

表 4 血清 miR-424、miR-31-5p 表达水平与尿酸、胎儿双顶径、胎儿股骨长度的相关性

指标	miR-424		miR-31-5p	
	r	P	r	P
尿酸	0.485	<0.001	0.425	<0.001
胎儿双顶径	-0.502	<0.001	-0.488	<0.001
胎儿股骨长度	-0.496	<0.001	-0.587	<0.001

2.4 血清 miR-424、miR-31-5p 表达水平对子痫前期孕妇发生 FGR 的诊断价值 将血清 miR-424、miR-31-5p 作为检验变量,将子痫前期患者是否发生 FGR 作为状态变量(发生=1,未发生=0)绘制 ROC 曲线

表 5 血清 miR-424、miR-31-5p 表达水平对子痫前期孕妇 FGR 发生的诊断价值

指标	约登指数	AUC	AUC 的 95%CI	最佳截断值	灵敏度(%)	特异度(%)	P
miR-424	0.627	0.897	0.828~0.944	1.163	69.35	93.33	<0.05
miR-31-5p	0.544	0.834	0.756~0.895	1.144	67.74	86.67	<0.05
miR-424+miR-31-5p	0.710	0.945	0.888~0.978	—	90.30	80.70	<0.05

注:—表示无数据。

表 6 多因素 Logistic 回归分析子痫前期孕妇 FGR 发生的影响因素

变量	赋值	B	SE	Wald $\chi^2$	P	OR(95%CI)
羊水过少	连续变量	0.589	0.517	1.297	0.255	1.802(0.654~4.964)
尿酸	连续变量	0.923	0.638	2.093	0.148	2.517(0.721~8.789)
miR-424	连续变量	0.523	0.236	4.910	0.027	1.687(1.062~2.679)
miR-31-5p	连续变量	1.046	0.328	10.161	0.001	2.845(1.496~5.411)

### 3 讨论

子痫前期患者全身小血管痉挛,造成肾血流量降低,导致胎盘血管发生粥样硬化,胎儿对营养物质的摄取减少,影响胎儿正常生长发育,导致 FGR 发生<sup>[11]</sup>。FGR 可由于孕妇健康问题(如糖尿病)而导致,如高血压、子痫、心脏病、自身免疫性疾病、感染等,是子痫前期最严重的并发症之一<sup>[12-14]</sup>。因此,寻找与 FGR 相关的生物指标有重要的价值。

研究表明,与正常妊娠组相比,FGR 胎盘组织中 miR-424 呈高表达<sup>[15]</sup>。miR-424 的上调减少了滋养层来源细胞系的侵袭和增殖,miR-424 下调增强了滋养层细胞的侵袭和增殖能力<sup>[16]</sup>。miR-424 通过靶向激活 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号传导来影响滋养层细胞迁移和侵袭,miR-424 上调可能作为子痫前期患者的潜在诊断靶点<sup>[17]</sup>。滋养层细胞中的 miR-424-5p 可能是先天性子痫治疗的有效策略,可通过促进滋养层细胞迁移和侵袭达到治疗目的<sup>[18]</sup>。与健康孕妇相比,FGR 孕妇胎盘 miR-424 水平明显升高<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,与非 FGR 组相比,FGR 组患者血清中 miR-424 表达水平明显升高,表明 miR-424 参与 FGR 的发生,

进行分析,结果显示,血清 miR-424、miR-31-5p 联合诊断 FGR 的曲线下面积(AUC)高于各指标单独诊断的 AUC( $Z_{miR-424 vs. miR-424+miR-31-5p} = 2.500, P = 0.012; Z_{miR-31-5p vs. miR-424+miR-31-5p} = 3.521, P < 0.001$ )。见表 5。

2.5 多因素 Logistic 回归分析子痫前期孕妇发生 FGR 的影响因素 将 FGR 是否发生作为因变量(发生=1,未发生=0),以羊水过少、尿酸、miR-424、miR-31-5p 表达水平作为自变量进行多因素 Logistic 回归分析,结果显示,血清 miR-424 高表达、miR-31-5p 高表达是子痫前期孕妇发生 FGR 的危险因素( $P < 0.05$ )。见表 6。

