

doi:10.3969/j.issn.1673-6184.2019.06.004

• 论著 •

高毒力肺炎克雷伯菌血清型、毒力基因分布及分子标志物探索

徐水宝, 杨思宇, 翁珊珊, 陈晨, 陈澍, 张文宏, 金嘉琳

复旦大学附属华山医院感染科, 上海 200040

摘要:为探讨高毒力肺炎克雷伯菌(*hypervirulent Klebsiella pneumoniae*, HVKP)血清型和毒力基因分布特点并寻找可预测高毒力的分子标志物,本研究收集侵袭综合征肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)25株(视为HVKP)和单纯血流感染的普通肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP)28株(为cKP组)。采用DNA Kit提取菌株DNA,参照文献分别合成血清型(K1、K2、K5、K20、K54和K57)和毒力基因(*wcaG*、*rmpA*、*rmpA2*、*magA*、*fimH*、*mrkD*、*uge*、*wabG*、*aero*、*iucB*、*iutA*、*iroNB*、*ybtA*、*kfuBC*、*ureA*、*alls*)的引物序列。通过PCR测定菌株的血清型和毒力基因分布情况。运用统计软件对数据进行统计分析,对2组之间有显著差异的分子标志物分别计算其灵敏度、特异度、准确度和约登指数。结果显示,血清型K1在HVKP组中的阳性率为60%,高于cKP组,有显著差异。毒力基因*uge*检出率最高,达100%;其次是*fimH*,占96%;*wabG*和*ybtA*也在90%以上。总体上HVKP组的毒力基因阳性率较cKP组更高,尤其是*rmpA2*、*magA*、*fimH*、*aero*、*iutA*、*kfuBC*。根据约登指数,诊断效能由高到低排列:*iutA*>*kfuBC*>*magA*(K1)>*aero*>*fimH*>*rmpA2*。经多因素Logistic回归分析得出,*rmpA2*、*magA*、*fimH*、*aero*、*iutA*、*kfuBC*可作为HVKP的分子标志物,尤其是*iutA*,在HVKP和cKP组之间有显著差异($P = 0.002$)。但缺乏100%特异性的分子标志物,仍需要进一步探索。

关键词:高毒力肺炎克雷伯菌; 血清型; 毒力基因; 分子标志物

Distribution of serotypes and virulence genes in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and exploration of molecular markers

XU Shuibao, YANG Siyu, WENG Shanshan, CHEN Chen, CHEN Shu, ZHANG Wenhong, JIN Jialin

Department of Infectious Diseases, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China

Abstract: In order to investigate the distribution of serotypes and virulence genes in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (HVKP) and to explore the molecular markers, *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) strains were collected and divided into the HVKP group and classic *K. pneumoniae* (cKP) group. The results showed that the positive rate of serotype K1 in the HVKP group was 60%, which was significantly higher than that in the cKP group. The positive detection rates of *rmpA2*, *magA*, *fimH*, *aero*, *iutA*, *kfuBC* in the HVKP group were significantly higher than those in the cKP group. According to the Yoden index, the diagnostic efficacy of these molecular markers ranked from high to low was as follows: *iutA* > *kfuBC* > *magA* (K1) > *aero* > *fimH* > *rmpA2*. Multivariate logistic regression analysis showed that

通信作者:金嘉琳

Correspondence to: JIN Jialin E-mail: jinjialin@fudan.edu.cn

rmpA2, *magA*, *fimH*, *aero*, *iutA* and *kfuBC* could be used as molecular markers of HVKP, especially *iutA*.

