

DOI:10.12138/j.issn.1671-9638.20257358

· 论著 ·

基于全基因组测序的 ICU 环境中肺炎克雷伯菌耐药及分子特征分析

杨博雯¹, 王远萍², 徐依盈¹, 王闻卿¹, 许统圣¹, 袁灵月³, 赵冰¹, 王筱¹

(1. 上海市浦东新区疾病预防控制中心微检室, 上海 200136; 2. 上海市浦东新区疾病预防控制中心消毒科, 上海 200136;

3. 上海市疾病预防控制中心细菌室, 上海 200336)

[摘要] 目的 了解医疗机构综合重症监护病房(ICU)环境中肺炎克雷伯菌(KP)、高毒力肺炎克雷伯菌(hvKP)、耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)及高毒耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(hv-CRKP/CR-hvKP)的分布特征, 为 ICU 环境评估与医院感染防控提供参考。方法 2019、2023 年共采集上海市医疗机构综合 ICU 3 336 份环境标本, 分离菌株后进行药敏试验和全基因组测序。结果 KP 检出率为 1.59% (53 株), 其中 hvKP、CRKP、hv-CRKP/CR-hvKP 分别占总检出数的 37.74% (20/53)、52.83% (28/53)、24.53% (13/53)。hvKP 主要为 ST11-KL64、ST11-KL25, CRKP 主要为 ST15-KL19、ST11-KL25, hv-CRKP/CR-hvKP 主要为 ST11-KL25、ST11-KL64。主要携带的耐药基因有 *fosA*、*oqxAB*、*tet(A)*、*bla_{TEM-1B}*、*bla_{KPC-2}*、*qnrS11* 等。所有菌株均携带毒力基因 *fimH*、*iutA*、*entA*、*entB*、*entC*、*entD*、*entE*、*entF*, 仅 1 株检出 *rmpA* 基因。结论 医疗机构综合 ICU 环境中 KP 污染广泛, 以 ST11 和 ST15 为优势, 呈多态性分布。CRKP 和 hvKP 占比较高, 且多重耐药情况严峻。KP 存在耐药与毒力共进化的情形, 提示综合 ICU 环境污染对患者具有感染和致病危害, 临床需加强重视并警惕暴发风险。

[关键词] ICU 环境; 肺炎克雷伯菌; 全基因组测序; 耐药表型; 基因型**[中图分类号]** R181.3¹ 2

Antimicrobial resistance and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit environment based on whole genome sequencing

YANG Bowen¹, WANG Yuanping², XU Yiyi¹, WANG Wenqing¹, XU Tongsheng¹, YUAN Lingyue³, ZHAO Bing¹, WANG Xiao¹ (1. Microbial Detection Department, Shanghai Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200136, China; 2. Disinfection Department, Shanghai Pudong New Area Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200136, China; 3. Bacteria Department, Shanghai Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shanghai 200336, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution characteristics of *Klebsiella pneumoniae* (KP), hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hvKP), carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), and hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (hv-CRKP/CR-hvKP) in the environment of general intensive care unit (ICU) at medical institutions, and provide reference for environment assessment as well as healthcare-associated infection (HAI) prevention and control in ICU. **Methods** A total of 3 336 environmental specimens were collected from general ICUs of medical institutions in Shanghai in 2019 and 2023. After strain isolation, antimicrobial susceptibility testing and whole genome sequencing were conducted. **Results** The detection rate of KP was 1.59% ($n = 53$), among which hvKP, CRKP, and hv-CRKP/CR-hvKP accounted for 37.74% (20/53), 52.83% (28/53), and 24.53% (13/53) of the total detected strains, respectively. The main types of hvKP were ST11-KL64 and ST11-KL25, CRKP were ST15-KL19 and ST11-KL25, hv-CRKP/CR-hvKP were ST11-KL25 and ST11-KL64. The main

[收稿日期] 2024-12-30**[基金项目]** 上海市加强公共卫生体系建设三年行动计划(2023-2025 年)重点学科(GWVI-11.1-02); 上海市浦东新区科委项目(PKJ2024-Y78); 浦东新区疾控中心级科技项目(PDCDC-2023-02)**[作者简介]** 杨博雯(1990-), 女(汉族), 上海市人, 主管技师, 主要从事病原微生物检测及耐药研究。**[通信作者]** 王筱 E-mail:wangxiaoyouran@126.com

carried resistance genes included *fosA*, *oqxAB*, *tet(A)*, *bla_{TEM-1B}*, *bla_{KPC-2}*, *qnrS11*, etc. All strains carried virulence genes *fimH*, *iutA*, *entA*, *entB*, *entC*, *entD*, *entE*, and *entF*, with only one strain carrying *rmpA* gene.