与前人研究结果类似,推测 miR-424 可能通过调控滋养层细胞迁移和侵袭来影响 FGR 的发生。

据相关文献报道,miR-31-5p 在血管生成中起至关重要的作用<sup>[20]</sup>。一项研究报道,心房颤动患者 miR-31 的心房特异性上调是导致神经元一氧化氮合酶丢失的重要原因,与高血压和子痫前期密切相关<sup>[21]</sup>。miR-31-5p 还通过靶向内皮素受体 B 型(ETBR)负调节脐静脉内皮细胞和人乳腺上皮细胞的增殖、迁移和网络样形成,ETBR 是内皮素-1 的受体,影响微血管功能障碍<sup>[22]</sup>。miR-31-5p 在子痫前期患者胎盘和血清中上调<sup>[7,23]</sup>。本研究结果显示,与非 FGR 组相比,FGR 组患者血清中 miR-31-5p 表达水平明显升高,提示 miR-31-5p 与 FGR 的发生有关,分析原因可能为 miR-31-5p 通过促进血管功能障碍,导致 FGR 的发生。

本研究结果显示,与非 FGR 组相比,FGR 组尿酸水平、羊水过少占比明显升高,胎儿双顶径、胎儿股骨长度明显降低,且 Pearson 相关分析结果显示,子痫前期患者血清 miR-424、miR-31-5p 表达水平与尿酸水平呈正相关,与胎儿双顶径、胎儿股骨长度均呈负相

关,进一步表明血清 miR-424、miR-31-5p 水平与胎儿生长情况密切相关。ROC 曲线分析结果显示,血清 miR-424、miR-31-5p 联合检测对 FGR 发生诊断的 AUC 高于各指标单独诊断的 AUC,提示 miR-424、miR-31-5p 联合能够提高 FGR 的诊断效能,联合诊断的灵敏度为 90.30%,明显高于单一指标,特异度为 80.70%,明显低于单一指标,进一步说明 miR-424、miR-31-5p 诊断 FGR 发生的灵敏度较好。多因素 Logistic 回归分析结果显示,miR-424 高表达、miR-31-5p 高表达是子痫前期孕妇 FGR 发生的危险因素,进一步提示 miR-424、miR-31-5p 与子痫前期孕妇 FGR 发生相关。

综上所述,子痫前期发生 FGR 孕妇血清 miR-424、miR-31-5p 表达水平明显升高,二者联合诊断 FGR 发生的效能较单一指标高。但本次研究的样本有限,后续将加大样本量深入探究。

## 参考文献

[1] 胡继林,朱宝生.二甲双胍预防妊娠期糖尿病、肥胖、多囊卵巢综合征孕妇子痫前期的研究进展[J].中国实用妇科与产科杂志,2021,37(2):257-260.

[2] 葛成霞,郭建锋.剪切波弹性成像定量分析先兆子痫患者胎盘弹性的初步研究[J].临床超声医学杂志,2019,21(11):855-857.

[3] 姜方清,苏春芳,秦丽,等.血清 PAPP-A、PLGF 及 INH-A 变化与妊娠肝内胆汁淤积症严重程度及胎儿生长受限的影响研究[J].国际检验医学杂志,2022,43(6):745-748.

[4] 吴瑞凤,杨琦芳,田晓艳.硫酸镁对子痫前期模型大鼠胎盘功能以及子代发育性高血压和肠系膜动脉功能障碍的影响[J].临床和实验医学杂志,2022,21(21):2253-2257.

[5] 王蕊.miR-181a-5p 在胎盘滋养层细胞浸润和迁移中的作用机制研究[D].郑州:郑州大学,2018.

[6] 黄志华,孙红.miR-424 和 miR-503 介导的 MAPK 信号通路调节卵巢上皮性癌细胞增殖及迁移的作用及其机制[J].中华妇产科杂志,2017,52(10):704-707.

[7] 于艳,白青山,才蔚涛.子痫前期并发幽门螺旋杆菌感染患者血清 miR-31-5p 表达与不良妊娠结局的相关性研究[J].现代检验医学杂志,2022,37(1):17-20.

[8] 刘明宗,刘于嵩,龙国利,等.川芎嗪调控 miR-31-5p/Ednrb 通路抑制人肺泡上皮细胞 BEAS-2B 凋亡和炎症反应[J].中成药,2021,43(3):617-624.

