

网络出版时间: 2020-12-9 14:55 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201208.0843.022.html>

◇ 预防医学研究 ◇

## 安徽地区高黏液表型肺炎克雷伯菌分子流行病学研究

孙凯莉<sup>1</sup>, 刘周<sup>2</sup>, 刘艳艳<sup>3</sup>, 李家斌<sup>1,3</sup>

**摘要** 分析比较 2017 年 9 月及 2018 年 9 月安徽地区高黏液表型肺炎克雷伯菌的耐药性、毒力基因、荚膜基因和 ST 型分布, 为制定菌株防治措施提供依据。通过黏液丝实验筛选菌株 137 株; 琼脂平板稀释法检测抗菌药的最低抑菌浓度; 聚合酶链式反应检测毒力基因及荚膜血清型; 多位点序列分型技术进行分子分型; 分别比较菌株毒力基因 *rmpA* 或者 *rmpA2* 的阳性组与阴性组毒力基因携带率。137 株菌主要来自痰标本, 在 70~79 岁分离率最高; 菌株对于庆大霉素和左氧氟沙星的耐药率有所升高; 两个年度中均以 *aerobactin* 携带率最高; 2017 年以 K2、ST65 型为主, 2018 年以 K1、ST23 型为主; *rmpA* 阳性组 *rmpA2* 携带率和 70~79 岁感染率高于阴性组, *rmpA2* 阳性组 *kfu* 携带率和 70~79 岁感染率高于阴性组。应综合菌株表型及基因来鉴定菌株类型以便及时治疗。

**关键词** 肺炎克雷伯菌; 毒力基因; 高黏液表型

中图分类号 R 517.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)01-0121-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.01.023

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*, KP) 在近几年已成为社区获得性感染和医院感染的重要病原体<sup>[1]</sup>。高毒力肺炎克雷伯菌 (hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, HvKP) 以能引起多部分脓肿的感染特征引起广泛关注, 其具有的高黏液性与高毒力性均与其荚膜密切相关, 实验室常根据高黏液表型来筛选<sup>[2]</sup>。目前认为只依据高黏液表型来筛选会存在漏检, 携带了毒力因子 *rmpA* 或者 *rmpA2* 的高黏液表型肺炎克雷伯菌 (hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*, HMKP) 更可能为 HvKP<sup>[3]</sup>。HvKP 目前在全球具有广泛的分布, 多重耐药的 HvKP 临床分离株

已出现, 这使其治疗管理变得更加困难<sup>[4]</sup>。该研究主要对比前后两年菌株分子流行病学特征变化, 为临床合理用药提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株来源** 收集 2017 年 9 月及 2018 年 9 月份安徽省 26 家医院的 KP 非重复临床分离株, 筛选出具有高黏液表型的菌株。通过 VITEK-2 Compact 全自动微生物分析系统对细菌进行鉴定。由安徽省细菌耐药中心提供药敏质控菌大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

**1.1.2 主要仪器和试剂** VITEK-2 Compact 全自动细菌分析仪 (法国公司 Biomerieux); 生物安全柜 (山东新华医疗器械股份公司); 细菌多点接种仪 (英国 AQS Manufacturing 公司); PCR 仪器 (德国 Biometra 公司); 凝胶成像仪 (上海天能科技有限公司); 琼脂糖和染料、PCR 引物 (上海生工生物公司); 10 种药物 (中国食品药物检定研究院)。

#### 1.2 方法

**1.2.1 黏液丝实验** 用无菌接种环轻轻接触过夜培养好的新鲜菌落并对外牵拉, 若两次黏液丝均大于 5 mm 即具有高黏液表型, 该菌株则为 HMKP<sup>[5]</sup>。

**1.2.2 药敏试验** 参照 2017 版美国临床实验室标准协会推荐的标准<sup>[6]</sup> 判读结果, 采用琼脂平板稀释法测定 137 株菌对于 10 种常用抗菌药物的最低抑菌浓度。

**1.2.3 毒力基因及荚膜血清型检测** 用煮沸法提取各菌株的 DNA, 采用 PCR 方法检测 6 种毒力基因<sup>[7-8]</sup>, 包括 *aerobactin*、*magA*、*rmpA*、*rmpA2*、*iroNB*、*kfu*, 同样方法检测 *wzi* 获得不同的荚膜血清型<sup>[9]</sup>, 由上海生工生物有限公司合成所有引物。各菌株的 PCR 产物进行凝胶电泳后记录结果并进行比对。

