

研究报告

新生儿重症监护病房患儿粪便肺炎克雷伯菌分离株毒力特征分析

张亚南^{#1}, 丁赞博^{#2}, 孔一鸣², 刘尊杰¹, 李兆娜¹, 仝净净¹, 崔晶花^{*2}

1 首都医科大学附属北京妇产医院 北京妇幼保健院 新生儿重症监护室, 北京 100026

2 首都儿科研究所 细菌学研究室, 北京 100020

张亚南, 丁赞博, 孔一鸣, 刘尊杰, 李兆娜, 仝净净, 崔晶花. 新生儿重症监护病房患儿粪便肺炎克雷伯菌分离株毒力特征分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(7): 2663-2675.

ZHANG Ya'nan, DING Zanbo, KONG Yiming, LIU Zunjie, LI Zhaona, TONG Jingjing, CUI Jinghua. Virulence characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from the feces of children in neonatal intensive care unit[J]. Microbiology China, 2024, 51(7): 2663-2675.

摘要: 【背景】肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)常存在于人体上呼吸道和肠道, 属于条件性致病菌。目前由于临床上多重耐药菌株的出现及细菌毒力的不断增强使其受到了广泛关注。新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)患儿免疫系统不完善, 高毒力肺炎克雷伯菌的存在具有院内传播的潜在风险。【目的】探究 2021 年北京妇产医院/北京妇幼保健院 NICU 患儿粪便肺炎克雷伯菌存在情况与分离株毒力特征。【方法】对采集自北京妇产医院/北京妇幼保健院 NICU 患儿 421 份粪便样本进行肺炎克雷伯菌分离培养、全基因组测序及毒力基因分析。利用毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)和 Kleborate 数据库进行肺炎克雷伯菌毒力基因注释与多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST), 并通过拉丝试验、大蜡螟生存试验及细胞毒力试验验证各菌株毒力。【结果】在 421 份粪便样品中共检出 13 株肺炎克雷伯菌, 检出率为 3.1%, 肺炎克雷伯菌携带者主要集中于 ABO 溶血、低出生体重、新生儿肺炎和新生儿高胆红素血症患者。肺炎克雷伯菌分离株基因组大小为 5 Mb, 基因组组装后序列长度中位数 N_{50} 大于 20 kb, G+C 含量为 57%。13 株菌分别具有 13 种 ST 型别、13 种 K 血清型与 7 种 O 血清型。利用 VFDB 注释肺炎克雷伯菌分离株的 846 个毒力基因, 菌株 Kp50 具有最多的毒力蛋白和毒力结构基因, Kleborate 毒力因子评分中菌株 Kp50 评分最高。表型试验发现在 13 株肺炎克雷伯菌中, 仅有菌株 Kp50 具有高黏表型和更强的细胞毒力, 具有铁载体表达能力的菌株 Kp50、Kp260、Kp185 和 Kp273 在大

资助项目: 北京市自然科学基金(7204262)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (7204262).

[#]These authors contributed equally to this work.^{*}Corresponding author. E-mail: cuijinghua7910@hotmail.com

Received: 2023-11-20; Accepted: 2023-12-21; Published online: 2024-02-02

蜡螟幼虫试验中呈现较高的毒力。【结论】北京妇产医院/北京妇幼保健院 NICU 患儿粪便样本中肺炎克雷伯菌检出率较低, 分离得到的肺炎克雷伯菌分型呈现高度多样性, 存在携带多种毒力基因和表型的高毒力菌株, 需引起临床重视, 做好高毒力菌株在院内传播的预防与控制。

关键词: 肺炎克雷伯菌; 新生儿重症监护病房; 全基因组测序; 毒力基因; 毒力表型

Virulence characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from the feces of children in neonatal intensive care unit

ZHANG Ya'nan^{#1}, DING Zanbo^{#2}, KONG Yiming², LIU Zunjie¹, LI Zhaona¹,
TONG Jingjing¹, CUI Jinghua^{*2}

1 Neonatal Intensive Care Unit, Beijing Maternal and Child Health Care Hospital, Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital, Capital Medical University, Beijing 100026, China

2 Laboratory of Bacteriology, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China

Abstract: [Background] *Klebsiella pneumoniae*, a conditional pathogen, often colonizes the upper respiratory tract and intestinal tract of the human body. Due to the emergence of clinically multi-drug resistant strains and the continuous enhancement of strain virulence, this pathogen has received extensive attention. Children in the neonatal intensive care unit (NICU) have an imperfect immune system and are exposed to the risk of nosocomial transmission of highly virulent strains of *K. pneumoniae*. [Objective] To investigate the presence and virulence characteristics of *K. pneumoniae* isolates from feces of children in the NICU of Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital/Beijing Maternal and Child Health Care Hospital in 2021. [Methods] The strain isolation, whole genome sequencing, and virulence gene analysis of *K. pneumoniae* were carried out on 421 fecal samples collected from children in the NICU of Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital/Beijing Maternal and Child Health Care Hospital. The virulence factor database (VFDB) and Kleborate were used for annotation of the virulence genes and the multilocus sequence typing (MLST) of *K. pneumoniae*, and the virulence of each strain was examined by the string test, the *Galleria mellonella* survival test, and the cytotoxicity test. [Results] A total of 13 strains of *K. pneumoniae* were detected in the 421 fecal samples, with a detection rate of 3.1%. *K. pneumoniae* was mainly carried by the patients with ABO hemolytic, low birth weight, neonatal pneumonia, and neonatal hyperbilirubinemia. The genome of *K. pneumoniae* isolates was 5 Mb, with median sequence length after genome assembly $N_{50} > 20$ kb and G+C content of 57%. The 13 strains presented 13 ST types, 13 K serotypes, and 7 O serotypes. Among the 846 virulence genes annotated by the VFDB, strain Kp50 had the largest number of virulence proteins and virulence genes, and this strain had the highest virulence score determined by Kleborate. Phenotypic tests revealed that among the 13 *K. pneumoniae* strains, only strain Kp50 had a high mucoid phenotype and stronger cytotoxicity. Strains Kp50, Kp260, Kp185, and Kp273, which had siderophore expression ability, presented

stronger virulence in the larvae of *Galleria mellonella*. **[Conclusion]** *K. pneumoniae* isolates from the fecal samples of children in the NICU of Beijing Obstetrics and Gynecology Hospital/Beijing Maternal and Child Health Care Hospital showed a low detection rate and high diversity. There are highly virulent strains carrying multiple virulence genes and phenotypes. High attention should be paid to the prevention and control of the spread of highly virulent strains in hospitals.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; neonatal intensive care unit (NICU); whole genome sequencing; virulence gene; virulence phenotype