[9] 中华医学会妇产科学分会妊娠期高血压疾病学组.妊娠期高血压疾病诊治指南(2015)[J/CD].中华产科急救电子杂志,2015,4(4):206-213.

[10] 徐丛剑,华克勤.实用妇产科学[M].4版.北京:人民卫生

出版社,2018:44-44.

[11] 尹格平,陈铭,李秀云,等.子痫前期患者胎盘血管铸型特点与三联药物治疗对改善其胎盘血管灌注功能的研究[J/CD].中华妇幼临床医学杂志(电子版),2015,11(5):589-594.

[12] 陈焯,南瑞霞.胎儿生长受限严重不良妊娠结局与血流异常关系的超声研究[J].海南医学,2023,34(11):1616-1619.

[13] 王明辉.早发型与晚发型重度子痫前期 Th1、Th2 比例及其他检测结果分析[D].济南:山东大学,2018.

[14] MELAMED N, BASCHAT A, YINON Y, et al. FIGO (international Federation of Gynecology and obstetrics) initiative on fetal growth: best practice advice for screening, diagnosis, and management of fetal growth restriction[J]. Int J Gynaecol Obstet, 2021, 52(1): 53-57.

[15] 马宇光, 咎瑛, 王梦, 等. lncRNA NNT-AS1 和 miR-424 在子宫内腺癌组织中的表达及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(11): 1376-1381.

[16] 万红英, 王芬, 张戈, 等. miR-424 介导的 VEGFA 低表达阻碍宫颈鳞状细胞癌侵袭和转移[J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(23): 5256-5262.

[17] WU Z, SHI S, PAN F, et al. Propranolol inhibits infantile hemangioma by regulating the miR-424/vascular endothelial growth factor-A (VEGFA) axis[J]. Transl Pediatr, 2021, 10(7): 1867-1876.

[18] WANG X, WU Y, SUN Q, et al. Ultrasound and microbubble-mediated delivery of miR-424-5p has a therapeutic effect in preeclampsia[J]. Biol Proced Online, 2023, 25(1): 3.

[19] 魏璐璐, 吉文伟, 黄维平. 番泻苷 B 抑制 STAT 3 和 ERK1/2 活化对鼻咽癌 CNE-2 细胞生长、侵袭及裸鼠成瘤的影响[J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(3): 547-555.

[20] 朱碧莹. miR-31-5p 在肿瘤发生发展中的作用: miR-31-5p 调控细胞能量代谢的分子机制研究[D]. 广州: 暨南大学, 2021.

[21] FONG L Y, TACCIOLI C, PALAMARCHUK A, et al. Abrogation of esophageal carcinoma development in miR-31 knockout rats[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(11): 6075-6085.

[22] 吴春艳, 吴婕翎, 王馨, 等. miR-31-5p 通过靶向抑制胰岛素降解酶发挥促进动脉粥样硬化作用[J]. 中国动脉硬化杂志, 2015, 23(11): 1100-1106.

[23] 杜茜, 雷利梅. miR-210-5p 靶向 Netrin-1 在子痫前期中的表达及对绒毛外滋养层细胞增殖、凋亡、侵袭和迁移能力的影响[J]. 中国优生与遗传杂志, 2023, 31(3): 460-468.

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2024.20.022

# 生物标志物联合大蜡螟感染模型在鉴别临床高毒力肺炎克雷伯菌中的应用\*

宋爽<sup>1,2</sup>,赵树龙<sup>1</sup>,孙静芳<sup>1</sup>,徐银海<sup>1</sup>,马萍<sup>1,2</sup>,康海全<sup>1△</sup>

