

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20211269

· 论 著 ·

## 高黏液表型与基因型预测肺炎克雷伯菌毒力的比较

马明葱<sup>1</sup>, 李晓雨<sup>2</sup>, 卓超<sup>2</sup>

(1. 东莞市第一人民医院呼吸内科, 广东 东莞 523000; 2. 广州医科大学附属第一医院呼吸内科, 广东 广州 510000)

**[摘要]** **目的** 评价高黏液表型、毒力基因预测高毒力肺炎克雷伯菌(hvKp)的应用价值。**方法** 收集 2016 年 11 月—2018 年 4 月广东省 4 所医院分离的肺炎克雷伯菌,通过拉丝试验判断菌株黏液表型,检测毒力基因和血清型情况,采用蜡螟模型计算菌株的半数致死率(LD<sub>50</sub>),比较不同高黏液(hm)表型和毒力基因型菌株 LD<sub>50</sub>。**结果** 共收集 194 株肺炎克雷伯菌,拉丝试验阳性菌株占 40.2%(78 株)。蜡螟试验结果显示,仅毒力基因 *iucA*、*iroB*、*fimH* 阳性菌株 LD<sub>50</sub> 低于相应的阴性菌株( $P < 0.05$ )。*iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* 全阳性组( $n = 58$ )、*iucA* 阳性 + *iroB* 阳性 + *fimH* 阳性 + *hm* 阴性组( $n = 23$ )、*iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* 全阴性组( $n = 28$ )3 组 LD<sub>50</sub> 分别为(5.39 ± 0.71)、(5.44 ± 0.62)、(5.83 ± 0.64)log<sub>10</sub> CFU/mL,前两组比较差异无统计学意义( $P = 0.786$ ),但前两组分别与第 3 组比较差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。在高黏液表型菌株中血清型 K1、K2、K57 检出率高于非高黏液表型菌株,差异均有统计学意义(均  $P < 0.001$ )。**结论** 仅依据高黏液表型预测 hvKp 准确性较低,与高黏液表型相比,毒力基因 *iucA* + *iroB* + *fimH* 预测 hvKp 更准确。

**[关键词]** 毒力基因; 拉丝试验; 高毒力肺炎克雷伯菌

**[中图分类号]** R446.5

## Comparison of hypermucoviscous phenotype and genotype in predicting virulence of *Klebsiella pneumoniae*

MA Ming-cong<sup>1</sup>, LI Xiao-yu<sup>2</sup>, ZHUO Chao<sup>2</sup> (1. Department of Respiratory Diseases, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523000, China; 2. Department of Respiratory Diseases, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510000, China)

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the application value of hypermucoviscous phenotype and virulence gene in predicting hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp). **Methods** *Klebsiella pneumoniae* isolated from four hospitals in Guangdong Province from November 2016 to April 2018 were collected, mucoviscous phenotypes were determined through string test, virulence genes and serotypes were detected, 50% lethal rate (LD<sub>50</sub>) of strains was calculated by Galleria mellonella model, LD<sub>50</sub> of strains of different hypermucoviscous phenotypes and virulence genes were compared. **Results** A total of 194 strains of *Klebsiella pneumoniae* were collected, 40.2% ( $n = 78$ ) of which were positive for string test. Galleria mellonella test results showed that LD<sub>50</sub> of only *iucA*, *iroB*, and *fimH* positive strains was lower than that of corresponding negative strains ( $P < 0.05$ ). LD<sub>50</sub> of strain group of all positive for *iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* ( $n = 58$ ), *iucA* positive + *iroB* positive + *fimH* positive + *hm* negative ( $n = 23$ ) and all negative for *iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* ( $n = 28$ ) were (5.39 ± 0.71), (5.44 ± 0.62), and (5.83 ± 0.64) lg<sub>10</sub>CFU/mL respectively, there was no significant difference between the first two groups ( $P = 0.786$ ), but there was significant difference between the first two groups and the third group ( $P < 0.05$ ), positive rates of serotypes K1, K2 and K57 in hypermucoviscous phenotype strains were significantly higher than those in non-hypermucoviscous phenotype strains, difference were all significant (all  $P < 0.001$ ). **Conclusion** Accuracy of the prediction of hvKp based only

[收稿日期] 2021-03-24

[基金项目] 广州市科技重点项目(201607020044)

[作者简介] 马明葱(1990-),女(汉族),重庆市人,硕士研究生,主要从事微生物研究。

[通信作者] 卓超 E-mail:chaosheep@sina.com

on hypermucoviscous phenotype is low, compared with hypermucoviscous phenotype, virulence genes *iucA* + , *iroB* + and *fimH* + are more accurate to prediction hvKp.