Conclusion KP contamination is widespread in general ICU environment of medical institutions, predominantly ST11 and ST15, presenting a polymorphic distribution. CRKP and hvKP account for a relatively high proportion, and multidrug resistance is serious. Co-evolution of drug resistance and virulence presents in KP, and poses significant infection and pathogenic risks to patients, necessitating enhanced clinical vigilance and preparedness for potential outbreaks.

[Key words] ICU environment; *Klebsiella pneumoniae*; whole genome sequencing; drug resistance phenotype; genotype

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种属于肠杆菌目的条件致病菌,常定植于人体皮肤、鼻咽部和肠道。根据表型与毒力特征,KP可分为经典肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella pneumoniae*, cKP)和高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)。hvKP具有高侵袭性和高致病性等特点,但目前尚无统一鉴定标准。临床判定方法包括表型和基因检测两种途径,其中毒力基因检测因操作简便、耗时短而应用更为广泛^[1]。值得注意的是,随着菌株耐药性的演变,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)逐渐出现。CRKP被定义为对美罗培南、亚胺培南或厄他培南至少一种抗生素呈现耐药性或中介耐药性的KP^[2]。CRKP通常携带的耐药基因包括KPC、NDM、OXA、VIM、IMP等^[3]。目前,CRKP和hvKP已成为全球临床及公共卫生领域高度关注的重要病原菌。

此外,菌株的持续流行与传播,以及携带高毒力或碳青霉烯酶耐药基因质粒的接合与转移,可能导致KP同时获得高毒力和高耐药性特征,从而形成高毒力且耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(hv-CRKP/CR-hvKP)。研究^[4]提出,CR-hvKP可能是hv-CRKP进化过程中的中间形态,当CR-hvKP获得KPC耐药质粒后,其厚荚膜可能丢失,导致毒力降低和存活力减弱,使其在医院的抗菌药物选择压力下难以稳定存在。然而,更为普遍观察到的进化路径是CRKP获得毒力质粒演变为hv-CRKP。KP作为条件致病菌,通常不会引起健康人群感染。但在重症监护病房(ICU)环境中,患者常伴有严重基础疾病并接受多种侵入性操作,显著增加了KP感染的风险。KP可导致肺炎、血流感染、尿路感染和肝脓肿等严重后果,严重时可导致死亡,是医院感染暴发的重要病原菌之一^[5]。目前,针对ICU环境中KP耐药基因和毒力基因的研究,大多局限于单一病房或医疗机构在感染暴发或存在明确感染病例时

的环境调查,缺乏多中心、常态化的研究。因此,本研究以8所医疗机构的ICU环境为研究对象,采用最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)微量肉汤稀释法进行体外药敏试验,并结合全基因测序(whole genome sequencing, WGS)技术,旨在调查综合ICU环境中KP、CRKP、hvKP的污染现状与分子流行特征,为综合ICU环境风险评估和医院感染防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源 根据上海市及浦东新区医疗机构耐药菌监测方案,结合医疗机构性质、规模、地理位置、覆盖人群、就诊量及监测实施配合能力等因素,确定浦东新区8所公立医疗机构的综合ICU为监测点。参照GB 15982—2012《医院消毒卫生标准》,在各医疗机构对ICU环境进行彻底消毒前,采集ICU内物体表面和工作人员手部标本。具体采样方法为:使用浸有采样液的无菌棉签在物体表面来回涂抹5次,剪去手接触的棉签棒部分,将采样棉签头放入装有10 mL采样液的采样管中。物体表面采样:面积<100 cm²时涂抹全部表面,≥100 cm²时涂抹100 cm²;工作人员手部采样:涂抹面积约为30 cm²/只。物体表面采样对象包括诊疗器械、诊疗相关物品、医护人员直接接触物品、患者直接接触物品、保洁物品及其共用物品表面;工作人员手采样对象包括医生、护士、工勤人员的手部。每所医疗机构每月采集各种物品及工作人员手标本2~3份。

