

• 论 著 •

基于二代测序的碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌的分子特征分析*

陈典典¹, 曹敬荣¹, 白向荣², 杨文硕¹, 王培昌^{1△}

首都医科大学宣武医院:1. 检验科;2. 药学部, 北京 100053

摘要:目的 确定碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)基因组中耐药基因与毒力基因的分布,探讨 CR-hvKP 的耐药与毒力分子特征。方法 收集 2016—2020 年该院分离的 17 株 CR-hvKP 菌株,使用 Hisep 2500 型 Illumina 高通量测序仪进行二代测序,对所测序列进行拼接、组装与注释;应用 Diamond 软件和 RGI 软件将 CR-hvKP 基因组与毒力因子数据库(VFDB)和抗菌药物耐药基因数据库(ARDB)进行比对,发掘和分析菌株基因组中毒力因子和耐药基因分布,并比较不同型别菌株携带的耐药基因与毒力基因的差异。结果 基因组序列数据显示 17 株 CR-hvKP 菌株全部为 CC258 克隆复合群,其中 10 株(58.8%)MLST 型别为 ST11 型,7 株(41.2%)为国际上未报道的新序列型别。基因组中存在 20 多种耐药编码基因,包括对 β -内酰胺类、氨基糖苷类、喹诺酮类抗菌药物耐药的基因;存在 60 多个毒力编码基因,涉及铁摄取和铁载体、调节蛋白、黏附及侵袭作用的 10 类毒力因子,荚膜血清型仅存在 KL64 型(82.4%)和 KL47 型(17.6%),未发现其他血清型。ST11 型流行株与新 ST 型菌株相比,耐药基因 $\text{bla}_{\text{CTX-M-27}}$ 、 $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$ 、 $\text{bla}_{\text{TEM-2}}$ 、 ant2ia 、 sul1 和毒力基因 rmpA , 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 该院分离的 CC258 克隆 CR-hvKP 菌中 ST11 型为主要流行株,CR-hvKP 基因组携带大量的耐药基因与毒力基因,新 ST 型的出现亟待进一步全基因组水平监测耐药和毒力进化,为临床诊治提供依据。

关键词:碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌; 耐药基因; 毒力因子; 基因组学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.24.007

中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)24-2971-07

文献标志码:A

Next-generation sequencing analysis on molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae**

CHEN Diandian¹, CAO Jingrong¹, BAI Xiangrong², YANG Wenshuo¹, WANG Peichang^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory; 2. Department of Pharmacy, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Beijing 100053, China

Abstract: Objective To determine the distribution and molecular characteristics of resistance and virulence genes in the genome of Carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CR-hvKP). **Methods** A total of 17 CR-hvKP strains isolated from Xuanwu Hospital of Capital Medical University from 2016 to 2020 were collected and sequenced by Illumina Hisep 2500. The sequences were stitched, assembled and annotated. The CR-hvKP genome was compared with virulence factor database (VFDB) and antibiotic resistance gene database (ARDB) by Diamond software and RGI software. The distribution of virulence factor and drug resistance gene in the genome of the strains were explored and analyzed, and the differences of drug resistance genes and virulence genes carried by different strains were compared. **Results** Genome sequence data showed that all 17 CR-hvKP strains were CC258 clones, of which 10 strains (58.8%) were ST11, and 7 strains (41.2%) were new sequence types not reported in the world. There were more than 20 genes encoding drug resistance in the genome, including genes resistant to β -lactams, aminoglycosides and quinolones. There were more than 60 virulence coding genes, virulence factors involved in iron uptake and iron carriers, regulatory proteins, adhesion and invasion. The capsular serotypes were only KL64 (82.4%) and KL47 (17.6%), and no other serotypes were found. Resistance genes of $\text{bla}_{\text{CTX-M-27}}$, $\text{bla}_{\text{TEM-1}}$, $\text{bla}_{\text{TEM-2}}$, ant2ia , sul1 and virulence gene

* 基金项目:北京市临床重点专科项目建设项目(1-1-2-2-20-YZYG-05);2021 年度“扬帆”计划重点医学专业项目(ZYLX202114);北京市属医院科研培育项目计划(PX2020038)。

作者简介:陈典典,男,技师,主要从事临床微生物检验研究。△ 通信作者, E-mail: pcw1905@126.com。

本文引用格式:陈典典,曹敬荣,白向荣,等. 基于二代测序的碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌的分子特征分析[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(24): 2971-2976.

rpmA were significant different between new ST strains and ST11 strains ($P < 0.05$). **Conclusion** ST11 of CC258 was the main epidemic strain in CR-hvKP strains. The CR-hvKP genome carries a large number of drug resistance genes and virulence genes. Further genome-wide monitoring of drug resistance and virulence evolution is urgently needed for the emergence of new ST types, so as to provide basis for clinical diagnosis and treatment.

