

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20223363

论著·多重耐药菌专题

## 某教学医院耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌临床及分子特征

乔艳<sup>1</sup>, 孙红<sup>2</sup>, 李江艳<sup>2</sup>, 应冲涛<sup>3</sup>, 黄永强<sup>2</sup>, 郝斐然<sup>4</sup>, 余莲<sup>2</sup>, 郭普<sup>2</sup>

(1. 蚌埠医学院第一附属医院感染性疾病科, 安徽 蚌埠 233004; 2. 蚌埠医学院第一附属医院检验科, 安徽 蚌埠 233004; 3. 蚌埠医学院第一附属医院输血科, 安徽 蚌埠 233004; 4. 齐齐哈尔医学院临床医学系, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

[摘要] 目的 了解临床分离的耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)的耐药、毒力及流行病学特征。

方法 收集安徽省某教学医院 2018 年 1 月—2020 年 12 月临床分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP), 并分析其临床特征。采用飞行时间质谱鉴定菌株, 拉丝试验及检测毒力基因筛选出 CR-hvKP, 按 1:1 配比选取与 CR-hvKP 同病室或相近时间内分离的碳青霉烯耐药非高毒力肺炎克雷伯菌(CR-non-hvKP)作为对照组, 采用全基因组测序检测分析 CR-hvKP 及对照组 CR-non-hvKP 的荚膜血清型、耐药、毒力基因及 ST 分型, 比较两组菌株间的差异。结果 共分离 512 株 CRKP, 其中 CR-hvKP 30 株, CR-non-hvKP 482 株。CR-hvKP 感染患者多为老年(20 例, 66.67%), 存在呼吸系统疾病(29 例, 96.67%)、消化系统疾病(12 例, 40.00%)、感染性休克(10 例, 33.33%)、侵入性治疗(23 例, 76.67%)以及高病死率(20 例, 66.67%)。CR-hvKP 对常用的大多数抗菌药物耐药率 >90%, 对替加环素的耐药率为 3.33%, 对多粘菌素 B 全部敏感, 与 CR-non-hvKP 的耐药率比较, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。测序结果表明: CR-hvKP 携带主要的碳青霉烯耐药基因为  $bla_{KPC-2}$  (28 株, 93.33%), 耐药基因 SHV-11、 $mph(A)$  和  $armA$  检出率低于 CR-non-hvKP 菌株。30 株 CR-hvKP 携带的毒力基因  $iucA$ 、 $iutA$ 、 $fimF$ 、 $fimH$ 、 $mrkD$  检出率均为 100%, 高于 CR-non-hvKP 菌株, 差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。CR-hvKP 菌株中 ST11-K64 检出率(76.67%)高于 CR-non-hvKP 菌株(40.00%), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论 该院主要流行株为 ST11-K64 产 KPC-2 酶的 CR-hvKP, 携带较多毒力和耐药基因, 病死率高, 临床应重点关注老年及重症监护病房患者。

[关键词] 耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌; 毒力; 耐药; 流行病学

[中图分类号] R181.3<sup>+</sup>2Clinical and molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital

QIAO Yan<sup>1</sup>, SUN Hong<sup>2</sup>, LI Jiang-yan<sup>2</sup>, YING Chong-tao<sup>3</sup>, HUANG Yong-qiang<sup>2</sup>, HAO Fei-ran<sup>4</sup>, YU Lian<sup>2</sup>, GUO Pu<sup>2</sup> (1. Department of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 3. Department of Blood Transfusion, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China; 4. Department of Clinical Medicine, School of Basic Medicine, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

[Abstract] **Objective** To understand the drug resistance, virulence and epidemiological characteristics of clinically isolated carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CR-hvKP). **Methods** Clinically isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) from a teaching hospital in Anhui Province from January 2018 to December 2020 were collected, their clinical characteristics were analyzed. Bacterial strains were identified by time-

[收稿日期] 2022-09-13

[基金项目] 安徽省高校自然科学基金项目(KJ2021A0761)