1.2 仪器与试剂 飞行时间质谱仪(MALDI-TOF MS, 德国布鲁克公司),测序仪(美国 Illumina 公司);TSB增菌液(英国 OXOID 公司),麦康凯琼脂平板、哥伦比亚血琼脂平板(上海科玛嘉公司),DNA提取试剂盒(西安天隆科技公司),建库试剂盒(美国 Illumina 公司),MIC 药敏板(上海复星诊断科技公司)等,以上试剂均在有效期内使用。

1.3 方法

1.3.1 细菌分离鉴定 采集的标本经 TSB 增菌后,接种到麦康凯平板和哥伦比亚血平板进行分离。挑取麦康凯平板上呈粉红色黏液型的菌落及哥伦比亚血平板上灰白色、湿润的黏液型菌落,进行氧化酶试验等生化初筛。符合者(氧化酶阴性、乳糖发酵阳性等)采用 MALDI-TOF MS 进行菌种鉴定。鉴定后的菌株保存于 20% 甘油的脑心浸液肉汤中,置于 -70℃ 备用。

1.3.2 药敏试验 菌株复苏后,挑取血平板纯培养物,配制成 0.5 麦氏单位菌悬液,按照革兰阴性 B5、B6 肠道菌群药敏板说明书操作,测定菌株 MIC。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922 和肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.3.3 核酸提取 按照 DNA 提取试剂盒说明书操作。

1.3.4 WGS 和数据分析 提取的 DNA 按照 Illumina DNA prep 试剂盒说明书进行文库构建,依次进行 DNA 片段化、加标签、纯化、扩增、文库构建和均一化等步骤。文库经定量和稀释至所需浓度后,使用 Illumina MiSeq 测序仪进行测序。原始测序数据经 CLC 数据分析工具进行质控和组装,并利用 Pathogenwatch、BacWGSTd、CARD、ResFinder 等平台进行核心基因组多位点序列分型(cgMLST)、荚膜血清型预测、毒力和耐药基因分析。

1.3.5 相关定义 多重耐药(multidrug resistance, MDR)菌是指对三类及以上抗菌药物耐药的菌株^[6]。hvKP 是指毒力基因 *peg-344*、*iroB*、*iucA*、*rmpA*、*rmpA2* 至少一种检测为阳性的 KP^[7]。hv-CRKP/CR-hvKP 是指至少对一种碳青霉烯类抗生素(包括美罗培南、亚胺培南和厄他培南)耐药且至少携带一

种毒力基因(*peg-344*、*iroB*、*iucA*、*rmpA*、*rmpA2*)的 KP。

1.4 统计分析 应用 SPSS 27.0 对数据进行分析,计数资料以例(%)表示,组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 精确概率检验,进一步两两比较采用 Bonferroni 校正。通过 Kappa 检验进行一致性分析,以 Kappa 值衡量一致性水平:Kappa 值<0.2 表示一致性较差,0.21~0.40 表示一般,0.41~0.60 表示中等,0.61~0.80 表示较强,0.81~1.00 表示强。 $P\leqslant 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基本情况

2.1.1 医疗机构综合 ICU 环境 KP 检出情况

2019、2023 年 8 所医疗机构综合 ICU 共采集环境标本 3 336 份,检出 KP 53 株,检出率为 1.59%。其中 2019 年采集环境标本 1 680 份,检出 KP 22 株,检出率为 1.31%;2023 年采集环境标本 1 656 份,检出 KP 31 株,检出率为 1.87%;2019 年与 2023 年综合 ICU 环境 KP 检出率比较,差异无统计学意义 ($\chi^2 = 1.687, P = 0.194$)。8 所医疗机构综合 ICU 环境 KP 检出情况见表 1。不同医疗机构综合 ICU 环境 KP 检出率比较,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 20.905, P = 0.004$)。

2.1.2 不同物体表面 KP 检出情况 不同采样位点 KP 检出情况见表 2。3 336 份标本根据患者直接接触物品、共用物品、诊疗相关物品、诊疗器械、医护人员直接接触物品、保洁物品、工作人员手各类物体表面类型进行分组,结果显示,不同类型物体表面 KP 检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 23.853, P < 0.001$)。

