

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20217799

· 综述 ·

## 高毒力肺炎克雷伯菌毒力和耐药机制研究进展

蒋玉婷, 张珂, 刘唐娟, 黄莹莹, 温中薇, 孔晋亮, 陈一强

(广西医科大学第一附属医院呼吸与危重症医学科, 广西南宁 530021)

**[摘要]** 自 20 世纪 80 年代中期以来, 高毒力肺炎克雷伯菌(hvKp)感染率逐年增加, 已引起全球的关注。hvKp 较普通型肺炎克雷伯菌(cKp)更具致病性, 在健康人群中即可引发侵袭性感染, 不仅病死率高(3%~31%), 而且常伴随严重的后遗症, 如眼盲或神经系统疾病。更令人担忧的是, 近年来对第三代头孢菌素、碳青霉烯类抗生素和粘菌素耐药的 hvKp 菌株相继出现, 给临床治疗和管理带来巨大挑战。因此, 了解 hvKp 毒力及耐药机制尤为重要, 此文就其最新研究进展进行综述。

**[关键词]** 高毒力; 肺炎克雷伯菌; 毒力因子; 耐药机制

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

### Research progress on virulence and drug resistance mechanism of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*

JIANG Yu-ting, ZHANG Ke, LIU Tang-juan, HUANG Ying-ying, WEN Zhong-wei, KONG Jin-liang, CHEN Yi-qiang (Department of Respiratory and Critical Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** Since the mid-1980s, incidence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) has increased year by year, which has attracted global attention. hvKp is more pathogenic than classic *Klebsiella pneumoniae* (cKp), it can lead to invasive infection in healthy people, not only with high mortality (3% - 31%), but also often accompanied by serious sequelae, such as blindness or neurological diseases. What is more worrying is that, in recent years, the emergence of hvKp strains resistant to the third generation cephalosporins, carbapenem antibiotics and colistin has brought great challenge to clinical treatment and management. Therefore, understanding virulence and drug resistance mechanism of hvKp is particularly important, this paper reviews the latest research progress of hvKp.

**[Key words]** hypervirulent; *Klebsiella pneumoniae*; virulence factor; drug resistance mechanism

肺炎克雷伯菌是常见的革兰阴性杆菌, 尤其在免疫力低下患者中, 是最常见的机会性致病菌之一。根据毒力特点可将肺炎克雷伯菌分为普通型肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKp)和高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKp)。cKp 通常在免疫力低下患者中致病, 引起医院获得性感染。而 hvKp 通常在健康人群中引起社区获得性感染, 糖尿病和消化系统疾病患者更易感染<sup>[1]</sup>, 且常伴随多部位侵袭性感染, 如化

脓性肝脓肿、脑膜炎、眼内炎、骨髓炎、脾脓肿和坏死性筋膜炎等, 较 cKp 更具毒性, 因此被称为 hvKp<sup>[2-3]</sup>。起初, 人们以高黏液黏度表型定义 hvKp, 但越来越多研究发现, 并不是所有 hvKp 菌株都具有高黏液黏度表型<sup>[4]</sup>。Zhang 等<sup>[5]</sup> 建议 hvKp 应由关键毒力基因型而不是高黏液黏度表型进行定义, 并认为仅通过检测高黏液黏度表型的拉丝试验定义 hvKp 可能会使研究结果产生偏颇, 特别是在小样本量的研究中。Harada 等<sup>[6]</sup> 也指出拉

**[收稿日期]** 2020-07-16

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81760743); 广西壮族自治区卫生健康委员会自筹经费科研项目(Z20190940)

**[作者简介]** 蒋玉婷(1994-), 女(汉族), 广西壮族自治区贺州市人, 硕士研究生, 主要从事呼吸系统感染性疾病的研究和治疗。

**[通信作者]** 陈一强 E-mail: chenylq0708@163.com

丝试验性能较差,准确率仅为 90%,而 *rmpA*、*rmpA2*、*peg-344*、*iroB* 和 *iucA* 等毒力基因,以及铁载体定量测定  $\geq 30 \mu\text{g/mL}$ ,准确率  $> 95\%$ ,可作为准确区分 hvKp 与 cKp 的生物标志物。因此,人们逐渐结合关键毒力基因型定义 hvKp,如采用 *rmpA* 和 *iucA* 基因阳性,*rmpA*、*iucA* 和 *iroB* 基因阳性,高黏液黏度表型、*rmpA* 基因阳性和 K1/K2,高黏液黏度表型、*rmpA/rmpA2* 和 *magA* 基因阳性(尤其适用于 K1 ST23 hvKp)等组合定义 hvKp<sup>[7-10]</sup>。但至今还未有 hvKp 定义的国际共识,仍需继续探索 hvKp 的最佳定义标准,以期能尽早发现 hvKp 菌株,便于临床预防和治疗。另外,hvKp 菌株可获得单种或多种耐药基因,如碳青霉烯酶基因、广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因、粘菌素抗性相关基因、磺酰胺抗性基因(*sul1*、*sul2* 和 *sul3*)及甲氧苄啶抗性基因(*dfpA1* 和 *dfpA12*)等,表明部分 hvKp 菌株已经进化成既有高毒力表型又有耐药表型的“超级细菌”<sup>[11-12]</sup>。高毒力和耐药共存的肺炎克雷伯菌近期已增加了约 50%<sup>[13]</sup>,并在多地医院引起感染暴发,导致极高病死率<sup>[12, 14]</sup>。hvKp 耐药株已经出现并越来越多,可能导致严重甚至无法治疗的感染,对公众健康造成极大威胁,因此本文对 hvKp 菌株的毒力因子和耐药机制研究进展进行综述。