[Key words] virulence; string test; hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*

肺炎克雷伯菌属于革兰阴性杆菌,可引起多系统感染<sup>[1]</sup>。与经典肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, CKP)相比,高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp)受到广泛关注,不仅可引起细菌性肝脓肿<sup>[2]</sup>,还可引起脑膜炎、坏死性筋膜炎和眼内膜炎等转移性感染<sup>[3-4]</sup>。hvKp 菌株在琼脂平板上的菌落表现为高黏液性(hypermucoviscous, hm)<sup>[5]</sup>,可引起严重的转移性感染<sup>[6]</sup>。但也有小鼠试验表明,仅少数(1/5)高黏液表型菌株表现为高毒力<sup>[7]</sup>。因此,不能仅以高黏液表型区分 hvKp 与 CKP 菌株。研究高黏液表型以及基因型预测 hvKp 的可靠性,现将结果报告如下。

## 1 资料与方法

1.1 菌株来源 2016 年 11 月—2018 年 4 月广东省 4 所医院收集多种标本(包括血液、引流液、尿等)来源的肺炎克雷伯菌。将收集的菌株应用 Vitek 全自动微生物分析仪进行鉴定。初次鉴定后再经 16S rRNA 基因测序鉴定。

1.2 拉丝试验 用接种环蘸取生长在 LB(购自广东环凯微生物科技有限公司)琼脂平板上的新鲜肺炎克雷伯菌菌落,将接种环向上提起,若菌落形成的黏丝长度 > 5 mm,则判定为拉丝试验阳性,称为高黏液表型肺炎克雷伯菌(hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*, hmKp);反之则为阴性,称为非高黏液表型肺炎克雷伯菌(non-hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae*, non-hmKp)<sup>[5]</sup>。

1.3 血清荚膜分型与毒力基因检测 采用煮沸法提取菌株 DNA 模板,PCR 扩增特异性引物(血清型 K1、K2、K5、K20、K54、K57 及毒力基因 *rmpA*、*rmpA2*、*magA*、*iucA* 等 18 个毒力基因)参照文献[8]合成。PCR 体系:PCR 上下游引物(引物浓度 10 pmol/μL)各 1.0 μL, Premix 12.5 μL(购自北京六合华大基因科技有限公司),超纯水 9.5 μL, DNA 模板 1.0 μL, 总共 25.0 μL。PCR 扩增阳性产物送北京六合华大基因科技有限公司进行双脱氧末端终止法(也称 sanger 测序法)测序, GenBank 进行 Blast 比对双测序结果,进而获得相应基因型。

1.4 蜡螟试验 从天津惠裕德生物科技有限公司

购买符合试验标准的大蜡螟幼虫,每只重约 300~400 mg,肤色不正常或活力欠佳的幼虫均剔除在外。为减少物理损伤及自身原因,共设置 2 组对照组,一组注射等量的 PBS,一组蜡螟不做任何处理。收集孵育于 LB 琼脂平板上 18~20 h 分纯的临床肺炎克雷伯菌菌株,将单菌落加入 PBS 溶液(pH = 6.5)调制成为 0.5 麦氏单位,进行菌落计数,依照菌落计数结果将菌液浓度稀释至 10<sup>4</sup>~10<sup>7</sup> CFU/mL。随机选择 10 只大蜡螟为一组,每一株肺炎克雷伯菌共注射 3 组,每株菌 4 个稀释浓度共需 120 只蜡螟,每株待检细菌均进行试验。取微量注射器吸取 20.0 μL 细菌悬液从蜡螟伪足的第一腹节进针,全部注入后置于干净的培养皿内放入孵箱,培养皿上标记细菌名称及浓度。注射后每隔 6 h 观察记录每组蜡螟死亡数量,直到 72 h,72 h 后大蜡螟做灭菌无害化处理。用回归分析方法中的 probit 概率法计算半数致死率(LD<sub>50</sub>)(log<sub>10</sub> CFU/mL)。

1.5 统计学分析 应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,计数资料比较采用卡方检验,各组 LD<sub>50</sub> 比较采用 *t* 检验或单因素分析<sup>[9]</sup>, *P* ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 拉丝试验结果 共收集 194 株肺炎克雷伯菌,主要来源于血标本(占 70.1%),其次为引流液(11.4%)、下呼吸道标本(10.8%)、尿(3.6%)、无菌体液(3.1%)、脑脊液(1.0%)。所有菌株拉丝试验阳性率为 40.2%(78/194),其中血标本来源菌株阳性率为 33.1%(45/136),其他标本来源菌株阳性率为 56.9%(33/58)。

