

网络出版时间: 2023-12-28 11:38:10 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20231227.0756.012>

6株肺炎克雷伯菌的耐药性及致病性分析

隋成宇^{1,2}, 王家桢^{2,3}, 张之珺², 张丽丽², 吕蒙², 周冬生², 杨文慧^{1,2}

摘要 目的 了解6株肺炎克雷伯菌临床分离株的耐药性及致病性,为肺炎克雷伯菌感染防治提供依据。方法 分离培养获得来自不同医院的6株临床菌株后,基于*khe*基因对其进行物种特异性鉴定,利用第二代测序技术获得其全基因组序列;基于全基因组序列鉴定其荚膜血清型分型、ST分型、耐药基因;利用PCR法对其荚膜血清型基因、毒力基因进行验证或鉴定;利用微量肉汤稀释法对其进行药物敏感性验证;利用液体气溶胶肺递送装置进行小鼠肺炎克雷伯菌攻毒试验以检测其致病性。结果 基因鉴定结果显示6株菌均为K2荚膜血清型,分属ST14、ST65、ST700、ST86四种ST分型;6株菌共包含6种毒力基因、23种耐药基因。微量肉汤稀释法实验结果显示,6株菌皆对氨苄西林耐药,仅1株菌为多药耐药菌株;有4株菌为高黏菌株;有5株菌可导致小鼠死亡,初步判定为高毒力菌株。结论 不同来源的6株肺炎克雷伯菌临床分离株中,有1株NY 13294株为高毒力且多药耐药菌株,另有4株高毒力菌株对1~2类抗生素耐药。**关键词** 肺炎克雷伯菌;临床分离株;耐药性;致病性;黏性中图分类号 R 378.99

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2024)01-0071-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.01.012

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)是一种肠杆菌科、克雷伯菌属的革兰阴性兼性厌氧杆菌,有较厚的荚膜,无芽孢、鞭毛,通常定植于人体黏膜表面,尤其是口鼻黏膜和胃肠道黏膜^[1]。该菌属于条件致病菌,是院内感染最常见病原体之一,可导致新生儿败血症、免疫力低下人群肺部和尿路等多系统感染^[2]。据报道^[3]感染肺炎克雷伯菌的人数每年至少超过90 000人,其中有超过7 000人死亡。与此同时,由于不加限制地滥用抗生素,肺炎克雷伯菌有

向多重耐药迅速发展的趋势,其高致病性与高耐药性已逐渐引起世界卫生组织的注意^[4]。肺炎克雷伯菌的临床感染与耐药形势严峻,该研究对6株肺炎克雷伯菌临床分离株进行了系统的细菌分型、耐药性和致病性分析,旨在为肺炎克雷伯菌防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 脑心浸液培养基购于美国BD公司;泊洛沙姆溶液购于美国Sigma公司;血琼脂平板购于北京陆桥技术有限责任公司;PBS缓冲液购于天津灏洋生物制品科技有限责任公司;PCR引物合成、PCR产物测序由北京天一辉远公司完成。

1.1.2 主要仪器 喉镜以及手持气溶胶肺递送装置购于北京慧荣和科技有限公司;PCR扩增仪购于美国ABI公司(型号: GeneAmp 9700);电泳仪购于美国BIO-RAD公司(型号: POWER-PAC-300);紫外分光光度计购于上海元析仪器有限公司(型号: UV-8000);生物安全柜购于美国Nauire公司(型号: NU-400-400E)。

1.1.3 菌株以及实验动物 6株肺炎克雷伯菌临床分离株来自2007—2022年间不同医院的6例住院患者,具体来源见表1;对照菌株肺炎克雷伯菌SGH10由本实验室保藏。70只18~20g的SPF级雌性CBA/J小鼠,购自北京华阜康科技有限公司。本实验已通过军事医学研究院微生物流行病学研究所动物福利伦理审查(编号: IACUC-IME-2023-023)。小鼠饲养于军事医学研究院实验动物中心。