新生儿重症监护室(neonatal intensive care unit, NICU)是集中治疗危重新生儿的病室,患儿多为早产、低出生体重、先天畸形、免疫不成熟,在接触病原体时防御能力较为脆弱^[1-2]。肺炎克雷伯菌属于肠杆菌科克雷伯氏菌属中最为重要的一个种,广泛存在于自然界中,是NICU中常见的病原菌之一,可引起新生儿肺炎、败血症、尿路感染等多种疾病,严重时可危及患儿生命^[3]。基于传统拉丝试验、毒力基因检测和体内感染模型,肺炎克雷伯菌常被分为经典肺炎克雷伯菌(classical *Klebsiella pneumoniae*, cKp)和高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp)两种表型^[4-5]。cKp毒力较弱,主要感染抵抗力低的人群,而hvKp的侵袭性和毒力显著高于cKp,具有更大的公共健康危害^[6]。目前,临床样本中肺炎克雷伯菌的毒力调查主要包括基因检测和表型检测^[7]。全基因组测序技术能够得到更加完整的肺炎克雷伯菌分子生物学特征,结合相应的表型试验,可以更好地研究临床菌株的致病性。本研究于2021年对北京妇产医院NICU患儿粪便中的肺炎克雷伯菌携带情况进行检测,并全基因组测序,对测序数据进行多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)以及基于毒力因子数据库(virulence factor database, VFDB)的毒力基因分析,同时进行拉丝试验、大蜡螟生存试验和细胞毒力试验。旨在准确获得患儿肠道微生物中肺炎克雷伯菌的基因组特征,了

解各菌株性状以及与患儿疾病的对应关系,为今后NICU肺炎克雷伯菌的感染防控和分子流行病学监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品

2021年5–10月收集北京妇产医院/北京妇幼保健院NICU 421份患者的粪便样本(伦理审批号:2021-KY-015-01)。所有样本采集后2 h内在4℃无菌环境下转运至首都儿科研究所细菌学研究室进行肺炎克雷伯菌分离培养。参考菌株肺炎克雷伯菌ATCC 2146获赠于军事医学科学院。结肠癌细胞MC38,武汉普诺赛生命科技有限公司。大蜡螟,天津惠裕德生物科技有限公司。

1.2 培养基、主要试剂和仪器

麦康凯琼脂培养基,青岛海博生物技术有限公司;BHI肉汤培养基和血琼脂培养基,北京陆桥技术股份有限公司。细菌基因组DNA提取试剂盒,北京天根生化科技有限公司;CCK8细胞计数试剂盒,南京诺维赞生物科技股份有限公司;建库试剂盒,NEB公司;DNA检测琼脂糖凝胶,Thermo Fisher Scientific公司。荧光分光光度计,Thermo Fisher Scientific公司;生物分析仪,安捷伦科技有限公司;Illumina NovaSeq PE150测序仪,Illumina公司;实时荧光定量PCR分析仪,杭州博日科技股份有限公司;一体化荧光显微成像系统相差显微镜,Keyence公司。

1.3 菌株的分离和鉴定

按照无菌操作使用无菌水梯度稀释粪便样本,吸取 100 μL 稀释液涂布于麦康凯琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后根据肺炎克雷伯菌菌落特征初步筛选可疑菌落^[8]。采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA,使用肺炎克雷伯菌特异性检测引物 *kheF* (5'-TGATTGCATTCGCCACTGG-3') 和 *kheR* (5'-GGTCAACCCAACGATCCTG-3') 扩增 *khe* 基因(体外溶血酶基因),预期条带大小为 428 bp^[9]。PCR 反应体系(50 μL): 2 \times PCR Mix 25 μL , DNA 模板(10–20 ng/ μL) 1 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 2 μL , ddH₂O 20 μL 。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min^[10]。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测后将符合预期的菌株初步判定为肺炎克雷伯菌,于–80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存。试验开始前,取出冻存的菌株,在 BHI 固体培养基上三区划线,得到单菌落。

1.4 全基因组测序与进化关系分析

使用荧光分光光度计定量检测细菌基因组。取 1 μg DNA,使用建库试剂盒进行 DNA 文库的构建,PCR 反应条件和体系按照建库试剂盒说明书操作,PCR 产物经 AMPure XP 系统纯化,使用生物分析仪和实时荧光定量 PCR 分析仪进行粒径分布与分子定量。通过 Illumina NovaSeq PE150 测序仪进行全基因组测序,测序数据保存至 PRJNA1040414 (<https://dataview.ncbi.nlm.nih.gov/object/PRJNA1040414?reviewer=rj8trsehoas7gkpi3p1ntv558e>)。测序所得 raw reads 序列使用 readfq (version10)进行过滤处理,得到 clean data。将 clean data 使用 SPAdes v3.9.0^[11]、ABYSS^[12]和 SOAP denovo^[13]软件进行组装,并通过 CISA 软件^[14]进行整合和筛选,过滤掉小片段长度与低测序深度的序列。将得到的 fasta 格式序列文件导入 MEGA 11.0 软件^[15],利用

ClustalW 进行多序列比对,使用最大似然法构建进化树。同时使用 Kleborate 软件输入各菌株序列信息,与筛选数据库比对分析后得到各菌株组装质量、物种信息、MLST 分型,并报告 K/O 血清分型预测结果^[16–17]。

1.5 毒力基因分析

分别使用 VFDB 和 Kleborate 数据库对肺炎克雷伯菌分离株进行毒力基因分析。报告各菌株大肠菌素、耶尔森菌素、沙门菌素、气杆菌素、普鲁兰酶、鞭毛蛋白、菌毛及其他毒力结构和毒力蛋白预测结果。

1.6 拉丝试验

分别将分离到的肺炎克雷伯菌及参考菌株 ATCC 2146 接种在血琼脂培养基上,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 24 h 后用接种环向上挑起单个菌落,若有黏液丝形成且长度 $\geq 5\text{ mm}$,则判定为拉丝试验阳性。

1.7 细胞毒力试验

使用结肠癌细胞 MC38 进行体外细胞毒力试验。将分离到的肺炎克雷伯菌及参考菌株 ATCC 2146 接种至 BHI 肉汤培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 4 h 后室温、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,以感染复数 MOI=100 干预 MC38 细胞 24 h 后使用一体化荧光显微成像系统相差显微镜进行明场拍照。拍照后加入 10% CCK8 试剂孵育 2 h,测定细胞毒力。

