不同黏液表型 KPN 对抗菌药物的耐药情况[n(%)]

抗菌药物	株数 (n=93)	组别		P
		HvKP	cKP	
		(n=51)	(n=42)	
环丙沙星	15(16.10)	1(1.90)	14(33.30)	<0.000 1
左氧氟沙星	12(12.90)	1(1.90)	11(26.10)	0.000 5
亚胺培南	2(2.10)	0(0.00)	2(4.70)	0.115
美罗培南	2(2.10)	0(0.00)	2(4.70)	0.115
米诺环素	8(8.60)	1(1.90)	7(16.60)	0.012

注：—表示无数据。

2.4 多重耐药菌与黏液表型、荚膜血清型和毒力基因的相关性比较 93 株 KPN 中,检出 20 株多重耐药菌,其中产超广谱 β 内酰胺酶(ESBLs)的 KPN 18 株(19.35%),耐碳青霉烯类抗菌药物的 KPN 2 株(2.15%),多重耐药菌在黏液表型、主要荚膜血清型、

rmpA、magA、wcaG、Aero 的检出率均明显高于耐药菌,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 5。

表 5 耐药菌与敏感菌的荚膜血清型和毒力基因比较[n(%)]

项目	多重耐药菌 (n=20)	敏感菌 (n=73)	P
ST 试验	1(5.00)	50(68.49)	0.00
K1/K2/K5/K20/K54/K57	2(10.00)	46(63.01)	0.00
rmpA	3(15.00)	57(78.08)	0.00
magA	0(0.00)	13(17.81)	0.04
wcaG	0(0.00)	16(21.92)	0.02
fimH	19(95.00)	71(97.26)	0.61
kfu	3(15.00)	26(35.62)	0.08
Aero	3(15.00)	57(78.08)	0.00

3 讨 论

自从 20 世纪 80 年代台湾地区报道了可引起多处非传统部位感染的 HvKP 以来^[10],越来越多的研究发现 HvKP 相较 cKP 而言,其细菌的黏液表型特征、致病特点都有很大的差异^[11]。其主要特征是可引起健康人群、没有基础疾病的亚太人群的感染,同时具有从原始感染部位转移至其他组织器官,从而导致远端、不常见部位如眼和软组织等处的感染,这在非免疫缺陷患者革兰阴性杆菌的感染中非常罕见^[12]。本次研究中,HvKP 占 54.85%,cKP 占 45.16%,本次分离的 KPN 以高黏液表型为主。

荚膜多糖(CPS)被认为是 KPN 最重要的毒力因子之一,CPS 亲水并带有负电荷,与同样带有负电荷的吞噬细胞之间存在静电相斥现象,可以阻滞和抵抗宿主吞噬细胞的吞噬和消化作用。根据 CPS 抗原的不同,可将 KPN 分为 82 个血清型^[13],其中 K1、K2、K5、K20、K54、K57 型荚膜血清型与 HvKP 密切相关,是最常见的、毒力最强的型别,具有更强的致病性^[14]。本次研究中 6 种荚膜血清型都有检出,其中以 K2 型为主(21.50%),其次是 K1 型(13.98%)和 K57 型(8.60%)。K1/K2/K57 型在 HvKP 的检出率(70.59%)明显高于 cKP(11.90%),K57 型只出现在 HvKP 中,与上海地区相似^[15]。虽然 K1/K2 型主要见于高黏液表型中,但是在非黏液表型也有少量检出,所以仅仅通过 ST 试验可能会漏检高产毒菌株,检测人员需要通过 PCR 检测荚膜血清型和毒力基因才能更好地筛选出产毒菌株。

6 种毒力基因在 13 株 K1 型菌中全部都有检出;其他 5 个型别同时携带 3~4 种毒力基因者(82.86%)明显高于未分型者(30.95%);HvKP 组中同时携带 3 种以上毒力基因者(86.27%)明显高于 cKP 组(30.95%)。此次研究证实了高毒力血清型携带有更多的毒力基因;K1 型毒力相较其他荚膜血清