## 1 hvKp 流行病学

1986 年 Liu 等<sup>[15]</sup>首次提及 hvKp,发现 7 例来自中国台湾的肺炎克雷伯菌化脓性肝脓肿患者均合并眼内炎,且同时合并心内膜炎、脑膜炎、肺炎或肾炎之一,此是一种不同于 cKp 的侵袭性感染。随后,在韩国、越南及中国出现许多相似报道<sup>[16]</sup>。中国台湾研究<sup>[17]</sup>显示,肺炎克雷伯菌分离株中,hvKp 菌株占 54.3%(150/276)。韩国 37.4%(155/414)的肺炎克雷伯菌具有高黏液黏度表型<sup>[18]</sup>。中国大陆研究<sup>[19]</sup>显示,230 株肺炎克雷伯菌分离株中 37.8%为 hvKp,且 hvKp 的检出率在不同城市之间存在差异,武汉高达 73.9%,而浙江仅 8.3%。肺炎克雷伯菌引起的社区获得性肝脓肿占有化脓性肝脓肿病例的 80%,而引起化脓性肝脓肿的病原体中 90.9%是 hvKp 菌株<sup>[20]</sup>。hvKp 成为了亚洲化脓性肝脓肿最常见的原因,并开始在全球播散。21 世纪以来,法国、日本、伊朗、美国、埃及、西班牙、英国、加拿大、澳大利亚、印度和新加坡等国家也逐渐出现 hvKp 相关报道,但检出率并不高(3.2% ~

20.3%)<sup>[21-24]</sup>。然而近几年,新的 hvKp 菌株—耐药 hvKp 开始在临床出现,其表现出高毒力和难治愈性再度引起人们关注。一份来自温州某医院的报告<sup>[14]</sup>显示,2017 年 3 月—2018 年 1 月,该院重症监护病房耐碳青霉烯类 hvKp 暴发,导致病死率 100%(8/8)。类似的报道也曾在中国杭州以及伊朗等地出现<sup>[12, 25]</sup>。hvKp 和耐药 hvKp 正在威胁着人类健康,必须加强对 hvKp 的认知及管控。

## 2 hvKp 相关毒力因子

较 cKp 菌株而言,hvKp 菌株对中性粒细胞和补体介导的吞噬作用以及中性粒细胞胞外杀菌作用具有更强的抵抗力<sup>[26]</sup>。体外试验<sup>[24]</sup>也表明,hvKp 菌株具有更强的生存能力,且在各种感染模式中表现出更强的毒力。在 hvKp 菌株中,存在多种与其高毒力相关的因子,主要包括荚膜多糖、序列类型、毒力质粒、整合性接合元件(integrative conjugative elements,ICEs)、铁载体等。

2.1 荚膜多糖 荚膜多糖由直链或支链低聚糖组成,其包裹在肺炎克雷伯菌周围形成一个保护屏障,使肺炎克雷伯菌能在劣势环境(如干燥环境、宿主免疫吞噬、抗菌药物攻击等)中生存。hvKp 菌株的荚膜多糖受黏液表型调节基因 *rmpA/rmpA2*、*rmpC* 和 *magA*(*wzy-k1*)的正调控<sup>[10, 27]</sup>。根据 K 抗原血清学检测,荚膜多糖至少可分为 78 种类型<sup>[28]</sup>,K1、K2、K5、K20、K54 和 K57 是 hvKp 菌株最普遍的血清型。其中 K1 血清型与 ST23 密切相关,常引起化脓性肝脓肿,在亚洲占主导地位。而 K2 血清型在遗传上呈多样化,在美国和欧洲更常见,K2 血清型的 ST65 hvKp 菌株与各种侵袭性感染相关<sup>[3, 29]</sup>。值得注意的是,K1、K2、K5 和 K57 型荚膜多糖缺乏巨噬细胞凝集素受体识别的甘露糖或鼠李糖,能逃避凝集素吞噬和巨噬细胞杀伤,为 hvKp 存活和繁殖创造了良好环境<sup>[26]</sup>。荚膜多糖的厚度决定了其对肺炎克雷伯菌的保护程度<sup>[30]</sup>,而 hvKp 菌株常伴随较 cKp 更丰富的荚膜多糖,因此,hvKp 菌株更能抵抗各种体液防御(如补体杀伤、人  $\beta$ -防御素)和抗菌肽(如中性粒细胞蛋白 1 和乳铁蛋白),有助于其在宿主体内播散并产生耐药性<sup>[31]</sup>。

2.2 序列类型 多位点序列分型(multilocus sequence typing,MLST)是一种基于核酸序列测定的细菌分型方法,可将细菌分为不同的序列类型(sequence type,ST),并确定不同序列类型间的关系以

