

网络出版时间: 2020-3-30 17:09 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200330.0846.020.html>

血流感染肺炎克雷伯菌毒力基因分布及与 CRISPR-CAS 系统相关性研究

宋国滨 王 刚 黄 颖 徐元宏

摘要 目的 分析该院血流感染阳性肺炎克雷伯菌的常见荚膜血清型和毒力基因分布特征,探讨毒力基因与成簇的规律间隔的短回文重复序列及其相关序列(CRISPR-CAS)系统的相关性。方法 收集 Bac T/ALERT 3D 全自动培养仪报告阳性的血培养瓶并经鉴定为肺炎克雷伯菌 61 株,运用纸片扩散法和 Vitek-compact2 仪器法检测菌株对临床常用抗生素的敏感性,用拉丝实验筛选高黏液型肺炎克雷伯菌,聚合酶链式反应(PCR)检测 6 种常见荚膜血清型(K1、K2、K5、K20、K54、K57)、7 种毒力相关基因(rmpA、aerobactin、alls、Kfu、wcaG、magA、fimH)及 3 种 CRISPR-CAS 系统基因(CRISPR-1、CRISPR-2、CAS1)。结果 荚膜血清型以 K1、K2 型为主,检出率分别是 19.7%、13.1%。K5、K20、K57 各检出 1 例,未检出 K54 型。毒力基因 rmpA、aerobactin、alls、Kfu、wcaG、magA、fimH 检出率分别是 32.8%、23.0%、9.8%、31.1%、19.7%、19.7%、98.4%。高黏液表型筛选出 14 株。CRISPR-CAS 系统阳性检出 11 株,检出率为 18%,与 CRISPR-CAS 系统阴性菌株相比,其毒力基因携带率高,经 χ^2 检验,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 血流感染肺炎克雷伯菌荚膜血清型以 K1、K2 为主,毒力基因主要存在于表型为高黏液型的菌株,CRISPR-CAS 系统阳性菌株毒力基因携带率高。

关键词 高毒力肺炎克雷伯菌;CRISPR-CAS 系统;毒力基因中图分类号 R 446.5

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)03-0427-05
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.03.020

肺炎克雷伯菌由于最近几年对临床常用抗生素的耐药率呈现大幅度增长,已经跃居为院内感染的第二大致病菌,引起临床医师、临床微生物实验室医务工作者的高度重视^[1]。除耐药率越来越高的特点外,其毒力基因同样受到广大医务工作者及科研工作者的关注,从 1986 年 Liu et al^[2]报道了肺炎克雷伯菌导致的原发性侵袭性肝脓肿,伴有转移性眼内炎病例以来,越来越多的病例在国内外很多医疗机构都有报道,因其具有高毒力性、高致病性,有学者^[3]将其称为高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP),其细胞壁结构具有丰富的荚膜多糖导致菌落呈现高黏液表型,可以抵抗中性粒细胞对其的杀伤作用,并可借助中性粒细胞向远处转移,引起眼部和中枢神经系统感染^[4]。尤其肺炎克雷伯菌引起的血流感染,导致的败血症极易增加患者的住院时间,引起患者的死亡。成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced shortpalindromic repeats, CRISPR)及其相关序列(CRISPR associated sequences, CAS)组成的 CRISPR-CAS 系统广泛存在于古细菌和细菌中,是近 30 年发现的天然的适应性免疫调节系统^[5]。该研究着重探讨分离于安徽医科大学第一附属医院血流感染阳性的肺炎克雷伯菌的荚膜血清型、毒力相关基因的分布情况,以及与 CRISPR-CAS 系统的相关性,以便更好地阐明两者之间的关系,有助于为临

2019-11-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81171606)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院检验科,合肥 230022

作者简介:宋国滨,男,硕士研究生;

徐元宏,男,教授,主任技师,博士生导师,责任作者, E-mail:xyhong1964@163.com

at fracture site, the expression of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2), runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and zinc finger transcription factor (OSX) in bone callus tissue increased, while the levels of serum bone alkaline phosphatase (BALP), bone gla protein (BGP) and procollagen type I carboxy-terminal peptide (PICP) decreased ($P < 0.05$). And the effect was better than that in OVX + ESW group and OVX + PRP group. **Conclusion** ESW combined with PRP can promote bone healing in rats with osteoporotic fracture, which may be related to down-regulation of BALP, BGP and PICP levels, and up-regulation of BMP-2, RUNX2 and OSX expression.