[作者简介] 乔艳(1981-), 女(汉族), 安徽省和县人, 副主任护师, 主要从事感染性疾病研究。

[通信作者] 郭普 E-mail: 3504624902@qq.com

of-flight mass spectrometry, CR-hvKP was screened out by string test and virulence gene detection, carbapenem-resistant non-hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CR-non-hvKP) isolated in the same ward or at a similar time with CR-hvKP was as control group according to 1:1 ratio. The whole genome sequencing was used to analyze the capsule serotype, drug resistance, virulence gene and ST typing of CR-hvKP and CR-non-hvKP in control group, difference between two groups of strains was compared. **Results** A total of 512 CRKP strains were isolated, including 30 CR-hvKP strains and 482 CR-non-hvKP strains. Most patients with CR-hvKP infection were the elderly ( $n = 20, 66.67\%$ ), with respiratory diseases ( $n = 29, 96.67\%$ ), digestive system diseases ( $n = 12, 40.00\%$ ), septic shock ( $n = 10, 33.33\%$ ), invasive treatment ( $n = 23, 76.67\%$ ) and high mortality ( $n = 20, 66.67\%$ ). Resistant rates of CR-hvKP to most commonly used antimicrobial agents were  $>90\%$ , to tegacyclin was  $3.33\%$ , and all were sensitive to polymyxin B. There was no statistically significant difference in resistance between CR-hvKP and CR-non-hvKP ( $P > 0.05$ ). Sequencing results showed that the major carbapenem-resistance gene carried by CR-hvKP was *bla<sub>KPC-2</sub>* ( $n = 28, 93.33\%$ ). Detection rate of resistant genes SHV-11, *mph*(A) and *armA* were lower than those of CR-non-hvKP strains. Detection rates of virulence genes *iucA*, *iutA*, *fimF*, *fimH* and *mrkD* carried by 30 CR-hvKP strains were all  $100\%$ , which was higher than those of CR-non-hvKP strains, with statistically significant difference (all  $P < 0.05$ ). Detection rate of ST11-K64 in CR-hvKP strains was higher than that in CR-non-hvKP strains ( $76.67\%$  vs  $40.00\%$ ,  $P < 0.05$ ). **Conclusion** KPC-2-producing ST11-K64 CR-hvKP is the main prevalent strain in the hospital, which carries more virulence and drug resistance genes and has a high mortality. The elderly and intensive care unit patients should be paid more attention in clinic.

[**Key words**] carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; virulence; drug resistance; epidemiology

随着细菌适应性进化,兼具高耐药性和高毒力的耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP)已逐渐在临床流行<sup>[1]</sup>。2015 年 Zhang 等首次报道了 CR-hvKP 的存在<sup>[2]</sup>,随后相继在中国上海等地出现了 CR-hvKP 流行,给临床带来严重的威胁<sup>[3]</sup>。除中国外,欧美等国也出现了 CR-hvKP 临床感染的报道<sup>[4]</sup>。CR-hvKP 菌株携带大量毒力因子和耐药基因,其引起的感染治疗相当困难,患者病死率高<sup>[3]</sup>。近年来,不同 ST 类型的 CR-hvKP 不断出现,流行范围逐渐扩大,而且耐药及毒力不断发生新的突变,各地流行病学特征也有较大差异。研究<sup>[5]</sup>显示,肺炎克雷伯菌 ST 分型已超过 2 000 种型别,在中国,ST11 为 CR-hvKP 主要流行型别,也有其他 ST 型别的报道,包括 ST25、ST15 和 ST375 等。目前,CR-hvKP 相关研究报道较少,其致病、耐药机制及流行特点尚不十分明确。笔者调查分析安徽某教学医院临床分离 CR-hvKP 的耐药、毒力及流行病学特征,对于了解 CR-hvKP 的临床特征,制定感染控制措施,阻止其传播流行具有重要意义。

## 1 材料与方法

1.1 菌株鉴定 收集 2018 年 1 月—2020 年 12 月蚌埠医学院附属第一医院临床分离的 CRKP 非重

复分离株,基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(法国生物梅里埃公司)鉴定细菌。根据菌株拉丝试验结果和 *rmpA*、*iutA* 和 *iucA* 基因结果将 CRKP 分为 CR-hvKP 和 碳青霉烯耐药非高毒力肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant non-hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-non-hvKP)。其中拉丝试验和 *rmpA*、*iutA* 和 *iucA* 基因同时阳性为 CR-hvKP。收集 CR-hvKP 和 CR-non-hvKP 患者基本信息(如患者年龄、性别等)、基础疾病、侵袭性操作以及临床转归情况等。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922、肺炎克雷伯菌 ATCC BAA1705。

1.2 药敏试验 采用全自动细菌药敏分析仪 VITEK 2(法国生物梅里埃公司)检测抗菌药物敏感性。根据美国临床和实验室标准化协会(CLSI) 2020 版标准判读结果。替加环素和多粘菌素 B 结果分别采用美国食品药品监督管理局(FDA)标准和欧洲 AST(EUCAST)标准委员会制定的标准。