Key words: carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; resistance genes; virulence factor; genomics

肺炎克雷伯菌(KP)是社区获得性感染和院内感染最常见的致病菌之一,临床上根据其致病性的强弱分为经典型肺炎克雷伯菌(cKP)和高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)^[1]。随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛应用,hvKP 菌株的耐药性也逐渐增加,且已有产超广谱β-内酰胺酶(ESBLs)hvKP 的报道^[2],而随着耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(CRKP)在临床上的大量出现,碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)分离株的报道越来越多^[3]。CR-hvKP 菌株不仅具有 CRKP 菌株的高耐药性和传播性,还具有 hvKP 菌株的高致病性,使得临床治疗非常棘手。既往研究发现,CRKP 主要集中于 CC258 克隆复合群的 ST11 型和 ST258 型^[4],hvKP 主要集中于 CC258 克隆复合群中的 ST23、ST65 及 ST86 型^[5]。而二代测序为全面了解细菌耐药、毒力基因分布、分子型别等的可靠方法,因此,为进一步明确本院分离的 CR-hvKP 菌株,尤其 CC258 流行株的基因分布与分子特征,本研究收集本院分离的 17 株 CR-hvKP,进行了二代测序,现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集本院检验科 2016—2020 年临床分离的 17 株 CR-hvKP 为研究对象。入选标准:改良碳青霉烯类灭活试验(mCIM)与 EDTA-碳青霉烯类灭活试验(eCIM)阳性,毒力表型试验阳性,且同时存在耐药基因 KPC-2 及毒力基因 rpmA 或 *Aer* 的 CRKP 菌株。排除标准:mCIM 试验、eCIM 试验和毒力表型试验阴性,PCR 方法检测不到耐药或毒力基因。

1.2 菌株筛选方法 通过 Whonet5.6 软件筛选研究菌株,菌株的分离培养步骤按照《全国临床检验操作规程(第 4 版)》进行操作,使用基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)仪(德国布鲁克公司)进行细菌鉴定,采用 Vitek 2 Compact 细菌药物敏感分析系统进行药敏试验,药敏试验结果判断参照美国临床和实验室标准协会(CLSI)相关标准执行。本研究符合《赫尔辛基宣言》的原则和本院临床研究相关规定,研究方案通过本院医学伦理委员会批准(批件号:临研审 2020052 号)。

1.3 二代测序方法 参考文献[6],首先将留存菌株接种于血平板(英国 Oxoid 公司)进行复苏,35℃过夜培养后挑取单菌落进行液体培养。使用 DNA 试剂

盒(美国 Qiagen 公司)提取细菌总 DNA。采用 Hisep 2500 型 Illumina 高通量测序仪(美国 Illumina 公司)进行二代测序。使用 SOAP、Spades、Abyss 软件对测序结果进行数据拼接组装,采用 CISA 软件进行整合,对结果进行最终优化处理,得到的基因组序列用于后期分析。

1.4 耐药、毒力基因和荚膜血清型的分子生物学分析 基因组序列首先使用 GeneMarkS 软件进行细菌的编码基因预测。使用综合抗菌药物耐药基因数据库(ARDB)进行耐药基因分析。通过 RGI 软件与 ARDB 数据库中已知耐药基因进行比对,得到耐药性相关基因的名称及耐受的抗菌药物种类等信息。使用毒力因子数据库(VFDB)分析毒力基因、功能和致病机制。通过 Diamond 软件与 VFDB 数据库已知毒力基因进行比对,得到毒力基因的名称、基本特征描述、毒力基因功能和致病机制信息;将得到的基因组数据提交到 NCBI 数据库,与已知的荚膜血清型(K1-K82、KL103-KL125、KN1 和 KN2)序列进行比对^[7],得到检测菌株的血清型数据。耐药和毒力基因选择鉴定率≥90%基因进行分析统计。

1.5 多位点序列分型(MLST)和分子克隆(CC) 将组装后的基因组数据提交 NCBI 数据库,利用 7 个管家基因(rpoB、gapA、mdh、pgi、phoE、infB 和 tonB)序列结果进行在线比对(<http://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>),将比对的等位基因编码组合与 MLST 库中已经提交的 KP 等位基因编码组合进行对比,获得 MLST 分型。将本研究获得的等位基因序列与 eBURST 网站(<http://eburst.mlst.net>)中的数据库进行比对可得到 CC 鉴定结果(7 个等位基因有 6 个相同定义为同一克隆系)。

1.6 统计学处理 采用 Whonet5.6 软件和 SPSS 23.0 统计学软件进行数据分析,计数资料以例数或百分率表示,组间比较采用 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株标本来源及耐药情况 非重复的 17 株 CR-hvKP 中,16 株(94.1%)分离自痰液标本,1 株(5.9%)分离自尿液标本,复苏后均经 MALDI-TOF MS 二次鉴定。17 株 CR-hvKP 均为多重耐药菌株,对β-内酰胺类(第一、二、三代头孢菌素,碳青霉烯类,复合酶抑制剂类)、喹诺酮类(环丙沙星和左氧氟沙

星)、头霉素类(头孢西丁)抗菌药物均表现为 100.0% 耐药,对复方磺胺甲噁唑耐药率最低,为 23.5%;对阿米卡星和庆大霉素耐药率为 76.5%,未发现对替加环素和多黏菌素耐药的菌株。