表 1 2019、2023 年不同医疗机构 ICU 环境 KP 检出情况

Table 1 Detection of KP from ICU environment in different medical institutions in 2019 and 2023

| 医疗机构 代码 | 医疗机构 等级 | 床位数 (张) | 地理位置 | 2019 年 | | 2023 年 | |
|------------|------------|------------|-------|--------|-------------|--------|-------------|
| | | | | 标本份数 | 检出 KP 株数(%) | 标本份数 | 检出 KP 株数(%) |
| A | 三级甲等 | 1 000 | 城区 | 240 | 8(3.33) | 356 | 10(2.81) |
| B | 三级甲等 | 1 000 | 城区 | 240 | 1(0.42) | 200 | 0(0) |
| C | 三级甲等 | 1 500 | 城区 | 240 | 4(1.67) | 200 | 5(2.50) |
| D | 三级乙等 | 1 000 | 城郊结合部 | 240 | 5(2.08) | 180 | 2(1.11) |
| E | 二级甲等 | 900 | 城郊结合部 | 240 | 4(1.67) | 180 | 4(2.22) |
| F | 三级甲等 | 880 | 城郊结合部 | 240 | 0(0) | 180 | 2(1.11) |
| G | 三级乙等 | 1 000 | 城区 | 240 | 0(0) | 180 | 3(1.67) |
| H | 二级甲等 | 550 | 城区 | - | - | 180 | 5(2.78) |

注: - 表示未对该机构进行采样。

表 2 不同类型标本各类 KP 检出情况

Table 2 Detection of KP from different types of specimens

| 物体表面 类型 | 标本来源 | 标本 份数 | 检出株数 | | | | KP 检出率 (%) | KP 医疗机构分布 (株) |
|------------|-----------|----------|------|------|------|---------------------|---------------|-------------------------------|
| | | | KP | CRKP | hvKP | hv-CRKP/ CR-hvKP | | |
| 患者直接接触物品 | 被褥 | 124 | 12 | 7 | 6 | 4 | 9.68 | A(3)、C(2)、D(2)、E(2)、F(2)、H(1) |
| | 床(扶手、床栏等) | 242 | 6 | 3 | 3 | 2 | 2.48 | A(2)、C(1)、E(1)、H(2) |
| | 枕头 | 40 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2.50 | A(1) |
| 共用物品 | 垃圾桶 | 74 | 6 | 2 | 2 | 2 | 8.11 | A(2)、C(3)、D(1) |
| | 空调进/出风口 | 25 | 1 | 1 | 0 | 0 | 4.00 | A(1) |
| | 门把手 | 49 | 1 | 1 | 1 | 1 | 2.04 | D(1) |
| | 水龙头 | 91 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1.10 | A(1) |
| | 便器 | 62 | 3 | 1 | 2 | 0 | 4.84 | A(1)、G(1)、H(1) |
| 诊疗相关物品 | 病历夹 | 134 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0.75 | A(1) |
| | 治疗推车 | 125 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0.80 | E(1) |
| | 输液泵/架 | 212 | 5 | 3 | 1 | 1 | 2.36 | C(1)、D(2)、E(2) |
| 诊疗器械 | 呼吸机 | 115 | 4 | 2 | 2 | 1 | 3.48 | A(1)、D(1)、G(1)、H(1) |
| | 心电监护仪 | 122 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.82 | A(1) |
| | 血压计 | 15 | 1 | 1 | 0 | 0 | 6.67 | E(1) |
| 医护人员直接接触物品 | 工作服 | 121 | 4 | 1 | 1 | 0 | 3.31 | A(2)、C(1)、G(1) |
| | 洗手(消毒)瓶 | 149 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0.67 | B(1) |
| 保洁用品 | 清洗消毒车 | 93 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1.08 | E(1) |
| | 拖把 | 70 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1.43 | A(1) |
| 工作人员手 | 工作人员手 | 461 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0.43 | A(1)、C(1) |

注: 表中未检出 KP 的标本未列入。

2.2 分子分型与同源性检测结果 53 株 KP 共分成 17 种 ST 型, 其中 3 株未能分型。可分型菌株中 ST11 占比最多(24.53%, 13 株), 其次为 ST15 (18.87%, 10 株)、ST147 (9.43%, 5 株), ST23、ST3623 各检出 3 株(各占 5.66%), ST152、ST1326、ST34 各检出 2 株(各占 3.77%)。