Keywords: Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; Serotype; Virulence gene; Molecular marker

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种革兰染色阴性、有荚膜的肠杆菌科细菌,广泛存在于环境中,亦寄生于人类的皮肤、鼻咽部、肠道等,为条件致病菌,主要感染免疫功能低下者^[1]。1986年7例由KP引起的肝脓肿并发眼内炎首次被报道,并被定义为高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, HVKP)^[2]。HVKP也可引起健康人群肝脓肿伴远处播散,如眼内炎、坏死性筋膜炎、中枢神经系统感染等,称为侵袭综合征^[2-3]。此后,HVKP的报道在全球范围逐渐增多,早诊断、早治疗可改善其感染的预后,然而目前仍然缺乏确切的分子诊断标准和特异性分子标志物(不同文献之间所述标准不一),对人类健康造成严重威胁。本研究对分离自本院的25株HVKP与28株普通肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP)血清型和毒力基因分布特点进行比较分析,探索HVKP的分子标志物,期望对该病的分子诊断提供数据。

1 研究对象与方法

1.1 对象

从复旦大学附属华山医院(2009—2018年)住院患者中,根据临床病史和病原学检查结果,筛选出侵袭综合征KP阳性患者(表1),从本院保存的菌库中获得相应的非重复KP菌株共25株,将其视为HVKP组;从菌库中随机抽取血流感染的KP菌株,并根据病史剔除有合并其他侵袭性感染的菌株,最终得到28株,将其视为cKP组。

本研究关于HVKP组和cKP组的划分主要通过临床定义。据文献报道,HVKP引起的侵袭综合征主要表现为肝脓肿合并肝外侵袭性感染,如眼内炎、坏死性筋膜炎、中枢神经系统感染等^[3]。

血清型主要包括K1、K2、K5、K20、K54和K57^[4-6];毒力基因包括^[6-9]:①荚膜多糖合成和合成调控相关基因^[10-11] *wcaG* 和 *rmpA*、*rmpA2*、*magA*;②菌毛合成相关基因^[12] *fimH*、*mrkD*;③脂多糖相关基因^[13] *uge*、*wabG*;④铁摄取系统相关基因^[14] *aero*、*iucB*、*iutA*、*iroNB*、*ybtA*、*kfuBC*;⑤尿素酶相

关基因^[10] *ureA*、*allS*。

表1 25株HVKP菌株临床特点

Tab. 1 Clinical characteristics of 25 strains of HVKP

菌株 编号	菌株 来源	侵袭综合征表现
KP1	血	肝脓肿、化脓性腰椎间盘感染、菌血症
KP2	血	肝脓肿、眼内炎、肺脓肿、菌血症
KP3	血	肝脓肿、肺脓肿、泌尿系感染、菌血症
KP4	脓液	肝脓肿、肺脓肿
KP5	血	肝脓肿、皮肤软组织感染、肺部感染、菌血症
KP6	血	肝脓肿、肺脓肿、菌血症
KP7	脓液	肝脓肿、肺脓肿
KP8	脓液	肝脓肿、肺脓肿
KP9	脓液	肝脓肿、脑脓肿、肺部感染
KP10	脓液	肝脓肿、肛周脓肿
KP11	脓液	肝脓肿、皮肤软组织感染
KP12	血	肝脓肿、腰大肌脓肿、菌血症
KP13	血	肝脓肿、眼内炎、菌血症
KP14	血	肝脓肿、皮肤软组织感染、菌血症
KP15	血	肝脓肿、眼内炎、菌血症
KP16	血	肝脓肿、眼内炎、肺部感染、菌血症
KP17	脓液	肝脓肿、中枢神经系统感染
KP18	血	肝脓肿、中枢神经系统感染、菌血症
KP19	脓液	肝脓肿、脑脓肿
KP20	血	肝脓肿、眼内炎、肺部感染、菌血症
KP21	血	肝脓肿、眼内炎、菌血症
KP22	血	肝脓肿、肺脓肿、菌血症
KP23	血	肝脓肿、皮肤软组织感染、肺部感染
KP24	血	颈部蜂窝织炎、化脓性椎间盘感染、菌血症
KP25	血	皮肤软组织感染、菌血症

1.2 方法

菌株进行复苏和培养,采用Tiangen TIANamp Bacteria DNA Kit提取菌株DNA。血清型和毒力基因的引物序列参照文献(表2、表3),由生工生物