表1 菌株背景

菌株名称	时间(年)	来源
NY 10906	2020	秦皇岛市第一医院
NY 6595	2019	烟台市毓璜顶医院
NY 7322	2018	北京市佑安医院
NY 5166	2009	重庆市某医院
NY 5156	2007	重庆市某医院
NY 13294	2022	北京市中国人民解放军第302医院

1.2 方法

2023-11-25 接收

基金项目: 病原微生物生物安全国家重点实验室自主研究课题(编号: SKLPBS2225)

作者单位: ¹ 安徽医科大学基础医学院, 合肥 230032² 军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所, 病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071³ 贵州医科大学基础医学院免疫学教研室, 贵阳 550025

作者简介: 隋成宇, 男, 硕士研究生;

杨文慧, 女, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: fionyoung@163.com

1.2.1 菌落形态学观察 取 15 μl 甘油菌接种于固体脑心浸液培养基(BHI 培养基) 上, 进行平板划线, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 12 h, 观察菌落纯度与菌落形态。挑选单菌落进行拉丝实验测试菌株黏性, 重复 3 次, 拉丝长度大于 5 mm 则为高黏菌株^[5]。

1.2.2 物种特异性基因 PCR 鉴定 以溶血毒素 *khe* 基因^[6] (F: TGATTGCATTGCCACTGG; R: GGT-CAACCCAACGATCCTG; 片段长度: 428 bp) 为肺炎克雷伯菌物种特异性基因, 对 6 株临床分离株以及 SGH 10 对照株进行菌种 PCR 鉴定, 其引物序列见表 2。挑单菌落置于 100 μl 无菌水中, 利用 PCR 扩增仪在 99 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解细菌 10 min, 离心后获得到菌株 DNA, 随后进行 PCR 扩增, 反应体系共计 30 μl , 包含 3 μl 的菌株 DNA 模板、15 μl 的 2 \times Taq PCR MasterMix、上下游引物各 0.3 μl 、11.4 μl 的 ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s 48 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 进行 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 随后置于凝胶成像仪下观察目标条带产生情况。

1.2.3 全基因组测序 利用第二代测序(next generation sequencing, NGS) 技术对 6 株临床分离株进行全基因组测序。挑取单克隆菌落, 接菌至 LB 液体培养基 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 过夜培养, 菌液以 4 800 r/min 离心 10 min, 弃上清液。加 1 ml PBS 缓冲液重复清洗细菌, 弃掉上清液后样品送至北京诺禾致源科技股份有限公司进行 NGS 测序。

1.2.4 血清型以及 ST 分型检测 将 6 株菌的全基因组序列录入线上网站 <https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>, 对菌株荚膜血清型以及 ST 分型进行鉴定。随后将在线网站鉴定出的代表荚膜血清型的多糖变异体等位基因(*wzi*) 全序列与菌株 NGS 测序序列进行比对, 根据 6 株菌比对重复序列的上下游各 300 bp 设计引物, 对 *wzi* 基因进行 PCR 扩增, 并对 PCR 产物进行测序。引物序列见表 2, PCR 扩增方法同 1.2.2 项。

1.2.5 毒力基因检测 为检验 6 株菌各自携带的毒力基因, 针对肺炎克雷伯菌的 9 个主要毒力基因设计了引物序列^[7], 序列见表 3, 取 6 株菌的甘油菌液进行相应毒力基因的 PCR 鉴定, PCR 扩增方法同 1.2.2 项。

1.2.6 菌株耐药性鉴定 首先基于 6 株菌全基因组序列, 利用在线网站(<http://www.genomicepidemiology.org/>) 对其耐药基因进行鉴定。随后利用微