基于 kaptive 对荚膜血清型进行预测, 53 株 KP 共得到 20 种荚膜 KL 型, 其中 KL64 型最多 (20.75%, 11 株), 其次为 KL19 (16.98%, 9 株)、KL25 (11.32%, 6 株), 与 hvKp 有关的主要型别 KL1 和 KL2 分别占 5.66% (3 株)、1.89% (1 株)。结合 ST 型别和荚膜 KL 型别分析, 发现 ST11 由 KL64、KL25 和 KL47 亚系构成, 分别占 46.15% (6/13)、46.15% (6/13)、7.69% (1/13); ST23 均由 KL1 亚系构成, ST15 由 KL19 和 KL112 亚系构成, 分别占 90.00% (9/10)、10.00% (1/10)。

采用 cgMLST 策略进行系统发育分析, 发现 53 株 KP 基因组进化分为 3 个主要分支(见图 1), 不同年份 KP 菌株在各分支上分布差异无统计学意义

($P>0.05$)。分支一 19 株 KP 有 10 种 ST 型, 优势型为 ST147 和 ST3623, 占该分支 42.11% (8 株); 分支二 17 株 KP 包含 4 种 ST 型, 优势型为 ST15 和 ST23, 占该分支 76.47% (13 株); 分支三 17 株 KP 包含 3 种 ST 型, 优势型为 ST11, 占该分支 76.47% (13 株)。

2.3 耐药特征及两种方法判断耐药结局的一致性 53 株 KP 对碳青霉烯类抗生素亚胺培南、美罗培南、厄他培南的耐药率分别为 47.17% (25 株)、41.51% (22 株)、49.06% (26 株)。检出 MDR-KP 36 株, 占 67.92%。其中, 2019 年检出 12 株, 2023 年检出 24 株, 检出率分别为 0.71% (12/1680)、1.45% (24/1656)。2019 和 2023 年 MDR 菌检出率比较, 差异有统计学意义 ($\chi^2 = 4.220, P = 0.04$)。MDR 菌耐药谱以青霉素类(阿莫西林/克拉维酸)、头孢菌素类(头孢呋辛、头孢他啶、头孢吡肟)、碳青霉烯类(厄他培南)、喹诺酮类(环丙沙星)和四环素类(四环素)抗菌药物为主, 占 52.78% (19/36)。1 株 KP(2019KP22) 对替加环素耐药, 2 株(2023KP14、2023KP27)对替



图 1 53 株 KP 聚类分布

Figure 1 Clustering distribution of 53 KP strains

加环素中介,3 株(2019KP05、2023KP24、2023KP27)
对多黏菌素 B 耐药。

在 CARD 数据库中检索耐药基因携带情况,53 株 KP 共检出 120 种耐药基因,其中 53 种与已知耐

药机制相关。磷霉素耐药基因 *fosA*、喹诺酮类耐药基因 *oqxAB* 检出率最高, 分别占 90.57% (48 株)、77.36% (41 株), 其次是四环素耐药基因 *tet(A)* (47.17%, 25 株), β -内酰胺耐药基因 *bla_{TEM-1B}* 和 *bla_{KPC-2}* 均占 43.40% (各 23 株), *bla_{LAP-2}*、*bla_{CTX-M-65}*、*bla_{SHV-106}* 分别占 30.19% (16 株)、22.64% (12 株)、18.87% (10 株), 喹诺酮类耐药基因 *qnrS1* 占 39.62% (21 株) 等。结合菌株 ST 型比较, 10 株 ST15 均携带 *bla_{SHV-106}*, 3 株 ST23 均携带 *bla_{SHV-190}*, 且这两种基因仅在对应 ST 型菌携带。ResFinder 数据库预测耐药, 将结果中预测为耐药 (标记 Resistance) 且与参考序列位点完全一致即 Identity 为 100% 的抗菌药物视为 WGS(R), 一致性 Identity < 100% 或不耐药 No resistance 的视为 WGS(I + S)。整理数据, 与对应抗菌药物 MIC 耐药试验折点判断为 R、I、S 的结果形成配对四格表, 进行一致性检验, 见表 3。结果显示, WGS 和 MIC 两种方法对头孢噻肟、头孢他啶、美罗培南的耐药结局判断有强一致性, 对庆大霉素和四环素的判断有较强一致性, 对环丙沙星、阿莫西林/克拉维酸、头孢西丁的判断一致性中等, 对阿奇霉素判断一致性差, 对氯霉素判断不具备一致性。