2.2 血清分型结果 194 株中有 82 株(42.3%)肺炎克雷伯菌可进行荚膜血清型分型,112 株(57.7%)用 PCR 方法无法获得确切血清型(非 K1/K2/K5/K20/K54/K57)。hmKp 与 non-hmKp 菌株的荚膜血清型比较, hmKp 菌株中血清型 K1、K2、K57 检出率高于 non-hmKp 菌株,差异均有统计学意义(均 *P* < 0.001)。hmKp 与 non-hmKp 菌株中血清型 K5、K20、K54 检出率比较,差异均无统计学意义(均 *P* > 0.05),且检出率均较低。见表 1。

表 1 hmKp 和 non-hmKp 菌株血清型分布情况

Table 1 Serotype distribution of hmKp and non-hmKp strains

血清型	hmKp(n=78)		non-hmKp(n=116)		P
	株数	检出率(%)	株数	检出率(%)	
K2	30	38.5	3	2.6	<0.001
K1	19	24.4	7	6.0	<0.001
K57	11	14.1	1	0.9	<0.001
K20	4	5.1	1	0.9	0.169
K5	2	2.6	0	0.0	0.313
K54	1	1.3	3	2.6	0.911

2.3 毒力基因检测结果 检测 78 株 hmKp 菌株的毒力基因,其中 5 个毒力基因检出率超过 80%,分别为 *ureA* (93.6%)、*fimH* (88.5%)、*iroB* (87.2%)、*entB* (84.6%)、*iucA* (82.1%); *iroB* + *fimH* 基因检出率为 80.8% (63 株), *entB* + *fimH* 基因检出率为 79.5% (62 株), *iucA* + *iroB* 基因检出率为 78.2% (61 株), *iucA* + *iroB* + *fimH* 基因检出率为 74.4% (58 株), *iucA* + *iroB* + *peg-344* 基因检出率为 71.8% (56 株)。hmKp 菌株中 *fimH*、*iroB*、*entB*、*iucA*、*rmpA*、*rmpA2*、*peg-344*、*ycfM*、*Irp-2*、*ybts*、*kfuB*、*uge*、*magA* 检出率高于 non-hmKp 菌株,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 蜡螟试验结果 hmKp 菌株 LD<sub>50</sub> 低于 non-hmKp 菌株,血清型 K1 菌株 LD<sub>50</sub> 高于血清型 K2 菌株。根据菌株毒力基因阳性和阴性进行分组,对比各组蜡螟 LD<sub>50</sub>,发现仅 *iucA*、*iroB*、*fimH* 毒力基因阳性菌株 LD<sub>50</sub> 低于相应的阴性菌株。见表 3。*iucA* + *iroB* + *imH* 基因均阳性菌株 LD<sub>50</sub> 低于均阴性菌株 [LD<sub>50</sub> 分别为 (5.4 ± 0.7)、(5.8 ± 0.6) log<sub>10</sub> CFU/mL,  $P = 0.004$ ]。3 个基因 (*iucA*、*iroB*、*fimH*) 均阳性与其中任意两个基因阳性或一个基因阳性 LD<sub>50</sub> 比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。将 *iucA* + *iroB* + *fimH* 全阳性、*iucA* + *iroB* + *fimH* 全阴性菌株分为两组,结合高黏液表型 (*hm* 阳性/*hm* 阴性),比较毒力基因与高黏液表型预测 hvKp 的准确性。*iucA* 阴性 + *iroB* 阴性 + *fimH* 阴性 + *hm* 阳性组 ( $n = 2$ ) 菌株数较少,无法对比,因此共分为三组,分别为 *iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* 全阳性组 ( $n = 58$ )、*iucA* 阳性 + *iroB* 阳性 + *fimH* 阳性 + *hm* 阴性组 ( $n = 23$ )、*iucA* + *iroB* + *fimH* + *hm* 全阴性组 ( $n = 28$ ),其 LD<sub>50</sub> 分别为 (5.39 ± 0.71)、(5.44 ± 0.62)、(5.83 ± 0.64) log<sub>10</sub> CFU/mL,总体比较,差异有统计学意义 ( $F = 4.157, P = 0.018$ ),前两组间