1.3 拉丝试验 用接种环轻轻挑取经过 18~24 h 37℃ 培养的 5% 羊血琼脂平板上的纯菌落,形成黏连且长度均  $>5$  mm 的黏液丝,重复 3 次出现相同情况则认为拉丝试验阳性。

1.4 DNA 提取 挑取经过 18~24 h 37℃ 培养的血琼脂平板上的纯菌落加入 3 mL LB 肉汤培养基中,经 37℃、220 r/min 摇床 12 h 培养后,取菌液 1 mL,12 000 r/min 离心 2 min 后,弃上清,留沉淀,

用 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取菌株 DNA,超微量分光光度计检测回收产物的纯度和浓度,合格样品 OD260/OD280 为 1.7~1.9。

1.5 毒力和耐药基因检测 按 1:1 配比从 2018 年 1 月—2020 年 12 月该院分离的 CR-non-hvKP 中选取与 CR-hvKP 同病室或相近时间内分离菌株作为对照组,采用 illumina Hiseq 2500 测序平台(上海生工生物有限公司)对 CR-hvKP 和对照组 CR-non-hvKP 菌株进行全基因组测序。在 Linux 系统下运行 SPAdes-2.0 软件拼接原始数据。

1.6 统计学方法 应用 SPSS 25.0 进行统计学分析,计数资料以率或构成比(%)表示,采用  $\chi^2$  检验或 Fisher 确切概率法进行统计学分析。双侧检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 CR-hvKP 菌株的分布情况 2018 年 1 月—2020 年 12 月该院临床共分离 512 株 CRKP,其中 CR-hvKP 30 株,CR-non-hvKP 482 株。30 株 CR-hvKP 主要来源于重症监护病房(ICU, 14 株, 46.67%)、神经外科(6 株, 20.00%)和急诊内科(4 株, 13.33%)等;标本来源为痰(14 株, 46.67%)、血(12 株, 40.00%)、尿(2 株, 6.67%)和脓液(2 株, 6.67%)。

2.2 药敏试验结果 30 株 CR-hvKP 对氨苄西林/舒巴坦、哌拉西林/他唑巴坦、头孢唑林、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、头孢替坦、氨曲南、厄他培南、亚胺培南、左氧氟沙星和环丙沙星的耐药率均为 100%;对阿米卡星、复方磺胺甲噁唑、妥布霉素和替加环素的耐药率分别为 96.67%、83.33%、96.67% 和 3.33%。CR-hvKP 对常用抗菌药物的耐药率与 CR-non-hvKP 耐药率比较,差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ )。未检出对多粘菌素 B 耐药的 CRKP 菌株。见表 1。

2.3 耐药基因检测结果 30 株 CR-hvKP 经全基因组测序共发现 43 种耐药基因。携带  $\beta$ -内酰胺类耐药基因主要有 *bla<sub>KPC-2</sub>* (93.33%)、*bla<sub>TEM-1</sub>* (80.00%)、*bla<sub>CTX-M-65</sub>* (73.33%)、*bla<sub>SHV-12</sub>* (80.00%)。氨基糖苷类耐药基因主要有 *aadA2* (80.00%)、*rmtB* (80.00%)、

表 1 CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 对常用抗菌药物的耐药情况比较[株(%)]

Table 1 Comparison of resistance rates to commonly used antimicrobial agents between CR hvKP and CR-non-hvKP (No. of isolates[%])

抗菌药物	CR-hvKP (n = 30)	CR-non-hvKP (n = 482)	$\chi^2$	P
氨苄西林/ 舒巴坦	30(100)	480(99.59)	0.125	0.724
哌拉西林/ 他唑巴坦	30(100)	470(97.51)	0.765	0.382
头孢唑林	30(100)	482(100)	-	-
头孢他啶	30(100)	481(99.79)	0.062	0.803
头孢曲松	30(100)	482(100)	-	-
头孢吡肟	30(100)	473(98.13)	0.570	0.450
头孢替坦	30(100)	462(95.85)	1.295	0.255
氨曲南	30(100)	480(99.59)	0.125	0.724
厄他培南	30(100)	482(100)	-	-
亚胺培南	30(100)	482(100)	-	-
阿米卡星	29(96.67)	415(86.10)	2.738	0.098
庆大霉素	30(100)	455(94.40)	1.774	0.183
妥布霉素	29(96.67)	430(89.21)	1.691	0.193
替加环素	1(3.33)	6(1.24)	0.378	0.539
左氧氟沙星	30(100)	445(92.32)	2.482	0.115
环丙沙星	30(100)	468(97.10)	0.896	0.344
复方磺胺甲 噁唑	25(83.33)	338(70.12)	2.388	0.122
多粘菌素 B	0(0)	0(0)	-	-

