

论著·临床研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2020.06.017

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20191018.1320.002.html>(2019-10-18)

肝脓肿肺炎克雷伯菌血清型及毒力基因检测

席健峰,李慧玲,邹佳贺,王瑶,王勇[△]

(佳木斯大学附属第一医院,黑龙江佳木斯 154007)

[摘要] **目的** 探讨肝脓肿肺炎克雷伯菌的血清型及毒力基因携带情况。**方法** 收集 2018 年 4 月至 2019 年 4 月该院肝脓肿住院患者标本分离的肺炎克雷伯菌菌株 32 株;所有菌株进行拉丝试验,用聚合酶链反应(PCR)法检测肺炎克雷伯菌的主要血清型及毒力基因的分布情况。**结果** 32 株非重复肺炎克雷伯菌中高黏液型 26 株(81.25%),血清型 K1 型 18 株(56.25%),K2 型 7 株(21.88%),K5 型 1 株(3.13%);这 3 种血清型均携带有毒力基因 rmpA+aero+uge。**结论** 肝脓肿高毒力肺炎克雷伯菌以 K1、K2 血清型为主,并携带了大量的毒力基因,多见于糖尿病老年患者,对临床常用的抗生素敏感性高。

[关键词] 肺炎克雷伯菌;血清型;毒力基因**[中图分类号]** R378**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2020)06-0938-04Serotype and virulence gene detection of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscessXI Jianfeng, LI Huiling, ZOU Jiahe, WANG Yao, WANG Yong[△]

(First Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the serotype and virulence gene carrying situation of *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess. **Methods** A total of 32 strains of *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients with liver abscess in this hospital from April 2018 to April 2019 were collected. All strains were subjected to a wire drawing test. The main serotypes of *Klebsiella pneumoniae* strains and the distribution situation of virulence genes were detected by PCR. **Results** Among 32 strains of non-repetitive *Klebsiella pneumoniae*, the high mucus type accounted for 26 (81.25%), the K1 serotype had 18 strains (56.25%), and the K2 serotype had 7 strains (21.88%), K5 serotype had 1 strains (3.13%); all three serotypes carried the virulence gene rmpA+aero+uge. **Conclusion** Highly virulent *Klebsiella pneumoniae* in liver abscess is mainly dominated by K1 and K2 serotypes, which carry a large number of virulence genes. This disease is more common in elderly people with diabetes and has high sensitivity to commonly used antibiotics in clinic.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; serotype; virulence gene

肺炎克雷伯菌是肠杆菌科克雷伯菌属中最为重要的一种,同时也是克雷伯菌属中重要的致病菌。肺炎克雷伯菌根据毒力的不同可分为毒力较弱的经典型肺炎克雷伯菌(cKP)和毒力较强的高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)。cKP 主要定植于宿主的上呼吸道和消化道,当宿主免疫功能低下的时候可引起肺部、血液、腹部、泌尿道、伤口和软组织的感染,为临床主要的条件致病菌。本研究旨在分析 2018 年 4 月至 2019 年 4 月本院 32 例由肺炎克雷伯菌引起的肝脓肿患者的血清型及毒力基因携带情况。

1 材料与方法**1.1 材料**

分析 2018 年 4 月至 2019 年 4 月本院由肺炎克雷伯菌引起的肝脓肿患者临床相关资料,并对患者标本中分离出的肺炎克雷伯菌进行分析。去除同一患者不同

部位相同的菌株后共获得 32 株肺炎克雷伯菌。质控菌株大肠埃希菌 ATCC 25922,沙门菌 H9812 和肺炎克雷伯 ATCC 700603 均购自中国微生物菌种保藏中心。

1.2 仪器与试剂

Vitek-2 Compact 全自动微生物分析仪购自法国梅里埃公司。血平板、麦康凯平板购自英国 Oxoid 公司。GoTaq[®] Green Master Mix (M7122)购自美国 Promega 公司,PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司、电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司,凝胶成像分析系统(Tocan)购自上海领成生物科技有限公司,麦氏比浊仪购自法国 Bio-Merieux 公司。

1.3 方法**1.3.1 药敏及拉丝试验**

把患者标本接种到血平板、麦康凯培养基上,第 2 天将纯化的菌落在 Vitek-2 Compact 全自动微生物分

析仪上进行鉴定,并用配套的药敏卡进行药敏检测。
 拉丝试验:将肺炎克雷伯菌接种在含 5%羊血琼脂平板上,于 37 °C CO₂ 恒温孵箱培养 18 h 后,用灭菌接种针轻轻放于菌落上并慢慢向上挑起菌落,如果挑起菌落过程中出现丝状物并且大于或等于 5 mm,则为拉丝试验阳性;反之,则为阴性^[1]。参照文献^[2] 拉丝试验阳性被定义为 hvKP。