比较差异无统计学意义 ( $P$  值为 0.786),但前两组分别与第 3 组比较差异均有统计学意义 ( $P$  值分别为 0.006、0.041)。*iucA* + *iroB* + *fimH* 3 个毒力基因阳性的情况下,是否为高黏液表型菌株的 LD<sub>50</sub> 比较,差异无统计学意义;对于非高黏液表型菌株, *iucA* + *iroB* + *fimH* 3 个毒力基因阳性菌株的 LD<sub>50</sub> 低于相应阴性菌株。

表 2 hmKp 和 non-hmKp 菌株毒力基因检出情况

Table 2 Detection of virulence genes of hmKp and non-hmKp strains

毒力基因	hmKp(n=78)		non-hmKp(n=116)		P
	株数	检出率(%)	株数	检出率(%)	
<i>ureA</i>	73	93.6	104	89.7	0.342
<i>fimH</i>	69	88.5	88	75.9	0.029
<i>iroB</i>	68	87.2	23	19.8	<0.001
<i>entB</i>	66	84.6	75	64.7	0.002
<i>iucA</i>	64	82.1	29	25.0	<0.001
<i>ycfM</i>	62	79.5	68	58.6	0.002
<i>Irp-2</i>	60	76.9	57	49.1	0.000
<i>peg-344</i>	59	75.6	16	13.8	<0.001
<i>uge</i>	56	71.8	66	56.9	0.035
<i>wabG</i>	53	67.9	64	55.2	0.075
<i>rmpA</i>	52	66.7	13	11.2	<0.001
<i>rmpA2</i>	48	61.5	9	7.8	<0.001
<i>ybts</i>	44	56.4	37	31.9	0.001
<i>kpn</i>	43	55.1	58	50.0	0.483
<i>Alls</i>	32	41.0	40	34.5	0.355
<i>kfuB</i>	29	37.2	20	17.2	0.002
<i>wcaG</i>	20	25.6	33	28.4	0.667
<i>magA</i>	18	23.1	5	4.3	<0.001

表 3 不同组肺炎克雷伯菌感染蜡螟的 LD<sub>50</sub> 比较

Table 3 Comparison of LD<sub>50</sub> of different groups of *Klebsiella pneumoniae* infected with *Galleria mellonella*

高黏液表型与基因型	株数	LD <sub>50</sub> (log <sub>10</sub> CFU/mL)	P
高黏液表型	78	5.4 ± 0.7	0.023
非高黏液表型	116	5.6 ± 0.7	
血清型 K1	26	5.9 ± 0.3	<0.001
血清型 K2	33	5.4 ± 0.6	
<i>iucA</i> +	94	5.4 ± 0.7	0.002
<i>iucA</i> -	100	5.7 ± 0.7	
<i>iroB</i> +	91	5.4 ± 0.7	0.017
<i>iroB</i> -	103	5.6 ± 0.7	
<i>fimH</i> +	157	5.5 ± 0.7	0.045
<i>fimH</i> -	37	5.7 ± 0.6	

### 3 讨论

2016 年 11 月—2018 年 4 月从广东省 4 所医院收集的肺炎克雷伯菌中,来源于血标本者有 33.1% 为拉丝试验阳性,与北京两家单中心研究的血流感染中 hvKp(拉丝试验阳性的菌株定义为 hvKp)的比率相近(分别为 33.0%、31.4%)<sup>[10-12]</sup>,但高于西班牙(6.0%),加拿大(8.2%)等地区<sup>[5]</sup>。若依据拉丝试验阳性和 *iucA* 基因阳性定义 hvKp,本研究中 hvKp 的比率为 40.2%,低于我国两所教学医院中老年患者中 hvKp 的比率(47.5%)<sup>[13]</sup>,不排除与本研究中标本来源较多有关。若依据基因背景(*rpmA* + *iucA*)定义 hvKp,本研究中血流感染 hvKp 的比率为 24.3%,与我国血流感染中 hvKp 24.5% 的比率相似<sup>[14]</sup>。在本研究中,依据拉丝试验和毒力基因型定义 hvKp 与仅拉丝试验定义的比例相近,因此,对于流行病学研究或者临床病例初筛,应用拉丝试验初筛 hvKp 是可取的。总的来说,无论依据何种方法定义 hvKp,本研究中广东地区 hvKp 的比例与我国其他地区差异不大。蜡螟试验结果表明,hmKp 菌株的平均毒力强于 non-hmKp 菌株,此结果与 Russo 等<sup>[15]</sup> 2012 年采用小鼠模型进行相关研究的结果一致。但并非所有 hmKp 菌株的毒力均高于 non-hmKp 菌株,尚有 non-hmKp 菌株的毒力较强,表明存在其他因素影响肺炎克雷伯菌的毒力,仅依据高黏液表型定义 hvKp 是不可取的,但可以作为 hvKp 菌株的初步筛查。铁载体肠杆菌素(*entB*)、气杆菌素(*iucA*)、沙门菌素(*iroB*)、耶尔森菌素(*ybts*, *irp-2*)、*kfuB* 等均介导三价铁的摄取,均是肺炎克雷伯菌感染的重要毒力因子<sup>[11]</sup>。Hsieh 等<sup>[16]</sup> 2008 年的小鼠模型研究表明,与 *iucA* 阴性菌株相比,*iucA* 阳性菌株可使小鼠模型的毒力增加,本研究中蜡螟模型的毒力研究结果与此一致。除此之外,还发现 *iroB* +、*fimH* + 阳性菌株的毒力强于相应的阴性菌株,并且不受高黏液表型的影响,表明铁载体系统和纤毛对于肺炎克雷伯菌毒力的重要性。