1.8 大蜡螟生存试验

将分离的肺炎克雷伯菌及参考菌株 ATCC 2146 接种至 BHI 肉汤培养基,37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 4 h 后室温、8 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,使用 PBS 稀释菌液浓度为 $1.0\times 10^8\text{ CFU/mL}$,用微量注射器经右后足注射 10 μL 入幼虫体腔,每组注射 10 只,以 PBS 组为对照。将各组大蜡螟置于一次性培养皿中,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育,每 3 h 记录各组大蜡螟存活情况。

1.9 数据分析

应用 GraphPad Prism 8 软件对数据进行统计学分析,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。使用 GraphPad Prism 8 软件和 ChiPlot 网站(<https://www.chiplot.online/>)绘制图片。

2 结果与分析

2.1 肺炎克雷伯菌来源分布

从北京妇产医院/北京妇幼保健院 NICU 病房共收集到 421 份样本,经分离、培养和鉴定,

共检出 13 份肺炎克雷伯菌阳性样本,检出率为 3.1% (表 1)。检出患者集中于 4 类疾病: ABO 溶血(2/5)、低出生体重儿(1/31)、新生儿肺炎(6/241)和新生儿高胆红素血症(4/26) (图 1)。

2.2 基因组组装报告与进化关系

根据患者病例号对肺炎克雷伯菌分离株进行编号,使用 Kleborate 软件对细菌基因组进行注释,结果证实 13 个细菌分离株均为肺炎克雷伯菌。对基因组组装质量评估显示,13 株肺炎克雷伯菌基因组大小接近,均为 5 Mb,基因组组装后序列长度中位数 $N_{50}>20$ kb, G+C 含量为 57%,基因组组装质量较好(表 2)。本研究中的

表 1 13 例肺炎克雷伯菌检出阳性患儿基本信息

Table 1 Basic information of 13 children with positive *Klebsiella pneumoniae* detection

病例 Patient	胎龄 Gestational age	性别 Gender	出生体重 Birth weight (g)	分娩方式 Type of childbirth	Apgar 评分 Apgar score	日龄 Age in days (d)	患儿疾病 Diseases of children
50	39	男 Male	4 190	剖宫产 Caesarean	10-10-10	3	ABO 溶血 ABO hemolytic
55	38	女 Female	3 750	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	3	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia
59	35	女 Female	2 300	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	6	低出生体重 Low birth weight
131	40	女 Female	3 720	产钳 Forceps midwifery	10-10-10	4	高胆红素血症 Hyperbilirubinemia
182	37	男 Male	2 810	产钳 Forceps midwifery	10-10-10	8	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia
185	38	男 Male	3 030	产钳 Forceps midwifery	10-10-10	7	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia
234	41	男 Male	3 490	剖宫产 Caesarean	10-10-10	3	高胆红素血症 Hyperbilirubinemia
260	39	男 Male	3 580	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	4	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia
263	41	男 Male	3 770	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	7	高胆红素血症 Hyperbilirubinemia
273	37	男 Male	2 315	剖宫产 Caesarean	10-10-10	5	ABO 溶血 ABO hemolytic
293	36	女 Female	1 920	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	3	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia
369	38	男 Male	3 490	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	7	高胆红素血症 Hyperbilirubinemia
417	39	男 Male	3 710	自娩 Spontaneous childbirth	10-10-10	6	新生儿肺炎 Neonatal pneumonia

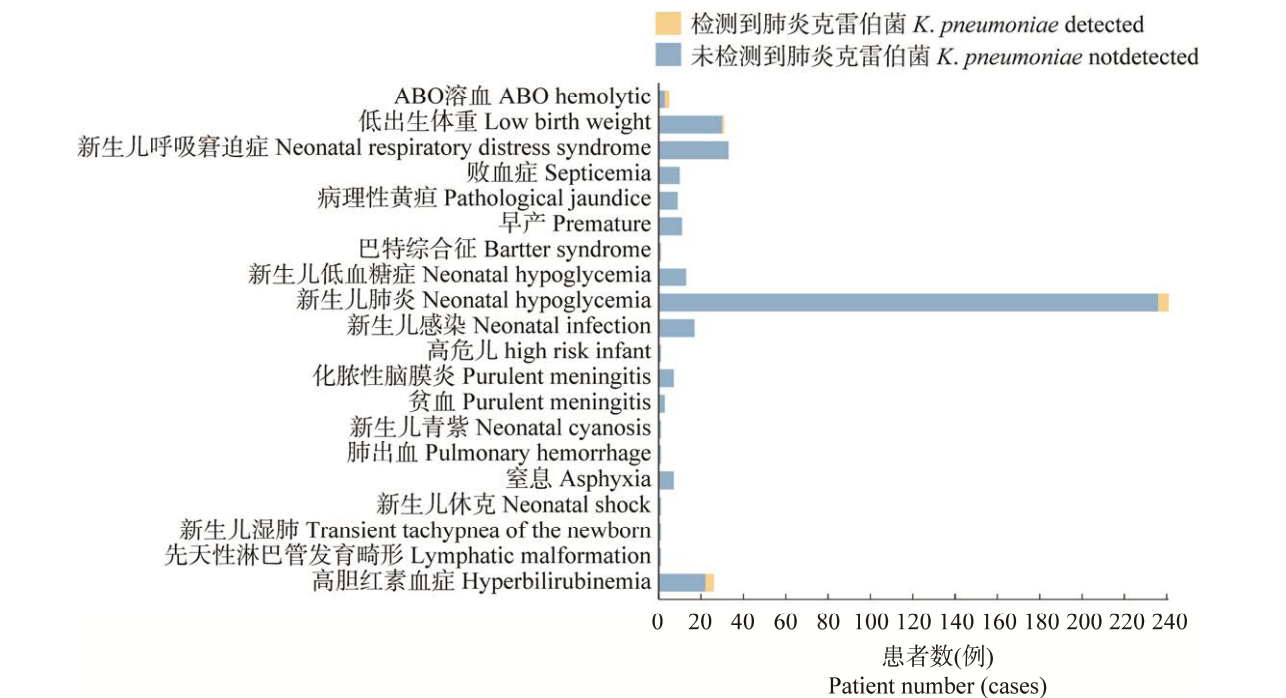


图 1 不同疾病患儿粪便中肺炎克雷伯菌检出情况
Figure 1 Detection of *Klebsiella pneumoniae* in the feces of children with different diseases.