表 2 KP 血清型 PCR 引物

Tab. 2 Primers used for detecting KP serotypes by PCR

Serotype		Sequence (5'-3')	bp	Annealing(°C)
K1 ^[10]	K1-F	GGTGCTTTACATCATTGC	1 283	58
	K1-R	GCAATGGCCATTGCGTTAG		
K2 ^[10]	K2-F	GACCCGATATTCTACTTGACAGAG	641	58
	K2-R	CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC		
K5 ^[10]	K5-F	TGGTAGTGATGCTCGCGA	280	58
	K5-R	CCTGAACCCACCCCAATC		
K20 ^[10]	K20-F	CGGTGCTACAGTGATCATT	741	58
	K20-R	GTTATACGATGCTCAGTCGC		
K54 ^[10]	K54-F	CATTAGCTCAGTGGTTGGCT	881	58
	K54-R	GCTTGACAAACACCATAAGCAG		
K57 ^[10]	K57-F	CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC	1037	58
	K57-R	TAGCTTTTCATTCTGTGTTGTT		

表 3 KP 毒力基因 PCR 引物

Tab. 3 Primers used for detecting KP virulence genes by PCR

Virulence genes		Sequence(5'-3')	bp	Annealing(°C)
<i>rmpA</i> ^[15]	<i>rmpA</i> -F	ACTGGGCTACCTCTGCTTC	516	58
	<i>rmpA</i> -R	CTTGCATGAGCCATCTTCA		
<i>rmpA2</i> ^[15]	<i>rmpA2</i> -F	TGTGCAATAAGGATGTTACATTAGT	535	58
	<i>rmpA2</i> -R	TTTGATGTGCACCATTTC		
<i>aero</i> ^[15]	<i>aero</i> -F	GCATAGGCGGATACGAACAT	556	49
	<i>aero</i> -R	CACAGGGCAATTGCTTACCT		
<i>wcaG</i> ^[16]	<i>wcaG</i> -F	GGTTGGKTCAGCAATCGTA	169	49
	<i>wcaG</i> -R	ACTATTCCGCCAACCTTGC		
<i>allS</i> ^[16]	<i>allS</i> -F	CCGAAACATTACGCACCTTT	508	49
	<i>allS</i> -R	ATCACGAAGAGGCCAGGTAC		
<i>fimH</i> ^[16]	<i>fimH</i> -F	TGCTGCTGGCTGGTCGATG	688	49
	<i>fimH</i> -R	GGGAGGGTGACGGTGACATC		
<i>uge</i> ^[16]	<i>uge</i> -F	TCTTCACGCCCTCCTTC	543	49
	<i>uge</i> -R	GATCATCCGGTCTCCCTGTA		
<i>wabG</i> ^[16]	<i>wabG</i> -F	ACCATCGGCCATTGATAGA	683	49
	<i>wabG</i> -R	CGGACTGGCAGATCCATATC		
<i>ureA</i> ^[16]	<i>ureA</i> -F	GCTGACTTAAGAGAACOTTATG	337	55
	<i>ureA</i> -R	GATCATGGCGCTACCTCA		
<i>iutA</i> ^[16]	<i>iutA</i> -F	GGCTGGACATCATGGAACTGG	300	55
	<i>iutA</i> -R	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		
<i>iroNB</i> ^[16]	<i>iroNB</i> -F	GGCTACTGATACTTGACTATT	992	50
	<i>iroNB</i> -R	CAGGATACAATAGCCCATAG		
<i>ybtA</i> ^[16]	<i>ybtA</i> -F	ATGACGGAGTCACCGCAAAC	960	55
	<i>ybtA</i> -R	TTACATCACGCGTTAAAGG		
<i>kfuBC</i> ^[16]	<i>kfuBC</i> -F	GAAGTGACGCTGTTCTGGC	797	55
	<i>kfuBC</i> -R	TTTCGTGTGGCCAGTGACTC		
<i>mrkD</i> ^[16]	<i>mrkD</i> -F	TTCTGCACAGCGGTCCC	240	49
	<i>mrkD</i> -R	GATACCCGGCGTTTCGTTAC		