**1.2.4 多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST)** 参照 MLST 官网的引物序列合成管家基因 (*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB*)<sup>[10]</sup>, 并进行扩增, 由上海生工生物有限公司对 PCR 纯化后

2020-09-09 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81673242); 安徽省自然科学基金 (编号: 1908085QH366)

作者单位: <sup>1</sup> 安徽医科大学附属巢湖医院感染病科, 合肥 238000

<sup>2</sup> 安徽医科大学第二附属医院检验科, 合肥 230601

<sup>3</sup> 安徽医科大学第一附属医院感染科, 合肥 230022

作者简介: 孙凯莉, 女, 硕士研究生;

李家斌, 男, 教授, 主任医师, 博士生导师, 责任作者,

E-mail: lijiaabin@ahmu.edu.cn

表1 各年度 HMKP 对常用抗菌药药敏结果( %)

抗菌药物	2017 年( 69 株)			2018 年( 68 株)			总菌株( 137 株)		
	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感	耐药	中介	敏感
哌拉西林/他唑巴坦	1.45	1.45	97.10	4.41	1.47	94.12	2.92	1.46	95.62
头孢他啶	2.90	1.45	95.65	5.88	1.47	92.65	4.38	1.46	94.16
头孢曲松	4.35	0	95.65	7.35	1.47	91.18	5.84	0.73	93.43
头孢吡肟	4.35	0	95.65	5.88	14.71	79.41	5.11	7.30	87.59
氨曲南	1.45	1.45	97.10	5.88	0	94.12	3.65	0.73	95.62
亚胺培南	1.45	0	98.55	4.41	0	95.59	2.92	0	97.08
阿米卡星	2.90	0	97.10	2.94	4.41	92.65	2.92	2.19	94.89
庆大霉素	0	0	100	8.82	0	91.18	4.38	0	95.62
环丙沙星	1.45	1.45	97.10	7.35	0	92.65	4.38	0.73	94.89
左氧氟沙星	0	0	100	7.35	0	92.65	3.65	0	96.35

的产物进行测序。在 MLST 数据库官网( <http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>) 进行比对, 得到各菌株对应的 ST 型。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 22.0 软件进行数据分析。两组样本间率的比较采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 精确概率法  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 HMKP 检出率 2017 年分离出 KP 为 657 株, 从其中的 18 家医院分离出 69 株 HMKP, 分离率为 10.50%; 2018 年分离出的 KP 为 707 株, 从其中 14 家医院分离出 68 株 HMKP, 分离率为 9.62%。

2.2 菌株分布情况 标本来源分布: 两年里 137 株菌分离出的痰液标本有 104 株, 尿液标本 9 株, 脓液和分泌物标本各 6 株, 血液标本 5 株, 咽拭子 4 株, 腹水、引流液、未知标本各 1 株。年龄段分布: 1~49 岁有 17 株, 50~59 岁 21 株, 60~69 岁 36 株, 70~79 岁 42 株, 80~89 岁 17 株, 90~99 岁 4 株。科室分布: 菌株检出率在 5 株以上的科室有呼吸内科 24 株, ICU 17 株, 心内科 10 株, 急诊科 9 株, 神经外科、神经内科各 8 株, 普外科、感染病科、肿瘤科各 6 株, 泌尿外科 5 株。菌株主要疾病分布: 脑部疾病 25 株, 呼吸系统疾病 17 株, 心血管疾病 6 株, 恶性肿瘤 11 株。

2.3 药敏结果分析 2017 年菌株对庆大霉素和左氧氟沙星的耐药率为 0%。2018 年菌株对庆大霉素、左氧氟沙星的耐药率分别为 8.82%、7.35%。137 株菌对于头孢曲松的耐药率最高, 为 5.84%。见表 1。