1.3.2 血清型及毒力基因检测

用煮沸法提取细菌的模板 DNA,参照文献^[12-14]

委托上海生工生物有限公司合成肺炎克雷伯菌的血清型 K1、K2、K5、K20、K54、K57 和毒力基因 magA、rmpA、uge、kfu、wcaG、aero、iroNB、allS、mrkD、kpn、fimH,PCR 总反应体系 25 μL;Go Taq[®] Green Master Mix 12.5 μL,上下游引物各 1 μL,模板 1 μL,ddH₂O 9.5 μL,扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳,然后用紫外凝胶成像系统观察结果。阳性产物送上海生工生物有限公司测序,结果在 NCBI 网站上运用 BLAST 比对确定其基因型,见表 1。

表 1 荚膜血清型及毒力相关基因引物序列

引物名称	血清型	引物序列(5'-3')	产物长度(bp)	退火温度(°C)
K1	K1-F	GTA GGT ATT GCA AGC CAT GC	1 047	58
	K1-R	GCC CAG GTT AAT GAA TCC GT		
K2	K2-F	GAC CCG ATA TTC ATA CTT GAC AGA G	641	50
	K2-R	CCT GAA GTA AAA TCG TAA ATA GAT GGC		
K5	K5-F	TGG TAG TGA TGC TCG CGA	280	58
	K5-R	CCT GAA CCC ACC CCA ATC		
K20	K20-F	CGG TGC TAC AGT GCA TCA TT	741	58
	K20-R	GTT ATA CGA TGC TCA GTC GC		
K54	K54-F	CAT TAG CTC AGT GGT TGG CT	881	50
	K54-R	GCT TGA CAA ACA CCA TAG CAG		
K57	K57-F	CTC AGG GCT AGA AGT GTC AT	1 037	50
	K57-R	CAC TAA CCC AGA AAG TCG AG		
magA	magA-F	GGT GCT CTT TAC ATC ATT GC	1 280	55
	magA-R	GCA ATG GCC ATT TGC GTT AG		
rmpA	rmpA-F	ACT GGG CTA CCT CTG CTT CA	535	60
	rmpA-R	CTT GCA TGA GCC ATC TTT CA		
uge	uge-F	TCT TCA CGC CTT CCT TCA CT	534	55
	uge-R	GAT CAT CCG GTC TCC CTG TA		
kfu	kfu-F	GAA GTG ACG CTG TTT CTG GC	797	60
	kfu-R	TTT CGT GTG GCC AGT GAC TC		
wcaG	wcaG-F	GGT TGG KTC AGC AAT CGT A	169	53
	wcaG-R	ACT ATT CCG CCA ACT TTT GC		
aero	aero-F	GCA TAG GCG GAT ACG AAC AT	556	56
	aero-R	CAC AGG GCA ATT GCT TAC CT		
iroNB	iroNB-F	GGC TAC TGA TAC TTG ACT ATT C	992	50
	iroNB-R	CAG GAT ACA ATA GCC CAT AG		
allS	allS-F	CCG TTA GGC AAT CCA GAC	1 090	49
	allS-R	TCT GAT TTA (A/T)CC CAC ATT		
mrkD	mrkD-F	AAG CTA TCG CTG TAC TTC CGG CA	340	53
	mrkD-R	GGC GTT GGC GCT CAG ATA GG		
kpn	kpn-F	GTA TGA CTC GGG GAA GAT TA	628	53
	kpn-R	CAG AAG CAG CCA CCA CAC G		
fimH	fimH-F	ATG AAC GCC TGG TCC TTT GC	688	58
	fimH-R	GCT GAA CGC CTA TCC CCT GC		

1.4 统计学处理

数据使用 SPSS 22.0 进行统计分析,将各组别之间进行四格交叉表 Fisher's 确切检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺炎克雷伯菌性肝脓肿(LA)的临床科室分布

32 株引起 LA 的肺炎克雷伯菌中, hvKP 26 株 (81.25%), cKP 6 株 (18.75%)。与 hvKP 一样, cKP 也主要来自于普外科 (表 2), 其中男性患者 21 例, 女性患者 11 例, 年龄 27~84 岁, 平均 61 岁, 60 岁以上的 17 例 (53.13%), 基础疾病中以糖尿病最为多见, 达到了 72.00%。脓肿有 25 例发生于肝右叶, 占 78.13% (25/32), 临床治愈和好转占 90.63% (29/32)。