表 2 菌株 *wzi* 基因引物序列

菌株名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
NY 10906	F: AGATGCGTATCATAATCACTAGGT R: ATCTGTCCCGGTATTATCATGG	1 137
NY 6595	F: CTAATTCTAACGACTGGAATGGCG R: CAATCTGGGTGATTAACGCCATAAG	1 063
NY 7322	F: ATGCGAGACGCACCTAATTCT R: GGTCAACCCAACGATCCTG	1 080
NY 5166	F: TGCTGCACAGAGTTCTCTT R: CTGAAACGGCGTAAAGGTGA	1 091
NY 5156	F: CAGAGTTCTCTTCAACGGCT R: AAACGGCGTAAAGGTGAAGC	1 081
NY 13294	F: ACCTAATTCTAATGACTGAAACGGC R: GATATCCTCAGAAGTTGGCCAGG	1 020

表 3 毒力基因引物序列

基因名称	引物序列(5'-3')	片段长度(bp)
<i>Peg-344</i>	F: CTTGAAACTATCCCTCCAGTC R: CCAGCGAAAGAATAACCCC	508
<i>IucA</i>	F: CCTGCGTGA AAAAGCGTTGA R: CACGGTAGATAAGCCCGACC	239
<i>iroN-p</i>	F: GTCCGGCGGTAACCTCAGCC R: TCAGAATGAACTACCGCCC	829
<i>rmpA-p</i>	F: GAGTAGTTAATAAATCAATAGCA R: CAGTAGGCATTGCAGCACTG	332
<i>rmpA-2</i>	F: GTGCAATAAGGATGTTACATTA R: GGATGCCCTCCCTCCTG	455
<i>allS</i>	F: CTTGGCGCGTTCAATATCGG R: CCGGCAAATCCACAATCGTC	471
<i>ybtP</i>	F: GCCGACACGATAGCCAATAAC R: GTTGCCAGAGCCGTTGATAC	442
<i>clbH</i>	F: ACCAAGAAGAGTGCGCTCAG R: TGACACCGTTTGTGTCGGG	567
<i>mceG</i>	F: GTGGCAGTCGGGTCTGTTTA R: GCCCAGCGAAAGAACCAAAC	578

量肉汤稀释法对菌株药物敏感性进行鉴定: ① 蘸取待测菌液接种于 1 ml 的 MH 肉汤 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜; ② 取过夜培养菌液和 MH 培养基混匀, 使得混合溶液为吸光度(600 nm) 值为 0.26 左右; ③ 按照浓度梯度在 96 孔板进行药物配置; ④ 除阴性对照组外, 每孔加入 100 μl 的 30 倍稀释菌液; ⑤ 混匀药物和菌液后, 盖上盖板 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温静置培养 18 h, 观察结果。

1.2.7 菌株致病性检测 采用液体气溶胶肺递送的方法^[8] 对小鼠进行攻毒, 以初步评测 6 株菌的致病性。每株菌致病性检测皆设实验组和对照组, 每组各 10 只小鼠, 实验组每只小鼠肺递送 50 μl 浓度为 2×10^6 CFU/ml 的菌液, 对照组给予同等体积的 PBS 缓冲液, 攻毒后每 12 h 观察 1 次, 记录各组小鼠生存情况。

1.3 统计学处理 采用软件 GraphPad Prism 9.5.1 的 Logrank(Mantel-Cox test) 对生存曲线进行分析, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