工程(上海)股份有限公司合成。PCR 体系 20 μL : 1 μL DNA 模板、0.5 μL 引物 R、0.5 μL 引物 F、10 μL Premix Taq (TaKaRa Premix Taq Version 2.0)、8 μL ddH₂O。PCR 条件: 预变性 95 °C 3 min; 变性 95 °C 30 s, 退火(温度见表 2、3) 30 s, 延伸 72 °C 1 min, 30 个循环; 72 °C 维持 10 min。PCR 产物在 1% 浓度琼脂糖凝胶中电泳(电压 120 V, 时间 30 min), 经紫外成像仪拍照保存。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 20.0 进行统计学分析。分类变量用卡方检验做比较。对 2 组之间有显著差异的分子标志物分别计算其灵敏度、特异度、准确度和约登指数。应用二元 Logistic 回归(向后:LR)对分子标志物进行多因素分析, $P < 0.05$ 为有统计学差异。

2 结果

2.1 HVKP 组中最常见的血清型为 K1 型

HVKP 组(25 株)中最常见的血清型为 K1 型, 占 60% (15/25); 另外还检测到 K2 和 K20 各 2 株, 未测到血清型 K5、K54 和 K57。HVKP 组与 cKP 组相比, 血清型 K1 有统计学差异($\chi^2 = 9.983, P < 0.05$), K2 和 K20 虽然在统计学上无差异, 但这 2 种血清型只在 HVKP 组中测到(表 4)。

表 4 HVKP 与 cKP 血清型比较

Tab. 4 Comparison of serotypes between HVKP and cKP

Serotype	HVKP (n = 25)	cKP (n = 28)	χ^2	P
K1	15(60.00%)	5(17.86%)	9.983	0.002
K2	2(8.00%)	0	—	0.218
K5	0	0	—	—
K20	2(8.00%)	0	—	0.218
K54	0	0	—	—
K57	0	0	—	—

2.2 毒力基因分布

HVKP 组中毒力基因阳性率最高的前 3 种为 *uge*、*fimH* 和 *wabG*, 分别占 100%、96% 和 92%。与 cKP 组相比, 毒力基因有统计学差异的是 *rmpA2* ($\chi^2 = 6.335, P = 0.012$)、*magA* ($\chi^2 = 9.983, P = 0.002$)、*fimH* ($\chi^2 = 9.389, P = 0.002$)、*aero* ($\chi^2 = 6.692, P = 0.010$)、*iutA* ($\chi^2 = 23.645, P = 0.000$)、*kfuBC* ($\chi^2 = 14.018, P = 0.000$)。其他

基因虽然在统计学上无差异, 但在 HVKP 组中基因的阳性率基本都高于 cKP 组。如果增大样本量, 可能会得到不同的结果(表 5)。

对 HVKP 与 cKP 组之间有显著差异的分子标志物, 分别计算其灵敏度、特异度、准确度和约登指数。根据约登指数将标志物的诊断效能由高到低排列: *iutA* > *kfuBC* > *magA* (K1) > *aero* > *fimH* > *rmpA2*。经多因素 Logistic 回归分析, 发现 *iutA* 在 HVKP 与 cKP 组之间有统计学差异 ($P = 0.002$), 见表 6、表 7 和图 1。

表 5 HVKP 和 cKP 毒力基因比较

Tab. 5 Comparison of virulence genes between HVKP and cKP

Virulence genes	HVKP (n = 25)	cKP (n = 28)	χ^2	P
<i>rmpA</i>	15(60.00%)	13(46.43%)	0.976	0.323
<i>rmpA2</i>	20(80.00%)	13(46.43%)	6.335	0.012
<i>magA</i>	15(60.00%)	5(17.86%)	9.983	0.002
<i>wcaG</i>	9(36.00%)	7(25.00%)	0.758	0.384
<i>fimH</i>	24(96.00%)	17(60.71%)	9.389	0.002
<i>mrkD</i>	18(72.00%)	16(57.14%)	1.268	0.260
<i>uge</i>	25(100%)	23(82.14%)	3.061	0.080
<i>wabG</i>	23(92.00%)	23(82.14%)	0.425	0.515
<i>aero</i>	16(64.00%)	8(28.57%)	6.691	0.010
<i>iutA</i>	18(72.00%)	2(7.14%)	23.645	0.000
<i>iroNB</i>	4(16.00%)	0	2.824	0.093
<i>ybtA</i>	23(92.00%)	21(75.00%)	1.636	0.201
<i>kfuBC</i>	20(80.00%)	8(28.57%)	14.018	0.000
<i>ureA</i>	22(88.00%)	26(92.86%)	0.018	0.894
<i>alls</i>	9(36.00%)	6(21.43%)	1.382	0.240