表 2 肺炎克雷伯菌性 LA 菌株的科室分布 (n)

科室	hvKP (n=26)	cKP (n=6)
普外科	12	5
感染科	6	1
消化科	3	0
ICU	3	0
急诊	1	0
血管外科	1	0

表 3 hvKP 各种血清型所携带的毒力基因分布

血清型	总株数	毒力基因携带情况	株数 (n)	构成比 (%)
K1	17	rmpA+aero+uge+magA+wcaG	17	100.00
		rmpA+aero+uge+magA+wcaG+fimH	15	88.24
		rmpA+aero+uge+magA+wcaG+mrkD	16	94.12
		rmpA+aero+uge+magA+wcaG+mrkD+fimH+kfu	7	41.18
K2	5	rmpA+aero+uge+mrkD+kpn	5	100.00
		rmpA+aero+uge+mrkD+kpn+fimH	4	80.00
K5	1	rmpA+aero+uge+mrkD+kpn	1	100.00

2.4 肺炎克雷伯菌的药敏结果

32 株非重复肺炎克雷伯菌对常用的抗菌药物敏感率都达到了 84% 以上, 8 株中介耐药, 检测到 1 株产超广谱 β -内酰胺酶, 为 K2 血清型且是黏液型菌落, 未发现多重耐药的菌株。

3 讨论

近年来, 肺炎克雷伯菌现已成为继大肠埃希菌后, 临床排名第 2 位的导致感染性疾病的肠杆菌科细菌。最近, 很多国家和地区都报道了 hvKP 所引起的严重的感染性疾病并对 hvKP 进行了相应的研究。流行病学资料表明, 亚洲地区的人群感染 hvKP 的比例明显高于其他地区^[3]。虽然感染 hvKP 的机制目前并不是很明确, 但根据现有的统计资料, 可以推断出曾经来过亚洲或接触过来自亚洲的人是感染 hvKP

2.2 肺炎克雷伯菌的微生物学特征

32 株肺炎克雷伯菌经 PCR 共检测出 3 种血清型, 为 K1、K2、K5, 分别占 56.25%、21.88%、3.13%, 未检测出 K20、K54 和 K57 型。毒力基因 rmpA、aero、uge、magA、kfu、wcaG、iroNB、mrkD、kpn、fimH 分别检出了 30、30、31、18、7、19、3、30、11、26, 未检测到 allS 毒力基因, 见图 1。其中 26 株属于 hvKP, 所携带的血清型包括 K1、K2、K5, 分别占 65.38% (17/26)、19.23% (5/26)、3.85% (1/26)。

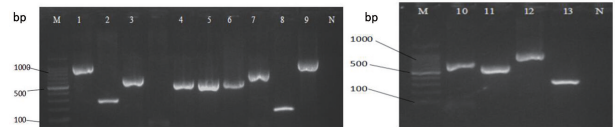


图 1 肺炎克雷伯菌血清型及毒力基因电泳分析
M: Marker; 1~13: K1、K5、K2、rmpA、aero、uge、kfu、wcaG、magA、fimH、kpn、iroNB、mrkD; N: 阴性对照。

图 1 肺炎克雷伯菌血清型及毒力基因电泳分析

2.3 hvKP 血清型及所携带的毒力基因分布情况

K1 血清型主要携带的毒力基因有 rmpA、aero、uge、magA、wcaG 5 种, K2 血清型主要携带的毒力基因有 rmpA、aero、uge、mrkD、kpn 5 种, 1 株 K5 所带的毒力基因是 rmpA+aero+uge+mrkD+kpn, 见表 3。

的重要因素^[4-5]。根据 LI 等^[3]的研究结果, 肺炎克雷伯菌性肝脓肿发生在肝右叶的概率约为 80%, 多为单发, 主要发生在 60~70 岁的老年人。本研究结果显示约 78.1% 的肺炎克雷伯菌性肝脓肿发生于肝右叶, 所有患者中 60 岁以上的就占 17 例 (53.13%), 这与 LI 的研究结果基本相符。本研究中发现有糖尿病病史的患者高达 23 例, 占总人数的 71.88%, 估计跟糖尿病患者的自身的免疫功能低下有很大的关系。与文献^[6-7]报道一致, hvKP 易感染糖尿病患者, 因高糖的情况下机体的免疫系统易遭到破坏, 进而使 hvKP 荚膜多糖合成能力大大提高, 从而使细菌侵袭及抵抗中性粒细胞吞噬的能力得到增强^[8]。