Key words extracorporeal shock wave; platelet-rich plasma; osteoporosis; bone healing

床防控感染以及研究毒力基因的作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源及鉴定 收集安徽医科大学第一附属医院检验科 2018 年 1 月 ~ 2019 年 1 月保存的血流感染阳性非重复肺炎克雷伯菌, 采用基质辅助激光解吸电离飞行质谱 (MALDI-TOF MS) 重新鉴定, 质谱鉴定质控菌株大肠埃希菌 8739 及实验质控菌株肺炎克雷伯菌 ATCC700603 为本实验室所保存。

1.2 仪器与试剂 高速冷冻离心机 (中国 heal force 公司); GeneAmp970 基因扩增仪 (美国 PE 公司); C-880V CO₂ 孵箱、紫外线凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); VITEK MS 质谱仪 (法国生物梅里埃公司)。抗菌药物 (英国 OXOID 公司); 琼脂糖、引物 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司); 标志物 DNA Marker、Premix Taq™ (日本 TaKaRa 公司); VITEK MS CHCA 基质液 (法国生物梅里埃公司); 哥伦比亚血平板 (合肥天达诊断试剂有限公司); 药敏试验培养基为 Muller-Hinton 琼脂 (江门市凯林贸易有限公司)。

1.3 药物敏感试验 采用 vitek-compact2 仪器及纸片扩散法对肺炎克雷伯菌进行药敏试验。

1.4 高黏液表型筛选 将菌株复苏接种于血平板上, 在培养箱孵育 22 h 后, 用接种环挑取单个菌落, 拉丝实验的黏液丝 ≥ 5 mm 为阳性^[6]。

1.5 PCR 检测荚膜血清型、毒力基因 将菌株接种于哥伦比亚血平板上, 置于 37 °C 温箱中孵育 18 ~ 22 h, 挑取 4 ~ 5 个单菌落置于 500 μ l TE 缓冲液内, 在振荡器上涡旋震荡 10 s, 放于水浴锅内煮 10 min 后冰上冷却 5 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 离心后吸取 300 μ l 上清液转移到新的 EP 管内, 即为 DNA 模板。运用 PCR 扩增 K1、K2、K5、K20、K54、K57 6 种最常见荚膜血清型和 rmpA、aerobactin、alls、Kfu、wcaG、magA、fimH 7 种毒力相关基因。其条件为 94 °C 预变性 30 s, 94 °C 变性 60 s, 50 ~ 59 °C 退火 90 s, 72 °C 延伸 60 s, 经过 35 个循环后, 最后 72 °C 延伸 10 min。引物序列参考文献^[7-10]、退火温度及产物大小见表 1。

1.6 PCR 检测 CRISPR-CAS 系统 根据参考文献^[11-12] 分别扩增 CRISPR-1、CRISPR-2、CAS1 3 种基因, 退火温度进行梯度摸索, 将阳性产物送至上海

表 1 6 种荚膜血清型和 7 种毒力基因引物序列

基因型	引物序列	产物	退火温
		大小(bp)	度(°C)
K1	F: GGTGCTCTTTACATCATTGC R: GCAATGGCCATTTCGCTTAG	1 283	50
K2	F: GACCCGATATTACATCTTGACAGAG R: CCTGAAGTAAATCGTAAATAGATGGC	641	52
K5	F: TGGTAGTGATGCTCGCGA R: CCTGAACCCACCCCAATC	280	53
K20	F: CGGTGCTACAGTGCATCATT R: GTTATACGATGCTCAGTCGC	741	54
K54	F: CATTAGCTCAGTGGTTGGCT R: GCTTGACAAACACCATAGCAG	881	52
K57	F: CTCAGGGCTAGAAGTGTAT R: CACTAACCCAGAAAGTCGAG	1 037	54
rmpA	F: ACTGGGCTACCTCTGCTTCA R: CTTCATGAGCCATCTTTCA	516	53
wcaG	F: GGTGGKTCAGCAATCGTA R: ACTATTCCGCCAACTTTTGC	169	53
aerobactin	F: GCATAGCGGATACGAACAT R: CACAGGGCAATTGCTTACCT	556	55
Kfu	F: ATAGTAGCGGAGCACCAGAGA R: AGAACCTTCCTCGCTGAACA	520	55
alls	F: CCGAAACATTACGCACCTTT R: ATCACGAAGAGCCAGCTCAC	508	57
magA	F: GGTGCTCTTTACATCATTGC R: GCAATGGCCATTTCGCTTAG	1 283	59
fimH	F: GCTCTGCCGATACACACACGG R: GCGTAGTAACGTGCCTGGAACGG	425	58