表 2 肺炎克雷伯菌分离株基因组组装和分型情况
Table 2 Genome assembly and typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates

菌株 Strain	基因组大小 Genome size (bp)	<i>N</i> ₅₀ (bp)	G+C (%)	MLST 分型 MLST type	K locus 分型 K locus type	O locus 分型 O locus type
Kp50	5 253 878	380 731	57.54	ST1764	KL64	O1v1
Kp55	5 184 581	305 467	57.52	ST65	KL2	O1v2
Kp59	5 332 168	216 741	57.28	ST200	KL27	O3b
Kp131	5 434 367	382 536	57.37	ST10-2LV	KL102	O2v1
Kp182	5 484 114	361 017	57.52	ST327	KL81	O1v2
Kp185	5 357 492	365 819	57.36	ST36	KL27	O2v2
Kp234	5 469 733	395 521	57.39	ST3827	KL111	O3b
Kp260	5 473 444	495 722	57.21	ST11	KL13	O3b
Kp263	5 311 811	319 394	57.47	ST29	KL54	O1v2
Kp273	5 343 834	297 956	57.41	ST585	KL15	O4
Kp293	5 134 610	322 553	57.68	ST37	KL12	OL103
Kp369	5 341 480	291 934	57.38	ST1446	KL39	O3b
Kp417	5 397 281	546 653	57.61	ST17-2LV	KL148	O1v2

13 株肺炎克雷伯菌分属 13 种不同的 MLST 型别, 其中 ST11 型肺炎克雷伯菌是中国最重要的临床病原菌之一, 菌株 Kp260 属于该型别^[18]。基于 O-抗原转运酶基因(*wzx*)、O-抗原聚合酶基因(*wzy*)和糖基转移酶基因(*wbaP*)等预测肺炎克雷伯菌血清型 KL, 同样可将肺炎克雷伯菌分离株分为 13 种不同的类型, 其中较多报道菌株 Kp50 对应的 KL64 分型和菌株 Kp55 对应的 KL2

分型与毒力相关^[18-19]。基于 O-抗原跨膜结构域基因(*wzm*)或 O-抗原核酸结合域基因(*wzt*)基因可将 13 株肺炎克雷伯菌按照脂多糖分型 O^[20]分为 7 种不同的类型,其中 O1 和 O2 分型为主要流行型,对应的菌株为菌株 Kp50、Kp55、Kp131、Kp182、Kp185、Kp263 和 Kp417。肺炎克雷伯菌序列比对结果显示,菌株 Kp50、Kp55、Kp260、Kp185 距离较近,可能具有相似的表型(图 2)。

2.3 毒力基因分析与毒力评分

采用 VFDB 注释 13 株肺炎克雷伯菌共得到 846 个注释结果,这些注释结果可聚类为 13 种毒力基因(图 3)。其中菌株 Kp50 具有最多的毒力蛋白和毒力结构基因。除菌株 Kp50 外,菌株 Kp185、Kp260、Kp263、Kp273 具有大肠菌素和耶尔森菌素基因的一种或多种,菌株 Kp182 和 Kp260 具有毒性蛋白基因,菌株 Kp131 和 Kp263 具有锚定基因和黏附素相关基因。聚类分析发现,菌株 Kp50、Kp185、Kp260、Kp273 聚类接近。铁载体是肺炎克雷伯菌主要的毒力因

子, Kleborate 根据铁载体相关基因进行毒力评分,菌株 Kp50 为 3 分,菌株 Kp185、Kp260、Kp273 为 1 分,菌株 Kp263 及其他菌株为 0 分,与 VFDB 聚类结果基本相同。

2.4 荚膜多糖基因与拉丝试验

高毒力肺炎克雷伯菌往往伴随着高黏表型^[17], Kleborate 分析表明,菌株 Kp50 具有与高黏表型相关的荚膜多糖基因 *rmpA* 和 *rmpA2* (表 3)。拉丝试验中,仅有菌株 Kp50 表现出了拉丝能力,而 ATCC 2146 及其他 12 株菌不具有拉丝能力,这与基因注释结果一致(图 4)。

2.5 肺炎克雷伯菌对肠道细胞毒性检测

肺炎克雷伯菌感染细胞后,菌株 Kp50、Kp185、Kp260、Kp273 和 Kp369 与 ATCC 2146 相比细胞存活率显著降低(表 4)。在一体化荧光显微成像系统相差显微镜下观察发现,菌株 Kp50 干预后 MC38 细胞数量明显减少,细胞状态异常(图 5)。其他菌株干预后细胞数量未观察到明显变化。

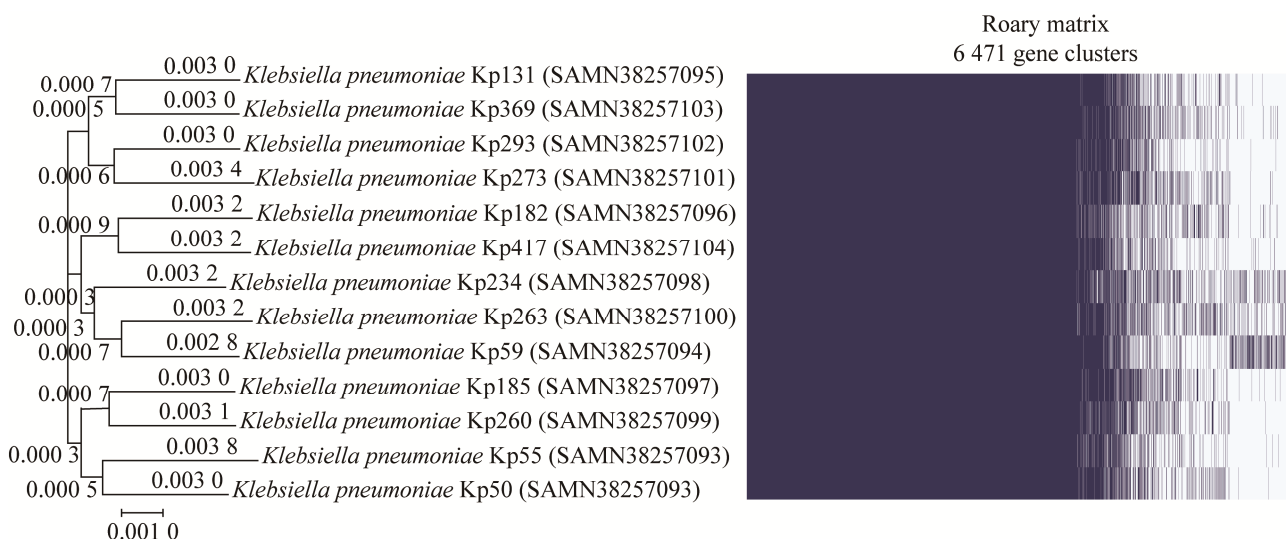


图 2 基于最大似然法构建肺炎克雷伯菌分离株进化树 比例尺“0.001 0”代表遗传距离的单位,分支上的数字代表进化距离,括号中的数字为菌株在 GenBank 中的序列号

Figure 2 Construction of the evolutionary tree of *Klebsiella pneumoniae* isolates based on the maximum likelihood method. Scale “0.001 0” represents the unit of genetic distance. The numbers on the branches represent evolutionary distances. The numbers in parentheses are the serial numbers of the strains in GenBank.