2.2 CR-hvKP 的分子分型和克隆型别 17 株 CR-hvKP 菌株中 10 株为国际流行的 CC258 型克隆复合群 ST11 型,7 株为国际上未分型的 MLST 新序列型别(新 ST 型),CR-hvKP 的 MLST 分型结果和克隆型别见表 1。新 ST 型与 ST11 型的 *phoE* 等位基因不

同,由 *phoE* 的 1 号等位基因点突变为 419 号等位基因,见图 1。

表 1 CR-hvKP 的 MLST 分型结果和克隆型别

MLST 分型	<i>rpoB</i> (n)	<i>gapA</i> (n)	<i>mdh</i> (n)	<i>pgi</i> (n)	<i>phoE</i> (n)	<i>infB</i> (n)	<i>tonB</i> (n)	克隆 型别
ST11	1	3	1	1	1	3	4	CC258
新 ST	1	3	1	1	419	3	4	CC258

Sequence ID: Query_9063 Length: 420 Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 420 Graphics

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
771 bits(417)	0.0	419/420(99%)	0/420(0%)	Plus/Plus
Query 1	GTCGGCACCTCGTTAAGCTATGATTTTCGGCGGCAGCGACTTCGCCGTCAGCGCAGCCCAC			60
Sbjct 1	GTCGGCACCTCGTTAAGCTATGATTTTCGGCGGCAGCGACTTCGCCGTCAGCGCAGCCTAC			60
Query 61	ACCAGCTCCGACCGTACCAACGATCAGAACCTGCTGGCCCGCGGCCAGGGTTCGAAAGCG			120
Sbjct 61	ACCAGCTCCGACCGTACCAACGATCAGAACCTGCTGGCCCGCGGCCAGGGTTCGAAAGCG			120
Query 121	GAAGCCTGGGCGACCGGCCTGAAATATGACGCCAACAAATATCTACCTGGCGACCATGTAC			180
Sbjct 121	GAAGCCTGGGCGACCGGCCTGAAATATGACGCCAACAAATATCTACCTGGCGACCATGTAC			180
Query 181	TCTGAAACCGCAAGATGACCCCGATCAGCGGCGGCTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT			240
Sbjct 181	TCTGAAACCGCAAGATGACCCCGATCAGCGGCGGCTTTGCCAACAAAGCGCAGAACTTT			240
Query 241	GAAGCGGTGGCGCAGTATCAGTTCGACTTCGGTCTGCGTCCGTCCTCGGCTATGTGCTG			300
Sbjct 241	GAAGCGGTGGCGCAGTATCAGTTCGACTTCGGTCTGCGTCCGTCCTCGGCTATGTGCTG			300
Query 301	TCGAAAGGGAAGGATATCGAAGGGGTGGGGAGTGAAGATCTGGTTAACTACATCGACGTG			360
Sbjct 301	TCGAAAGGGAAGGATATCGAAGGGGTGGGGAGTGAAGATCTGGTTAACTACATCGACGTG			360
Query 361	GGCCTGACCTACTACTTCAACAAAAACATGAACGCCTTCGTGGATTACAAAATCAACCAG			420
Sbjct 361	GGCCTGACCTACTACTTCAACAAAAACATGAACGCCTTCGTGGATTACAAAATCAACCAG			420