型而言,毒力更强。携带有多种毒力基因的 K1 型与侵袭性综合征(尤其在肝脓肿)密切相关^[10],实验室需要加强对 K1 型 KPN 的监控。

本次研究发现,fimH 在 6 种毒力基因中的检出率最高,为 96.80%;其次是 rmpA 和 Aero,均为 64.52%,magA 检出率最低。fimH 主要编码 I 型菌毛(TIP)蛋白^[16],fimH 主要介导细菌的 TIP 与上皮细胞的甘露糖受体结合,使 KPN 黏附于宿主细胞上,同时还介导生成生物膜^[17],因为不参与黏液的形成,所以在 HvKP 株(98.04%)和 cKP 株(96.24%)的分布没有差异,与相关报道一致^[18]。rmpA 作为黏液表型调节基因,属于转录调控因子家族,在多种荚膜血清型的合成中起到正向调控作用^[15],形成高黏液表型,rmpA 基因存在于 219×10^3 大质粒上,CHEN 等^[19]发现该毒力质粒上还同时表达包括 Aero 在内的多种毒力基因,HvKP 株含有此毒力质粒,可协同调控 HvKP 毒力的形成,增加 KPN 的侵袭力;Aero 编码的是铁载体中最为重要的气杆菌素,可与宿主转铁蛋白中 Fe^{3+} 结合形成螯合物,通过细胞膜上特定的铁蛋白受体进入细菌体内,从而干扰宿主体内的铁代谢,此外铁载体还可以催化产生自由基,造成宿主组织细胞的损伤^[20]。本次研究发现,所有 rmpA 阳性的菌株 Aero 也同时阳性,在 HvKP 株的检出率(96.08%)明显高于在 cKP 中的检出率(26.19%),在 6 种血清型的检出率(95.83%)明显高于非分型组(31.11%),提示 rmpA 和 Aero 是 KPN 的主要毒力基因。magA 是黏液相关基因,仅存在于 K1 型的质粒上,编码 K1 型特异性的 Wzy 聚合酶^[21],是 K1 型荚膜生成的主要调控因子;wcaG 编码的基因产物是 CPS 中的岩藻糖,ZHENG 等^[22]发现 wcaG 不仅参与 CPS 的合成,还是 KPN 形成生物膜的一个独立危险因素。本次研究发现,magA 基因仅存在于 K1 型菌,证实了 K1 型和 magA 具有相关性,而 wcaG 基因只存在于 K1 和 K54 型中,与报道一致^[23]。kfu 编码磷酸转移酶系统的一些成分,有助于 KPN 摄入 Fe^{3+} ,增强了 KPN 毒力^[24]。

细菌耐药方面,除了氨苄西林、亚胺培南和美罗培南的耐药率在两组 KPN 无差异外,HvKP 的耐药率明显低于 cKP。除了对氨苄西林的耐药率为 100.00%外,HvKP 对其他抗菌药物的耐药率均较低,仅有 1 株 HvKP 产 ESBLs,这株产 ESBLs 的 HvKP 为 K2 型,毒力基因的模式是 rmpA+fimH+Aero。cKP 中产 ESBLs 的检出率为 40.47%,只有 1 株为 K20 型,其余为未分型血清型,大多数只检出 1 种毒力基因 fimH;cKP 中检出 2 株 CRE,均为未分型血清型,毒力基因的模式均为 fimH+kfu。刘盼盼^[25]研究发现,经亚胺培南体外诱导 HvKP 产生耐药后,其高黏液表型消失、rmpA 等毒力基因丢失、小鼠致死率下降、大多数毒力基因表达下调。本次研究中,多

重耐药菌的荚膜血清型的检出率明显低于敏感菌,除了 fimH 和 kfu,其余 4 种毒力基因均存在明显差异,究其原因,可能是 KPN 在获得耐药基因的同时丢失了质粒上的毒力基因,导致毒力基因的表达发生改变,从而引起表型和毒力的变异。

