脓毒症患者感染肺炎克雷伯菌中的毒力分析

邝兆威　林文森　徐聪
东莞市东南部中心医院检验科　广东东莞　523722

摘　要：目的 探讨肺炎克雷伯菌感染致脓毒症患者的感染情况及毒力特点，为预防和控制提供理论依据。方法 复温脓毒症患者菌株并接种培养，分离纯化后进行拉丝实验检测高黏液表型；采用结晶紫染色法检测生物膜形成能力，CAS 平板法检测铁载体产生及定量分析；通过 PCR 检测毒力基因。结果 共分离 41 株肺炎克雷伯菌，血液来源 17 株（41.5%），痰液 9 株（22.0%），封闭性脓液 8 株（19.5%）。重症医学科菌株最多，占 43.9%。患者中男 28 例（68.3%），女 13 例（31.7%）。高黏液表型菌株 18 例（43.9%），其中生物膜形成强阳性 5 例，非高黏液表型菌株生物膜形成能力显著较弱（P=0.0155）。铁载体定性实验均为阳性，22 株为高产铁载体。携带 rmpA、rmpA2、peg-344 等毒力基因的菌株检出率较高，荚膜血清型以 K1 型为主，占 24.9%。结论 肺炎克雷伯菌感染致脓毒症患者的菌株主要来源于重症医学科和血液标本。高黏液表型与生物膜形成能力显著相关；铁载体产能与毒力基因携带种类密切相关，为控制感染提供了研究依据。

关键词：肺炎克雷伯菌；脓毒症；生物膜；铁载体；毒力基因

1. 仪器及材料

1.1 病例筛查及菌株培养

筛选依据 Sepsis 3.0 标准，包括感染、症状（如心率≥ 90 次 / 分、体温≤ 36℃或≥ 38℃等）、器官功能障碍及代谢紊乱。通过医院 LIS 系统收集 2022–2023 年感染肺炎克雷伯菌且诊断为脓毒症的患者信息，排除同一患者重复样本，确认 41 例符合条件的病例。从 –80℃冰箱取出菌株复溶，恢复正常活性后接种至血平板培养。

1.2 实验仪器及材料

实验仪器及材料	生产厂家
多功能酶标仪	安捷伦科技有限公司
荧光电泳分析仪	美国 Azure Biosystems 公司
全自动医用 PCR 分析系统（6 荧光通道）	天隆科技有限公司
DYC–8C 型电泳仪	北京六一仪器厂
恒温培养箱	JC–303
高压锅 /GI154DWS	厦门致微
10 通道标准型磁力搅拌器	北京大龙实验仪器有限公司
电子分析天平秤	赛多利斯科学仪器（北京）有限公司
HCL 标准溶液	东莞市远正实验科技有限公司
DNA 标准 Marker（200–5000）	上海生工有限公司
硫酸镁七水化合物	东莞市远正实验科技有限公司
琼脂糖	东莞市远正实验科技有限公司
无水哌嗪（99%）	东莞市远正实验科技有限公司
铬天青 S	东莞市远正实验科技有限公司
酸水解酪蛋白	东莞市远正实验科技有限公司
十六烷基 – 三甲基 – 溴化铵	东莞市远正实验科技有限公司
6× 蔗糖凝胶上样缓冲液（含溴酚蓝、EDTA）	上海生工有限公司
50 × TEA 缓冲液	上海生工有限公司
DNA 引物序列	上海生工有限公司
2 × Rapid Taq Master Mix 混合液	南京诺唯赞生物科技股份有限公司
三氯化铁六水化合物	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
0.22 μ m 滤膜	广州硕谱生物科技有限公司
MKB 固体培养基	山东拓普生物工程有限公司
营养肉汤	北京陆桥技术股份有限公司
结晶紫染色液（1%）	北京索莱宝科技有限公司
无菌蛋白胨水（0.1%）	上海源叶生物科技有限公司
PBS 缓冲液	北京索莱宝科技有限公司
细菌基因组 DNA 提取试剂盒	天根生化科技（北京）有限公司