注:ST11 型第 58 个碱基为 C,新 ST 型变为 T。

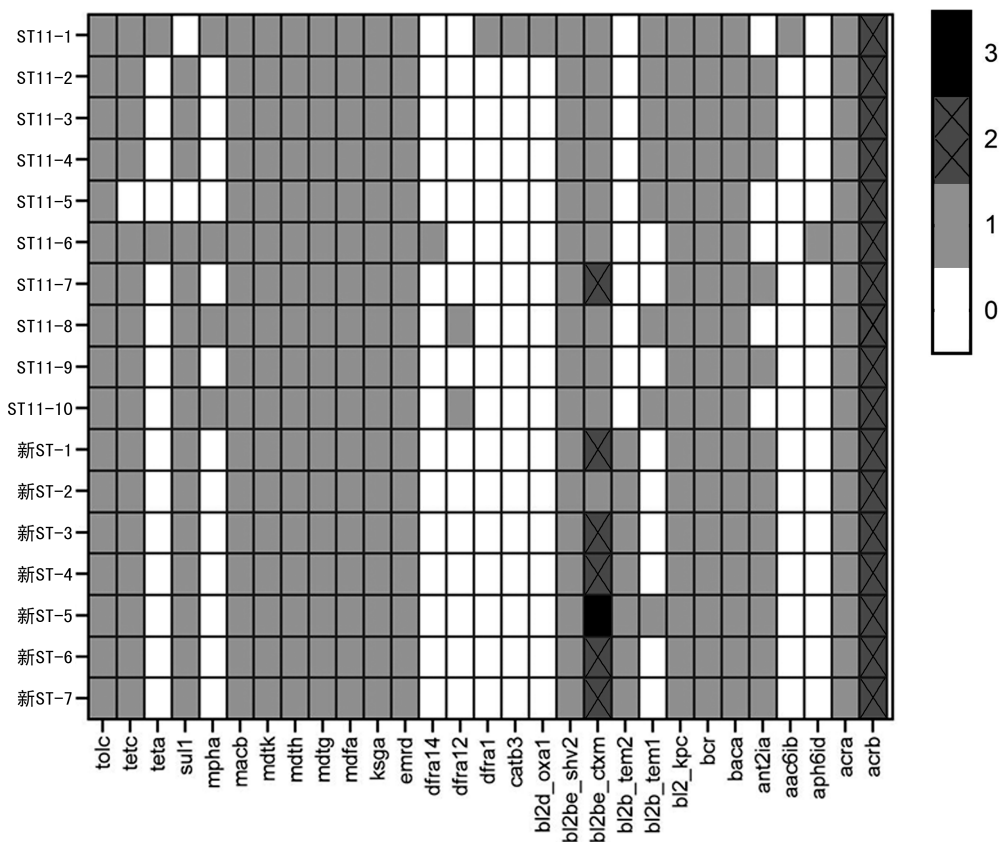
图 1 ST11 型与新 ST 型的 Blast 序列对比图

2.3 CR-hvKP 的耐药基因分析 对基因组测序结果进行耐药基因分析,共检出 29 种耐药基因,涉及 8 类抗菌药物耐药表型,见图 2。17 株 CR-hvKP 各自携带 18~25 个耐药基因,见图 2。新 ST 型与 ST11 型相比所携带的耐药基因存在较多差异:7 株新 ST 型菌株均携带两种及以上 *bla*_{CTX-M} 基因,而 ST11 型仅 1 株(10%,1/10)携带两种 *bla*_{CTX-M} 基因(*bla*_{CTX-M-65} 和 *bla*_{CTX-M-27});新 ST 型中 *bla*_{TEM-1} 基因占 14%(1/7),ST11 型为 70%(7/10);*bla*_{TEM-2} 基因仅存在于新 ST 型菌株,而 *bla*_{OXA-1} 基因仅在 ST11 型中出现,见图 2。CR-hvKP 基因组中存在多种耐药基因,包括 5 种氨基糖苷类的基因(*aph6id*、*aac6ib*、*ant2ia*、*acrb*、*acra*),3 种甲氧嘧啶耐药基因(*dfra14*、*dfra12*、*dfra1*),2 种大环内酯类的耐药基因(*mpha*、*macb*),2 种磷霉素耐药基因(*mdth*、*mdtg*),2 种四环素耐药基因(*tetc*、*teta*),磺胺类耐药基因(*sul1*)、喹诺酮类耐药基因(*mdtk*)和氯

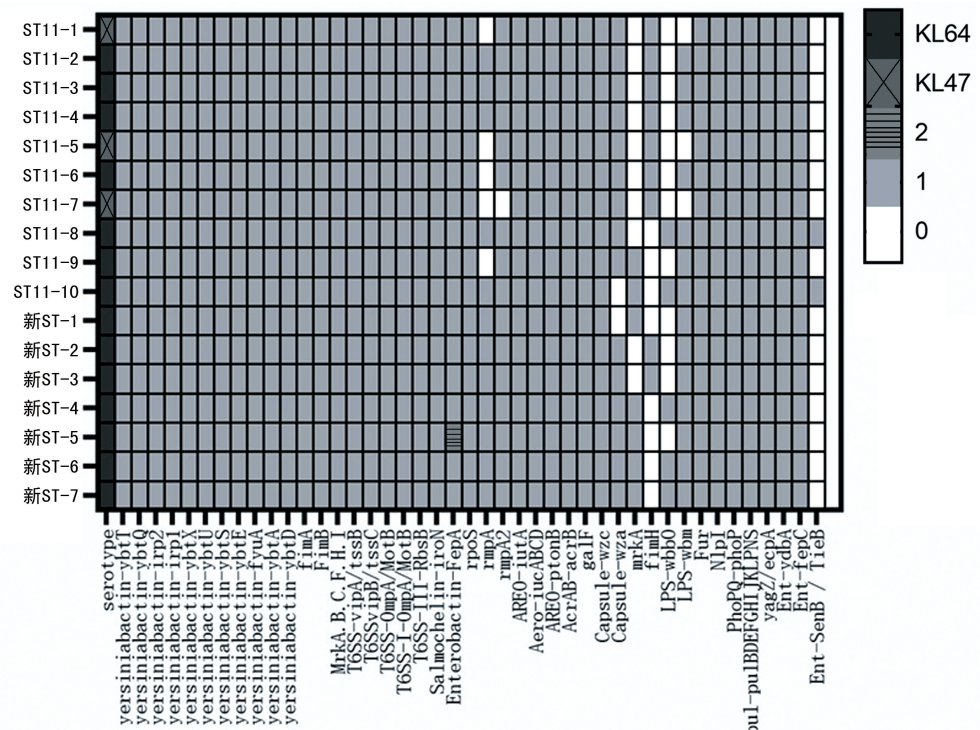
霉素类耐药基因(*catb3*)各 1 种。ST11 型菌株携带的耐药基因较新 ST 型菌株更加复杂多元化。见图 2。