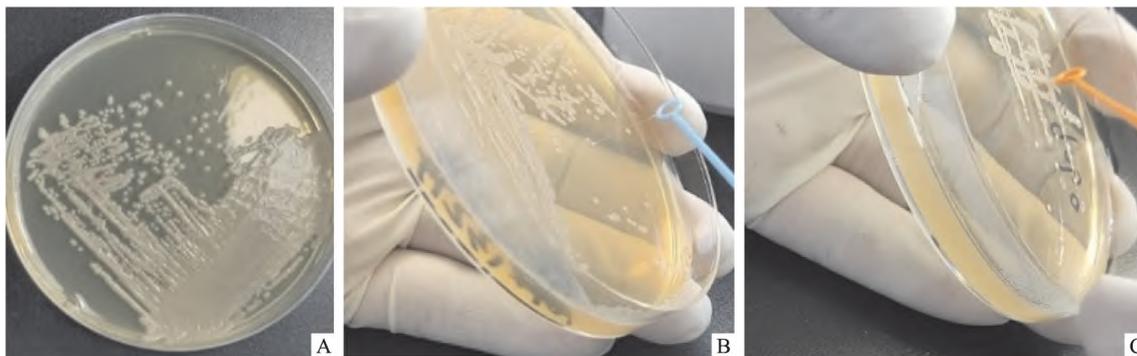


图1 平板画线及拉丝结果图

A: 平板画线结果图; B: 拉丝阳性结果图; C: 拉丝阴性结果图

2 结果

2.1 菌株分离鉴定

2.1.1 菌落形态学观察 菌株平板画线结果显示, 菌落为灰白色、表面光滑、边缘整齐。平板画线均未出现异常单菌落, 证明菌种未被污染, 可用于后续实验。根据6株肺炎克雷伯菌的拉丝长度是否大于5 mm 判断6株菌的黏性, 拉丝阳性的高黏菌株共4株, 分别为 NY 7322、NY 5166、NY 5156、NY 13294; 拉丝阴性的低黏菌株共2株, 分别为 NY 10 906、NY 6595。见图1。

2.1.2 物种特异性基因 *khe* 的鉴定 6株实验菌株和阳性对照菌株 SGH 10 的 *khe* 基因 PCR 扩增结果均呈阳性, 且条带均位于 *khe* 基因428 bp 片段区域, 表明6株临床分离株皆为肺炎克雷伯菌。见图2。

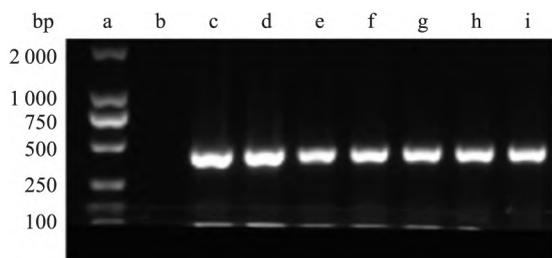


图2 物种特异性基因 *khe* 基因 PCR 结果

a: DL 2000(marker); b: 空白对照; c: SGH 10; d: NY 13294; e: NY 7322; f: NY 10906; g: NY 6595; h: NY 5156; i: NY 5166

2.1.3 6株菌株血清型及 ST 分型鉴定 基于菌株 NGS 测序结果进行血清型基因鉴定, 鉴定结果6株菌株均为 K2 荚膜血清型。随后对代表 K2 荚膜血清型的 *wzi* 基因及其上下游 300 bp 片段进行 PCR 验证, 结果如图3A、B所示, 6株肺炎克雷伯菌均出现明显条带, 且测序结果与 K2 荚膜血清型基因序

列的重复率均高于99%, 证明6株菌均为 K2 荚膜血清型。在线网站 ST 分型鉴定结果表明, 6株菌中 NY 13294 为 ST 14 型、NY 10906 为 ST 65 型、NY 6595 和 NY 7322 为 ST 700 型、NY 5156 和 NY 5166 为 ST 86 型。

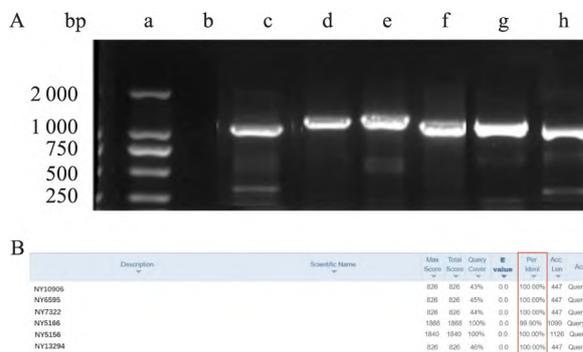


图3 *wzi* 基因 PCR 结果以及 PCR 产物测序比对结果

A: *wzi* 基因 PCR 结果; B: PCR 产物测序比对结果; a: DL2000 (marker); b: 空白对照; c: NY 13294; d: NY 7322; e: NY 10906; f: NY 6595; g: NY 5156; h: NY 5166