1.3 所需试剂及材料的配置

1.3.1 CAS 检测平板

称 3.6g 琼脂粉加 150mL 去离子水，121℃灭菌 20min，加入 2mL 20% 蔗糖、4mL 1mM 硫酸镁、6mL 10% 酸水解酪

素、20mL 0.1M 磷酸盐缓冲液、20mL CAS 染液，混匀倒平板，紫外灭菌 1h，冷却保存。

1.3.2 CAS 染液

配制 1mM $FeCl_3$、2mM CAS、5mM HDTMA 溶液，按 10mL $FeCl_3$+50mL CAS，再加 40mL HDTMA，边加边混匀，得到 CAS 染液。

1.3.3 CAS 定量检测液

配制 1mM $FeCl_3$、2mM CAS、10mM HDTMA、哌嗪溶液。按 1.5mL $FeCl_3$+7.5mL CAS+6mL HDTMA，再加入 30mL 哌嗪溶液，定容至 100mL，混匀得检测液。

1.4 菌株来源及科室分布

通过 LIS 系统对 41 份病例进行搜索并确认其科室分布及菌株来源进行统计。

1.5 拉丝实验

将菌株从 –80℃保存冰箱中复温至正常生理活性并重新接种至血平板，进一步分离纯化形成单个菌落，用无菌接种环挑取单个菌落，若挑取的粘液丝长度 >5mm, 该菌株则判断为高黏液性肺炎克雷伯菌。将部分单菌落溶解于生理盐水中并加入 40% 甘油肉汤至 –80℃冰箱中保存。

1.6 生物膜形成实验（结晶紫染色法）

1.6.1 构建肺炎克雷伯菌生物膜模型

将复苏的肺炎克雷伯菌接种至血平板，37℃培养 24h，取单菌落制备 0.5 麦氏浓度菌悬液。每孔加入 10μL 菌悬液和 190μL LB 肉汤，重复 3 孔，设空白对照孔。96 孔板于 37℃培养 24h。

1.6.2 结晶紫染色法

弃去上清液，用生理盐水洗 3 次，加入 200μL 0.1% 结晶紫染色 20min 后弃染液，再用生理盐水洗 3 次，风干后加 95% 无水乙醇 200μL，脱色 20min，洗脱染色液。

1.6.3 结果判读

酶标仪测 590nm 吸光度值 A，设空白对照均值为 Ac。按 A 值分为阴性（$A \leq Ac$）、弱阳性（$Ac \leq A \leq 2Ac$）、阳性（$2Ac \leq A \leq 4Ac$）、强阳性（$A > 4Ac$），保存数据并分析。

1.7 铁载体定性及定量检测

1.7.1 铁载体定性检测

取单菌落接种于 MKB 固体培养基，37℃培养 18–24h。玻璃器具需盐酸浸泡 24–48h 去铁离子。用生理盐水制备 4 麦氏浓度菌悬液，吸取 10μL 滴加至 CAS 平板，干燥后倒置 37℃培养 24h，菌落周围出现橘黄色环表示产生铁载体。

1.7.2 铁载体定量检测

将 4 麦氏浓度菌悬液按 1:5 与蛋白胨水混合，37℃培养 18–24h，离心取上清液，过滤后与 CAS 定量检测液等体积混合。蛋白胨水为空白对照。室温静置 1h 后测 630nm 吸光度值 A 和对照值 Ar。

1.7.3 结果判读

A/Ar 比值越低，铁载体含量越高；比值越高，铁载体含量越低。

1.8 毒力基因检测

（1）DNA 提取：挑取单菌落与甘油肉汤混合培养过夜，调整 OD600 至 0.2–0.5，按基因组 DNA 提取试剂盒步骤提取纯 DNA。

（2）毒力基因扩增

DNA 引物由上海生工科技合成，PCR 反应体系：ddH2O 26μL、2×Rapid Taq Master Mix 25μL、上下游引物各 2μL、DNA 1μL。PCR 流程：95℃预变性 3min，95℃ 15s、Tm–3℃退火、72℃延伸 15s，35 个循环，72℃延伸 5min。