生工进行测序, 将测序结果于网站 <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr> 进行比对, CAS1 阳性及 CRISPR-1、CRISPR-2 两个基因中至少一个基因阳性代表存在 CRISPR-CAS 系统, 其余基因阳性组合为不存在 CRISPR-CAS 系统。

2 结果

2.1 药物敏感性 纸片扩散法和 vitek-compact2 仪器结果一致。将 61 株肺炎克雷伯菌分为 hvKP 和经典肺炎克雷伯菌 (classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP) 2 种类型, hvKP 对氨苄西林天然耐药, 对哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟、复方新诺明、亚胺培南、美罗培南、替加环素、多黏菌素 B 均敏感。cKP 对氨苄西林均耐药, 对哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、头孢他啶、头孢噻肟、头孢曲松、头孢吡肟、复方新诺明、亚胺培南、美罗培南、替加环素、多黏菌素 B 的耐药率分别为 48.8%、56.1%、61%、65.9%、63.4%、58.5%、44%、46.3%、41.4%、2.4%、14.6%。

2.2 肺炎克雷伯菌拉丝实验 61 株肺炎克雷伯菌经过拉丝实验共检出 14 株阳性菌, 检出率为 23%, 经 PCR 检测 14 株高黏液型菌株 *rmpA* 基因全为阳性, 定义为 hvKP, 其余为 cKP。

2.3 荚膜血清型及毒力基因分布情况 PCR 检出 K1 型 12 株, K2 型 8 株, K5、K20、K57 各 1 株。毒力基因以 *fimH* 检出最多, 为 60 株, 检出率为 98.4%, *rmpA*、*aerobactin*、*alls*、*Kfu*、*wcaG*、*magA* 分别检出 20、14、6、19、12、12 株, 检出率分别为 32.8%、23.0%、9.8%、31.1%、19.7%、19.7%。hvKP 与 cKP 荚膜血清型及毒力基因分布情况见表 2, 5 种荚膜血清型阳性条带图见图 1, 7 种毒力基因条带图见图 2。

表 2 hvKP 与 cKP 荚膜血清型及毒力基因分布情况 [n(%)]

项目	hvKP (n=14)	cKP (n=47)	总计
K1	5 (35.7)	7 (14.9)	12 (19.7)
K2	7 (50.0)	1 (2.1)	8 (13.1)
K5	0 (0.0)	1 (2.1)	1 (1.6)
K20	1 (7.1)	0 (0.0)	1 (1.6)
K54	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
K57	1 (7.1)	0 (0.0)	1 (1.6)
<i>rmpA</i>	14 (100.0)	6 (12.8)	20 (32.8)
<i>aerobactin</i>	14 (100.0)	0 (0.0)	14 (23.0)
<i>alls</i>	6 (42.9)	0 (0.0)	6 (9.8)
<i>Kfu</i>	7 (50.0)	12 (25.5)	19 (31.1)
<i>wcaG</i>	5 (35.7)	7 (14.9)	12 (19.7)
<i>magA</i>	5 (35.7)	7 (14.9)	12 (19.7)
<i>fimH</i>	14 (100.0)	46 (97.9)	60 (98.4)

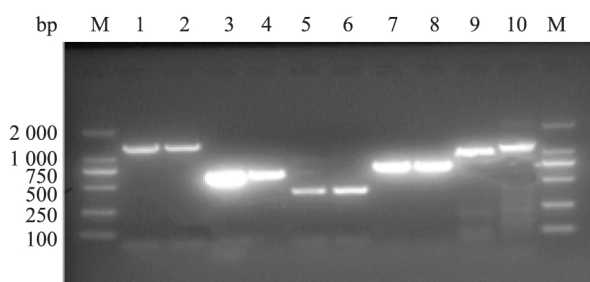


图 1 5 种荚膜血清型阳性条带图

M: Marker; 1、2: K1 血清型; 3、4: K2 血清型; 5、6: K5 血清型; 7、8: K20 血清型; 9、10: K57 血清型

2.4 CRISPR-CAS 系统与毒力基因分布相关性 经过 PCR 技术检测及测序, 共筛选出 CRISPR-CAS 系统阳性菌株为 11 株, CRISPR-CAS 系统阴性为 50 株, CRISPR-CAS 系统阳性菌株中, 有 9 株为 hvKP, 有 5 株同时含有 *rmpA*、*aerobactin*、*alls*、*Kfu*、*wcaG*、*magA*、*fimH*。有 3 株同时含有 *rmpA*、*aerobactin*、