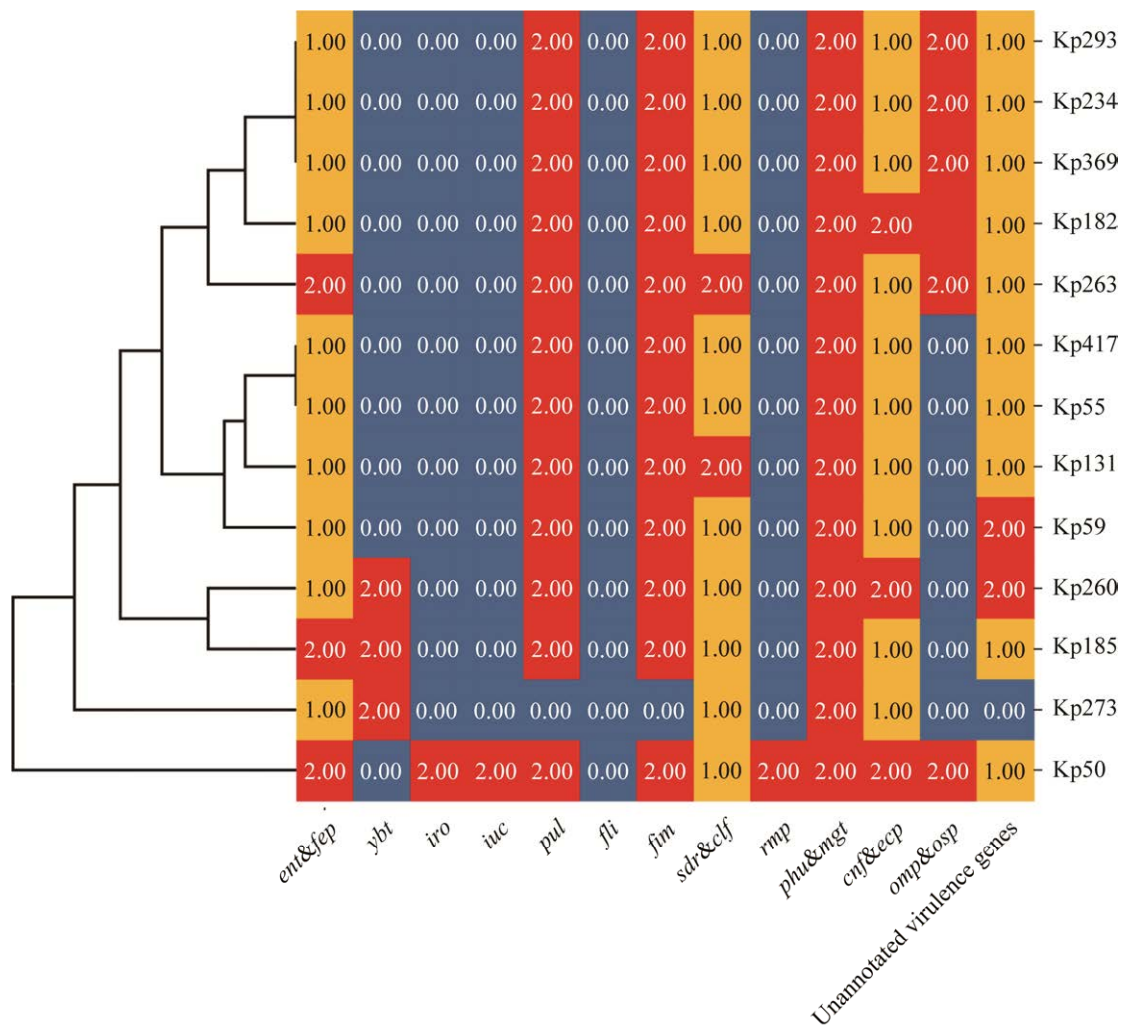


图3 VFDB 数据库注释肺炎克雷伯菌分离株毒力基因 *ent&fep*: 大肠菌素基因; *ybt*: 耶尔菌素基因; *iro*: 沙门菌素基因; *iuc*: 气杆菌素基因; *pul*: 普鲁兰酶基因; *fli*: 鞭毛蛋白基因; *fim*: 菌毛基因; *sdr&clf*: 锚定蛋白和黏附素基因; *rmp*: 荚膜多糖基因; *phu&mgt*: 逃避免疫反应相关基因; *cnf&ecp*: 毒性蛋白分泌基因; *omp&osp*: 特殊膜蛋白基因. 图中颜色与毒力基因完整性有关. 蓝色(0.00)表示与参考基因序列比对相似度为 0%; 橙色(1.00)表示与参考基因序列比对相似度为 1%–99%; 红色(2.00)表示与参考基因序列比对相似度为 100%

Figure 3 VFDB database annotation of virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *ent & fep*: Colistin genes; *ybt*: Yersin genes; *iro*: Salmonellin genes; *iuc*: Aerobactin genes; *pul*: Pullulanase genes; *fli*: Flagellin genes; *fim*: Bacteriorhodopsin genes; *sdr & clf*: Anchoring proteins and adhesins genes; *rmp*: Podocarp polysaccharide genes; *phu & mgt*: Evasion of immune response-related genes; *cnf & ecp*: Virulence protein secretion genes; *omp & osp*: Specialized membrane protein genes. The colors in the figure are related to virulence gene integrity. Blue (0.00) indicates 0% similarity to the reference gene sequence comparison; Orange (1.00) indicates 1%–99% similarity to the reference gene sequence comparison; Red (2.00) indicates 100% similarity to the reference gene sequence comparison.

表 3 肺炎克雷伯菌分离株荚膜多糖基因
Table 3 Genes for podoplanin polysaccharide in *Klebsiella pneumoniae* isolates

Strain	<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>
Kp50	+	+
Kp55	-	-
Kp59	-	-
Kp131	-	-
Kp182	-	-
Kp185	-	-
Kp234	-	-
Kp260	-	-
Kp263	-	-
Kp273	-	-
Kp293	-	-
Kp369	-	-
Kp417	-	-

+: 荚膜多糖基因注释阳性; -: 荚膜多糖基因注释阴性
+: Positive annotation of podoplanin gene; -: Negative annotation of podoplanin gene.