1. 徐州医科大学附属医院检验科,江苏徐州 221002;2. 徐州医科大学医学技术学院,江苏徐州 221004

**摘要:**目的 探讨生物标志物检测联合大蜡螟感染模型准确鉴别临床高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)的应用价值。方法 非重复收集 2020 年 1 月至 2021 年 12 月徐州医科大学附属医院分离自重症监护室患者的肺炎克雷伯菌,经拉丝实验和毒力基因检测鉴定出生物标志物阳性的肺炎克雷伯菌,并进行荚膜血清分型和多位点序列分型。使用标准菌株 ATCC700603、ATCC43816 建立大蜡螟感染模型,将临床分离的肺炎克雷伯菌分别制作 4 个不同浓度的菌液进行大蜡螟感染试验,每 12 小时记录死亡情况,绘制生存曲线并计算 72 h 50% 致死量(LD<sub>50</sub>)。结果 共收集 15 株 hvKP,检出 3 种血清型,分别为 K1 ST23 型(13.3%,2/15)、K64 ST11 型(60.0%,9/15)、K112 ST15 型(26.7%,4/15)。K1 和 K64 型的菌株均含有 rmpA、rmpA2、iucA 和 iroN 4 个毒力基因,而 K112 型的 4 株均只含有 rmpA2 和 iucA 2 个毒力基因。K64 ST11 型和 K112 ST15 型菌株均对碳青霉烯类抗菌药物耐药。大蜡螟能够区分出高毒力和低毒力肺炎克雷伯菌,当菌液浓度分别为 1×10<sup>5</sup> CFU/mL、1×10<sup>6</sup> CFU/mL、1×10<sup>7</sup> CFU/mL、1×10<sup>8</sup> CFU/mL 时,ATCC700603 和 ATCC43816 对应浓度比较,差异有统计学意义(P=0.000 1、0.002 3、0.024 5、0.042 8)。未做任何处理的空白对照和注射了磷酸盐缓冲液的大蜡螟均存活,随着菌液浓度的升高,大蜡螟的病死率也随之升高。与高毒力标准菌株 ATCC43816 相同,K1、K64、K112 型临床菌株均表现出高致死率,当菌液浓度在 1×10<sup>7</sup>~1×10<sup>8</sup> CFU/mL 时,所有大蜡螟在 48 h 内死亡。1×10<sup>6</sup> CFU/mL 的菌液可区分出 hvKP 和 cKP,差异均有统计学意义(P<0.05)。ATCC700603、ATCC43816、K1 型、K64 型、K112 型和 cKP 在 72 h 的 LD<sub>50</sub> 分别为 5.2×10<sup>6</sup> CFU/mL、6.8×10<sup>4</sup> CFU/mL、1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL、1.0×10<sup>4</sup> CFU/mL、3.1×10<sup>4</sup> CFU/mL、1.6×10<sup>6</sup> CFU/mL,对应的 Log<sub>10</sub>LD<sub>50</sub> 分别为 6.718、4.834、3.987、3.987、4.504、6.212,临床分离的 K1 型、K64 型、K112 型肺炎克雷伯菌均可被定为高毒力菌株。结论 生物标志物联合大蜡螟感染模型,可以准确实现临床经典肺炎克雷伯菌和高毒力肺炎克雷伯菌的鉴别。

**关键词:**大蜡螟感染模型; 毒力基因检测; 肺炎克雷伯菌; LD<sub>50</sub>; 高毒力

中图法分类号:R446.5;R372

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2024)20-3053-06

## Application of biomarkers combined with Galleria mellonella infection model in the identification of clinical hypervirulent Klebsiella pneumoniae\*

SONG Shuang<sup>1,2</sup>, ZHAO Shulong<sup>1</sup>, SUN Jingfang<sup>1</sup>, XU Yin Hai<sup>1</sup>, MA Ping<sup>1,2</sup>, KANG Haiquan<sup>1△</sup>

1. Department of Laboratory Medicine, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. College of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221004, China

**Abstract: Objective** To explore the application value of biomarker detection combined with Galleria mellonella infection model to accurately identify clinical hypervirulent Klebsiella pneumoniae (hvKP). **Methods** Klebsiella pneumoniae isolated from patients in the intensive care unit of the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from January 2020 to December 2021 were collected in a non-repeated way. The biomarkers of Klebsiella pneumoniae were identified by string test and virulence gene detection, and capsule serotyping and multilocus sequence typing were performed. Standard strains ATCC700603 and ATCC43816 were used to establish Galleria mellonella infection models, and clinical isolates of Klebsiella pneumoniae were made into four different concentrations for Galleria mellonella infection test. The death rate was recorded every 12 hours, and

\* 基金项目:江苏省卫生健康委员会科研项目(Z2021009、Ym2023110)、江苏省徐州市科技计划项目(KC23269)、徐州医科大学附属医院院级科研项目(2023ZY07)。