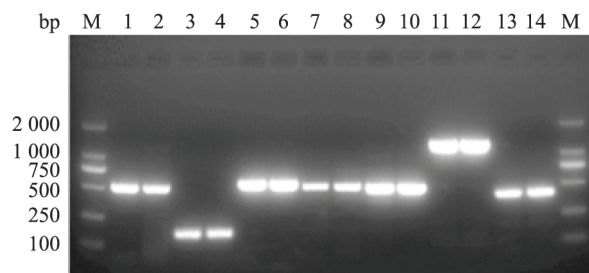


图 2 7 种毒力基因条带图

M: Marker; 1、2: *rmpA* 基因阳性; 3、4: *wcaG* 基因阳性; 5、6: *aerobactin* 基因阳性; 7、8: *Kfu* 基因阳性; 9、10: *alls* 基因阳性; 11、12: *magA* 基因阳性; 13、14: *fimH* 基因阳性

Kfu。1 株只含有 *rmpA*、*aerobactin* 2 种基因。除 *fimH* 基因外, CRISPR-CAS 系统阳性菌株其携带毒力基因数量明显高于 CRISPR-CAS 系统阴性菌株, 经 χ^2 检验统计学计算 $P < 0.05$, 差异有统计学意义。CRISPR-CAS 系统与毒力基因相关性见表 3。

表 3 CRISPR-CAS 系统与毒力基因相关性 (n)

毒力基因	CRISPR-CAS		合计	χ^2 值	P 值
	系统阳性 (n=11)	系统阴性 (n=50)			
<i>rmpA</i>	9	11	20	14.640	<0.001
<i>aerobactin</i>	9	5	14	24.338	<0.001
<i>alls</i>	5	1	6	11.791	<0.05
<i>Kfu</i>	9	10	19	14.409	<0.001
<i>wcaG</i>	5	7	12	5.645	<0.05
<i>magA</i>	5	7	12	5.645	<0.05
<i>fimH</i>	11	49	60	*	>0.05

* 采用 Fisher 确切概率法比较, 无 χ^2 值

3 讨论

hvKP 因其携带多个毒力基因, 使其呈现高黏液表型, 可以抵抗人体内中性粒细胞的杀伤作用, 极易引起败血症, 给患者的健康带来了严重的威胁。hvKP 除了可以引起院内感染外, 也可引起社区感染, 正常青年人同样可以感染此种类型菌株, 并易向眼部和中枢神经系统等位置远处转移。

本研究 61 株肺炎克雷伯菌共筛选出 14 株 hvKP, 其对抗生素的耐药性远低于普通肺炎克雷伯菌。K1 和 K2 型荚膜血清型在 6 种血清型中检出率最高, 且最常见、毒力最强^[13], 除了在 hvKP 中检出到 K1 型, 在 cKP 中也有检出到, 与李喜红等^[14]研究一致。*rmpA* 基因是促进肺炎克雷伯菌荚膜多糖合成的调控基因, 其编码的 *rmpA* 蛋白可以促进高