2.4 毒力基因检测结果 2017 年以 *iroNB* (91.30%) 和 *aerobactin* (88.41%) 的携带率最高, *rmpA*、*rmpA2*、*kfu*、*magA* 分别为 66.67%、53.62%、44.93% 和 13.04%。2018 年以 *aerobactin*

(88.24%) 和 *rmpA* (80.88%) 携带率最高, *rmpA2*、*kfu*、*iroNB*、*magA* 分别为 63.24%、48.53%、33.82% 和 26.47%。两年的总菌株以 *aerobactin* (88.32%) 携带率最高, *rmpA*、*iroNB*、*rmpA2*、*kfu*、*magA* 的携带率分别为 73.72%、62.77%、58.39%、46.72%、19.71%。

2.5 荚膜血清型检测结果 2017 年以 K2 型为主, 其次为 K1 型和 K23 型, K14K4 型、K14K64 型、K2 型、K20 型、K21 型、K5 型、K54 型、K57 型、K63 型各 1 株, 其余未分型。2018 年以 K1 型为主, 其次为 K2、K57、K63 型, K14K64、K5 型各 2 株, K20、K23、K24、K25、K54 型各 1 株, 其余未分型。两年里 137 株菌以 K2 型和 K1 型为主, K23、K57、K63 型各 4 株, K14K64、K5 型各 3 株, K20、K54 型各 2 株, K14K4、K21、K24、K25 型各 1 株, 其余未分型。137 株菌 K1 型包含 14 种毒力基因携带模式, 而 K2 型包含 19 种毒力基因携带模式, 见表 2。

表2 各年份主要荚膜型主要的毒力基因携带模式

荚膜型(株数)	毒力基因携带模式	株数
2017 年		
K1(12)	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	5
K2(28)	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	4
	<i>aerobactin rmpA iroNB</i>	4
	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB</i>	4
2018 年		
K1(15)	<i>aerobactin magA rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	5
K2(13)	<i>aerobactin rmpA</i>	3
	<i>aerobactin rmpA rmpA2</i>	3
总菌株		
K1(27)	<i>aerobactin magA rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	6
	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	5
K2(41)	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB kfu</i>	5
	<i>aerobactin rmpA iroNB</i>	4
	<i>aerobactin rmpA rmpA2 iroNB</i>	4

**2.6 MLST 分型** 2017 年(69 株)分为 27 种 ST 型别,以 ST65、ST23、ST86、ST412 最常见,比例分别为 17.39%、14.49%、14.49%、13.04%。2018 年(68 株)分为 31 种 ST 型别,以 ST23、ST86、ST412、ST592 为主,分别为 20.59%、10.29%、5.88%、5.88%。137 株菌分为 43 种 ST 型,以 ST23、ST86、ST65、ST412 为主,分别为 17.52%、12.41%、10.95%、9.49%。见表 3。

表 3 137 株高黏液性肺炎克雷伯菌的 ST 序列分型

ST 型	株数	ST 型	株数	ST 型	株数
ST11	1	ST268	2	ST721	1
ST23	24	ST281	1	ST727	1
ST25	3	ST290	1	ST793	1
ST29	3	ST307	1	ST881	1
ST39	1	ST314	1	ST1049	4
ST45	2	ST340	1	ST1265	1
ST60	2	ST367	5	ST1266	1
ST65	15	ST375	3	ST1333	1
ST70	1	ST380	3	ST1552	1
ST86	17	ST412	13	ST1660	1
ST87	1	ST505	1	ST1764	1
ST111	4	ST524	1	ST1805	1
ST138	1	ST592	6	ST3536	1
ST216	1	ST685	1		
ST218	4	ST700	1		

**2.7 rmpA 或者 rmpA2 阳性组与阴性组的比较** 在 137 株菌中 rmpA 阳性组的毒力基因 rmpA2 携带率高于其阴性组, rmpA2 阳性组的毒力基因 kfu 携带率高于其阴性组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在 137 株菌中 rmpA 阳性组中 70~79 岁的感染率要高于阴性组,同时 rmpA2 阳性组中 70~79 岁的感染率也高于阴性组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 4、5。