2.4 CR-hvKP 毒力基因分析 17 株 CR-hvKP 菌株共检测到两种荚膜血清型,包括 14 株(82.4%,14/17)KL64 和 3 株 KL47(17.6%,3/17)。10 株 ST11 型菌中有 7 株(70.0%,7/10)为 KL64,3 株(30%,3/10)为 KL47,7 株新 ST 型菌株均为 KL64 型(100.0%,7/7)。CR-hvKP 菌株毒力基因数据分析共获得 60 多种相关毒力基因,包括铁载体编码基因气杆菌素(*iutA*、*iucA*、*iucB*、*iucC*、*iucD* 等)、耶尔森菌素(*ybtA*、*ybtD*、*ybtE*、*ybtP*、*ybtQ*、*ybtS*、*ybtT*、*ybtU*、*irp1*、*irp2* 等)、沙门菌素(*iroN*)、肠杆菌素(*ydbA*、*SenB*、*TieB*、*fepC*)、荚膜多糖编码基因 Capsule(*galF*、*wza* 等)、脂多糖编码基因 LPS(*wbb0* 和 *wzm*)、高黏液表型调节因子(*rmpA*、*rmpA2*)、菌毛相关编码基因(*mrkA*、*fimH* 等)、转录调控因子(*RcsAB*、*fur*),以及

Ⅳ型分泌系统相关编码基因等。有 12 株 CR-hvKP 见图 3。
菌株同时检测出 iucA、rmpA、rmpA2 和 iroN 基因。



注:0 为未携带该基因;1 为携带 1 种亚型基因;2 为携带 2 种亚型基因;3 为携带 3 种亚型基因。
图 2 17 株 CR-hvKP 分离株的耐药基因分布



注:0 为未携带该基因;1 为携带 1 种亚型基因;2 为携带 2 种亚型基因。
图 3 17 株 CR-hvKP 分离株毒力相关基因的分布

2.5 耐药与毒力基因差异分析 ST11 型流行株与 新 ST 型菌株中, 耐药基因 bla_{CTX-M-27}、bla_{TEM-1}、

bla_{TEM-2}、ant2ia、sul1 和毒力基因 rmpA 分布比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 CR-hvKP 分离株不同 ST 型菌株的主要差异耐药基因和毒力基因分布[n(%)]

耐药种类与毒力基因	ST11 (n=10)	新 ST (n=7)	P
耐药基因			
碳青霉烯类/ β -内酰胺类			
bla _{CTX-M-27}	2(20.0)	6(86.0)	0.015
bla _{CTX-M-14}	0(0.0)	1(14.0)	0.412
bla _{TEM-1}	7(70.0)	1(14.0)	0.049
bla _{TEM-2}	0(0.0)	7(100.0)	<0.001
bla _{OXA-1}	1(10.0)	0(0.0)	1.000
氨基糖苷类			
aac61b	1(10.0)	0(0.0)	1.000
ant2ia	5(50.0)	7(100.0)	0.044
四环素类			
tetC	8(80.0)	7(100.0)	0.485
tetA	2(20.0)	0(0.0)	0.485
磺胺类			
sul1	5(50.0)	7(100.0)	0.041
大环内酯类			
mphA	4(40.0)	0(0.0)	0.103
甲氧苄啶类			
dfra14	1(10.0)	0(0.0)	1.000
dfra12	2(20.0)	0(0.0)	0.485
dfra1	1(10.0)	0(0.0)	1.000
氯霉素类			
catB3	1(10.0)	0(0.0)	1.000
毒力基因			
Enterobactin			
fepC	2(20.0)	0(0.0)	0.485
LPS			
wbb0	2(20.0)	1(14.0)	1.000
高黏液表型调节因子			
rmpA	5(50.0)	7(100.0)	0.044
rmpA2	9(90.0)	7(100.0)	1.000
Type I fimbriae			
fimH	7(70.0)	2(29.0)	0.092
Type III fimbriae			
mrkA	2(20.0)	3(43.0)	0.593

3 讨 论

既往临床认为 hvKP 除对氨苄西林天然耐药外,对临床常用抗菌药物保持高敏感性,随着 CRKP 的分离率日益增加,目前已有 hvKP 耐药性增加的报道^[8-10],尤其 CR-hvKP 的报道逐渐增多,使得临床上最为广泛使用的碳青霉烯类药物无法有效控制 KP 感染,临床治疗难度增加,甚至引起了医院内感染暴发流行^[11]。本研究通过对临床分离自痰液和尿液标本的 17 株 CR-hvKP 菌株的基因序列进行分析,描绘了其携带的耐药基因、毒力基因、分子型别等相关分子生物信息学的分布情况,以期为临床制订治疗策略提供相应的理论依据。