黏液表型的形成。本研究中除了 14 株拉丝实验阳性菌株 *rmpA* 基因阳性,在拉丝实验阴性的菌株中也检测到了 *rmpA* 基因,说明高黏液表型的形成除了 *rmpA* 基因参与调控外,还需要其他毒力基因共同参与。对于很多生物来讲,铁作为一种辅助因子在生化代谢方面,电子传递等生命活动过程中起到非常重要的作用, *aerobactin* 基因所编码产生的铁载体,可以竞争血液中的铁离子,促进菌株的生长繁殖,是肺炎克雷伯菌重要的毒力因子,有研究^[15]表明 *aerobactin* 存在可以使菌株的毒力增强 100 倍,本研究该基因仅存在于 14 株 hvKP 中,从侧面可以反映出菌株高黏液表型的形成与 *aerobactin* 基因的存在密切相关。值得注意的是,本研究中毒力基因 *fimH* 基因筛选数量最多,与付方俊等^[16]的研究一致,在 hvKP 和 cKP 中并没有显著区别,说明该基因并不能成为区分肺炎克雷伯菌的一个标志。*magA* 基因编码的蛋白可以促进黏液性的形成,并参与荚膜多糖的产生,后来的研究^[17]证实该基因仅存在于血清型 K1 菌株中,本研究结果与之一致,国内也有相关的报道^[18]。*wcaG* 基因的编码产物为胞外多糖的岩藻糖,可以避免被血液中巨噬细胞的吞噬作用所消灭,本研究中该基因也和 K1 型血清型分布一致,可能和 K1 血清型基因分布在同一质粒上,是否含有其他的机制,需要进一步研究。其他毒力基因在 hvKP 中的检出率明显高于 cKP。

CRISPR-CAS 系统是广泛存在于细菌和古细菌中的一种适应性免疫调节系统,其间隔序列与噬菌体和质粒有很高的同源性,有学者^[8]认为该系统可以抵御来源于外界的核酸,经过一系列研究,证实了该系统可以对外源核酸进行切割,具体的过程分为 3 步:首先在适应性阶段,携带一个或多个 CRISPR 基因座的细菌和古生菌通过将外源序列的短片段(原间隔子)整合到宿主染色体 CRISPR 序列近端对外源病毒和质粒作出反应,在表达和干扰阶段,重复间隔子元件转录到为前体 CRISPR-RNA (pre-crRNA) 分子,然后经过酶切产生短的 crRNA,可与入侵病毒或质粒的互补原间隔子序列配对,由 crRNA 识别目标并通过与 crRNA 结合的 CAS 蛋白来使外源核酸序列不表达达到清除外源核酸的目的。肺炎克雷伯菌的毒力基因存在于质粒中,有很多文献研究过其与耐药性之间的相关性,而与毒力基因之间存在的相关性研究不多,本研究将 61 株肺

炎克雷伯菌分为 CRISPR-CAS 系统阳性菌株和 CRISPR-CAS 系统阴性菌株,显示 CRISPR-CAS 系统阳性菌株毒力基因携带率比 CRISPR-CAS 系统阴性菌株高,经过 χ^2 检验差异有统计学意义,其与质粒或染色体介导的耐药基因的携带率正好相反,本研究中 hvKP 除了对氨苄西林天然耐药外,对临床常用抗生素均有良好的敏感性, cKP 对抗生素的耐药率较高,可能和由质粒或染色体介导的碳青霉烯酶、超广谱 β -内酰胺酶、头孢菌素酶的传播有关,其具体的耐药机制还应通过相关实验从分子基因水平进行验证,另外在细菌的进化过程中,耐药基因的获得对细菌的生长起到非常重要的作用,但并不是任何的质粒都能被细菌所接受,仍然需要平衡细菌获得质粒所需能量与细菌所产能量之间两者的关系。Palmer et al^[19]的研究表明,CRISPR-CAS 系统阳性菌株其耐药率比阴性系统低,本研究通过 χ^2 检验经过计算 CRISPR-CAS 系统与耐药性之间的相关性,差异无统计学意义,可能与样本数量少有关,对于质粒介导的毒力基因和 CRISPR-CAS 系统相关性的分子机制仍需要进一步研究。

参考文献

- [1] 胡付品,郭燕,朱德妹,等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-51.
- [2] Liu Y C, Cheng D L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis[J]. Arch Intern Med, 1986, 146(10): 1913-6.
- [3] Chuang C, Fan W C, Lin Y T, et al. The emergence of *Klebsiella pneumoniae* liver abscess in non-diabetic patients and the distribution of capsular types[J]. Gut Pathog 2016, 8:46.
- [4] 叶李铭,麦丽婷,黄静. 高毒力肺炎克雷伯杆菌的临床特征和高毒力机制[J]. 国际呼吸杂志, 2017, 37(3): 221-6.
- [5] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science (New York, N. Y.), 2012, 337(6096): 816-21.
- [6] Kumabe A. String test of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. QJM 2014, 107(12): 1053.
- [7] Sun Y, Wu H. Clinical and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* causing liver abscess in China [J]. J Mol Microbiol Biotechnol 2016, 26(4): 245-51.
- [8] Turtton J F, Perry C, Elgohari S. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets [J]. J Med Microbiol, 2010, 59(Pt 5): 541-7.
- [9] Ye M, Tu J, Jiang J, et al. Clinical and genomic analysis of liver abscess-causing identifies new liver abscess-associated virulence