表 4 rmpA 阳性组与阴性组的比较 [n(%) ]

指标	rmpA 阳性组 (n=101)	rmpA 阴性组 (n=36)	$\chi^2$ 值	P 值
毒力基因				
rmpA2	69(68.32)	11(30.56)	15.577	<0.001
aerobactin	92(91.09)	29(80.56)	2.855	0.091
kfu	52(51.49)	12(33.33)	3.513	0.061
iroNB	62(61.39)	24(66.67)	0.317	0.574
magA	23(22.77)	4(11.11)	2.281	0.131
年龄(岁)				
60~69	25(24.75)	11(30.56)	0.461	0.497
70~79	37(36.63)	5(13.89)	6.459	0.011

表 5 rmpA2 阳性组与阴性组的比较 [n(%) ]

指标	rmpA2 阳性组 (n=80)	rmpA2 阴性组 (n=57)	$\chi^2$ 值	P 值
毒力基因				
aerobactin	71(88.75)	50(87.72)	0.034	0.853
kfu	44(55.00)	20(35.09)	5.302	0.021
iroNB	50(62.50)	36(63.16)	0.006	0.937
magA	15(18.75)	12(21.05)	0.112	0.738
年龄(岁)				
60~69	21(26.25)	15(26.32)	0.000	0.993
70~79	30(37.50)	12(21.05)	4.236	0.040

### 3 讨论

HMKP 主要分离自具有心脑血管疾病、呼吸系统疾病和肿瘤患者,可能与疾病导致抵抗力下降相关<sup>[11]</sup>。目前碳青霉烯类药物仍是治疗 HvKP 感染的常用药,菌株对常用抗菌药耐药性仍较低<sup>[12]</sup>。本研究表明 2018 年的 HMKP 对庆大霉素和左氧氟沙星的耐药率相较于 2017 年有所增加。

aerobactin 和 kfu 为铁载体, rmpA 与 rmpA2 具有极高的同源性且参与荚膜多糖的合成。magA 负责 K 抗原的合成<sup>[13]</sup>。iroNB 也属于铁载体<sup>[5]</sup>。本研究表明两年里都以 aerobactin 的检出率最高,以 magA 检出率最低。HvKP 可根据荚膜多糖分为 82 个荚膜型, K1 和 K2 型表现出更强的毒力,更易引起肝脓肿<sup>[14]</sup>。本研究 K1 型和 K2 型都具有多种毒力基因携带模式,毒力基因的种类也比其他荚膜型更多,这可能与其相较于其他荚膜型危害性更强有关。

与 HvKP 密切相关的 ST 型有 ST23、ST65、ST86<sup>[15]</sup>。该研究 2017 年以 ST23 为主,2018 年以 ST65 为主。70~79 岁更易感染携带了 rmpA 或者 rmpA2 毒力基因的 HMKP。这个年龄段若感染了 KP,在未判断出其是否为 HvKP 之前,可经验用抗 HvKP 的药。同时携带 rmpA 和 rmpA2 的 HMKP 更有可能是 HvKP。实验室可将表型和基因型结合起来判断菌株是否为 HvKP 以便及时制定合理有效抗菌药物治疗方案,从而降低细菌耐药情况的发生。

### 参考文献

- [1] 杜芳玲,王莲慧,魏丹丹,等.高毒力肺炎克雷伯菌诱导人外周血中性粒细胞凋亡延迟及其影响核因子- $\kappa$ B 的潜在机制[J].中国感染与化疗杂志 2018,18(4):389-93.
- [2] 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):829-31.
- [3] 吴华,周晓君,李天娇,等.2016 年海南省高毒力肺炎克雷伯菌的临床分布、毒力基因和分子流行病学特点[J].中国感染