表 3 两种方法判断 KP 耐药结局的一致性分析

Table 3 Consistency of the two methods in judging KP drug resistance

| 抗菌药物类别 | 抗菌药物 | MIC 耐药率 (%) | 耐药结局 | WGS(株) | | Kappa | P |
|--------|-----------|-------------|------|--------|-------|-------|--------|
| | | | | R | I + S | | |
| 喹诺酮类 | 环丙沙星 | 58.49 | MIC | R | 26 | 5 | 0.570 |
| | | | | I + S | 6 | 16 | <0.001 |
| 青霉素类 | 阿莫西林/克拉维酸 | 50.94 | MIC | R | 18 | 9 | 0.549 |
| | | | | I + S | 3 | 23 | <0.001 |
| 头孢菌素类 | 头孢西丁 | 49.06 | MIC | R | 17 | 9 | 0.545 |
| | | | | I + S | 3 | 24 | <0.001 |
| | 头孢噻肟 | 62.26 | MIC | R | 31 | 2 | 0.881 |
| | | | | I + S | 1 | 19 | <0.001 |
| | 头孢他啶 | 58.49 | MIC | R | 29 | 2 | 0.845 |
| | | | | I + S | 2 | 20 | <0.001 |
| 碳青霉烯类 | 美罗培南 | 41.51 | MIC | R | 21 | 1 | 0.884 |
| | | | | I + S | 2 | 29 | <0.001 |
| 大环内酯类 | 阿奇霉素 | 37.74 | MIC | R | 3 | 17 | 0.180 |
| | | | | I + S | 0 | 33 | 0.022 |
| 氯霉素类 | 氯霉素 | 41.51 | MIC | R | 4 | 18 | 0.168 |
| | | | | I + S | 1 | 30 | 0.066 |
| 氨基糖苷类 | 庆大霉素 | 45.28 | MIC | R | 16 | 8 | 0.648 |
| | | | | I + S | 1 | 28 | <0.001 |
| 四环素类 | 四环素 | 52.83 | MIC | R | 22 | 6 | 0.776 |
| | | | | I + S | 0 | 25 | <0.001 |

2.4 毒力基因携带情况 53 株 KP 携带 155 种毒力基因,其中 26 种与荚膜、菌毛、铁载体等主要毒力因子有关。所有菌株携带的主要毒力基因包括菌毛基因 *fimH*、气杆菌素基因 *iutA*、肠杆菌素基因(*entA*、*entB*、*entC*、*entD*、*entE*、*entF*)。除 1 株(19KP06)外,其余菌株均检出 *iroN*。仅 1 株(23kp17)检出 *rmpA* 基因。其余主要毒力基因的阳性率:*mrkA*、*B*、*C*、*D*、*F* 分别为 90.57%、86.79%、90.57%、96.23%、92.45%,*fimA* 为 96.23%,*iucA*、*B*、*C*、*D* 均为 37.74%,*iroB*、*C*、*D* 均为 11.32%,*fyuA*、*irp1*、*ybtA* 分别为 71.70%、71.70%、69.81%。

2.5 CRKP、hvKP 和 hv-CRKP/CR-hvKP 检出情况

2.5.1 CRKP 检出 CRKP 28 株(占 52.83%),2019、2023 年 CRKP 检出率分别为 0.83%(14/1 680)、0.85%(14/1 656),差异无统计学意义($P>0.05$)。各医疗机构 CRKP 检出率:A 为 1.68%(10/596),B 为 0.23%(1/440),C 为 0.23%(1/440),D 为 1.19%(5/420),E 为 1.19%(5/420),F 为 0.48%(2/420),G 为 0.24%(1/420),H 为 1.67%(3/180)。

2.5.2 hvKP 检出 hvKP 20 株(占 37.74%),2019、2023 年 hvKP 检出率分别为 0.36%(6/1 680)、0.85%(14/1 656),2023 年 hvKP 检出率高于 2019 年($\chi^2=5.732$, $P=0.017$)。不同医疗机构 hvKP 检出率:A 为 1.68%(10/596),C 为 0.23%(1/440),D 为 0.95%(4/420),E 为 0.24%(1/420),F 为 0.24%(1/420),G 为 0.24%(1/420),H 为 1.11%(2/180),B 医院未检出。