及与疾病的联系。经 MLST 分析发现,大多数 hvKp 菌株都是经克隆扩增的,其核心基因组变异有限且毒力基因高度保守,克隆群 CG23 与 hvKp 菌株的高毒力表型密切相关<sup>[29]</sup>。在亚洲流行的 hvKp 菌株中,37%~64% 的分离株为克隆群 CG23,包括 ST23、ST26、ST57 和 ST163。ST23 是 hvKp 菌株中最普遍的序列类型,并与 K1 血清型和肝脓肿密切相关<sup>[3]</sup>;而 ST65、ST66、ST86、ST373、ST374、ST375、ST380 和 ST434 与 K2 相关,其中又以 ST65(42%)和 ST86(46%)更常见<sup>[32]</sup>。据不完全统计,2015—2017 年中国鉴定的 47 株耐碳青霉烯类的 hvKp 分离株,其序列类型分布为 ST11(26 株)、ST65(7 株)、ST23(5 株)、ST1797(3 株)、ST268(2 株)以及 ST25、ST595、ST692 和 ST1700(各 1 株)<sup>[29,33]</sup>,表明我国耐碳青霉烯类的 hvKp 菌株以 ST11 为主。中国耐碳青霉烯类 cKp 以 ST11 常见,hvKp 多见于 ST23<sup>[34]</sup>,提示 ST23 hvKp 菌株和 ST11 cKp 耐药株间存在相互作用,即 ST23 hvKp 和 ST11 耐碳青霉烯类 cKp 间已出现毒力和耐药相关遗传物质的交换。

**2.3 毒力质粒** 与 cKp 相比,hvKp 的一个明显特征是存在毒力质粒。该质粒通常包含多个毒力编码基因,并可在菌株间转移,是 hvKp 菌株呈现高毒力的主要原因。最早被鉴定的两个毒力质粒是 pK2044(224 152 bp)和 pLVPK(219 385 bp),两个毒力质粒高度相似,都是 IncHI1/IncFIB 质粒,含黏液表型调节基因 *rmpA/rmpA2*、气杆菌素编码基因 *iuc* 和沙门菌素编码基因 *iro*<sup>[10,24]</sup>;但不含质粒接合转移基因,因此,不具有自主接合转移功能,可能与过去很长一段时间内,肺炎克雷伯菌中高毒力和耐药表型不相重叠的现象有关<sup>[35]</sup>。随着研究的深入,越来越多的毒力质粒相继被鉴定出来,甚至发现了与耐药基因共存的毒力质粒。如 Gu 等<sup>[12]</sup>指出,类 pLVPK 毒力质粒 pVir-CR-HvKp4(178 154 bp,含 *rmpA2*、*iuc*ABCD、*iutA*,缺 *rmpA*、*iro*BCDN)可转移到耐碳青霉烯类 cKp 菌株中,实现与耐药质粒 pKPC-CR-HvKp4 共存,并形成耐碳青霉烯类 hvKp 菌株;该耐药与毒力结合的 hvKp 菌株在当地医院引起感染暴发,并导致病死率 100%。同样地,将 pLVPK 毒力质粒的 100 kb 片段整合到接合性 IncFIB 质粒中,形成 p15WZ-82-vir 毒力质粒,可与耐碳青霉烯类 cKp 接合,并表达出高毒力和呈现耐药表型<sup>[36]</sup>。此外,人们还发现新的共存形式的毒力质粒—杂交毒力质粒,此类质粒将耐药基因重组到

毒力质粒中,形成既含有毒力相关基因又含有耐药相关基因的新质粒。Dong 等<sup>[37]</sup>从临床 hvKp 菌株中分离出的杂交质粒 pKP70-2(240 kb),同时含毒力基因 *rmpA2* 以及碳青霉烯酶基因 *blaKPC-2* 和甲氧苄啶抗性基因 *dfrA*。Huang 等<sup>[38]</sup>通过 WGS 在 TVGHCRE225 菌株中也检测出一个杂交毒力质粒 pVir,该质粒第一区域与 pK2044 和 pLVPK 质粒有 99% 的同源性,含毒力基因 *rmpA* 和 *rmpA2*;第二区域则与 pPMK1-NDM 抗性质粒高度相似。这些 hvKp 耐药株,同时具有高毒力、耐药性以及移动性,可在医院或社区引起严重感染<sup>[39]</sup>。而杂交毒力质粒将耐药和毒力基因融合在同一质粒中,其在菌株间转移所带来的威胁更大。

**2.4 ICEs** ICEs 是细菌中可自主移动的元件,通常存在于细菌染色体上,自身即可完成转移的相关编码,并携带多种功能基因,是毒力和耐药播散的重要介质。肺炎克雷伯菌中的 ICEs 可依据其右端携带的不同 *cargo* 基因簇分为 14 种类型(ICEKp1~ICEKp14),各 ICEs 间有以下共性:(1)左端有一个整合酶基因 *int*;(2)有编码耶尔森菌素的 29 kb 位点;(3)有编码 *xis* 激活酶、virB-IV 型分泌系统、oriT 转移起点和 mobBC 蛋白的 14 kb 序列<sup>[40]</sup>。hvKp 菌株中以 ICEKp1 和 ICEKp10 常见。ICEKp1 在 hvKp 菌株 NTUH-K2044 中被首次发现,其 5' 区域有一个高致病性岛(high pathogenicity island, HPI),编码耶尔森菌素、沙门菌素和黏液表型调节因子 *rmpA*,3' 区域含接合转移基因<sup>[41]</sup>。ICEKp10 编码耶尔森菌素和基因毒素 colibactin,但缺少 *rmpA* 和 *iro* 基因<sup>[42]</sup>。ICEs 普遍存在于肺炎克雷伯菌中,尤其是 hvKp 菌株。近 90% 的 CG23 菌株和近 75% 的 hvKp 菌株均含 ICEs<sup>[10]</sup>。Lam 等<sup>[40]</sup>对肺炎克雷伯菌中 ICEs 的流行、进化和迁移性进行研究,发现 ICEs 主要通过基因水平转移在肺炎克雷伯菌群(包括多重耐药肺炎克雷伯菌)中动态循环,极大地促进肺炎克雷伯菌间的遗传物质交流。Farzand 等<sup>[43]</sup>发现,ICEKp2 虽与铜绿假单胞菌 PAPI 高度同源,广泛分布于铜绿假单胞菌中,但在肺炎克雷伯菌中也有少量分布,当 ICEKp2 和 ICEKp1 存在于同一肺炎克雷伯菌中,ICEKp2 的 4 型偶联蛋白促进 ICEKp1 在肺炎克雷伯菌间转移,此为 ICEs 促进毒力和耐药性播散提供了新的作用途径。另外,最近一项研究<sup>[44]</sup>显示,ICEKp 的缺失可使肺炎克雷伯菌铁载体分泌减少,抗菌药物抗性降低,并指出此与 ICEkp 编码的耶尔森菌素