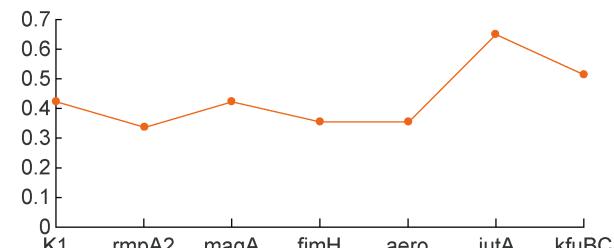


图 1 HVKP 分子标志物约登指数

Fig. 1 Yoden index of molecular markers in HVKP

表 6 HVKP 分子标志物准确度、灵敏度、特异度和 OR 值

Tab. 6 Accuracy, sensitivity, specificity and OR value of molecular markers in HVKP

Molecular markers	Accuracy(%)	Sensitivity(%)	Specificity(%)	Yoden index	OR(95% CI)
K1	71.7	60.0	82.1	0.421	6.900(1.967,24.209)
<i>rmpA2</i>	66.0	80.0	53.6	0.336	4.615(1.350,15.784)
<i>magA</i>	71.7	60.0	82.1	0.421	6.900(1.967,24.209)
<i>fimH</i>	66.0	96.0	39.3	0.353	15.529(1.828,131.902)
<i>aero</i>	67.9	64.0	71.4	0.354	4.444(1.397,14.138)
<i>iutA</i>	52.8	72.0	92.9	0.649	33.429(6.215,179.805)
<i>kfuBC</i>	75.5	80.0	71.4	0.514	10.000(2.787,35.885)

表 7 HVKP 分子标志物多因素 Logistic 回归分析

Tab. 7 Multivariate logistic regression of molecular markers in HVKP

Molecular markers	B	S.E.	Wals	P	Exp(B)	95% CI
K1	1.045	1.115	0.879	0.349	2.844	0.320,25.282
<i>rmpA2</i>	-1.569	1.144	1.882	0.170	0.208	0.022,1.960
<i>aero</i>	-1.582	1.248	1.609	0.205	0.205	0.018,2.370
<i>fimH</i>	2.067	1.272	2.644	0.104	7.900	0.654,95.439
<i>iutA</i>	4.377	1.432	9.340	0.002	79.623	4.807,1 318.947
<i>kfuBC</i>	0.473	1.075	0.194	0.660	1.605	0.195,13.192

3 讨论

目前,关于 HVKP 的分子标志物相关报道不多。本研究将侵袭综合征患者中分离的菌株视为 HVKP,单纯血流感染患者中分离的菌株视为 cKP,通过对既往所报道的 KP 血清型和毒力基因分别在 HVKP 组和 cKP 组中进行检测和比较,筛选 HVKP 的分子标志物,并评估其效能。

荚膜多糖是 KP 重要的毒力因子,主要通过抗巨噬细胞吞噬作用、抑制早期炎症反应、抵抗抗菌肽和抑制树突细胞成熟帮助细菌免疫逃逸^[6]。在目前发现的 82 种荚膜血清型中 HVKP 主要为 K1、K2、K5、K20、K54 和 K57 型^[6-7, 16]。其中 K1 和 K2 型在亚洲地区常见^[5-6],血清型 K1 是亚洲地区最常见的血清型(21.7%),在北美、欧洲和澳大利亚不常见^[16]。研究表明 K1 型与侵袭综合征密切相关,K2 型菌株毒力一般低于 K1 型。本研究中 HVKP 组 K1 型占 60.00%,cKP 组 K1 型占 17.86%,两者之间有统计学差异($\chi^2 = 9.983, P = 0.002$)。除此之外,HVKP 组中还检测到 K2 和 K20 型各 2 株,虽然与 cKP 组之间无统计学差异,这可能与样本量较