作者简介:宋爽,女,主管检验师,主要从事感染性疾病诊断与耐药机制方面的研究。△ 通信作者,E-mail:hqk811029@163.com。

the survival curve was drawn and the 72-hour 50% lethal dose ( $LD_{50}$ ) was calculated. **Results** A total of 15 hvKP strains were collected, and 3 serotypes were detected, including K1 ST23 (13.3%, 2/15), K64 ST11 (60.0%, 9/15), and K112 ST15 (26.7%, 4/15). The K1 and K64 strains all contained four virulence genes, *rmpA*, *rmpA2*, *iucA* and *iroN*, while the K112 strains all contained only two virulence genes. Both K64 ST11 and K112 ST15 strains were resistant to carbapenems. *Galleria mellonella* can distinguish high and low virulence *Klebsiella pneumoniae*. When the concentration of bacteria solution was  $1 \times 10^5$  CFU/mL,  $1 \times 10^6$  CFU/mL,  $1 \times 10^7$  CFU/mL and  $1 \times 10^8$  CFU/mL, the corresponding concentration of ATCC700603 and ATCC43816 was compared, and the differences were all statistically significant ( $P=0.0001, 0.0023, 0.0245, 0.0428$ ). The blank control group without any treatment and the phosphate buffer saline injected group survived. With the increase of bacterial concentration, the mortality of the *Galleria mellonella* also increased. Similar to the highly virulent standard strain ATCC43816, the clinical strains of K1, K64 and K112 showed high lethality, and all strains died within 48 hours when the bacterial concentration was between  $1 \times 10^7$  and  $1 \times 10^8$  CFU/mL. hvKP and cKP could be distinguished by  $1 \times 10^6$  CFU/mL bacterial solution, and the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). The  $LD_{50}$  of ATCC700603, ATCC43816, K1, K64, K112 and cKP at 72 h were  $5.2 \times 10^6$  CFU/mL,  $6.8 \times 10^4$  CFU/mL,  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL,  $1.0 \times 10^4$  CFU/mL and  $3.1 \times 10^4$  CFU/mL,  $1.6 \times 10^6$  CFU/mL respectively, and the corresponding  $\text{Log}_{10}LD_{50}$  were 6.718, 4.834, 3.987, 3.987, 4.504, 6.212 respectively. Clinical isolates of K1, K64, K112 types of *Klebsiella pneumoniae* can be classified as hypervirulent strains. **Conclusion** Biomarkers combined with *Galleria mellonella* infection model can accurately identify clinical classic *Klebsiella pneumoniae* and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*.

**Key words:** *Galleria mellonella* infection model; virulence gene detection; *Klebsiella pneumoniae*;  $LD_{50}$ ; high virulence

1986 年,我国首次报道了高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)<sup>[1]</sup>,与可引起机会致病性感染的经典肺炎克雷伯菌(cKP)不同,hvKP可引起健康人群的严重感染,如社区相关性肝脓肿、脑膜炎、眼内炎等<sup>[2]</sup>,并可引起转移性播散。hvKP常表现为对抗菌药物敏感,近年来,对碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)引起的医院感染案例及局部暴发的报道日渐增多<sup>[3-4]</sup>,临床防控面临巨大挑战。目前国际上对 hvKP 的定义尚无统一论,动物实验仍是直观反应肺炎克雷伯菌毒力水平的方法,实验室常用小鼠建立感染模型,然而小鼠模型对环境条件要求高,需获得伦理批准,操作人员要具备一定资质,且操作复杂,难以批量实验。考虑到 hvKP 感染病例逐年增多及其高致病性和高致死率<sup>[5]</sup>,对 hvKP 的鉴别和对其毒力水平的评估非常重要,亟需一种便捷、准确、直观识别 hvKP 的方法以满足临床需求。

目前,常用于鉴别 hvKP 的方法有拉丝实验、荚膜血清分型、多位点序列分型(MLST)、毒力相关基因检测、血清杀菌实验和动物实验。之前有研究对 hvKP 进行测序,结果显示,hvKP 存在高度相似的毒力质粒 pK2044(224152 bp)和 pLVPK(219385 bp),质粒上编码的毒力基因如 *iuc*、*iro*、*peg-344*、*rmpA* 和 *rmpA2* 赋予了菌株高毒力表型<sup>[6-7]</sup>。此外,hvKP 具有较高的铁捕获能力,有研究已经发现 *peg-344*、*iroB*、*iucA*、*p-rmpA*、*p-rmpA2* 和铁载体产量大于 30