综上所述,本次研究的 KPN 以 HvKP 为主,K1、K2 和 K57 型是本院常见的荚膜血清型,K1 型所携带的毒力基因最多;rmpA 和 Aero 是 KPN 的主要毒力基因;HvKP 携带的荚膜血清型和毒力基因均明显高于 cKP,但是耐药率明显低于 cKP。本次研究还发现了 1 株产 ESBLs 的高产毒菌,这种高产毒多重耐药菌一旦侵入机体将会为临床的治疗带来极大地挑战,因此必须引起高度重视,应深入对此类菌株研究。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2018,18(3):241-251.
- [2] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志,2020,20(1):1-10.
- [3] 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.
- [4] 惠靖雯,倪焰,栾洁,等. 肺炎克雷伯菌的毒力特性及其对视网膜色素上皮细胞炎症相关因子表达的影响[J]. 眼科新进展,2018,38(9):829-831.
- [5] YF S, WANG Y K, WANG Y H, et al. Metastatic infection caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and coinfection with *Cryptococcus meningitis*: a case report[J]. *World J Clin Cases*, 2019, 7(22):3812-3820.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 马荣,刘科芳,聂大平,等. 肺炎克雷伯菌中 K1、K2 血清型菌株的分布及其耐药性分析[J]. 中国感染与化疗杂志,2015,15(3):204-208.
- [9] SUN Y F, WU H, SHEN D X. Clinical and molecular analysis of *klebsiella pneumoniae* causing liver abscess in China[J]. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2016, 26(4):245-251.
- [10] LIU Y C, CHENG D L, LIN C L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis[J]. *Arch Intern Med*, 1986, 146(10):1913-1916.
- [11] SHON A S, BAJWA R P, RUSSO T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. *Virulence*, 2013, 4(2):107-118.
- [12] DOUD M S, GRIMES-ZEPPEGNO R, MOLINA E, et al. A k2A-positive *Klebsiella pneumoniae* causes liver and

brain abscess in a Saint Kitt's man[J]. *Int J Med Sci*, 2009, 6(6):301-304.

- [13] KU Y H, YC C, YU W L. Clinical spectrum and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* causing community-acquired extrahepatic abscess[J]. *J Microbiol Immunol Infect*, 2008, 41(4):311-317.
- [14] WU H, LI D D, ZHOU H, et al. Bacteremia and other body site infection caused by hypervirulent and classic *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microb Pathog*, 2017, 104(1):254-262.
- [15] 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.
- [16] KLINE K A, DODSON K W, CAPARON M G, et al. A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria[J]. *Trends Microbiol*, 2010, 18(5):224-232.
- [17] MURPHY C N, MORTENSEN M S, KROGFELT K A. Role of *klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a model of Catheter-Associated urinary tract infections[J]. *Infect Immun*, 2013, 81(8):3009-3017.
- [18] 付方俊,白永凤,程颖,等. 血流感染耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及毒力因子研究[J]. 中国卫生检验杂志,2018,28(18):2217-2219.
- [19] CHEN Y T, CHANG H Y, YC L, et al. Sequencing and analysis of the large virulence plasmid pLVPK of *Klebsiella pneumoniae* CG43[J]. *Gene*, 2004, 337(1/2):189-198.
- [20] RUSSO T A, OLSON R, MACDONALD U, et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *klebsiella pneumoniae* Ex vivo and in vivo[J]. *Infect Immun*, 2015, 83(8):3325-3333.
- [21] LI B, ZHAO Y L, LIU C T, et al. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(9):1071-1081.
- [22] ZHENG J X, LIN Z W, CHEN C, et al. Biofilm formation in *klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of wcaG[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8(3):21.
- [23] TURTON J F, PERRY C, ELGOHARI S, et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets[J]. *J Med Microbiol*, 2010, 59(Pt 5):541-547.
- [24] HOLDEN V I, BACHMAN M. Diverging roles of bacterial siderophores during infection[J]. *Metallomics*, 2015, 7(6):986-995.
- [25] 刘盼盼. 亚胺培南体外诱导高毒力肺炎克雷伯菌耐药后毒力特征变化以及转录组学分析[D]. 南昌:南昌大学, 2018.