注: - 表示无数据。

*aac(3)-IIId* (30.00%)、*mph(A)* (30.00%)、喹诺酮类耐药基因 *qnrSI* (46.67%)、*qnrB4* (6.67%)、*oqxA* (6.67%)、*oqxB* (3.33%)、磷霉素耐药基因 *fosA6* (100%) 和 *fosA3* (20.00%)、磺胺类耐药基因主要携带 *sul2* (43.33%) 和 *sul1* (43.33%)、四环素耐药基因 *tet(A)* (36.67%)。30 株 CR-hvKP 耐药基因 SHV-11、*mph(A)* 和 *armA* 的检出率低于 CR-non-hvKP 菌株,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

2.4 毒力基因检测结果 30 株 CR-hvKP 携带的毒力基因 *iucA*、*iutA*、*fimF*、*fimH*、*mrkD* 检出率高于 CR-non-hvKP 菌株,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 3。

**表 2** CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 耐药基因检测结果比较

**Table 2** Comparison of detection results between CR-hvKP and CR-non-hvKP resistance genes

耐药基因	CR-hvKP (n = 30)		CR-non-hvKP (n = 30)		$\chi^2$	P
	株数	检出率 (%)	株数	检出率 (%)		
KPC-2	28	93.33	30	100	2.069	0.150
SHV-12	24	80.00	21	70.00	0.800	0.371
TEM-1	24	80.00	28	93.33	2.308	0.129
CTX-M-65	22	73.33	26	86.67	1.667	0.197
SHV-11	2	6.67	8	26.67	4.320	0.038
<i>aadA2</i>	24	80.00	20	66.67	1.364	0.243
<i>rmtB</i>	24	80.00	21	70.00	0.800	0.371
<i>armA</i>	0	0.00	9	30.00	10.588	0.001
<i>aac(3)-IIId</i>	9	30.00	15	50.00	2.500	0.114
<i>mph(A)</i>	9	30.00	18	60.00	5.455	0.020
<i>qnrS1</i>	14	46.67	13	43.33	0.067	0.795
<i>qnrB4</i>	2	6.67	4	13.33	0.741	0.389
<i>oqxA</i>	2	6.67	4	13.33	0.741	0.389
<i>oqxB</i>	1	3.33	4	13.33	1.964	0.161
<i>dfpA12</i>	3	10.00	7	23.33	1.920	0.166
<i>fosA6</i>	30	100	30	100	-	-
<i>fosA3</i>	6	20.00	9	30.00	0.800	0.371
<i>sul1</i>	13	43.33	16	53.33	0.601	0.438
<i>sul2</i>	13	43.33	16	53.33	0.601	0.438
<i>tet(A)</i>	11	36.67	7	23.33	1.270	0.260

注：- 表示无数据。

2.5 荚膜血清型及 ST 分型 30 株 CR-hvKP 菌株中 ST11 型 28 株,ST23 型 2 株。通过荚膜和 ST 组合分成几个克隆基因型: ST11-K64 (23 株, 76.67%)、ST11-K47(5 株,16.67%)和 ST23-K1(2 株,6.67%);30 株 CR-non-hvKP 菌株中 ST11 型 27 株,ST15 型 3 株,荚膜和 ST 组合分成几个克隆基因型:ST11-K64(12 株,40.00%)、ST11-K47(14 株,46.67%)和 ST15-K107(3 株,10.00%)和 ST11-K57(1 株,3.33%)。CR-hvKP 菌株中 ST11-K64 检出率(76.67%)高于 CR-non-hvKP 菌株