表 4 CCK8 检测细胞毒力
Table 4 CCK8 assay for cytotoxicity

Strain	Cell survival rate (%)	Adjusted <i>P</i> value	Summary
ATCC 2146	74.13±1.82	ns	ns
Kp50	38.12±0.36	<0.000 1	****
Kp55	69.29±0.89	0.589 1	ns
Kp59	70.59±4.92	0.877 2	ns
Kp131	73.83±2.74	0.999 9	ns
Kp182	80.57±2.25	0.266 2	ns
Kp185	40.88±2.22	<0.000 1	****
Kp234	68.50±2.94	0.413 6	ns
Kp260	48.62±0.30	<0.000 1	****
Kp263	80.57±2.25	0.266 2	ns
Kp273	61.65±0.65	0.002 8	**
Kp293	68.13±0.96	0.341 1	ns
Kp369	61.09±0.85	0.001 7	**
Kp417	90.39±0.89	0.000 1	***

以 PBS 处理细胞为空白对照计算细胞存活率, 同时进行组间比较(对照组为 ATCC 2146, *: $P\leq0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.000\ 1$; ns: 无显著性差异)
Cell survival was calculated using PBS-treated cells as a blank control, and intergroup comparisons were also performed (ATCC 2146 for control, *: $P\leq0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$; ****: $P<0.000\ 1$; ns: No significant difference).

2.6 大蜡螟毒性试验结果

将肺炎克雷伯菌注射大蜡螟后, 大蜡螟对不同菌株耐受能力存在差异。其中菌株 Kp50、Kp260、Kp369 在 18 h 内达到大蜡螟 80%致死量

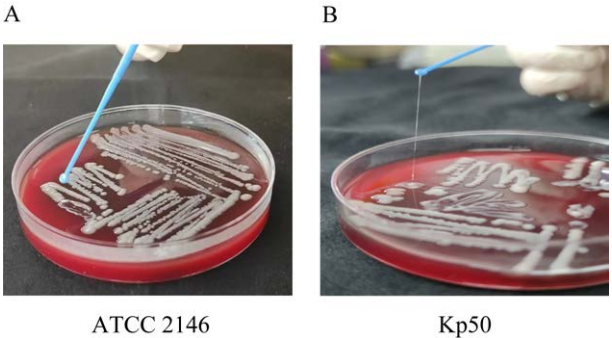


图 4 肺炎克雷伯菌分离株拉丝试验 A:参考菌株 ATCC 2146, 拉丝试验阴性. B: Kp50, 拉丝试验阳性

Figure 4 String test of *Klebsiella pneumoniae* isolates. A: Reference strain ATCC 2146, negative string test. B: Kp50, positive string test.

LD_{80} , 菌株毒性较高(图 6)。菌株 Kp55、Kp185、Kp234、Kp263、Kp273、Kp293 与 PBS 组具有显著性差异($P<0.05$), 但毒性相较于菌株 Kp50、Kp260、Kp369 这 3 株菌较弱。

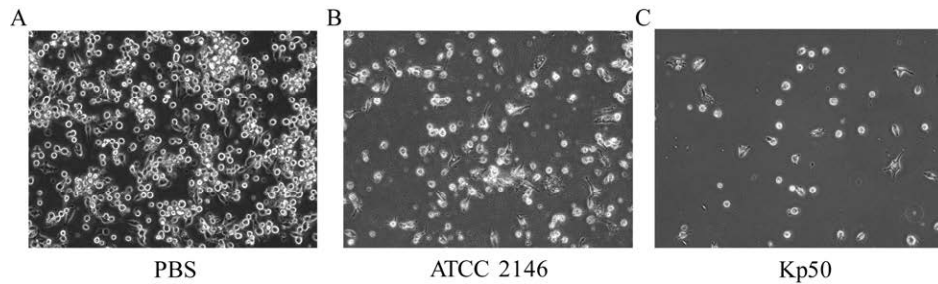


图5 肺炎克雷伯菌对肠道细胞毒性 A: PBS 阴性对照. B: ATCC 2146 与细胞共培养. C: Kp50 与细胞共培养. 拍摄使用一体化荧光显微成像系统相差显微镜, 放大倍数为 200 倍

Figure 5 Intestinal cytotoxicity by *Klebsiella pneumoniae*. A: PBS negative control. B: ATCC 2146 infected cells. C: Kp50 infected cells. Photography using a phase contrast microscope in an integrated fluorescence microimaging system with a magnification of 200 \times .