（3）凝胶电泳流程

用 1% 琼脂糖凝胶，加入 10μL NA Red 染色，冷却至 60℃倒入模型。加 1×TAE 缓冲液至凝胶表面，第一孔加 5μL DNA 标准 Marker，其余孔加 5μL 样品。电泳 80V，40min 后用成像仪观察结果，并与参考文献对比 DNA 片段大小。

2. 结果

2.1 菌株来源与科室分布

菌株来源与科室分布具体如表 2–1 和图 1 所示

表 2–1 菌株科室分布情况

临床科室	数量	占比（%）
重症医学科	20	48.8
肝胆胰外科	9	22.0
胃肠外科	2	4.9
消化内科	2	4.9
肾脏内科	2	4.9
内分泌科	1	2.4
普外科	1	2.4
肿瘤中心	1	2.4
康复治疗科	1	2.4
中医经典科	1	2.4
介入治疗科	1	2.4

（注：重症医学科包括 ICU、儿科重症医学科、呼吸及重症医学科）

图 1 菌株样本来源

2.2 拉丝实验

根据上述实验标准进行判定（粘液丝长度 >5mm), 可将 41 例肺炎克雷伯菌分为高粘液表型 18 例和非高粘液表型 21 例，拉丝实验阳性部分结果见图 2。

图 2 部分拉丝实验阳性结果

2.3 生物膜形成实验

本实验采用结晶紫染色法对肺炎克雷伯菌的生物膜形成能力进行检测，结果见表 2–2。

菌株编号	OD590 吸光度值	生物膜形成能力
KPN2014	0.209	阴性（–）
KPN2015	0.382	阴性（–）
KPN2031	0.364	阴性（–）
KPN2060	0.779	弱阳性（+）
KPN2079	0.529	阴性（–）
KPN2085	3.246	强阳性（+++）
KPN2093	1.473	阳性（++）
KPN2220	0.334	阴性（–）
KPN2224	3.166	强阳性（+++）
KPN2231	1.847	阳性（++）
KPN2294	1.395	弱阳性（+）
KPN2320	1.991	阳性（++）
KPN2321	2.928	强阳性（+++）
KPN2333	0.748	弱阳性（+）
KPN2345	1.152	弱阳性（+）
KPN2360	3.330	强阳性（+++）
KPN2363	0.499	阴性（–）
KPN2365	1.618	阳性（++）
KPN2414	2.237	阳性（++）
KPN2427	0.299	阴性（–）
KPN2440	0.768	弱阳性（+）
KPN2472	0.347	阴性（–）
KPN2499	0.901	弱阳性（+）
KPN2534	0.946	弱阳性（+）
KPN2551	1.727	阳性（++）
KPN2554	0.946	弱阳性（+）
KPN2566	0.331	阴性（–）
KPN2595	0.813	弱阳性（+）
KPN2625	2.233	阳性（++）
KPN2643	1.135	弱阳性（+）
KPN2658	1.324	阳性（++）
KPN2664	2.660	强阳性（+++）
KPN2744	1.470	阳性（++）
KPN2754	2.258	强阳性（+++）
KPN2777	0.670	阴性（–）
KPN2799	0.480	阴性（–）
KPN2872	2.793	强阳性（+++）
KPN2828	1.587	阳性（++）
KPN2899	3.185	强阳性（+++）
KPN2904	0.933	弱阳性（+）
KPN2909	1.079	弱阳性（+）

注：Ac 为空白对照（未加菌悬液），将生物膜形成能力分为 4 类，A ≤ Ac 为阴性（–），Ac ≤ A ≤ 2Ac 为弱阳性（+），2Ac ≤ A ≤ 4Ac 为阳性（++），A > 4Ac 为强阳性（+++）

该实验中肺炎克雷伯菌菌株的生物膜形成能力与黏液表型的关系，如表 2–3 所示。

表 2–3 生物膜形成能力结果

	生物膜形成能力			
	阴性	弱阳性	阳性	强阳性
高黏液表型	2	4	7	5
非高黏液表型	9	8	3	3

其中将 18 例高黏液表型（HM) 菌株与 23 例非高黏液表型 (NHM) 菌株的生物膜形成能力进行统计学分析，经过统计分析发现，高黏液表型与非高黏液表型的菌株生物膜形成能力有统计学意义（P=0.0155，P<0.05), 见图 3 所示。