2.5.3 hv-CRKP/CR-hvKP 检出 hv-CRKP/CR-hvKP 13 株(占 24.53%),2019、2023 年 hv-CRKP/CR-hvKP 检出率分别为 0.36%(6/1 680)、0.42%(7/1 656),差异无统计学意义($P>0.05$)。各医疗机构 hv-CRKP/CR-hvKP 检出率:A 为 0.84%(5/596),C 为 0.23%(1/440),D 为 0.95%(4/420),E 为 0.24%(1/420),F 为 0.24%(1/420),H 为 0.56%(1/180),B、G 未检出,不同医疗机构 hv-CRKP/CR-hvKP 检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.5.4 不同物体表面 按物体表面类型分组,分别对 CRKP、hvKP、hv-CRKP/CR-hvKP 检出率进行分析,结果显示各组间 CRKP、hvKP、hv-CRKP/CR-hvKP 检出率差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。

2.5.5 主要 ST 型 CRKP 菌株以 ST15-KL19(9 株)、ST11-KL25 型(6 株)、ST11-KL64 型(5 株)为主,此 3 种型别占 CRKP 的 71.43%(20/28);hvKP

菌株以 ST11-KL64(6 株)、ST11-KL25(6 株)和 ST23-KL1(3 株)型别为主,此 3 种优势型别占 hvKP 的 75.00%(15/20);hv-CRKP/CR-hvKP 菌株以 ST11-KL25(6 株)、ST11-KL64(5 株)型别为主,占 hv-CRKP/CR-hvKP 的 84.62%(11/13)。

3 讨论

ICU 环境是医院内患者感染的重要传播途径,对其进行监测至关重要。本研究关注医疗机构综合 ICU 环境中 KP 的污染状况,发现 KP 在 ICU 环境中广泛存在,且 ST 型别与国内优势株分布一致^[8-9],主要为 ST11 和 ST15,呈多样性分布。KP 检出率为 1.59%,低于刘晓杰等^[10]报道的 4.12%。KP 检出率在不同年份间较为稳定,但在不同医疗机构间存在差异。患者直接接触物品和共用物品的 KP 检出率高于工作人员手部标本。患者直接接触物品中,被褥的 KP 污染程度高于病床(扶手、床栏等)。结合已有研究,ICU 环境中最易被污染的物品为床面、输液泵、床头柜等^[11],提示医院感染的关键控制点为患者直接接触物品和共用物品,建议增加被褥等病房内患者高频接触物品的消毒频次。

本研究中,CRKP 总检出率为 0.84%,低于某次疑似医院感染暴发时环境调查的 4.84%^[12]。53 株 KP 对碳青霉烯类抗生素的耐药率为 41.51%~49.06%,高于全国细菌耐药监测网数据中 KP 对美罗培南的耐药率 26.0%~26.8%^[13-14],表明 CRKP 在综合 ICU 日常环境中检出较少,但在分离出的 KP 中占比较高,需引起重视。本研究分离的 28 株 CRKP 中,39.29% 属于 ST11 型 KL64 和 KL25 亚系,32.14% 属于 ST15 型 KL19 亚系,而同属 ST11 型的 KL47 亚系和 ST15 型 KL112 亚系均未发现对碳青霉烯类抗生素耐药。有学者对全国 CRKP 进行进化分析,发现 KL64 由 KL47 演化而来^[15],可能在演化过程中获得相关质粒,从而提高了耐药性。

基因测序结果显示,28 株 CRKP 携带多种 β -内酰胺酶基因,前八位依次为 *bla_KPC-2*、*bla_TEM-1B*、*bla_CTX-M-65*、*bla_LAP-2*、*bla_OXA-1*、*bla_SHV-106*、*bla_CTX-M-15*、*bla_SHV-182*。这些耐药基因与 A 类碳青霉烯酶(KPC)以及 TEM、SHV 等广谱 β -内酰胺酶的合成有关,可广泛参与细菌对 β -内酰胺类抗生素(如头孢菌素、青霉素)耐药。此外,本研究分析了表型药物敏感性试验与耐药基因预测结果的一致性,发现携带氯霉素类耐药基因 *catA2* 以及大环内酯类耐药基因 *mph(A)*、

mph(E)、*msr*(E)的菌株,其基因型与对应抗生素的体外耐药表型之间存在较大差异,提示在实际监测和研究中,仅依据抗菌药物耐药基因(ARGS)预测细菌耐药性存在局限性。