CR-hvKP 二代测序结果显示,17 株菌株均为国际流行的 CC258 克隆复合群,其中 ST11 型为主要流行株,与全国细菌耐药检测网(CHINET)报道结果一致^[12]。17 株 CR-hvKP 携带多种与抗菌药物耐药相关的基因,包括 β -内酰胺类基因(bla_{TEM}、bla_{CTX-M} 和 bla_{SHV})和碳青霉烯酶基因(bla_{KPC} 和 bla_{OXA})^[13-14],其中编码丝氨酸酶 KPC 基因(bla_{KPC-2})存在于全部 CR-hvKP 菌株中,是本院 KP 最常见的耐碳青霉烯类抗菌药物的决定性基因^[15]。临床应重视位于质粒上的 bla_{KPC-2}、bla_{CTX-M} 和 bla_{TEM} 基因^[16],以防止这些基因在细菌间水平转移产生更多耐药菌,甚至引起医院内感染的暴发流行。 β -内酰胺类耐药基因方面,所有 CR-hvKP 均检测出 bla_{CTX-M} 基因,ST11 型菌株主要为 bla_{TEM-1} 基因,但新 ST 型菌株携带了更多的 bla_{CTX-M} 亚型(两种以上),如 bla_{TEM-2}^[17],TEM-2 含有赖氨酸,识别水解抗菌药物的能力强于 TEM-1,ST11 型流行株与新 ST 型菌株耐药基因 bla_{TEM-1}、bla_{TEM-2} 检测结果有明显差异;bla_{CTX-M-65} 是 ST11 型和新 ST 型菌株中检测出最多的 β -内酰胺类亚型,但新 ST 型中存在更多的 bla_{CTX} 亚型,可能与其存在更复杂的耐药机制及存在耐药进化有关,表明新 ST 型菌株在耐药方面情况更复杂,更严峻。另外,本研究的 CR-hvKP 基因组中还检测到了除上述基因外的其他类型的耐药基因,这些基因有可能导致产生耐药谱更为广泛的超级耐药菌,对我国乃至国际公共卫生安全产生巨大威胁^[18]。值得注意的是,新 ST 型与 ST11 型菌株相比,虽然体外药敏实验结果显示 ST11 型对阿米卡星多为敏感,但是实际上新 ST 型基因组中氨基糖苷类耐药基因 ant2ia 携带率明显高于 ST11 型,造成体外药敏实验与耐药基因携带情况相悖的原因仍需要进一步研究。由于体外实验无法完全代表体内情况,此类药物具体临床疗效仍需进一步确认。新 ST 型磺胺类药物耐药基因 sul1 的携带率高于 ST11 型,但体外药敏实验结果表现为新 ST 型与 ST11 型无明显差异,所以复方磺胺类药物是否可用于治疗新 ST 型感染需进一步深入研究。体外药敏实验未发现对替加环素和多黏菌素耐药的 CR-hvKP 菌株,但检测到 tet 耐药基因,因此,临床治疗 CR-hvKP 感染时替加环素是否达到疗效,有待进一步观察研究。

毒力基因结果发现研究的菌株携带 60 多种毒力相关基因,包括荚膜多糖、与侵袭相关的基因、与黏附相关的基因、与荚膜形成相关的基因、与高毒力相关的 rmpA/rmpA2 基因、与宿主多部位散播感染和细胞内生长相关的铁载体编码基因、与生物膜相关的编码基因和与宿主不同部位免疫防御相关的编码基因。既往研究显示,hvKP 菌株中最常见的荚膜血清型为 K1、K2、K5、K20、K54 和 K57,其中 K1 和 K2 最多见,而 CR-hvKP 菌株的血清荚膜分型目前文献报道

的有 K1、K2、K20、KL64 和 KL47, 中国的 CR-hvKP 菌株的荚膜血清分型以 KL64 型为主^[19-20]。本研究中 CR-hvKP 菌株中 14 株(82.4%)为 KL64, 3 株为 KL47(17.6%), 与以往研究结果一致^[21]。无论是 ST11 型还是新 ST 型的 CR-hvKP 中都包含上述所有类别的毒力基因, 毒力基因总体分布无差异。但不同菌株毒力基因的数目有所不同, 说明 CR-hvKP 在毒力方面仍呈进化趋势。与 ST11 型相比, 新 ST 型 rmpA 基因的携带率明显较高, 可能与新 ST 型形成时的点突变相关。既往研究发现, hvKP 菌株常携带 pLVPK 质粒或 pLVPK-like 质粒, 并可通过检测 iucA、rmpA、rmpA2 和 iroN 基因初步判定是否携带两种质粒^[22]。本研究结果还显示有 12 株菌均检测出 4 种相关毒力基因, 推测本院的 CR-hvKP 菌株可能为产 KPC-2 酶的 ST11 型 CRKP 菌株获得相关毒力质粒进化而来, 与国内报道一致^[23]。毒力质粒相关研究及新 ST 型形成和进化机制将在未来试验中进一步阐述。

综上所述, 本院 CR-hvKP 菌株全部是由 CC258 克隆系组成, 主要为 ST11 型和新 ST 型流行株, ST11 型仍是目前本院和国内临床最常见的类型。CR-hvKP 菌基因组存在多种碳青霉烯类耐药基因及大量其他类型耐药基因, 携带多种毒力基因和两种荚膜血清型(KL64 和 KL47), 不同 MLST 分型菌株的部分耐药基因与毒力基因分布有差异。本研究为单中心回顾性观察研究, 样本量较少, 仅对研究菌株进行基因序列分析, 未结合临床特点和治疗用药等。因此, 在未来研究中急需选取有代表性的 CR-hvKP 菌株进行全基因组筛查, 结合患者临床资料进行综合分析, 进一步揭示新 ST 型形成及 CR-hvKP 进化的具体机制, 帮助临床精准诊断, 并为治疗患者提供针对性的方案。