$\mu\text{g/mL}$  能够准确区分 hvKP 和 cKP<sup>[8]</sup>,但此研究的样本量较少且缺少临床数据支撑。近年来,大蜡螟感染模型在病原菌毒力检测方面的应用引起了广泛关注。大蜡螟作为昆虫动物,相较于传统的动物模型,操作简便,价格低廉,已被用于多种细菌和真菌的感染模型研究,但目前用于评估肺炎克雷伯菌毒力的模型研究较少见,本研究拟通过建立肺炎克雷伯菌毒力标志物联合大蜡螟感染模型评估肺炎克雷伯菌的毒力水平,以期为临床区别 hvKP 和 cKP 菌株提供一种新的思路与方法,提高临床对 hvKP 的防治能力。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2020 年 1 月至 2021 年 12 月徐州医科大学附属医院分离自重症监护室非重复患者的肺炎克雷伯菌,将其中拉丝实验阳性且含有毒力质粒 pLVPK 相关基因(*rmpA*、*rmpA2*、*iucA*、*iroN*)的菌株定义为 hvKP,其他菌株则为非高毒力的 cKP,从中随机收集 10 株用于实验。采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱仪(德国布鲁克公司)进行菌种鉴定,用 VITEK-2 compact 全自动细菌鉴定仪(法国梅里埃)进行药敏检测。质控菌株铜绿假单胞菌 ATCC27853 和大肠埃希菌 ATCC25922 来自国家卫生健康委临床检验中心,肺炎克雷伯菌 ATCC700603、ATCC43816 菌株由苏州大学第二附属医院杜鸿教授提供。本实验已获得徐州医科大学附属医院伦理委员会审核批准(XYFY2020-KL084)。

**1.2 仪器与试剂** T100 聚合酶链反应 (PCR) 扩增仪 (美国 Bio-Rad 公司)、GelDoc 2000 凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司)、DYY-6C 电泳仪 (北京六一生物科技股份有限公司)、25  $\mu$ L 微量注射器 (上海哈美顿实验器材有限公司)、大蜡螟 (盐城新安华生物科技有限公司)、DL2000 DNA marker (BBI 生命科学有限公司)、PCR 预混合溶液 (宝生物工程大连有限公司)、磷酸盐缓冲液 (PBS)。主要引物序列见表 1, 均由上海生物工程股份有限公司合成。

表 1 引物序列表

引物名称	序列 (5'-3')	产物大小 (bp)
Wzi	F:GTGCCGCGAGCGCTTTCTATCTTGGTAATCC	447
	R:GAGAGCCACTGGTTCAG AATTACCGC	
rmpA	F:CATAAGAGTATTGGTTGACAG	429
	R:CTTGCAATGAGCCATCTTTCA	
rmpA2	F:TGTGCAATAAGGATGTTACATTAGT	609
	R:TTTGAATGTGCACCAATTTTCA	
iroN	F:GTCCGCGGTAACCTCAGCC	829
	R:TCAGAATGAAACTACCGCCC	
iucA	F:AATCAATGGCTAATCCCGCTG	239
	R:CGCTTCACTTCTTCACTGACAGG	

注:F 表示正向引物;R 表示反向引物。

**1.3 方法**

**1.3.1 MLST、荚膜血清型及毒力基因检测** 采用煮沸法提取肺炎克雷伯菌基因组 DNA, PCR 扩增毒力基因 rmpA、rmpA2、iucA 和 iroN<sup>[9-10]</sup>, 筛选出 hvKP。采用 PCR 扩增肺炎克雷伯菌的 7 个管家基因 gapA、infB、mdh、pgi、phoE、rpoB 和 tonB 并测序 (<https://bigsdb.pasteur.fr/klebsiella/primers-used>), PCR 扩增 wzi 基因并测序<sup>[11]</sup>, 将所有测序结果上传至 <https://bigsdb.pasteur.fr> 网站进行比对, 确定所有 hvKP 的 MLST 分型及荚膜血清分型。