小有关。本研究和既往研究结果较相符,均表明 K1 型是 HVKP 最常见的血清型。

荚膜多糖 K1 型主要的调控基因是 *magA*^[17]。研究发现 *magA* 只存在于 K1 型 KP 菌株中,而 K1 型被认为是 HVKP 的主要血清型^[18]。*magA* 与高黏力表型密切相关,且该基因阳性的菌株往往在小鼠实验中表现出较高的毒力^[19]。*rmpA*、*rmpA2* 是荚膜多糖合成相关的转录调控因子基因,可调控多种血清型合成,形成高黏力表型^[6, 20]。一般认为 K1、K2 型 KP 菌株高黏力表型多见,其荚膜多糖合成调控基因 *rmpA* 和 *rmpA2* 阳性率也往往较高^[5]。

本研究中 HVKP 组 *magA* 和 *rmpA2* 基因分别占 60.00% 和 80.00%,与 cKP 组之间有统计学差异,可作为 HVKP 的重要分子标志物,与其他研究结果一致^[5]。然而, *rmpA* 在 HVKP 组阳性率为 60.00%,在 cKP 组阳性率为 46.43%,虽然 HVKP 组阳性率高于 cKP 组,但是在统计学上无差异,与大部分文献报道不符。这可能是因为样本量太小,若能增大样本量,其更有说服力。但也有一些研究报道,部分菌株 *rmpA*、*rmpA2* 均阳性却没有高黏力表现,而且为低毒力,可能与基因突变有关。

菌毛有助于细菌定植,形成生物膜,T1P 和 T3P 是 KP 的主要菌毛^[6]。T1P 由 FimA 和 FimH 组成,可介导细菌与宿主细胞上含甘露糖的受体结合,使细菌定植于泌尿生殖道、呼吸道、肠道等^[6, 21]。T3P 由 MrkA 和 MrkD 组成,主要黏附于内皮细胞、呼吸道和尿路的上皮细胞^[6]。本研究中, *fimH* 在 HVKP 组中阳性率为 96.00%,在 cKP 组中阳性率为 60.71%,有统计学差异($\chi^2 = 9.389, P = 0.002$);而 *mrkD* 在 HVKP 组中阳性率为 72.00%,在 cKP 组中阳性率为 57.14%,无统计学差异($\chi^2 = 1.268, P = 0.260$)。虽然两者在 HVKP 和 cKP 组中阳性率均不低,但是 *fimH* 比 *mrkD* 的特异性更强,故 *fimH* 提示为 HVKP 的可能性更大。

铁对于细菌新陈代谢至关重要,铁摄取系统是细菌重要的毒力分子机制。研究表明 *kfuBC* 编码铁摄取系统,是 KP 重要的毒力因子^[9, 20],在 K1、K2 血清型的 HVKP 中多见^[22]。本研究中 *kfuBC* 在 HVKP 组中阳性率为 80.00%,在 cKP 组中占 28.57%,两者差异较大($\chi^2 = 14.018, P = 0.000$),*kfuBC* 可成为 HVKP 的分子标志物。