2.2 菌株耐药性分析 耐药基因的鉴定结果如表4所示, 6株肺炎克雷伯菌共含有23种耐药基因。

表4 耐药基因鉴定结果

菌株名称	耐药基因
NY 10906	<i>blaTEM-116</i> 、 <i>aph(3)</i> 、 <i>-Iia</i> 、 <i>fosA</i> 、 <i>blaSHV-11</i> 、 <i>blaSHV-67</i>
NY 6595	<i>fosA</i> 、 <i>OqxB</i> 、 <i>OqxA</i> 、 <i>blaSHV-185</i>
NY 7322	<i>fosA</i> 、 <i>OqxB</i> 、 <i>OqxA</i> 、 <i>blaSHV-185</i>
NY 5166	<i>fosA</i> 、 <i>OqxB</i> 、 <i>OqxA</i> 、 <i>blaSHV-28</i>
NY 5156	<i>fosA</i> 、 <i>OqxB</i> 、 <i>OqxA</i> 、 <i>blaSHV-28</i>
NY 13294	<i>blaTEM-1A</i> 、 <i>aac(6)</i> 、 <i>-II</i> 、 <i>aph(6)</i> 、 <i>-Id</i> 、 <i>aph(3)</i> 、 <i>-Ib</i> 、 <i>aa-dA1b</i> 、 <i>su11</i> 、 <i>fosA</i> 、 <i>OqxB</i> 、 <i>OqxA</i> 、 <i>blaSHV-89</i> 、 <i>blaSHV-76</i> 、 <i>blaSHV-172</i> 、 <i>blaSHV-79</i> 、 <i>blaSHV-85</i> 、 <i>blaSHV-40</i> 、 <i>blaSHV-56</i>

表 5 药敏实验结果

药物名称	NY 10906	NY 6595	NY 7322	NY 5166	NY 5156	NY 13294
氨苄西林	64/R	64/R	64/R	>32/R	32/R	>32/R
氨苄西林/舒巴坦	8/4/S	8/4/S	16/8/S	32/16R	16/8/S	>32/6/R
哌拉西林	8/4/S	8/4/S	8/4/S	8/4/S	>128/4/R	>128/4/R
头孢唑林	2/S	2/S	8/R	2/S	4/S	>8/R
头孢呋辛	4/S	2/S	4/S	4/S	32/R	64/R
头孢曲松	0.25/S	0.25/S	0.25/S	0.25/S	2/S	0.5/S
头孢吡肟	2/S	2/S	2/S	2/S	2/S	4/S
美罗培南	0.25/S	0.25/S	0.25/S	2/I	0.5/S	1/S
阿米卡星	8/S	8/S	8/S	8/S	8/S	128/R
庆大霉素	1/S	1/S	1/S	1/S	1/S	4/S
左氧氟沙星	0.5/S	0.5/S	0.5/S	0.5/S	1/I	2/R
呋喃妥因	16/S	16/S	128/R	32/S	32/S	>128/R
复方新诺明	2/38/S	0.25/4.75/S	0.25/4.75/S	2/38/S	8/152/R	4/76/R
氯霉素	8/S	16/I	4/S	16/I	16/I	32/R