ABC 转运蛋白相关。

2.5 铁载体 铁是细菌生长所必需的,而铁载体可在低铁环境中(如人类宿主)以极高的铁亲和力和为细菌提供铁,促进细菌生长和繁殖<sup>[10]</sup>。hvKp 比 cKp 产生更多的铁载体,且铁载体活性提高了 6~10 倍<sup>[1]</sup>。hvKp 能产生 4 种铁载体:肠杆菌素、耶尔森菌素、沙门菌素和产气杆菌素。肠杆菌素普遍存在于肺炎克雷伯菌中,但由于其能被宿主载脂蛋白 2 灭活,在感染中几乎不发挥作用。耶尔森菌素也广泛存在于肺炎克雷伯菌,但在 hvKp 中更常见,研究<sup>[24]</sup>表明,耶尔森菌素与侵袭性感染(菌血症、肝脓肿等)风险增加显著相关。编码耶尔森菌素的 *ybt* 基因存在于 FIBK 质粒上。FIBK 质粒在肺炎克雷伯菌中非常普遍且高度稳定,并且许多 FIBK 质粒已获得 AMR 转座子,使得 AMR 与毒力基因的聚合几乎不存在障碍,可极大地促进 hvKp 菌株的耐药性<sup>[40]</sup>。编码沙门菌素和产气杆菌素的基因存在于毒力质粒上,因此沙门菌素和产气杆菌素是 hvKp 特有的。其中,产气杆菌素占铁载体总量的 80%~90%,对 hvKp 生长和存活至关重要,可协助 hvKp 从肠道转移到各种组织并在这些组织中繁殖,从而引起严重感染<sup>[1, 24]</sup>。产气杆菌素由 *iucABCD* 操纵子编码,其同源受体由 *iutA* 基因编码。沙门菌素在 hvKp 感染中的具体作用还未明确,有研究<sup>[45]</sup>指出沙门菌素似乎与微球菌素 E492 一起促进 hvKp 菌株在宿主中定植。

2.6 其他 hvKp 菌株的高毒力表型受多种毒力因子的共同作用,除了上述毒力因子外,还有其他可能发挥作用的毒力因子。一是 *peg-344*, 其位于 hvKp 菌株 hvKp1 的毒力质粒上,可增加 hvKp1 的毒力,并在 hvKp 菌株中广泛流行<sup>[46]</sup>,用 *peg-344* 环介导的等温扩增技术可快速分辨 hvKp 和 cKp<sup>[47]</sup>。二是尿囊素,其在肺炎克雷伯菌中既是氮源又是碳源。研究<sup>[48]</sup>表明,尿囊素在 K1 hvKp 菌株中更常见,肺炎克雷伯菌对尿囊素的利用能力可能有助于其对氮源的竞争。尿囊素代谢受基因 *allB*(尿囊素酶)、*allR*(负调节剂)、*allS*(转录激活因子)和 *ybbW*(丙氨酸通透酶)调控。三是 Colibactin, 是一种多肽类基因毒素,由位于 ICEkp 54 kb 位点上的 *clb* 基因(也称 *pks* 基因)编码的非核糖体肽合成酶-聚酮合成酶的合成,并通过 ICEkp 实现菌株间的基因水平转移<sup>[3]</sup>。Colibactin 可诱导 DNA 双链断裂,扰乱宿主细胞周期,还有助于 hvKp 菌株在宿主体内定植,导致小鼠感染 K1 ST23 肺炎克雷伯菌<sup>[49]</sup>。四

是 cAMP 受体蛋白,是一种具有多效性的转录调节因子,可负调控荚膜多糖生物合成,其突变体能产生更高的 CPS 水平,但会降低肺炎克雷伯菌 NTUH-2044 生物膜形成能力、生长速率和毒力<sup>[50]</sup>。因此,cAMP 受体蛋白是否具有同时调控其他毒力因子的功能,以及对 hvKp 毒力的具体调控作用仍待明确。最后是 hvKp 菌株形成生物膜的能力,Wu 等<sup>[51]</sup>研究发现,hvKp 比 cKp 产生更多的生物膜。但也有研究<sup>[52]</sup>提出,hvKp 与 cKp 生物膜形成能力无差异,且生物膜形成能力对 hvKp 毒力无明显影响。因此,生物膜形成与 hvKp 引起的侵袭性感染是否相关,仍值得进一步研究。

### 3 HvKp 相关耐药机制

相比于 cKp 对抗菌药物的高耐药率,hvKp 对抗菌药物的耐药率普遍较低。但近年来随着可移动遗传元件在全球的快速传播,已观察到两种融合方式形成耐药 hvKp 菌株:获得毒力基因的 cKp 菌株和获得耐药基因的 hvKp 菌株。以下就 hvKp 相关耐药机制进行阐述。