**表 3** CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 毒力基因检测结果比较

**Table 3** Comparison of virulence gene detection results between CR-hvKP and CR-non-hvKP

毒力基因	CR-hvKP (n = 30)		CR-non-hvKP (n = 30)		$\chi^2$	P
	株数	检出率 (%)	株数	检出率 (%)		
<i>rmpA</i>	30	100	0	0	-	-
<i>iutA</i>	30	100	26	86.67	4.286	0.038
<i>iucA</i>	30	100	24	80.00	6.667	0.010
<i>iucB</i>	30	100	28	93.33	2.069	0.150
<i>iucCD</i>	30	100	27	90.00	3.158	0.076
<i>mrkD</i>	30	100	26	86.67	4.286	0.038
<i>mrkABCE-FHJIK</i>	30	100	30	100	-	-
<i>fimF</i>	30	100	25	83.33	5.455	0.020
<i>fimH</i>	30	100	24	80.00	6.667	0.010
<i>fimABCD-EGIK</i>	30	100	30	100	-	-
<i>acrAB</i>	30	100	30	100	-	-
<i>entABC</i>	30	100	30	100	-	-
<i>entD</i>	8	26.67	8	26.67	-	-
<i>entEF</i>	30	100	30	100	-	-
<i>entS</i>	7	23.33	8	26.67	-	-
<i>fepABCDGS</i>	30	100	30	100	-	-
<i>iroB</i>	8	26.67	7	23.33	0.089	0.766
<i>iroC</i>	7	23.33	7	23.33	-	-
<i>iroD</i>	10	33.33	7	23.33	0.739	0.390
<i>iroE</i>	30	100	30	100	-	-
<i>fyuA</i>	30	100	30	100	-	-
<i>irp1</i>	30	100	30	100	-	-
<i>irp2</i>	30	100	30	100	-	-
<i>ybtAEPQ-STUX</i>	30	100	30	100	-	-
<i>rcaA B</i>	30	100	30	100	-	-

注：- 表示无数据。

(40.00%);而 CR-non-hvKP 菌株中 ST11-K47 检出率(46.67%)高于 CR-hvKP 菌株(16.67%);差异均有统计学差异(均  $P < 0.05$ )。见表 4。

**表 4** CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 荚膜血清型及 ST 分型检测结果比较

**Table 4** Comparison of detection results of capsule serotype and ST typing between CR-hvKP and CR-non-hvKP

荚膜血清型及 ST 分型	CR-hvKP (n = 30)		CR-non-hvKP (n = 30)		$\chi^2$	P
	株数	检出率 (%)	株数	检出率 (%)		
ST11	28	93.33	27	90.00	0.218	0.640
ST15	0	0	3	10.00	3.158	0.076
ST23	2	6.67	0	0	2.069	0.150
K1	2	6.67	0	0	2.069	0.150
K47	5	16.67	14	46.67	6.239	0.012
KL57	0	0	1	3.33	1.017	0.313
KL64	23	76.67	12	40.00	8.297	0.004
KL107	0	0	3	10.00	3.158	0.076
ST11-K64	23	76.67	12	40.00	8.297	0.004
ST11-K47	5	16.67	14	46.67	6.239	0.012
ST23-K1	2	6.67	0	0	2.069	0.150
ST15-K107	0	0	3	10.00	3.158	0.076
ST11-K57	0	0	1	3.33	1.017	0.313

**2.6 CR-hvKP 的临床特征** CR-hvKP 感染患者多为老年患者 (66.67%), 存在呼吸系统疾病 (96.67%)、消化系统疾病 (40.00%)、感染性休克 (33.33%)、侵入性治疗 (23 例, 76.67%) 以及高病死率 (20 例, 66.67%)。见表 5。CR-hvKP 组病死率 (20 例, 66.67%) 高于 CR-non-hvKP 组 (125 例, 25.93%), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。CR-hvKP 死亡组与存活组患者临床特征比较, 死亡组患者  $> 60$  岁、感染性休克、气管插管及动静脉置管比率较存活组高, 差异有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。见表 6。

**表 5** CR-hvKP 组与 CR-non-hvKP 组患者的临床特征分析 [例(%)]

**Table 5** Clinical characteristics of patients in CR-hvKP group and CR-non-hvKP group (No. of cases [%])

项目	CR-hvKP (n = 30)	CR-non-hvKP (n = 482)	$\chi^2$	P
年龄(岁)			2.151	0.142
>60	20(66.67)	255(52.90)		
≤60	10(33.33)	227(47.10)		
性别			0.469	0.494
男	19(63.33)	334(69.29)		
女	11(36.67)	148(30.71)		
高血压	19(63.33)	233(48.34)	2.540	0.111
糖尿病	5(16.67)	84(17.43)	0.011	0.915
肿瘤	7(23.33)	58(12.03)	3.254	0.071
呼吸系统疾病	29(96.67)	426(88.38)	1.211	0.271
呼吸衰竭	10(33.33)	104(21.58)	2.255	0.133
泌尿系统疾病	7(23.33)	126(26.14)	0.116	0.734
肾功能衰竭	0(0)	23(4.77)	0.593	0.441
循环系统疾病	10(33.33)	131(27.18)	0.536	0.464
心功能衰竭	1(3.33)	37(7.68)	0.272	0.602
消化系统疾病	12(40.00)	129(26.76)	2.480	0.115
血液系统疾病	2(6.67)	57(11.83)	0.737	0.391
多器官功能障碍综合征	2(6.67)	12(2.49)	1.853	0.173
感染性休克	10(33.33)	57(11.83)	9.673	0.002
入住 ICU	15(50.00)	192(39.83)	1.212	0.271
手术	4(13.33)	149(30.91)	4.165	0.041
留置导尿管	21(70.00)	311(64.52)	0.372	0.542
动静脉置管	15(50.00)	197(40.87)	0.970	0.325
气管插管	23(76.67)	125(25.93)	35.372	<0.001