参考文献

- [1] DU L, ZHANG J, LIU P, et al. Genome sequencing and comparative genome analysis of 6 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in China[J]. Arch Microbiol, 2021, 203(6): 3125-3133.
- [2] ZHANG J, ZHOU K, ZHENG B, et al. High prevalence of esbl-producing *Klebsiella pneumoniae* causing community-onset infections in China[J]. Front Microbiol, 2016, 7: 1830.
- [3] HAO M, SHI X, LV J, et al. In vitro activity of apramycin against carbapenem-resistant and hypervirulent *klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 425.
- [4] LIAO W, LIU Y, ZHANG W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a review over the last 10 years[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 23: 174-180.
- [5] SHANKAR C, JACOB J J, VASUDEVAN K, et al. Emergence of multidrug resistant hypervirulent ST23 *Klebsiella pneumoniae*; multidrug resistant plasmid acquisition drives evolution[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 20: 10.
- [6] 刘鑫磊, 滑明溪, 王慧珠, 等. 基于全基因组序列的耐碳青霉烯鲍曼不动杆菌的耐药与毒力研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2020, 14(5): 367-373.
- [7] RUSSO T A, MARR C M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3): e00001-19.
- [8] 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.
- [9] BIALEK-DAVENET S, CRISCUOLO A, AILLOUD F, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups[J]. Emerg Infect Dis, 2014, 20(11): 1812-1820.
- [10] XU M, LI A, KONG H S, et al. Endogenous endophthalmitis caused by a multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain belonging to a novel single locus variant of ST23; first case report in China[J]. BMC Infect Dis, 2018, 18(1): 669.
- [11] LIU C, DU P, XIAO N, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* is emerging as an increasingly prevalent *K. pneumoniae* pathotype responsible for nosocomial and healthcare-associated infections in Beijing, China[J]. Virulence, 2020, 11(1): 1215-1224.
- [12] ZHANG Y, JIN L, OUYANG P, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(2): 327-336.
- [13] ZHANG X, OUYANG J, HE W, et al. Co-occurrence of rapid gene gain and loss in an interhospital outbreak of carbapenem-resistant hypervirulent ST11-K64 *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 579618.
- [14] KATHERINE A T, THEA B, KENNETH P S. Evaluation of apramycin activity against methicillin-resistant, methicillin-sensitive, and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* clinical isolates[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2018, 92(2): 168-171.
- [15] LI J, HUANG Z Y, YU T, et al. Isolation and characterization of a sequence type 25 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from the mid-south region of China[J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 219.
- [16] DONG N, LIU L, ZHANG R, et al. An incr plasmid harbored by a hypervirulent carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* strain possesses five tandem repeats of the blaKPC-2:NTEKPC-Id fragment[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(3): e01775-18.
- [17] CHAÍBI E B, FARZANEH S, PÉDUZZI J, et al. An additional ionic bond suggested by molecular modelling of TEM-2 might induce a slight discrepancy between catalytic properties of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases[J]. FEMS Microbiol Lett, 1996, 143(2/3): 121-125. (下转第 2980 页)

细胞被大量损伤,引起 PGⅠ水平明显降低,而胃其他部位的细胞分泌大量的 PGⅡ进入血液,引起 PGⅡ血清水平升高^[20]。HLA-G 直接参与胃癌肿瘤免疫应答,可抑制 T 细胞和 NK 细胞的功能,促进胃癌的发展^[21]。本研究结果提示,PGⅠ、PGⅡ、PGR、HLA-G 在早期胃癌及癌前病变患者间存在明显差异。通过 ROC 曲线分析发现,PGⅠ、PGⅡ、PGR、HLA-G 联合检测诊断早期胃癌的 AUC 明显高于单独及两项联合检测。

综上所述,PGⅠ、PGⅡ、PGR、HLA-G 对早期胃癌具有良好的诊断价值,4 项指标联合检测有助于提高临床诊断价值。

参考文献

[1] 林艳,吕小锦,马玲敏,等.胃蛋白酶原联合幽门螺杆菌对早期胃癌筛查的价值[J].中国卫生检验杂志,2020,30(2):189-191.

[2] 韦娜,何三军.血清胃蛋白酶原对胃癌患者预后的预测价值[J].徐州医科大学学报,2020,40(6):419-422.

[3] 伍玉婷,张雪辉,庞子娟,等.胃蛋白酶原及比值、胃泌素-17、幽门螺杆菌 IgG 抗体检测在胃癌筛查中的价值研究[J].标记免疫分析与临床,2020,27(9):1516-1519.

[4] 徐丹萍,章彤彤,王青,等.胃癌患者外周血 HLA-G 表达水平研究及其临床意义[J].中华微生物学和免疫学杂志,2016,36(7):487-493.