3.1 基因水平转移 基因水平转移是指在非亲缘关系的有机体之间共享遗传物质,通常与细菌的抗菌药物耐药性和致病性相关,通过质粒、ICEs、转座子等移动遗传元件,以接合、转导和转化等方式播散或获得耐药性或毒力。接合是指供体细胞和受体细胞之间通过接合菌毛进行物理接触而实现遗传物质转移;转化是指从环境中摄取外源遗传物质;转导是指外源遗传物质整合到噬菌体基因组中并通过噬菌体传递<sup>[53]</sup>。其中,接合是细菌中最常见的基因水平转移<sup>[54]</sup>。接合转移由参与 DNA 转移和复制(Dtr)、交配对形成(Mpf)的相关转移基因调控。Dtr 基因是松弛酶处理 DNA 所必需的,松弛酶在转移起点的 *nic* 位点切割 DNA 分子,并保持附着在 DNA 单链上;Mpf 编码负责合成 T4SS 的蛋白;松弛酶与 DNA 链相连,通过 T4SS 形成的孔道转移到受体细胞,最后借助 ssDNA 结合蛋白、反限制蛋白和 SOS 抑制蛋白产生稳定的接合子<sup>[55]</sup>。一般情况下,转移基因处于关闭状态,当感知到特定信号(如特定受体的存在、高细胞密度以及氧气、温度变化等)时可开启并诱导基因的接合转移<sup>[55]</sup>。质粒和 ICEs 通常能自行完成接合转移,或者在其他基因组元件的帮助下进行接合转移。如前述 cKp 耐药株可获得 ICEs 或接合性毒力质粒而进化为 hvKp 耐药株。反之,

hvKp 菌株亦可获得耐药质粒而形成 hvKp 耐药株。Yang 等<sup>[56]</sup>研究发现, hvKp 菌株(pKpn1693, K1 ST23)可获得含碳青霉烯酶基因 *bla*CTX-M-24 的 IncFII 型质粒;在该菌株的染色体上还发现了多个外排泵基因和耐药基因,因此,还对磷霉素、多粘菌素、广谱  $\beta$ -内酰胺类和氟喹诺酮类等耐药。Huang 等<sup>[38]</sup>对 hvKp 的喹诺酮类耐药机制进行研究,发现 hvKp 的耐药质粒上含喹诺酮类耐药的关键基因 *qnrA1*,此外, *gyrA* 和 *parC* 基因的突变也参与了喹诺酮类药物耐药。

**3.2 AcrB 外排泵** 在许多革兰阴性杆菌中,抗性结瘤细胞分裂超家族(resistance-nodulation-cell division, RND)是主要的药物外排泵,可通过三个连续构象(进入、结合和挤出)的循环将药物排出。其通常以不对称的三聚体形式存在,含有 12/13/14 个跨膜螺旋,位于螺旋 1 和 2 以及 7 和 8 之间的两个大的外环,跨膜域主要作为能量源质子的管道,外部环包含与输出配体结合的位点<sup>[57]</sup>。而三聚体内膜成分吡啶黄素抗性蛋白 B(acriflavine resistance protein B, AcrB)是药物/质子逆向转运过程中的药物特异性识别和能量转导中心,与周质蛋白 AcrA 和外膜蛋白 TolC 作为一个三方系统协同工作。其在结构上可以分为对 AcrB 三聚重要的漏斗结构域或对接结构域(FD),负责能量转导以促进药物转运的 TMD,以及包含结合位点并介导底物识别、摄取和转位的转运蛋白结构域(PD)<sup>[58]</sup>。AcrB 由 *acrB* 基因编码,可被 *ramA*、*soxS*、*marA*、*rob* 和 *acrA* 等基因激活而过表达,进而降低肺炎克雷伯菌对药物,如喹诺酮类药物(萘啶酸、环丙沙星)和头孢西丁、氯霉素、红霉素、替加环素等的敏感性<sup>[59-60]</sup>。但 *ramR*、*soxR*、*acrR* 等可通过抑制 *acrB*,恢复细菌对抗菌药物的敏感性<sup>[61]</sup>。AcrB 外排泵介导的耐药在 hvKp 菌株中也得到了证实。Srinivasan 等<sup>[62]</sup>在 hvKp 菌株(NTUH-K2044)中发现一个新的信号转导调控蛋白—LysR 型转录调节因子 *oxyR*,其与 *acrB* 表达正相关; $\Delta$ *oxyR* 突变株的 *acrB* 相对表达量约降低为原来的 1/5,同时阿莫西林、氯霉素、红霉素、萘啶酸、利福平和甲氧苄啶的最低抑菌浓度也随之降低。Huang 等<sup>[38]</sup>研究也表明,相对于对照株 KP478, hvKp 菌株(VGHCRE225)的外排泵基因 *acrB* 及其调控基因 *ramA* 过表达,同时 AcrB 的负调控基因 *acrR* 和 *ramR* 分别被插入序列 ISKpn26,发生错义突变,此与替加环素耐药性有关。