其中, NY 13294 对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、磷霉素类、氯霉素类、磺胺类共 5 类抗生素耐药; NY 7322、NY 6595、NY 5156、NY 5166 对磷霉素类、氯霉素类、喹诺酮类、β-内酰胺类共 4 类抗生素耐药; NY 10906 对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、磷霉素类共 3 类抗生素耐药。肉汤稀释法测得的药敏结果(表 5)显示, NY 13294 对 β-内酰胺类、氨基糖苷类、磺胺类、氯霉素类共 3 类耐药。NY 7322、NY 6595、NY 5156、NY 10906 对 β-内酰胺类共 1 类抗生素耐药。NY 5166 对 β-内酰胺类、磺胺类共 2 类抗生素耐药。以上结果表明, 药敏实验本研究分离菌株中仅 NY 13294 属于多药耐药菌株, 并且基因鉴定的耐药结果与肉汤稀释法得到的耐药结果相比较并不相同。

2.3 菌株毒力基因分析 6 株肺炎克雷伯菌含有的毒力基因情况见表 6, NY 5156 菌株含有 4 个毒力基因, NY 5166 菌株含有 3 个毒力基因, NY 6595、NY 7322、NY 10906 菌株含有 2 个毒力基因, NY 13294 菌株含有 1 个毒力基因。

表 6 6 株肺炎克雷伯菌毒力基因 PCR 结果

菌株名称	含有毒力基因
NY 10906	<i>ybtP</i> 、 <i>clbH</i>
NY 6595	<i>Peg-344</i> 、 <i>ybtP</i>
NY 7322	<i>Peg-344</i> 、 <i>ybtP</i>
NY 5156	<i>Peg-344</i> 、 <i>iron-P</i> 、 <i>rmpA-2</i>
NY 5166	<i>Peg-344</i> 、 <i>iucA</i> 、 <i>iron-P</i> 、 <i>rmpA-2</i>
NY 13294	<i>ybtP</i>

2.4 菌株致病性分析 6 株菌进行液体气溶胶肺递送攻毒的小鼠生存曲线如图 4 所示。6 组实验组小鼠均从 0.5 d 开始出现背部耸毛、食欲不振、行动

迟缓等症状, 而对照组小鼠则活动正常。NY 13294、NY 5156、NY 5166、NY 6595 菌株攻毒后小鼠全部死亡, 其中前 3 株菌死亡时间集中于 1~1.5 d, 而 NY 6595 菌株死亡时间有所延迟, 集中在 2~3 d。NY 7322 菌株攻毒后, 70% 小鼠在 1~4 d 内死亡, 剩余小鼠 14 d 观察期内存活。NY 10906 菌株攻毒小鼠 14 d 内均存活, 仅在前期 3~4 d 内出现临床症状, 后恢复正常, 并且存活率均高于其余 5 株菌株 ($P < 0.001$)。

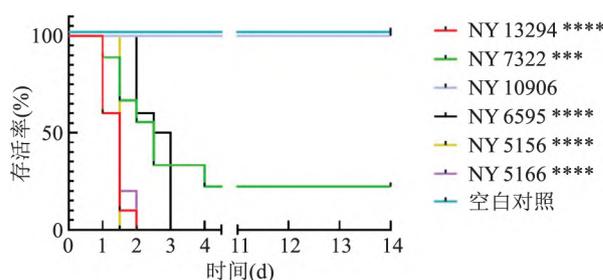


图 4 攻毒生存曲线结果

与 NY 10906 组比较: *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$

3 讨论

近 10 年来, 由肺炎克雷伯菌引起的感染数在逐渐增加^[9]。本研究收集了来自于山东、河北、重庆等多家医院的肺炎克雷伯菌临床分离株共 6 株, 并对上述菌株进行了分离鉴定、耐药性与致病性系统分析。