本次实验从肺炎克雷伯菌性肝脓肿标本菌株中检测出了 3 种血清型, 即 K1、K2、K5 型, 分别占

56.25%(18/32)、21.88%(7/32)、3.13%(1/32),SIU 等^[9]研究认为引起 LA 的肺炎克雷伯菌大多为 K1 和 K2 型,这一结果与本实验相符。通过拉丝试验可以确定本院 KPLA 中 26 例是由 hvKP 引起的,所携带的血清型包括 K1、K2、K5,分别占 65.38%(17/26)、19.23%(5/26)、3.84%(1/26)。在既往相关报道^[10]中 hvKP 均以 K1、K2 为主,曾认为 K1、K2 是 hvKP 重要的致病因子,在相关研究中指出 KPLA 中 K1 占 53.9%,K2 占 32.2%,这一结果与本实验结果相符。有研究^[11-13]发现黏液相关因子 A(magA)与 hvKP 荚膜合成有关,但 magA 基因仅存在于 K1 型特异性的聚合酶(wzy-K1)参与荚膜合成,这一结论与本实验结果相符。本实验中 hvKP 均携带有 3 种毒力基因 rmpA、aero、uge,可以得出结论这 3 种毒力基因是 hvKP 引发 LA 所必不可少的。

本院 hvKP 对除氨苄西林以外的普通抗菌药物均表现出较高的敏感性。然而,随着肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 KPC、NDM 等的传播,已经出现了碳青霉烯耐药的高毒力肺炎克雷伯菌(cr-hvKP),其具有高水平耐药性、高度侵袭性并能够逃避宿主的免疫反应,使得临床治疗更具有挑战性^[14]。

分析本院肺炎克雷伯菌肝脓肿患者的临床及微生物学特征,通过实验对肺炎克雷伯菌进行分析总结,进一步增加临床医生对 hvKP 的了解,从而为下一步预防及治疗提供参考。

参考文献

- [1] 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):374-377.
- [2] FUNG C P,LIN Y T,LIN J C,et al. Klebsiella pneumoniae in gastrointestinal tract and pyogenic liver abscess[J]. Emerg Infect Dis,2012,18(8):1322-1325.
- [3] LI W,SUN G,YU Y,et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) Klebsiella pneumoniae isolates in China[J]. Clin Infect Dis,2014,58(2):225-232.
- [4] 周薇,黄文芳.高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J].中国感染与化疗杂志,2016,16(6):800-803.
- [5] 王春燕,邱厚兵,彭胡.肺炎克雷伯菌肝脓肿微生物学特征和耐药情况分析[J].国际检验医学杂志,2017,38(21):2955-2957.
- [6] CUBERO M, GRAU I, TUBAU F, et al. Hypervirulent Klebsiella pneumoniae clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain(2007-2013)[J]. Clin Microbiol Infect,2016,22(2):154-160.
- [7] LIU Y M, LI B B, ZHANG Y Y, et al. Clinical and molecular characteristics of emerging hypervirulent Klebsiella pneumoniae bloodstream infections in mainland China[J]. Antimicrob Agents Chemother,2014,58(9):5379-5385.
- [8] 马荣,王晓丹,聂大平.高毒力肺炎克雷伯菌血流感染的临床特点[J].中国感染控制杂志,2018,17(1):26-30.
- [9] SIU L K, YE H K M, LIN J C, et al. Klebsiella pneumoniae liver abscess: a new invasive syndrome[J]. Lancet Infect Dis,2012,12(11):881-887.
- [10] 吴柳,张洁,孙琳,等.肺炎克雷伯菌肝脓肿 70 例临床分析[J].中国感染与化疗杂志,2018,18(1):11-17.
- [11] STRUVE C, BOJER M, NIELSEN E M, 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.
- [12] 钟雪珊.健康人、腹泻儿童与鼠形动物肠道肺炎克雷伯菌的病原学特征和耐药性分析[D].广州:南方医科大学,2016.
- [13] 和晋渝.肺炎克雷伯菌的血清分型及毒力基因分布的研究[D].重庆:重庆医科大学,2012.
- [14] 吕继芳.碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药基础及毒力因子分析[D].杭州:浙江大学,2016.

(收稿日期:2019-06-30 修回日期:2019-10-08)