**3.3 脂多糖修饰** 脂多糖是肺炎克雷伯菌细胞膜

的主要成分之一,在结构上主要包含三种成分:将整个结构锚定在细胞膜中的脂质 A 成分、核心寡糖和称为 O 抗原的末端侧链<sup>[28]</sup>。其中脂质 A 是位于细胞膜外单层的疏水部分,由 *lpx* 基因簇编码的一系列酶合成。脂质 A 由于游离磷酸基团的存在而带有负电荷,而多粘菌素对脂质 A 负电荷具有高亲和力,两者结合后可破坏脂多糖的稳定性,使细胞外膜不完整,最终导致多粘菌素进入细胞质而发挥杀菌作用<sup>[63]</sup>。但当脂多糖中带正电的残基如 4-氨基-L-阿拉伯糖、磷酸乙醇胺或氨基半乳糖增加,则可改变脂质 A 的负电荷状态,从而减少多粘菌素与脂质 A 间的相互作用并增强多粘菌素抗性。4-氨基-L-阿拉伯糖的生物合成由 *pmrEHFIJKLM* 基因编码的蛋白质调控,而 *pmrEHFIJKLM* 基因受双组分信号转导系统 PmrAB 的直接调节和 PhoPQ 的间接调节<sup>[64]</sup>。PmrAB 还通过磷酸乙醇胺转移酶 PmrC 控制合成磷酸乙醇胺所需基因的表达<sup>[65]</sup>。Huang 等<sup>[38]</sup>研究也证实, hvKp 菌株中 *pmrHFIJKLM* 的高表达增加了脂多糖的修饰,通常与多粘菌素抗性有关。Choi 等<sup>[66]</sup>研究表明, hvKp 中多粘菌素抗性的获得与编码 *phoPQ* 或 *pmrAB* 基因的上调,以及 *pmrD* 和 *pbgP* 基因表达的增加有关,并且指出这种抗性可能导致与毒力相关的表型缺陷,如荚膜多糖、HMV 表型和血清抵抗力等。另外, Lee 等<sup>[67]</sup>指出,携带 *mcr-1* 基因的质粒是革兰阴性菌产生多粘菌素抗性的重要原因,并可通过水平基因转移;*mcr-1* 基因编码一种磷酸乙醇胺转移酶,催化磷酸乙醇胺与脂质 A 反应,进而介导多粘菌素抗性。此与研究<sup>[11-12]</sup>结果一致。Sellick 等<sup>[68]</sup>在鼠体内研究发现, *mcrB* 突变诱导 PhoPQ 调控的脂质 A 重塑,进而赋予肺炎克雷伯菌对多粘菌素的抗性。随后,研究<sup>[69]</sup>表明,此机制亦出现在 hvKp 中,发现 IS Kpn18 对 *mcrB* 基因的截断,导致对多粘菌素和碳青霉烯类耐药 hvKp 的出现。

#### 4 总结与展望

自 1980 年中国台湾首次报道以来, hvKp 已在包括中国、印度、欧洲和美国等多个国家甚至全球范围内被报道<sup>[48, 69]</sup>。hvKp 能引起健康人群感染,且一旦感染极易导致多部位感染,造成极高的病死率。多重耐药 hvKp 的出现更是增加了感染患者的治疗难度。目前已有研究<sup>[24]</sup>证实, hvKp 的高毒力受毒力质粒、ICEs、铁载体、荚膜多糖等多种相关因素调

控,但有关 hvKp 耐药机制的研究仍较少,同时有关 hvKp 毒力因子及其耐药机制相关性的研究更少。虽然,目前 hvKp 耐药率仍远低于 cKp,但耐药 hvKp 感染一旦出现,往往造成难以预估的严重后果。因此,对于 hvKp 毒力因子、耐药机制以及其相关性的研究是非常有必要的。本综述详细介绍了 hvKp 菌株相关毒力因素以及可能存在的各种耐药机制,旨在探讨 hvKp 的耐药性是否与其高毒力相关,为临床诊疗提供一定的参考意见。此外,针对目前越来越多的多重耐药 hvKp 菌株的出现,更加有效的药物开发非常必要,而根据 hvKp 菌株毒力因子以及耐药机制寻找新的阻断方式是未来可以考虑的一个方向。