- genes[J]. *Front Cell Infect Microbiol* 2016 6:165.
- [10] Liu C, Shi J. High prevalence of hypervirulent infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China[J]. *Infect Drug Resist* 2018 11:1031–41.
- [11] Lin T L, Pan Y J, Hsieh P F, et al. Imipenem represses CRISPR-Cas interference of DNA acquisition through H-NS stimulation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Sci Rep* 2016 6:31644.
- [12] 杜芳玲, 黄先琪, 魏丹丹, 等. 血流感染肺炎克雷伯菌中 CRISPR-CAS 系统的分布及其与毒力基因和耐药的关系 [J]. *中国抗生素杂志* 2019 44(5):586–90.
- [13] Liao C H, Huang Y T, Chang C Y, et al. Capsular serotypes and multilocus sequence types of bacteremic *Klebsiella pneumoniae* isolates associated with different types of infections [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014 33(3):365–9.
- [14] 李喜红, 魏丹丹, 王莲慧, 等. 临床分离碳青霉烯类耐药与非耐药肺炎克雷伯菌株的血清荚膜类型特征及毒力基因分布研究 [J]. *中华医院感染学杂志* 2018 28(5):654–8.
- [15] 管红艳, 刘 瑛. 引起肝脓肿的肺炎克雷伯菌毒力因子研究进展 [J]. *检验医学* 2018 33(9):839–43.
- [16] 付方俊, 白永凤, 程 颖, 等. 血流感染耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及毒力因子研究 [J]. *中国卫生检验杂志* 2018, 28(18):2217–9 2222.
- [17] 胡仁静, 汤怡颖, 胡锡池, 等. 肝脓肿相关肺炎克雷伯菌毒力基因检测及同源性分析 [J]. *临床检验杂志* 2018 36(4):263–6.
- [18] Yu W L, Ko W C, Cheng K C, et al. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008 62(1):1–6.
- [19] Palmer K L, Gilmore M S. Multidrug-resistant enterococci lack CRISPR-cas [J]. *MBio* 2010 1(4):e00227.

Distribution of virulence gene of *Klebsiella pneumoniae* in blood stream infection and its correlation with CRISPR-CAS system

Song Guobin, Wang Gang, Huang Ying, et al

(Dept of Laboratory, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract Objective To analyze the distribution characteristics of common capsular serotypes and virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* with positive blood flow infection in the First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, and to explore the correlation between virulence genes and CRISPR-CAS system. **Methods** 61 strains of *Klebsiella pneumoniae* were collected from blood culture bottles and identified as *Klebsiella pneumoniae*. The susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* to commonly used antibiotics was detected by disk diffusion method and ViteK-compact 2 instrument. *Klebsiella pneumoniae* with high mucus type were screened by wire drawing test. Six common capsular serotypes (K1, K2, K5, K20, K54, K57), seven virulence-related genes (rmpA, aerobactin, iroA, Kfu, wcaG, magA, fimH) and three CRISPR-CAS system genes (CRISPR-1, CRISPR-2, CAS1) were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** The serotypes of capsule were mainly K1 and K2, and the detection rates were 19.7% and 13.1% respectively. K5, K20 and K57 serotypes were detected in one case while K54 serotypes were not detected. The detection rates of virulence genes rmpA, aerobactin, iroA, Kfu, wcaG, magA and fimH were 32.8%, 23.0%, 9.8%, 31.1%, 19.7%, 19.7% and 98.4%, respectively. 14 strains were screened for high mucus phenotype. 11 strains were detected as positive by CRISPR-CAS system and the detection rate was 18%. Compared with the negative strains of CRISPR-CAS system, the virulence gene carrying rate of CRISPR-CAS system was higher, and the difference was statistically significant by χ^2 test ($P < 0.05$). **Conclusion** K1 and K2 are the main serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. The virulence genes mainly exist in the strains with high mucus phenotype. The virulence gene carrying rate of CRISPR-CAS positive strains is high.

Key words *Klebsiella pneumoniae* with high virulence; CRISPR-CAS system; virulence genes