表 6 CR-hvKP 死亡组与存活组患者临床特征分析[例(%)]

Table 6 Clinical characteristics of patients in death group and survival group of CR-hvKP (No. of cases [%])

项目	死亡组(n=20)	存活组(n=10)	P
年龄(岁)			0.045
>60	16(80.00)	4(40.00)	
≤60	4(20.00)	6(60.00)	
性别			1.000
男	13(65.00)	6(60.00)	
女	7(35.00)	4(40.00)	
高血压	14(70.00)	5(50.00)	0.425
糖尿病	4(20.00)	1(10.00)	0.640
呼吸系统疾病	20(100)	9(90.00)	0.394
泌尿系统疾病	3(15.00)	4(40.00)	0.393
循环系统疾病	8(40.00)	2(20.00)	0.132
消化系统疾病	8(40.00)	4(40.00)	0.472
肿瘤	4(20.00)	3(30.00)	0.657
感染性休克	10(50.00)	0(0)	0.002
入住 ICU	12(60.00)	3(30.00)	0.722
留置导尿管	16(80.00)	5(50.00)	0.139
动静脉置管	14(70.00)	1(10.00)	0.001
气管插管	19(95.00)	4(40.00)	0.026

注:采用 Fisher 确切概率法进行比较。

### 3 讨论

近年来,CR-hvKP 菌株的相关临床报道逐渐增多,由于 CR-hvKP 兼具多重耐药和高毒力特性,给公众健康带来严重威胁,成为真正的“超级细菌”。本研究中 2018—2020 年共收集 30 株 CR-hvKP,检出率为 5.86%。雷静等<sup>[6]</sup>对西安交通大学第二附属医院 ICU 的研究报道 CR-hvKP 检出率为 13.2%。Zhang 等<sup>[5]</sup>对中国 56 个中心的 CR-hvKP 检测情况进行分析,CR-hvKP 感染患病率呈增长趋势,从 2015 年 2.0% 的检出率增长为 2017 年的 8.1%,不同地区之间差异较大(0~25.8%),其中河南(25.4%)和山东(25.8%)较高。30 株 CR-hvKP 来源于 30 例临床患者的不同感染部位,患者主要来自于 ICU、急诊内科以及神经外科,均为成年人,年龄>60 岁的患者占 66.67%,说明老年患者是 CR-hvKP 感染的易感人群,与相关报道一致<sup>[7]</sup>。多数患者伴有呼吸及消化系统等基础疾病,23 例患者有

气管插管等侵入性操作史。30 株 CR-hvKP 分离自患者的痰、血、尿和脓液标本,其中以痰标本为主,占 46.67%,与老年患者呼吸功能下降及呼吸机的使用有关,CR-hvKP 也是引起血流感染的重要病原菌。与文献<sup>[7-8]</sup>报道 CRKP 感染的危险因素主要为患者有基础疾病、侵入性操作及抗菌药物暴露史等相近。尽管 30 例 CR-hvKP 感染患者均接受了抗感染治疗,依然有 20 例患者死亡,病死率高达 66.67%,高于 CR-non-hvKP 菌株引起感染的患者,与相关研究<sup>[9-10]</sup>报道结果一致。提示临床需要对 CR-hvKP 菌株进行监测,以防止感染的发生与流行,给患者生命健康带来威胁。通过对 CR-hvKP 感染死亡组和存活组患者临床特征分析显示:年龄>60 岁、感染性休克、动静脉置管和气管插管等侵入性操作史可能会增加感染患者的病死率。这部分患者常合并基础疾病,病情复杂,往往需要使用各种置管,侵入性操作也增加了感染 CR-hvKP 的机会,而 CR-hvKP 高毒力和高耐药特点,增加了死亡的风险。