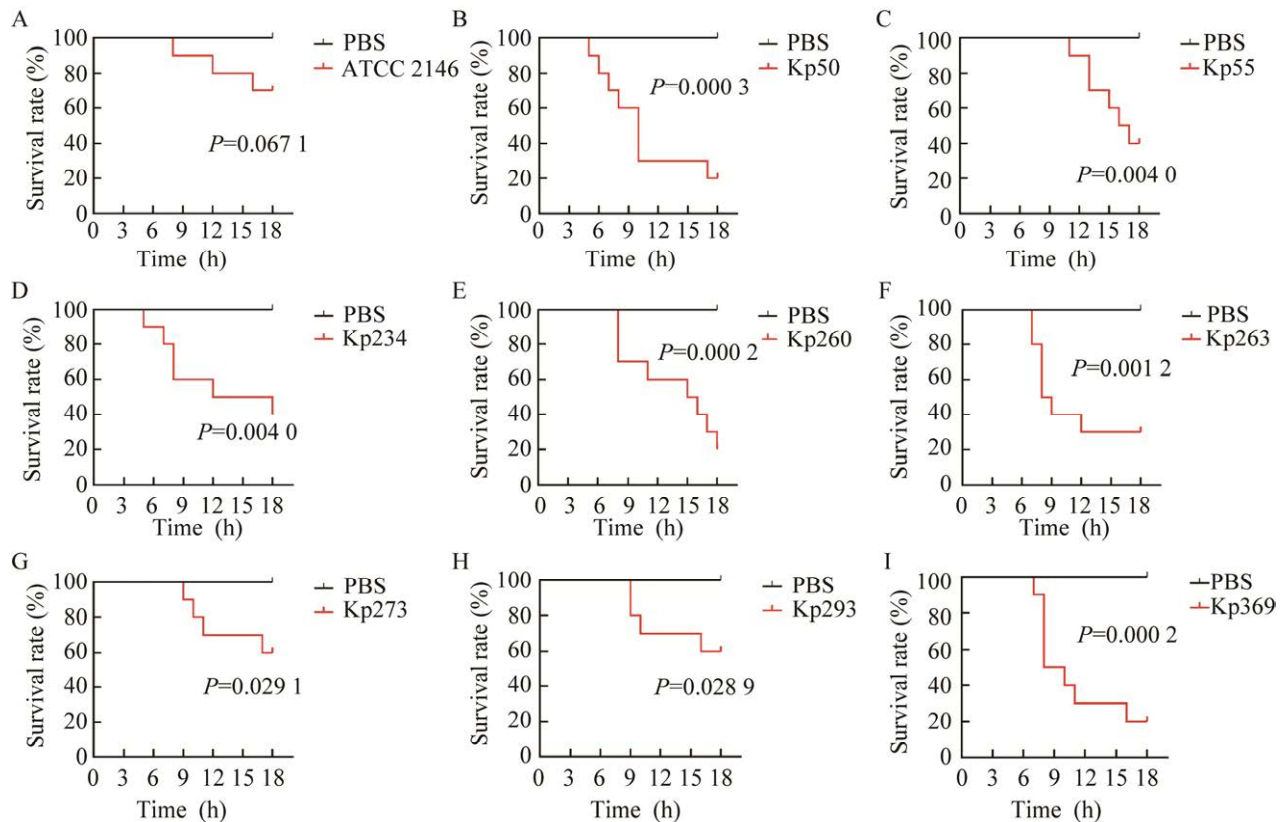


图6 肺炎克雷伯菌感染大蜡螟生存曲线 A: 注射参考菌株 ATCC 2146. B: 注射 Kp50. C: 注射 Kp55. D: 注射 Kp234. E: 注射 Kp260. F: 注射 Kp263. G: 注射 Kp273. H: 注射 Kp293. I: 注射 Kp369

Figure 6 Survival curve of *Klebsiella Pneumoniae* infected with greater wax borer. A: Injection of reference strain ATCC 2146. B: Injection of strain Kp50. C: Injection of strain Kp55. D: Injection of strain Kp234. E: Injection of strain Kp260. F: Injection of strain Kp263. G: Injection of strain Kp273. H: Injection of strain Kp293. I: Injection of strain Kp369.

3 讨论与结论

高毒力肺炎克雷伯菌(hvKp)比经典肺炎克雷伯菌(cKp)更具毒性和侵袭性,能够引起原发性肝脓肿、肺炎、脑膜炎和坏死性小肠结肠炎等疾病,对NICU患儿具有更加严重的危害^[21-23]。承德医科大学附属医院报道了一例由家庭感染hvKp引起脑膜炎的患儿,该患儿仅一月大,在其脑脊液、粪便及父亲的粪便中均检出hvKp,这表明hvKp具有在NICU中传播及暴发的可能^[24]。英国诺福克和诺里奇大学医院在2019年对NICU患儿粪便样本中的肺炎克雷伯菌进行检测,检出率为7.3%,检出的9株肺炎克雷伯菌均为仅携带肠杆菌素的cKp,患者多为早产儿^[25]。本研究对2021年北京妇产医院/北京妇幼保健院NICU患儿粪便样本进行监测,结果显示肺炎克雷伯菌在样本中的检出率为3.1%,略低于英国的报道,对肠道携带肺炎克雷伯菌患儿的疾病种类进行分析,发现阳性检出患儿主要集中于4类疾病,其中ABO溶血患者(2/5)肺炎克雷伯菌携带的比例最高,新生儿ABO溶血是指新生儿的血型与母亲的血型不相容,导致新生儿的红细胞被母体产生的抗体破坏,从而引起贫血、黄疸和高胆红素血症。这种疾病状态下是否容易导致肺炎克雷伯菌的定殖和感染需要收集更多样本并进行进一步的研究。

肺炎克雷伯菌的毒力与传播能力可以通过MLST分型和K/O血清分型初步判断。随着全基因组测序技术的发展和生物信息学分析工具的成熟,全基因组测序已经成为更加准确的分型判断手段^[26]。本研究发现分离得到的13株肺炎克雷伯菌呈现分型多样性。其中菌株Kp50对应的KL64分型和菌株Kp55对应的KL2分型具有较多的毒力报道^[18-19]。ST11型肺炎克雷伯菌是中国重要的临床病原菌,菌株Kp260则属于该

ST分型^[18]。通过分子分型方法可以初步判断以上3种菌株为潜在高毒力且传播性较强的菌株。这3株菌对应的新生儿出生时间仅为3-4d,如何在短期内接触到高毒高传播性的肺炎克雷伯菌需要重点关注。

利用VFDB数据库和Kleborate软件注释肺炎克雷伯菌分离株毒力基因,并通过拉丝试验、细胞试验和大蜡螟毒性试验从表型上验证。结果发现在各个评价体系下,菌株Kp50均具有高毒力,是典型的高毒力肺炎克雷伯菌。结合承德地区脑膜炎患儿的病例报告^[24],本研究粪便中检出高毒性肺炎克雷伯菌的50号患者的预后及家庭肺炎克雷伯菌感染情况值得重点关注。菌株Kp185、Kp260、Kp273和Kp360具有显著的细胞毒力和大蜡螟毒力,暗示着它们为潜在的高毒菌株。

综上所述,本研究发现北京妇产医院/北京妇幼保健院NICU患者肠道中肺炎克雷伯菌的携带率为3.1%,存在高毒力肺炎克雷伯菌,进一步挖掘高毒力肺炎克雷伯菌定殖与新生儿疾病的相关性意义重大。另外,粪便高毒力肺炎克雷伯菌有易传播的风险,且可能产生耐药性,因此要加强NICU新生儿肺炎克雷伯菌感染的防控问题,需重视粪便感染途径的阻断。

REFERENCES

- [1] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 中华儿科杂志编辑委员会. 宏基因组二代测序技术在新生儿感染性疾病中的临床应用专家共识[J]. 中华儿科杂志, 2022, 60(6): 516-521.
The Subspecialty Group of Neonatology, the Society of Pediatrics, Chinese Medical Association; the Editorial Board, Chinese Journal of Pediatrics. Expert consensus on the application of metagenomics next-generation sequencing in neonatal infectious diseases[J]. Chinese Journal of Pediatrics, 2022, 60(6): 516-521 (in Chinese).
- [2] MARINO A, PULVIRENTI S, CAMPANELLA E, STRACQUADANIO S, CECCARELLI M, MICALI C,