KP 有 4 种铁载体——enterbactin、aerobactin、yersiniabactin 和 salmochelin,其中 enterbactin 和 aerobactin 最为常见。有研究认为 aerobactin 是 KP 重要的毒力因子,可使毒力增加 100 倍^[6],是 HVKP 常见的铁载体。它由 *aero* 编码合成,而 *iutA* 则编码 aerobactin 的转运体,转运螯合体进入细胞^[23-24]。本研究中 *aero* 在 HVKP 组中阳性率为 64.00%,在 cKP 组中阳性率为 28.57%,两者之间有统计学差异($\chi^2 = 6.691, P = 0.010$),提示 *aero* 可作为 HVKP 分子标志物,与既往文献报道相符。王等研究发现引起肝脓肿的毒力较高的 KP 菌株中 *aero* 阳性率超过 90%^[1]。小鼠实验发现,低毒力、铁载体阴性的 KP 菌株经基因编辑插入 *aero* 后毒力明显增强,而敲除 *aero* 的 KP 突变体毒力和侵袭性明显下降。这些研究都提示 *aero* 对 KP 毒力十分重要, *aero* 阳性可在很大程度上提示高毒力^[1, 25]。本研究中 *iutA* 基因在 HVKP 组中占 72.00%,而在 cKP 组中仅占 7.14%,同样差异明显($\chi^2 = 23.645, P = 0.000$),说明 *iutA* 可作为 HVKP 的分子标志物。

铁载体中 yersiniabactin 在 HVKP 中可高达 90%,其转运体主要由 *ybtA* 编码;enterbactin 经 c-葡萄糖基修饰后成为 salmochelin,而 *iroNB* 是它的

修饰基因。在本研究中 *yersiniabactin* 相关的 *ybtA* 基因在 HVKP 组的阳性率(92.00%)高于在 cKP 组的阳性率(75.00%),但无统计学差异;*enterbactin* 相关的 *iroNB* 基因在 HVKP 组的阳性率为 16.00%,而在 cKP 中未检测到,可能该毒力基因与 HVKP 的高毒力有关,但由于样本量较小,在统计学上无差异。所以,本研究中暂认为 *ybtA* 和 *iroNB* 基因不适合作为 HVKP 的分子标志物。

毒力基因 *wcaG* 与荚膜多糖合成相关,编码合成细菌荚膜中岩藻糖成分,有助于逃逸巨噬细胞的吞噬作用^[10]。但本研究中 *wcaG* 基因在 2 组的阳性率均不高,在 HVKP 组占 36.00%,在 cKP 组占 25.00%,故认为 *wcaG* 可能不适合作为 HVKP 的分子标志物。

脂多糖由 O 抗原、核心多糖和脂质组成,是 KP 重要的毒力因素^[6]。*wabG* 是脂多糖核心多糖的合成酶基因之一,*uge* 是 UDP-半乳糖醛酸酯异构酶编码基因,与脂多糖合成相关。本研究结果显示,*wabG* 在 HVKP 组中占 92.00%,在 cKP 组中占 82.14%,*uge* 在 HVKP 组中阳性率为 100%,在 cKP 组中为 82.14%,两者阳性率均较高,且无明显差异,不适合作为 HVKP 的特异性分子标志物。

尿素酶催化尿素分解为氨和二氧化碳,为细菌生长提供氮源^[6]。基因簇 *ureABCDEF* 编码尿素酶,其中 *ureA*、*ureB* 和 *ureC* 是其主要的结构亚基^[26]。*alls* 编码尿囊素调节子激活剂,同时也与铁载体 aerobactin 生成相关^[10, 26]。本研究中 *ureA* 阳性率在 HVKP 组(88.00%)和 cKP 组(92.86%)差异不大($\chi^2 = 0.018, P = 0.894$);基因 *alls* 的阳性率不高,在 HVKP 组(36.00%)中阳性率高于 cKP 组(21.43%),但是无统计学差异($\chi^2 = 1.382, P = 0.240$)。*ureA* 和 *alls* 基因不适合作为 HVKP 的分子标志物。