[5] 杨友鹏,赵晓琳,牟方宏,等.胃癌患者血清可溶性人白细胞抗原-G、生长分化因子 15 水平变化及临床意义[J].中国中西医结合消化杂志,2019,27(4):280-283.

[6] 胡玲,张滔,唐静,等.长非编码 RNA HOTAIR 调控胃癌细胞 SGC-7901 来源肿瘤干细胞样细胞[J].中国生物化学与分子生物学报,2018,34(4):440-445.

[7] 张逸彪,郭丽丽,杨辰.胃癌前病变患者胃蛋白酶原、促胃液素-17 水平变化及幽门螺杆菌感染情况[J].中国微生物学杂志,2020,32(3):306-308.

[8] 葛海燕,陈桂明.胃蛋白酶原水平与幽门螺杆菌感染及胃黏膜疾病分析[J].临床血液学杂志,2020,33(2):97-100.

[9] 雷洪军,潘金,曹丽鹏,等.血清胃泌素-17、胃蛋白酶原Ⅰ、胃蛋白酶原Ⅱ、同型半胱氨酸在萎缩性胃炎患者表达的临床意义[J].实用医院临床杂志,2020,17(5):135-

138.

[10] 仁青东主,华青措,斗周才让,等.慢性萎缩性胃炎藏医四诊表象与 G17 及 PGⅠ/PGⅡ的相关性研究[J].中华中医药杂志,2019,34(8):3736-3738.

[11] 蔡利军,马海波,施易辉,等.血清胃蛋白酶原检测在胃癌高风险人群中的应用价值及中医证候相关性研究[J].浙江中医药大学学报,2020,44(4):332-338.

[12] 刘兵,赵勇,潘旭松,等.胃蛋白酶原与肿瘤标志物联合检测在胃癌诊断中的临床价值[J].中国现代普通外科进展,2019,22(8):655-656.

[13] 康晶,马振东,程慧,等.血清胃蛋白酶原检测在萎缩性胃炎和胃癌诊断中的临床意义[J].大连医科大学学报,2020,42(2):128-132.

[14] 赵娟娟,雷鑫明,孙爱华.胃癌及萎缩性胃炎患者血清胃蛋白酶原和幽门螺旋杆菌抗体检测的临床意义[J].中国卫生检验杂志,2020,30(12):1455-1457.

[15] 崔创撑,时宏,田景坤,等.ME-NBI 和多层螺旋 CT 对早期胃癌诊断价值分析[J].现代消化及介入诊疗,2019,24(1):94-96.

[16] 刘思涵,孙祥,汪毅,等.胃癌患者血清 sHLA-E 和 sHLA-G 的表达水平及临床意义[J].湖南师范大学学报(医学版),2019,16(3):30-34.

[17] 谭银利,陈和安,刘飞.外周血胃蛋白酶原Ⅰ与胃泌素-17 及可溶性人白细胞抗原-G 检测对胃癌的诊断价值[J].中国临床药理学杂志,2017,33(10):945-947.

[18] 高涛,高媛.血清可溶性人类白细胞抗原 G 在胃癌患者中的检测价值[J].国际检验医学杂志,2017,38(15):2133-2135.

[19] 周宇,陈蓉,夏先根.CEA 联合 sHLA-G、PG、DKK-1 在胃癌早期诊断及淋巴结转移预测中的临床价值[J].华南国防医学杂志,2020,34(5):314-317.

[20] 郭英杰,于海东,李鲜爱.血清胃蛋白酶原检测与胃镜检查诊断萎缩性胃炎的临床价值比较[J].现代消化及介入诊疗,2020,25(6):791-793.

[21] 丁娟,郑桂喜,杜鲁涛,等.外周血 sHLA-G 与 PGR、GPR 联合检测在胃癌诊断中的效能评估[J].山东大学学报(医学版),2015,12(11):59-63.

(收稿日期:2021-05-13 修回日期:2021-10-12)

(上接第 2976 页)

[18] FANG C T, CHUANG Y P, SHUN C T, et al. A novel virulence gene in Klebsiella pneumoniae strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications [J]. J Exp Med, 2004, 199(5):697-705.

[19] LI C, MA G, YANG T, et al. A rare carbapenem-resistant hypervirulent K1/ST1265 Klebsiella pneumoniae with an untypeable blaKPC-harboured conjugative plasmid [J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 22:426-433.

[20] STRUVE C, ROE C C, STEGGER M, et al. Mapping the evolution of hypervirulent Klebsiella pneumoniae [J]. mBio, 2015, 6(4):e00630.

[21] LI J, SHENG Y, MA R, et al. Identification of a depolymerase specific for K64-Serotype Klebsiella pneumoniae: potential applications in capsular typing and treatment [J]. Antibiotics (Basel), 2021, 10(2):144.

[22] YAO H, QIN S S, CHEN S, et al. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1):25.

[23] DU P, ZHANG Y, CHEN C. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent Klebsiella pneumoniae [J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1):23-24.

(收稿日期:2021-02-12 修回日期:2021-07-17)