**1.3.2 拉丝实验** 将肺炎克雷伯菌接种于哥伦比亚血琼脂培养基, 37  $^{\circ}$ C 过夜培养, 用接种环挑取菌落, 菌落被拉伸  $\geq 5$  mm 即为拉丝实验阳性, 本实验重复

3 次。

**1.3.3 大蜡螟感染模型** 选取虫体质量 250~350 mg 长 2~2.5 cm 活动良好的奶白色大蜡螟用于实验。用 PBS 缓冲液将菌液倍比稀释至  $1 \times 10^5$  CFU/mL、 $1 \times 10^6$  CFU/mL、 $1 \times 10^7$  CFU/mL、 $1 \times 10^8$  CFU/mL, 依次记为 1~4 组, 用 25  $\mu$ L 微量注射器吸取 10  $\mu$ L 菌液由大蜡螟的最后一只右后足注入虫体, 每组注射 10 只。另选取 10 只大蜡螟注射 PBS, 10 只不做任何处理作为空白对照。将大蜡螟放入一次性培养皿 37  $^{\circ}$ C 避光培养 72 h, 在注射后每 12 h 记录一次大蜡螟的生存情况, 虫体变黑、无活动、刺激无反应判定为死亡。菌株 ATCC43816 为本研究的高毒力对照, ATCC700603 为低毒力对照, 10 株临床收集的 10 株非高毒力 cKP 记为经典组。实验重复 3 次取平均值绘制生存曲线, 记算 72 h 时肺炎克雷伯菌 50% 致死量 (LD<sub>50</sub>)<sup>[12]</sup>。本研究先用高毒力标准菌株 ATCC43816 和低毒力标准菌株 ATCC700603 建立起肺炎克雷伯菌大蜡螟感染模型的操作规程并评价其可行性, 再用临床收集到的 K1 型、K64 型和 K112 型高毒力菌株及非高毒力的经典株进行实验评估该模型区分 hvKP 的能力。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS22.0 统计软件对 LD<sub>50</sub> 程序进行分析, 结果用 Log<sub>10</sub>LD<sub>50</sub> 表示。采用 GraphPad Prism 8.0 软件对大蜡螟数据进行处理分析并绘制 Kaplan-Meier 生存曲线图, 用 Log-rank 分析数据, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 高毒力肺炎克雷伯菌分型及毒力基因检测** 通过拉丝实验和毒力基因检测, 共收集 15 株 hvKP, 检出 3 种血清型, 分别为 K1 ST23 型 (13.3%, 2/15)、K64 ST11 型 (60.0%, 9/15)、K112 ST15 型 (26.7%, 4/15)。K1 和 K64 型的菌株均含有 rmpA、rmpA2、iucA 和 iroN 4 个毒力基因, 而 K112 型的 4 株均只含有 rmpA2 和 iucA 2 个毒力基因。K64 ST11 型和 K112 ST15 型菌株均对碳青霉烯类抗菌药物耐药, 即为 CR-hvKP, 对亚胺培南和美罗培南的最小抑菌浓度 (MIC) 见表 2。

表 2 高毒力肺炎克雷伯菌分型、毒力基因及亚胺培南和美罗培南 MIC 值检测结果

荚膜血清型	MLST	n	rmpA	rmpA2	iucA	iroN	亚胺培南 ( $\mu$ g/mL)	美罗培南 ( $\mu$ g/mL)
K1	ST23	2	+	+	+	+	$\leq 0.25$	$\leq 0.25$
K64	ST11	9	+	+	+	+	$> 8$	$> 8$
K112	ST15	4	-	+	+	-	2	$> 8$

注: + 表示含有目的基因; - 表示不含目的基因。

**2.2 大蜡螟感染模型** ATCC700603、ATCC43816 的生存曲线如图 1 所示, 大蜡螟能够区分出高毒力和低毒力肺炎克雷伯菌, 当菌液浓度分别为  $1 \times 10^5$

CFU/mL、 $1 \times 10^6$  CFU/mL、 $1 \times 10^7$  CFU/mL、 $1 \times 10^8$  CFU/mL 时, ATCC700603 和 ATCC43816 对应浓度比较, 差异均有统计学意义 ( $P = 0.000 1, 0.002 3,$