30 株 CR-hvKP 的药敏结果显示,对阿米卡星、复方磺胺甲噁唑和妥布霉素仅部分菌株敏感,对 β-内酰胺类包括碳青霉烯类、喹诺酮类抗菌药物全部耐药,对替加环素的耐药率低,仅 1 株 CR-hvKP 菌株对替加环素耐药,对多粘菌素 B 全部敏感。CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 对常用抗菌药物的耐药率比较,差异均无统计学意义,与相关文献<sup>[11]</sup>报道一致。由于 CR-hvKP 高耐药的特点,抗感染治疗需要针对菌株进行药敏和联合药敏试验,根据药敏结果合理使用抗菌药物。测序结果显示:产 KPC-2 碳青霉烯酶是碳青霉烯类耐药的主要机制,产酶菌株检出率高达 93.33%。本研究中 CR-hvKP 同时携带多种耐药基因,主要为 β-内酰胺类耐药基因(*bla*<sub>KPC-2</sub>、*bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>CTX-M-65</sub>、*bla*<sub>SHV-12</sub>),氨基糖苷类耐药基因[*aadA2*、*mph(A)*、*armA*、*rmtB*],喹诺酮类耐药基因(*qnrS*、*oqxA*、*oqxB*),磷霉素耐药基因(*fosA6* 和 *fosA3*),磺胺类耐药基因(*sul1* 和 *sul2*)及四环素耐药基因 *tet(A)* 等,这些耐药基因是导致多种抗菌药物耐药的主要原因,与相关报道<sup>[12-13]</sup>相近。与 30 株 CR-non-hvKP 测序结果相比,CR-hvKP 携带的耐药基因 SHV-11、*mph(A)* 和 *armA* 检出率低于 CR-non-hvKP 菌株,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),提示 CR-hvKP 与 CR-non-hvKP 存在耐药机制的差异。

肺炎克雷伯菌的重要毒力因子主要包括荚膜多糖、脂多糖和铁载体等<sup>[14]</sup>。*rmpA* 可以促进荚膜多

糖的合成,属于黏液表型调节基因,而铁载体在 CR-hvKP 的生长和感染中起着关键作用,其中气杆菌素为铁载体活性主要成分,占 90%,气杆菌素由 iucAB-CD 操纵子编码,其同源受体由 iutA 基因编码<sup>[15]</sup>。目前大多研究都基于高黏液表型和携带 *rmpA* 和 *iucA* 基因作为 hvKP 的诊断标准<sup>[16]</sup>。通过测序发现本研究 CR-hvKP 菌株中荚膜相关基因(*rmpA*),菌毛相关基因(*fimH*、*mrkD*)以及铁载体相关基因(*iucA*)等主要毒力基因携带率为 100%,高于 CR-non-hvKP 菌株,CR-hvKP 菌株同时还携带其他的毒力基因,与相关报道相似<sup>[13]</sup>。荚膜为由糖和多肽组成的一层黏液物质,位于细菌细胞壁外,可以使细菌具有黏附性及远处定植,同时可抵抗血清杀菌及抗中性粒细胞吞噬。根据荚膜多糖的不同,可将高毒力肺炎克雷伯菌分为 82 个荚膜血清型,其中常见的 K1 及 K2 型毒力最强,容易引起感染迁移<sup>[17]</sup>。CR-hvKP 报道的荚膜血清型与 hvKP 不同,常见的除 K1、K2 外,还有 K47、K64 及少见血清型如 K20、K54、K62 等<sup>[18]</sup>。本试验中检测出的 CR-hvKP 以 K64 和 K47 荚膜血清分型为主,与国内相关研究<sup>[3, 5]</sup>结果报道相近。多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)是一种基于核酸序列分析,常用于研究细菌的进化和流行病学监测的分型方法。ST11 型是我国 CRKP 最主要克隆群,ST23 是经典肺炎克雷伯菌(classical *Klebsiella pneumoniae*, CKP)主要的克隆群<sup>[19]</sup>。通过荚膜血清型和 ST 分型组合,该院 30 株 CR-hvKP 主要为 ST11-K64,其次为 ST11-K47,仅有 2 株是 ST23-K1 型。目前,报道显示 ST11-K64 型是 CR-hvKP 较为常见的荚膜型,在国内外医疗机构均有检出<sup>[20-21]</sup>。研究<sup>[22]</sup>显示,ST11-K64 型能够更快速杀灭大蜡螟幼虫,可以较强的抵抗人中性粒细胞的杀灭作用,易形成生物被膜,比 ST11-K47 型毒力强,更适合在医院环境中生存。本研究中 ST11-K64 在高毒力菌株中的分布高于非高毒力菌株,ST11-K47 型非高毒力菌株检测率高于高毒力菌株,与相关研究<sup>[22]</sup>一致。CR-hvKP 的进化路线主要有两种可能,一种是 hvKP 菌株从 CRKP 菌种中获得耐药质粒而表现出相关的耐药性;另一种是 CRKP 菌种从 hvKP 菌株获得毒力相关质粒从而表现出高毒力和高耐药性<sup>[5, 23]</sup>。本组 CR-hvKP 主要为 ST11-K64 型,因此推测该院分离的 CR-hvKP 是主要由 CRKP 获得毒力质粒进化而来。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参 考 文 献]