- TINA LG, Di DIO G, STEFANI S, CACOPARDO B, NUNNARI G. Ceftazidime-avibactam treatment for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in preterm infants in NICU: a clinical experience[J]. Antibiotics, 2023, 12(7): 1169.
- [3] WYRES KL, LAM MMC, HOLT KE. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nature Reviews Microbiology, 2020, 18: 344-359.
- [4] XU YP, ZHANG JF, WANG M, LIU M, LIU GT, QU HP, LIU JL, DENG ZX, SUN JY, OU HY, QU JM. Mobilization of the nonconjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Genome Medicine, 2021, 13(1): 119.
- [5] RUSSO TA, MARR CM. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clinical Microbiology Reviews, 2019, 32(3): e00001-e00019.
- [6] 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.
- WANG LF, SHEN DX. Progress in pathogenic mechanism of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Microbiology and Immunology, 2016, 36(6): 468-471 (in Chinese).
- [7] ZHANG QB, ZHU P, ZHANG S, RONG YJ, HUANG ZA, SUN LW, CAI T. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* detection methods: a minireview[J]. Archives of Microbiology, 2023, 205(10): 326.
- [8] YUAN J, CHEN C, CUI JH, LU J, YAN C, WEI X, ZHAO XN, LI NN, LI SL, XUE GH, CHENG WW, LI BX, LI H, LIN WS, TIAN CY, ZHAO JT, HAN JQ, AN DZ, ZHANG Q, WEI H, et al. Fatty liver disease caused by high-alcohol-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. Cell Metabolism, 2019, 30(6): 1172.
- [9] 和晋渝, 邱景富, 刘梦颖, 闫小娟, 李迎丽, 郭兆彪, 周冬生. PCR 鉴定肺炎克雷伯菌的强毒性血清型[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(4): 554-557.
- HE JY, QIU JF, LIU MY, YAN XJ, LI YL, GUO ZB, ZHOU DS. Polymerase chain reaction analysis for detecting highly virulent serotypes of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Letters in Biotechnology, 2012, 23(4): 554-557 (in Chinese).
- [10] 陶宇杰, 舒志万, 郭敏, 高翔, 王嵘, 沈国平, 韩睿, 朱德锐. 西藏扎布耶盐碱湖细菌的多样性与分离菌株的生长特性[J]. 微生物学通报, 2023, 50(12): 5286-5299.
- TAO YJ, SHU ZW, GUO M, GAO X, WANG R, SHEN GP, HAN R, ZHU DR. Bacterial diversity and growth characteristics of isolates from Zabuye Lake, Xizang[J]. Microbiology China, 2023, 50(12): 5286-5299 (in Chinese).
- [11] BANKEVICH A, NURK S, ANTIPOV D, GUREVICH AA, DVORKIN M, KULIKOV AS, LESIN VM, NIKOLENKO SI, PHAM S, PRJIBELSKI AD, PYSHKIN AV, SIROTKIN AV, VYAHHI N, TESLER G, ALEKSEYEV MA, PEVZNER PA. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. Journal of Computational Biology, 2012, 19(5): 455-477.
- [12] SIMPSON JT, WONG K, JACKMAN SD, SCHEIN JE, JONES SJM, BIROL I. ABySS: a parallel assembler for short read sequence data[J]. Genome Research, 2009, 19(6): 1117-1123.
- [13] LI RQ, ZHU HM, RUAN J, QIAN WB, FANG XD, SHI ZB, LI YR, LI ST, SHAN G, KRISTIANSEN K, LI SG, YANG HM, WANG J, WANG J. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing[J]. Genome Research, 2010, 20(2): 265-272.
- [14] LIN SH, LIAO YC. CISA: contig integrator for sequence assembly of bacterial genomes[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e60843.
- [15] TAMURA K, STECHER G, KUMAR S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. Molecular Biology and Evolution, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [16] LAM MMC, WICK RR, WATTS SC, CERDEIRA LT, WYRES KL, HOLT KE. A genomic surveillance framework and genotyping tool for *Klebsiella pneumoniae* and its related species complex[J]. Nature Communications, 2021, 12: 4188.
- [17] WYRES KL, WICK RR, GORRIE C, JENNEY A, FOLLADOR R, THOMSON NR, HOLT KE. Identification of *Klebsiella* capsule synthesis loci from whole genome data[J]. Microbial Genomics, 2016, 2(12): e000102.
- [18] PU DN, ZHAO JK, CHANG K, ZHUO XX, CAO B. "Superbugs" with hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*: the rise of such emerging nosocomial pathogens in China[J]. Science Bulletin, 2023, 68(21): 2658-2670.
- [19] ZHOU Y, WU CY, WANG BJ, XU YL, ZHAO HL, GUO YJ, WU XC, YU JY, RAO LL, WANG XY, YU FY. Characterization difference of typical KL1, KL2 and ST11-KL64 hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Drug Resistance Updates, 2023, 67: 100918.
- [20] PATRO LPP, SUDHAKAR KU, RATHINAVELAN T.

- K-PAM: a unified platform to distinguish *Klebsiella* species K- and O-antigen types, model antigen structures and identify hypervirulent strains[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10: 16732.
- [21] 徐水宝, 杨思宇, 翁珊珊, 陈晨, 陈澍, 张文宏, 金嘉琳. 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[J]. *微生物与感染*, 2019, 14(6): 338-344.
XU SB, YANG SY, WENG SS, CHEN C, CHEN S, ZHANG WH, JIN JL. Distribution of serotypes and virulence genes in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and exploration of molecular markers[J]. *Journal of Microbes and Infections*, 2019, 14(6): 338-344 (in Chinese).
- [22] HASSUNA NA, ABDELAZIZ RA, ZAKARIA A, ABDELHAKHEEM M. Extensively-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* recovered from neonatal sepsis cases from a major NICU in Egypt[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 11: 1375.
- [23] 郭梦雨, 刘莹, 费冰, 任彦颖, 刘心伟, 赵芝静, 李永伟. 高毒力肺炎克雷伯菌毒力因子研究进展[J]. *中华预防医学杂志*, 2021, 55(11): 1357-1363.
GUO MY, LIU Y, FEI B, REN YY, LIU XW, ZHAO ZJ, LI YW. Research progress on virulence factors of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Chinese Journal of Preventive Medicine*, 2021, 55(11): 1357-1363 (in Chinese).
- [24] ZHANG ZW, WEN HN, WANG H, ZHANG P, LI J, LIANG YY, LIU YC, SUN LH, XIE SJ. A case of meningitis in an infant due to hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* transmission within a family[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2022, 15: 4927-4933.
- [25] CHEN YH, BROOK TC, SOE CZ, O'NEILL I, ALCON-GINER C, LEELASTWATTANAGUL O, PHILLIPS S, CAIM S, CLARKE P, HALL LJ, HOYLES L. Preterm infants harbour diverse *Klebsiella* populations, including atypical species that encode and produce an array of antimicrobial resistance- and virulence-associated factors[J]. *Microbial Genomics*, 2020, 6(6): e000377.
- [26] LUO K, TANG J, QU Y, YANG X, ZHANG L, CHEN Z, KUANG L, SU M, MU D. Nosocomial infection by *Klebsiella pneumoniae* among neonates: a molecular epidemiological study[J]. *Journal of Hospital Infection*, 2021, 108: 174-180.