本研究对收集的 6 株肺炎克雷伯菌进行了荚膜血清型与 ST 分型的鉴定。经鉴定 6 株菌均为 K2 荚膜血清型, 提示该血清型在我国有较广的流行范

围。K2 荚膜血清型更容易引起化脓性肝囊肿、脑膜炎以及其它部位的脓肿,具有更强的致病性与流行性。根据多位点序列分型方法,目前西方的多药耐药克隆株主要为 ST 258、ST 147、ST 101,而东方的高致病性克隆株则趋向为 ST 23、ST 65、ST 86^[10],中国则更加趋向于 ST 11 分型^[11]。本研究的 6 株肺炎克雷伯菌中有 1 株 ST 65、2 株 ST 86,共 3 株高致病性克隆株。值得注意的是 2 株 ST 86 菌株来源于同一所医院的不同时期,且 2 株菌的耐药基因与毒力基因也较为接近,提示同一地域的流行菌株有较高的同源性。

肺炎克雷伯菌的耐药基因因其耐药的机制之一^[12]。本研究耐药基因 *OqxB*、*OqxA* 的检出率较高,达 83%,上述耐药基因除了介导喹诺酮类抗生素耐药外,还能降低细菌对替加环素及呋喃妥因的敏感性^[13],从而导致细菌向多药耐药发展。但本研究中耐药基因得到的药敏结果与肉汤稀释法得到的药敏结果并不相同,说明耐药基因的存在并不一定导致细菌对相应药物耐药,临床指导用药更应该以药敏实验结果为准。从药敏实验结果来看, NY 13294 菌株拥有更广的耐药谱,为多药耐药菌株。而来源于同一家医院的 NY 5156、NY 5166 菌株则拥有近乎相似的耐药谱。表明不同地区且不同时间的菌株的耐药性有较大的差别,因此精准诊断临床样本耐药性,是指导合理用药、防止抗生素滥用的重要举措。

细菌的致病性受多种因素影响,高毒力肺炎克雷伯菌的致病性往往更强。现今对于肺炎克雷伯菌高毒力的判定标准为含有毒力基因 *iucA* 或 *peg-344*^[14],或者为高黏菌株^[15]。依据上述标准,本研究除 NY 10906 菌株外皆为高毒力肺炎克雷伯菌,也仅有 NY 10906 菌株不会引起小鼠死亡。从小鼠攻毒实验来看,毒力基因对菌株致病性有显著影响,且拥有更多毒力基因的菌株致病性更强,小鼠的死亡时间更加集中并且靠前。然而,值得注意的是,高黏菌株 NY 13294 虽然仅含有一个毒力基因,但对于动物的致病性反而在 6 株菌中属于最强的菌株之一。推测高黏菌株经肺递送途径攻毒后,菌株更易在气管、支气管以及肺部定植并繁衍。而对于非黏性菌株,随着小鼠的呼吸以及呛咳,细菌更容易随着气管排出体外,导致细菌含量下降,进而导致了不同的疾病过程以及终点。本研究验证了细菌致病性受较多因素影响,除毒力基因类型和数量以外,细菌黏附性

也与致病性有着密切联系^[16]。

本研究得到的 6 株肺炎克雷伯菌临床分离株均为 K2 荚膜血清型,分为 4 种 ST 分型;6 株菌株中有高毒力菌株 5 株,均对小鼠具有较高的致病性;共有 1 株多药耐药菌株,其余菌株均对多数抗生素敏感。该实验耐药性与致病性的分析,为把握肺炎克雷伯菌的流行进化趋势以及科学的指导临床治疗提供依据。