- [1] Lan P, Jiang Y, Zhou JC, et al. A global perspective on the convergence of hypervirulence and carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2021, 25: 26-34.
- [2] Zhang YW, Zeng J, Liu WE, et al. Emergence of a hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from clinical infections in China[J]. J Infect, 2015, 71(5): 553-560.
- [3] Zhou C, Wu Q, He LQ, et al. Clinical and molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Shanghai, China[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 2697-2706.
- [4] Krapp F, Morris AR, Ozer EA, et al. Virulence characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from patients with necrotizing skin and soft tissue infections[J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13533.
- [5] Zhang YW, Jin LY, Ouyang PW, et al. Evolution of hypervirulence in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a multicentre, molecular epidemiological analysis[J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(2): 327-336.
- [6] 雷静,周维肖,雷珂,等.重症监护病房耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌分子及临床特征分析[J].中华预防医学杂志, 2022, 56(1): 63-68.  
Lei J, Zhou WX, Lei K, et al. Analysis of molecular and clinical characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2022, 56(1): 63-68.
- [7] Wei T, Zou CY, Qin J, et al. Emergence of hypervirulent ST11-K64 *Klebsiella pneumoniae* poses a serious clinical threat in older patients[J]. Front Public Health, 2022, 10: 765624.
- [8] Qin XH, Wu S, Hao M, et al. The colonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, resistance mechanisms, and risk factors in patients admitted to intensive care units in China[J]. J Infect Dis, 2020, 221(Suppl 2): S206-S214.
- [9] Shao CH, Jin Y, Wang W, et al. An outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* of K57 capsular serotype in an emergency intensive care unit of a teaching hospital in China[J]. Front Public Health, 2021, 9: 724212.
- [10] 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.
- [11] Hao MJ, Shi XH, Lv JN, et al. In vitro Activity of apramycin against carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Front Microbiol, 2020, 11: 425.

- [12] Ouyang PW, Jiang B, Peng N, et al. Characteristics of ST11 KPC-2-producing carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* causing nosocomial infection in a Chinese hospital[J]. J Clin Lab Anal, 2022, 36(6): e24476.
- [13] Yang XM, Sun QL, Li JP, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 841 - 849.
- [14] Zhu J, Wang T, Chen L, et al. Virulence factors in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 642484.
- [15] Russo TA, Olson R, MacDonald U, et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo [J]. Infect Immun, 2015, 83(8): 3325 - 3333.
- [16] Shankar C, Basu S, Lal B, et al. Aerobactin seems to be a promising marker compared with unstable RmpA2 for the identification of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; in silico and in vitro evidence[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 709681.
- [17] 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.
- [18] 郑茂, 邹玉, 刘晓, 等. 耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌的研究进展[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(1): 105 - 110.
- Zheng M, Zou Y, Liu X, et al. Research advances in carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2021, 21(1): 105 - 110.
- [19] Hu YY, Liu CC, Shen ZQ, et al. Prevalence, risk factors and molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in patients from Zhejiang, China, 2008 - 2018 [J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 1771 - 1779.
- [20] Eckstein S, Stender J, Mzoughi S, et al. Isolation and characterization of lytic phage TUN1 specific for *Klebsiella pneumoniae* K64 clinical isolates from Tunisia[J]. BMC Microbiol, 2021, 21(1): 186.
- [21] Yang QW, Jia XM, Zhou ML, et al. Emergence of ST11-K47 and ST11-K64 hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in bacterial liver abscesses from China: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Emerg Microbes Infect, 2020, 9(1): 320 - 331.
- [22] Zhou K, Xiao TT, David S, et al. Novel subclone of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 with enhanced virulence and transmissibility, China[J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(2): 289 - 297.
- [23] Liao WJ, Liu Y, Zhang W. Virulence evolution, molecular mechanisms of resistance and prevalence of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: a review over the last 10 years[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 23: 174 - 180.

(本文编辑:陈玉华)

**本文引用格式:** 乔艳, 孙红, 李江艳, 等. 某教学医院耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌临床及分子特征[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(12): 1185 - 1192. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20223363.

**Cite this article as:** QIAO Yan, SUN Hong, LI Jiang-yan, et al. Clinical and molecular characteristics of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital[J]. Chin J Infect Control, 2022, 21(12): 1185 - 1192. DOI: 10. 12138/j. issn. 1671 - 9638. 20223363.