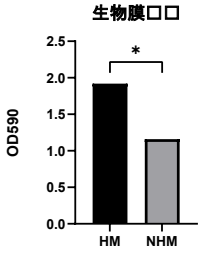

图 3 生物膜形成能力

2.4 铁载体定性及定量检测

1. 铁载体定性检测实验：本实验采取 CAS 平板来检测

菌株是否产铁载体（即形成橘黄色分泌环），该实验所检测的 41 例肺炎克雷伯菌菌株均形成橘黄色分泌环，即皆产铁载体，实验结果如图 4 所示。

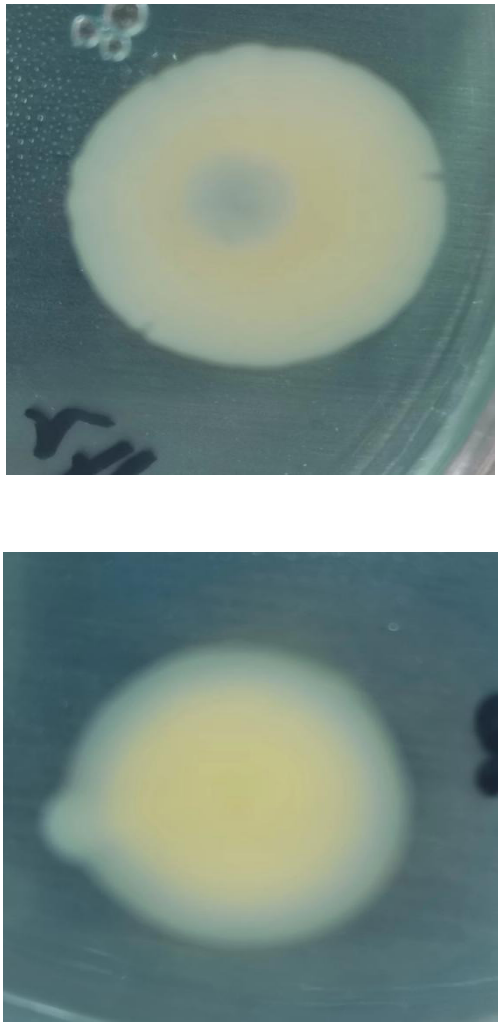

图 4 部分菌株铁载体定性实验结果

2. 铁载体定量检测实验：

本实验采取酶标仪检测肺炎克雷伯菌产铁载体含量在波长 630nm 处的吸光度值的实验数据，其中 630nm 处菌株及空白对照的吸光度比值（A/Ar）的中位数值为 0.74；其中高产（菌株吸光度值大于中位数）铁载体的菌株有 22 例，低产量铁载体的菌株数为 19 例；其中铁载体与黏液表型经过统计学分析显示（P=0.0872，P<0.05), 无统计学意义，结果见图 5 所示。

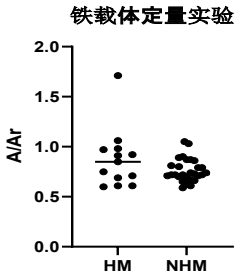

图 5 铁载体与黏液表型的关系

注：HM 为高黏液表型菌株，NHM 为非高黏液表型菌株

其中携带铁载体相关基因（iroN、iroB、iucA) 的菌株有 25 例，而 25 例菌株中铁载体相关基因有 6 组不同的分类，其中携带 iroB 基因的菌株有 6 株，携带 iroN 基因的菌株有 2 株，携带 iucA 基因的菌株有 5 株，携带 iroB+iroN 基因的菌株有 3 株。携带 iroB+iucA 的菌株有 5 株，携带 iucA+iroB+iroN 基因的菌株有 4 株，结果见表 2–4。