#### [参考文献]

- [1] Liu C, Guo J. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hyper-mucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor[J]. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*, 2019, 18(1): 4.
- [2] Rahim GR, Gupta N, Maheshwari P, et al. Monomicrobial *Klebsiella pneumoniae* necrotizing fasciitis: an emerging life-threatening entity[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2019, 25(3): 316 - 323.
- [3] Lai YC, Lu MC, Hsueh PR. Hypervirulence and carbapenem resistance: two distinct evolutionary directions that led high-risk *Klebsiella pneumoniae* clones to epidemic success[J]. *Expert Rev Mol Diagn*, 2019, 19(9): 825 - 837.
- [4] Yao B, Xiao XM, Wang F, et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China[J]. *Int J Infect Dis*, 2015, 37: 107 - 112.
- [5] Zhang YJ, Ma YN, Ye LY, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in China[J]. *Clin Infect Dis*, 2014, 58(10): 1493 - 1494.
- [6] Harada S, Doi Y. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a call for consensus definition and international collaboration[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9): e00959 - 18.
- [7] Li JY, Ren JA, Wang WP, et al. Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2018, 37(4): 679 - 689.
- [8] Yan Q, Zhou M, Zou M, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced ventilator-associated pneumonia in mechanically ventilated patients in China[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2016, 35(3): 387 - 396.
- [9] Yu WL, Lee MF, Chen CC, et al. Impacts of hypervirulence determinants on clinical features and outcomes of bacteremia caused by extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Microb Drug Resist*, 2017, 23(3): 376 - 383.
- [10] Choby JE, Howard-Anderson J, Weiss DS. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-clinical and molecular perspectives[J]. *J Intern Med*, 2020, 287(3): 283 - 300.
- [11] Lu Y, Feng Y, McNally A, et al. The occurrence of colistin-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2568.
- [12] Gu DX, Dong N, Zheng ZW, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study[J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(1): 37 - 46.
- [13] Wyres KL, Nguyen TNT, Lam MMC, et al. Genomic surveillance for hypervirulence and multi-drug resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* from South and Southeast Asia[J]. *Genome Med*, 2020, 12(1): 11.
- [14] Zhao YJ, Zhang XC, Torres VVL, et al. An outbreak of carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit of a major teaching hospital in Wenzhou, China[J]. *Front Public Health*, 2019, 7: 229.
- [15] Liu YC, Cheng DL, Lin CL. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis[J]. *Arch Intern Med*, 1986, 146(10): 1913 - 1916.
- [16] Lam MMC, Wyres KL, Judd LM, et al. Tracking key virulence loci encoding aerobactin and salmochelin siderophore synthesis in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Genome Med*, 2018, 10(1): 77.
- [17] Juan CH, Fang SY, Chou CH, et al. Clinical characteristics of patients with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan and prevalence of antimicrobial-resistant and hypervirulent strains: a retrospective study[J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2020, 9(1): 4.
- [18] Hyun M, Lee JY, Ryu SY, et al. Antibiotic resistance and clinical presentation of health care-associated hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in Korea[J]. *Microb Drug Resist*, 2019, 25(8): 1204 - 1209.
- [19] Zhang YW, Zhao CJ, Wang Q, et al. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in China: geographic distribution, clinical characteristics, and antimicrobial resistance[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2016, 60(10): 6115 - 6120.
- [20] Ye MP, Tu JF, Jiang JP, et al. Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing *Klebsiella pneumoniae* identifies new liver abscess-associated virulence genes[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2016, 6: 165.
- [21] Rafat C, Messika J, Barnaud G, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, a 5-year study in a French ICU[J]. *J Med Microbiol*, 2018, 67(8): 1083 - 1089.
- [22] Harada S, Aoki K, Yamamoto S, et al. Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates causing blood-

- stream infections in Japan: occurrence of hypervirulent infections in health care[J]. J Clin Microbiol, 2019, 57(11): e01206-19.
- [23] Rastegar S, Moradi M, Kalantar-Neyestanaki D, et al. Virulence factors, capsular serotypes and antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* and classical *Klebsiella pneumoniae* in Southeast Iran[J]. Infect Chemother, 2019, 51: e39.
- [24] Russo TA, Marr Candace M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3): e00001-19.
- [25] Mohammad Ali Tabrizi A, Badmasti F, Shahcheraghi F, et al. Outbreak of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaVIM-2 among mechanically-ventilated drug-poisoning patients with high mortality rate in Iran[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2018, 15: 93-98.
- [26] Wang LF, Shen DX, Wu H, et al. Resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* to both intracellular and extracellular killing of neutrophils[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173638.
- [27] Walker KA, Miner TA, Palacios M, et al. A *Klebsiella pneumoniae* regulatory mutant has reduced capsule expression but retains hypermucoviscosity[J]. mBio, 2019, 10(2): e00089-19.
- [28] Opoku-Temeng C, Kobayashi SD, Deleo FR. *Klebsiella pneumoniae* capsule polysaccharide as a target for therapeutics and vaccines[J]. Comput Struct Biotechnol J, 2019, 17: 1360-1366.
- [29] Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 483.
- [30] de Astorza B, Cortés G, Crespi C, et al. C3 promotes clearance of *Klebsiella pneumoniae* by A549 epithelial cells[J]. Infect Immun, 2004, 72(3): 1767-1774.
- [31] Fang CT, Chuang YP, Shun CT, et al. 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.
- [32] Lin JC, Koh TH, Lee N, et al. Genotypes and virulence in serotype K2 *Klebsiella pneumoniae* from liver abscess and non-infectious carriers in Hong Kong, Singapore and Taiwan[J]. Gut Pathog, 2014, 6: 21.
- [33] Zhan LL, Wang SS, Guo YJ, et al. Outbreak by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in a tertiary hospital in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 182.
- [34] 贺文芳, 周柯, 周磊, 等. MLST 和 PFGE 在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染监测中的应用[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(6): 533-538.
- [35] Yang XM, Dong N, Chan EW, et al. Carbapenem resistance-encoding and virulence-encoding conjugative plasmids in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Trends Microbiol, 2021, 29(1): 65-83.
- [36] Yang XM, Wai-Chi Chan E, Zhang R, et al. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Nat Microbiol, 2019, 4(12): 2039-2043.
- [37] Dong N, Lin DC, Zhang R, et al. Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(12): 3317-3321.
- [38] Huang YH, Chou SH, Liang SW, et al. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(8): 2039-2046.
- [39] Shen DX, Ma GN, Li CD, et al. Emergence of a multidrug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strain with a rare blaCTX-M-24-harboring virulence plasmid[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(3): e02273-18.
- [40] Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations[J]. Microb Genom, 2018, 4(9): e000196.
- [41] Lin TL, Lee CZ, Hsieh PF, et al. Characterization of integrative and conjugative element ICEKp1-associated genomic heterogeneity in a *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from a primary liver abscess[J]. J Bacteriol, 2008, 190(2): 515-526.
- [42] Lai YC, Lin AC, Chiang MK, et al. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan[J]. PLoS One, 2014, 9(5): e96292.
- [43] Farzand R, Rajakumar K, Zamudio R, et al. ICEKp2: description of an integrative and conjugative element in *Klebsiella pneumoniae*, co-occurring and interacting with ICEKp1[J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13892.
- [44] Farzand R, Rajakumar K, Barer MR, et al. A virulence associated siderophore importer reduces antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 607512.
- [45] Marcoleta AE, Gutiérrez-Cortez S, Hurtado F, et al. The Ferric uptake regulator (Fur) and iron availability control the production and maturation of the antibacterial peptide microcin E492[J]. PLoS One, 2018, 13(8): e0200835.
- [46] Bulger J, MacDonald U, Olson R, et al. Metabolite transporter PEG344 is required for full virulence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain hvKP1 after pulmonary but not subcutaneous challenge[J]. Infect Immun, 2017, 85(10): e00093-17.
- [47] Liao WJ, Long D, Huang QS, et al. Rapid detection to differentiate hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKp) from classical *K. pneumoniae* by identifying peg-344 with loop-mediated isothermal amplification (LAMP)[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 1189.
- [48] Shankar C, Veeraraghavan B, Nabarro LEB, et al. Whole genome analysis of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates from community and hospital acquired bloodstream infection [J]. BMC Microbiol, 2018, 18(1): 6.
- [49] Lu MC, Chen YT, Chiang MK, et al. Colibactin contributes