*rpmA*/*rpmA2* 调节胞外脂多糖的合成,与高黏液表型密切相关,也认为是 hvKp 的重要生物标记物<sup>[10]</sup>,但本研究高黏液表型中仅 66.7% 的菌株

*rpmA* 阳性,并且 *rpmA*/*rpmA2* 的阳性菌株与阴性菌株的毒力无明显差异,除与本研究中菌株来源较多有关外,也提示可能存在其他机制调节高黏液表型的表达<sup>[10]</sup>。

综上所述,本研究表明仅依据拉丝试验阳性检测预测 hvKp 准确性较低,毒力基因 *iucA* + *iroB* + *fimH* + 对预测 hvKp 有一定的意义。

### [参考文献]

- [1] Jarvis WR, Munn VP, Highsmith AK, et al. The epidemiology of nosocomial infections caused by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Infect Control, 1985, 6(2): 68-74.
- [2] Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis [J]. Arch Intern Med, 1986, 146(10): 1913-1916.
- [3] Chung DR, Lee SS, Lee HR, et al. Emerging invasive liver abscess caused by K1 serotype *Klebsiella pneumoniae* in Korea [J]. J Infect, 2007, 54(6): 578-583.
- [4] Shen DX, Wang J, Li DD. *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses [J]. Lancet Infect Dis, 2013, 13(5): 390-391.
- [5] Shon AS, Bajwa RPS, Russo TA. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed [J]. Virulence, 2013, 4(2): 107-118.
- [6] Prokesh BC, TeKippe M, Kim J, et al. Primary osteomyelitis caused by hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(9): e190-e195.
- [7] Zhang YW, Zeng J, Liu WE, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China [J]. J Infect, 2015, 71(5): 553-560.
- [8] Struve C, Bojer M, Nielsen EM, et al. Investigation of the putative virulence gene *magA* in a worldwide collection of 495 *Klebsiella* isolates: *magA* is restricted to the gene cluster of *Klebsiella pneumoniae* capsule serotype K1 [J]. J Med Microbiol, 2005, 54(Pt 11): 1111-1113.
- [9] Insua JL, Llobet E, Moranta D, et al. Modeling *Klebsiella pneumoniae* pathogenesis by infection of the wax moth galleria mellonella [J]. Infect Immun, 2013, 81(10): 3552-3565.
- [10] Cheng HY, Chen YS, Wu CY, et al. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43 [J]. J Bacteriol, 2010, 192(12): 3144-3158.
- [11] Russo TA, 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.

- [12] Li W, Sun GZ, Yu YH, et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China[J]. Clin Infect Dis, 2014, 58(2): 225 - 232.
- [13] Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor[J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2019, 18(1): 4.
- [14] Li JY, Ren JA, Wang WP, et al. Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2018, 37(4): 679 - 689.
- [15] Russo TA, Shon AS, Beanan JM, et al. Hypervirulent *K. pneumoniae* secretes more and more active iron-acquisition molecules than “classical” *K. pneumoniae* thereby enhancing its virulence[J]. PLoS One, 2011, 6(10): e26734.
- [16] Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, et al. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess[J]. J Infect Dis, 2008, 197(12): 1717 - 1727.

(本文编辑:文细毛)

**本文引用格式:**马明葱,李晓雨,卓超.高黏液表型与基因型预测肺炎克雷伯菌毒力的比较[J].中国感染控制杂志,2021,20(11):1003-1007. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20211269.

**Cite this article as:** MA Ming-cong, LI Xiao-yu, ZHUO Chao. Comparison of hypermucoviscous phenotype and genotype in predicting virulence of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(11): 1003 - 1007. DOI: 10.12138/j.issn.1671 - 9638.20211269.