本研究存在的一些不足之处:①样本量较小,若扩大样本量,结论可能会发生改变。比如部分试验数据表明一些毒力基因和血清型阳性率在 HVKP 组中高于 cKP 组,但在统计学上无显著差异,若能增大样本量,可能会得到不同的结果。②HVKP 为临床定义,即为引起侵袭综合征的 KP 菌株,未通过动物实验对其高毒力进行验证,研究缺乏足够的严谨性。③虽然本文在选择 cKP 菌株时对临床病例资料进行了筛选,只选择单纯血流感染的病例,剔除合并其他部位侵袭性感染的病例,减少了混入 HVKP 组的风险,但并不能完全将其笼统地归为

cKP 组。

参考文献

- [1] 王京. 引起肝脓肿的肺炎克雷伯菌毒力基因分析与分子流行特征研究 [D]. 北京: 解放军医学院, 2013.
- [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] Siu LK, Yeh KM, Lin JC, Fung CP, Chang FY. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess: a new invasive syndrome [J]. *Lancet Infect Dis*, 2012, 12(11): 881-887.
- [4] Lee A, Mao W, Warren MS, Mistry A, Hoshino K, Okumura R, Ishida H, Lomovskaya O. Interplay between efflux pumps may provide either additive or multiplicative effects on drug resistance [J]. *J Bacteriol*, 2000, 182(11): 3142-3150.
- [5] Yu WL, Ko WC, Cheng KC, Lee CC, Lai CC, Chuang YC. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2008, 62(1): 1-6.
- [6] 徐水宝, 金嘉琳. 高毒力肺炎克雷伯菌的分子致病机制 [J]. 微生物与感染, 2017, 12(5): 320-326.
- [7] 王丽凤, 沈定霞. 高毒力肺炎克雷伯菌的致病机制研究进展 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(6): 468-471.
- [8] Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microbiol Spectr*, 2016. doi: 10.1128/microbiolspec.UTI-0005-2012.
- [9] Li B, Zhao Y, Liu C, Chen Z, Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(9): 1071-1081.
- [10] Turton JF, Perry C, Elgohari S, Hampton CV. 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.
- [11] Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L, Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization [J]. *PLoS One*, 2009, 4(3): e4982.
- [12] Gerlach GF, Clegg S, Allen BL. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Bacteriol*, 1989, 171(3): 1262-1270.
- [13] Izquierdo L, Coderch N, Piqué N, Bedini E, Corsaro MM, Merino S, Fresno S, Tomás JM, Regué M. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence [J]. *J Bacteriol*, 2003, 185(24): 7213-7221.
- [14] Hsieh PF, Lin TL, Lee CZ, Tsai SF, Wang JT. 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.
- [15] Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL, Chang SC. *Klebsiella pneumoniae* genotype K1: an emerging pathogen that causes septic ocular or central nervous system complications from pyogenic liver abscess [J]. *Clin Infect Dis*, 2007, 45(3): 284-293.
- [16] 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.
- [17] Fang CT, Lai SY, Yi WC, Hsueh PR, Liu KL. The Function of wzy_K1 (magA), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae* cps gene cluster [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(8): 1268-1269.
- [18] Chuang YP, Fang CT, Lai SY, Chang SC, Wang JT. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(5): 645-654.
- [19] Fang CT, Chuang YP, Shun CT, Chang SC, Wang JT. 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.
- [20] 叶李铭, 麦丽婷, 黄静. 高毒力肺炎克雷伯杆菌的临床特征和高毒力机制 [J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(3): 221-226.
- [21] Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains [J]. *Infect Immun*, 1998, 66(6): 2887-2894.
- [22] Chen Z, Liu M, Cui Y, Wang L, Zhang Y, Qiu J, Yang R, Liu C, Zhou D. A novel PCR-based genotyping scheme for clinical *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Future Microbiol*, 2014, 9(1): 21-32.
- [23] Guo Y, Wang S, Zhan L, Jin Y, Duan J, Hao Z, Lv J, Qi X, Chen L, Kreiswirth BN, Wang L, Yu F. Microbiological and clinical characteristics of hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with invasive infections in China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 24. doi: 10.3389/fcimb.2017.00024.
- [24] Russo TA, Olson R, MacDonald U, Beanan J, Davidson BA. 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.
- [25] Rahimian J, Wilson T, Oram V, Holzman RS. Pyogenic liver abscess: recent trends in etiology and mortality [J]. *Clin Infect Dis*, 2004, 39(11): 1654-1659.
- [26] Paczosa MK, Mecsas J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 629-661.

(收稿日期: 2019-06-25)