参考文献

- [1] Bengoechea J A, Sa P J. *Klebsiella pneumoniae* infection biology: living to counteract host defences [J]. FEMS Microbiol Rev, 2019, 43(2): 123–44.
- [2] Okomo U, Akpalu E, Le Doare K, et al. Aetiology of invasive bacterial infection and antimicrobial resistance in neonates in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis in line with the strobe-ni reporting guidelines [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(11): 1219–34.
- [3] Cassini A, Högberg L D, Plachouras D, et al. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European economic area in 2015: a population-level modelling analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(1): 56–66.
- [4] 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): 475–9.
- [5] Kim Y A, Park Y S, Kim B, et al. Prevalence and risk factors for extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization in intensive care units [J]. Ann Lab Med, 2020, 40(2): 164–8.
- [6] Neuberger A, Oren I, Sprecher H. Clinical impact of a PCR assay for rapid identification of *Klebsiella pneumoniae* in blood cultures [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 377–9.
- [7] Russo T A, Olson R, Fang C T, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae* [J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00776–18.
- [8] Qiu H Y, Zhang N N, Ma Q Q, et al. Aerosolized zika virus infection in guinea pigs [J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 2350–8.
- [9] Vidal-Cortés P, Martín-Loeches I, Rodríguez A, et al. Current positioning against severe infections due to *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized adults [J]. Antibiotics (Basel), 2022, 11(9): 1160.
- [10] Arcari G, Carattoli A. Global spread and evolutionary convergence of multidrug-resistant anhypervirulent *Klebsiella pneumoniae* high-risk clones [J]. Pathog Glob Health, 2023, 117(4): 328–41.
- [11] Gu D, Dong N, Zheng Z, et al. A fatal outbreak of st11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hos-

- pital: a molecular epidemiological study [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(1): 37–46.
- [12] 赵 键, 贾代良. 多重耐药菌流行现状、耐药机制及其治疗策略 [J]. *济宁医学院学报*, 2023, 46(3): 216–20.
- [13] 王雅丽, 张宝锁, 张 雯, 等. 鸡源肺炎克雷伯菌的分离鉴定和耐药性分析 [J]. *中国兽药杂志*, 2022, 56(11): 1–9.
- [14] Lam M, Wyres K L, Judd L M, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 77.
- [15] Pomakova D K, Hsiao C B, Beanan J M, et al. Clinical and phenotypic differences between classic and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: an emerging and under-recognized pathogenic variant [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2012, 31(6): 981–9.
- [16] Catalan-Najera J C, Garza-Ramos U, Barrios-Camacho H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes? [J]. *Virulence*, 2017, 8(7): 1111–23.

Analysis of drug resistance and pathogenicity of six strains of *Klebsiella pneumoniae*

Sui Chengyu^{1,2}, Wang Jiazhen^{2,3}, Zhang Zhijun², Zhang Lili², Lv Meng², Zhou Dongsheng², Yang Wenhui^{1,2}
(¹*School of Basic Medical Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;*
²*State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Beijing Institute of Microbiology
and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071;*
³*Dept of Immunology of Basic Medical College, Guizhou Medical University, Guiyang 550025*)

Abstract Objective To investigate the drug resistance and pathogenicity of six clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (Kp), and to provide a basis for prevention and treatment of Kp infection. **Methods** The six strains from different hospitals were isolated, cultured, and identified by species-specific gene *khe*. Their whole genome sequences (WGS) were obtained using next-generation sequencing technology (NGS). Based on the WGS, the capsular serotypes, sequence types (ST) and drug-resistance genes of six strains were identified. The capsular serotype genes and virulence genes were validated or identified using PCR. Broth microdilution tests were conducted to validate their drug susceptibility, and mice were challenged with Kp aerosols by MicroSprayer aerosolizer to evaluate their pathogenicity. **Results** The six strains were all serotype K2 but belonged to four ST types (ST14, ST65, ST700, and ST86), and collectively carried six virulence genes and 23 drug-resistance genes. All the six strains were resistant to ampicillin, but only one strain was multidrug-resistant. Four strains exhibited high mucoid characteristics. Five strains could cause mortality in mice, which were preliminarily identified as high virulence strains. **Conclusion** For the six Kp clinical isolates from different sources, only one strain named NY 13294 is both multidrug-resistant and highly virulent, and other four highly virulent strains are resistant to one or two types of antibiotics.

Key words *Klebsiella pneumoniae*; clinical isolates; drug resistance; pathogenicity; viscosity