- 控制杂志 2018 ,17( 1) : 10 – 5.
- [4] Lee C R , Lee J H , Park K S , et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent : epidemiology , hypervirulence-associated determinants , and resistance mechanisms [J]. *Front Cell Infect Microbiol* , 2017 , 7: 483.
- [5] 李喜红 , 魏丹丹 , 王莲慧 , 等. 临床分离碳青霉烯类耐药与非耐药肺炎克雷伯菌株的血清荚膜类型特征及毒力基因分布研究 [J]. *中华医院感染学杂志* 2018 ,28( 5) : 654 – 8.
- [6] Wayne P A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ( M100 – S26) [S]. CLSI , 2017 , 31 – 4.
- [7] Ye M , Tu J , Jiang J , et al. Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing *Klebsiella pneumoniae* identifies new liver abscess-associated virulence genes [J]. *Front Cell Infect Microbiol* , 2016 , 6: 165.
- [8] Ma L , Wang J T , Wu T L , et al. Emergence of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan [J]. *PLoS One* , 2015 , 10 ( 9) : e0139152.
- [9] Brisse S , Passet V , Haugaard A B , et al. *wzi* Gene sequencing , a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains [J]. *J Clin Microbiol* , 2013 , 51( 12) : 4073 – 8.
- [10] 左 燕 , 赵冬梅 , 李家斌 , 等. 不同克隆耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学分析 [J]. *安徽医科大学学报* , 2020 , 55 ( 3) : 159 – 63.
- [11] Paczosa M K , Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense [J]. *Microbiol Mol Biol Rev* , 2016 , 80 ( 3) : 629 – 61.
- [12] 林佛君 , 胥志超 , 林志伟 , 等. 血流感染高致病性肺炎克雷伯菌毒力因子及分子分型特点分析 [J]. *中国病原生物学杂志* , 2018 , 13( 4) : 364 – 7 , 371.
- [13] 邱世洁 , 余广超 , 温旺荣. 高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展 [J]. *国外医药( 抗生素分册)* 2018 , 39( 2) : 129 – 34.
- [14] 吴翰欣 , 丁家伟 , 高 凌 , 等. 高毒力肺炎克雷伯菌的毒力机制研究进展 [J]. *生物技术通讯* 2018 , 29( 1) : 119 – 22.
- [15] Margaret M C L , Wyres K L , Duchêne S , et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination [J]. *Nat Commun* , 2018 , 9( 1) : 2703 – 13.

## Molecular epidemiological analysis of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* in Anhui Region

Sun Kaili<sup>1</sup> , Liu Zhou<sup>2</sup> , Liu Yanyan<sup>3</sup> , et al

<sup>1</sup>Dept of Infectious Diseases , Chaohu Hospital of Anhui Medical University , Chaohu 238000;

<sup>2</sup>Dept of Clinical Laboratory , The Second Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230601;

<sup>3</sup>Dept of Infectious Disease , The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230022)

**Abstract** To investigate and compare the drug resistance , virulence genes , capsular genes and ST type of Hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ( HMKP) in Anhui region in September 2017 and September 2018 to provide evidences for the formulation of HMKP prevention. 137 strains were isolated and identified by slime test. The minimum inhibitory concentration of antimicrobial drugs was determined by agar dilution method. Polymerase chain reaction was carried out to detect their virulence gene and serotype. Molecular typing was performed with multi-locus sequence typing. The carrying rate between the HMKP virulence gene *rmpA* or *rmpA2* positive group and the negative group was compared. 137 strains were mainly from sputum specimens , and the isolation rate was relatively high in aged 70 – 79. The resistance rate of the strain to gentamicin and levofloxacin had increased. The aerobactin carrying rate was the highest in both years. K2 were the major capsular serotypes and ST65 were the major clones in 2017 , K1 were the major capsular and ST23 were the major clones in 2018. In addition , the HMKP virulence gene *rmpA* positive group was more likely to carry *rmpA2* and infect people aged 70 – 79 than the negative group. The HMKP virulence gene *rmpA2* positive group was more likely to carry the *kfu* and infect people aged 70 – 79 than the negative group. The strains should be defined based on their phenotypes and genes for timely treatment.

**Key word** *Klebsiella pneumoniae*; virulent gene; hypermucoviscous