- to the hypervirulence of pks + K1 CC23 *Klebsiella pneumoniae* in mouse meningitis infections [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 103.
- [50] Lin DS, Fan JM, Wang JJ, et al. The fructose-specific phosphotransferase system of *Klebsiella pneumoniae* is regulated by global regulator CRP and linked to virulence and growth [J]. *Infect Immun*, 2018, 86(8): e00340–18.
- [51] Wu MC, Lin TL, Hsieh PF, et al. Isolation of genes involved in biofilm formation of a *Klebsiella pneumoniae* strain causing pyogenic liver abscess[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23500.
- [52] Kong QL, Beanan JM, Olson R, et al. Biofilm formed by a hypervirulent (hypermucoviscous) variant of *Klebsiella pneumoniae* does not enhance serum resistance or survival in an in vivo abscess model[J]. *Virulence*, 2012, 3(3): 309–318.
- [53] Soucy SM, Huang JJ, Gogarten JP. Horizontal gene transfer: building the web of life[J]. *Nat Rev Genet*, 2015, 16(8): 472–482.
- [54] Ochman H, Lawrence JG, Groisman EA. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation[J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 299–304.
- [55] Koraimann G, Wagner MA. Social behavior and decision making in bacterial conjugation[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2014, 4: 54.
- [56] Yang Y, Li X, Zhang YW, et al. Characterization of a hypervirulent multidrug-resistant ST23 *Klebsiella pneumoniae* carrying a blaCTX-M-24 IncFII plasmid and a Pk2044-like plasmid[J]. *J Glob Antimicrob Resist*, 2020, 22: 674–679.
- [57] Nikaido H. RND transporters in the living world[J]. *Res Microbiol*, 2018, 169(7–8): 363–371.
- [58] Kobylka J, Kuth MS, Müller RT, et al. AcrB; a mean, keen, drug efflux machine[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2020, 1459(1): 38–68.
- [59] Xu QQ, Jiang JP, Zhu ZH, et al. Efflux pumps AcrAB and OqxAB contribute to nitrofurantoin resistance in an uropathogenic *Klebsiella pneumoniae* isolate [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2019, 54(2): 223–227.
- [60] Nicolas-Chanoine MH, Mayer N, Guyot K, et al. Interplay between membrane permeability and enzymatic barrier leads to antibiotic-dependent resistance in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 1422.
- [61] Jiménez-Castellanos JC, Wan Ahmad Kamil WN, Cheung CH, et al. Comparative effects of overproducing the AraC-type transcriptional regulators MarA, SoxS, RarA and RamA on antimicrobial drug susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2016, 71(7): 1820–1825.
- [62] Srinivasan VB, Mondal A, Venkataramaiah M, et al. Role of oxyRKP, a novel LysR-family transcriptional regulator, in antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Microbiology (Reading)*, 2013, 159(Pt 7): 1301–1314.
- [63] Moffatt JH, Harper M, Boyce JD. Mechanisms of polymyxin resistance[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2019, 1145: 55–71.
- [64] Kox LF, Wösten MM, Groisman EA. A small protein that mediates the activation of a two-component system by another two-component system[J]. *EMBO J*, 2000, 19(8): 1861–1872.
- [65] Lee H, Hsu FF, Turk J, et al. The PmrA-regulated *pmrC* gene mediates phosphoethanolamine modification of lipid A and polymyxin resistance in *Salmonella enterica* [J]. *J Bacteriol*, 2004, 186(13): 4124–4133.
- [66] Choi MJ, Ko KS. Loss of hypermucoviscosity and increased fitness cost in colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 23 strains[J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2015, 59(11): 6763–6773.
- [67] Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods[J]. *Front Microbiol*, 2016, 7: 895.
- [68] Sellick JA, Russo TA. Getting hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* on the radar screen[J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2018, 31(4): 341–346.
- [69] Dong N, Yang XM, Zhang R, et al. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2018, 7(1): 146.

(本文编辑:文细毛)

**本文引用格式:**蒋玉婷,张珂,刘唐娟,等.高毒力肺炎克雷伯菌毒力和耐药机制研究进展[J].中国感染控制杂志,2021,20(5):473–480. DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20217799.

**Cite this article as:**JIANG Yu-ting, ZHANG Ke, LIU Tang-juan, et al. Research progress on virulence and drug resistance mechanism of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chin J Infect Control*, 2021, 20(5): 473–480. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20217799.