表 2–4 铁载体相关基因

iroB		iroN	iucA	iroB+iroN	iroB+iucA	iucA+iroB+iroN
菌株数	6	2	5	3	5	4

2.5 毒力基因检测

本实验经过对 DNA 提取、PCR 扩增以及琼脂糖凝胶电泳发现 41 例肺炎克雷伯菌中毒力基因 rmpA、rmpA2、iucA、iroN、iroB、peg–344 检出率为 31.7%、36.6%、31.7%、22.0%、46.3%、43.9%；荚膜血清型 K1、K2、K3、K5、K20、K54、K57 中以 K1 为主，占 24.9%，其次 K2、K5、K20、K57、K54 占 12.2%、9.8%、9.8%、9.8%、2.4%；部分凝胶电泳分析结果如图 6 所示

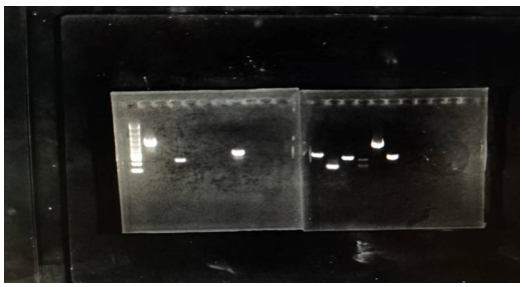

图 6 部分菌株凝胶电泳结果

注：上述图中第一孔均为 DNA 标准 Marker（200–5000），而第 2–9 孔依次为 K1、K2、K5、K20、K3、K54、iroN、K57, 第 2 块凝胶中第 1–6 孔分别是 rmpA、iroB、rmpA2、iucA、magA、peg–344。

参考文献：

[1] 孙巧玲，舒玲斌，胡洁，等 .MALDI-TOF MS 技术快速区分携带 rmpA2 毒力基因的高毒力肺炎克雷伯菌 [J]. 中华检验医学杂志，2018，41（8）：571-576.

[2] 胡远，陈立建 . 依托咪酯对脂多糖诱导 Kupffer 炎症反应及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3/ 白细胞介导 -1β 通路的影响 [J]. 中国临床药理学杂志，2020，36（2）：185-188.

[3] 徐丽，李蓓 . 肺炎克雷伯菌生物膜形成机制的研究进展 [J]. 中国病原生物学杂志，2016（11）：1056-1059.

[4] 王国旗，唐佩福 . 细菌生物膜特征及治疗的研究进展 [J]. 解放军医学院学报 .

[5] 吴翰欣，张静，郑春梅 . 高黏性肺炎克雷伯菌毒力血清型、毒力基因以及耐药性研究 [J]. 中国卫生检验杂志，2022,32(13):1571-1574.

[6] 阎鹤，梁惠贤 . 一株多重耐药猪源 ST37 型肺炎克雷伯菌铁载体因子的遗传多样性分析 [J]. 华南理工大学学报（自然科学版），2021,49(11):19-26.

[7] 马玉兰 . 肺炎克雷伯菌铁载体产量与毒力和碳青霉烯类耐药的关系 [D]. 河北医科大学 ,2020.

[8] 魏星 . 肺炎可雷伯菌生物膜形成与外排泵基因的相关性研究 [D]. 西南医科大学 ,2018.

[9] 潘琴艳，郭晗，赵优优，等 . 肺炎克雷伯菌铁载体产量与其毒力基因和碳青霉烯类抗菌药物耐药性的关系 [J]. 中华医院感染学杂志 ,2022,32(09):1286-1289.

[10] Stahlhut S G,struve C,Krogfelt K A,et al.Biofilm of Klebsiella pneumoniae on urethral catheters requires either type 1 or type 3 fimbriae[J].Fems Immunology and Medical Microbiology,2012,65(2):350.

[11] Kaiserm ,R.M,M Castanheira,R.N Jones,et al.Trends in Klebsiella pneumoniae carbapenemase-positive K.pneumoniae in US hospitals: repoet from the 2007-2009 SENTRY Antimicrobial Sueveillance Program.Diagn Microbiol Infect Dis,2013.76(3):356-60.