尽管本研究中 53 株 KP 中 hvKP 占比低于 CRKP,但 2023 年 hvKP 的检出率高于 2019 年,提示 ICU 环境中 KP 的毒力基因携带率可能增加,致病力增强。世界卫生组织(WHO)指出,碳青霉烯类耐药 ST23 型 hvKP 已成为全球公共卫生的一大威胁^[16]。本研究 20 株 hvKP 中有 3 株为 ST23 型,其中 1 株(2019KP13)对亚胺培南耐药,该株同时携带编码以下毒力因子的基因:菌毛(*mrkABCDF*、*fimAH*)、气杆菌素(*iucABCD*、*iutA*)、肠杆菌素(*entABCDEF*)、沙门菌素(*iroBCDN*)和耶尔森菌素(*fyuA*、*irp1*、*ybtA*)。这些毒力基因有助于细菌快速复制和繁殖,促进定植和生物膜形成及成熟,增强细菌毒力^[17]。该菌株的发现表明,本区域综合 ICU 环境中可能已出现 ST23 型 hvKP 通过获得碳青霉烯类耐药质粒转变为 CR-hvKP 的现象。更广泛的毒力与耐药共进化^[18]表现为 CRKP 获得毒力质粒后转变为 hv-CRKP。ST11-KL64 型是这种转变的典型代表^[19],因其具有增强的抗氧化能力而获得进化优势,且与该克隆型相关的毒力质粒表现出对 ST11 宿主的潜在偏好,使其具备更高的毒力基因携带率、更强的抗吞噬作用及生存优势^[20-21]。本研究分离的 6 株 ST11-KL64 型菌株中,5 株为 CRKP(2019KP14、2019KP15、2019KP16、2019KP17、2023KP15)。这些 CRKP 菌株均携带 *aadA2*、*bla*_{KPC-2}、*bla*_{LAP-2}、*fosA*、*qnrS1*、*tet(A)* 等耐药基因,部分菌株携带 *rmtB*、*bla*_{CTX-M-65}、*bla*_{TEM-1B}、*fosA3* 等耐药基因,均表现为多重耐药。同时,这 5 株菌还携带编码以下毒力因子的基因:菌毛(*mrkABCDF*、*fimAH*)、气杆菌素(*iucABCD*、*iutA*)、肠杆菌素(*entABCDEF*)、沙门菌素受体(*iroN*)、耶尔森菌素(*fyuA*、*irp1*、*irp2*、*ybtA*)等,表明它们具有高水平耐药性和高致病潜力。

CRKP 的临床治疗药物^[22]通常包括替加环素、多黏菌素和新型 β -内酰胺酶抑制剂复方制剂,如头孢他啶/阿维巴坦。本研究发现 1 株 CRKP(2019KP22)对替加环素和头孢他啶/阿维巴坦耐药,属于 ST15-KL19 型,携带四环素耐药基因 *tet(A)* 和 A 类碳青霉烯酶基因 *bla*_{KPC-2}。尽管该株不携带经典替加环素耐药基因 *tet(X)*,但其 *tet(A)* 基因发生突变,加之外排泵 *oqxAB* 和 *AcrAB-TolC* 外排系统的共同

作用^[23],可能导致了对替加环素的耐受表型。

综上所述,KP 在医疗机构综合 ICU 环境中污染广泛,主要表现为以 ST11 和 ST15 为优势的多样性分布。在本研究分离株中,CRKP 的比例高于 hvKP,但 KP 菌株的毒力基因携带率更高,存在致病力增强的危险。ST11-KL64 型具有生存优势和高水平的耐药性及致病潜力,与检出的 ST23 型相比,ST11-KL64 可能对公共卫生造成更大的威胁,提示临床需重视 ICU 环境的感染控制,并警惕未来可能的感染暴发风险。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] 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.
Jiang YT, Zhang K, Liu TJ, et al. Research progress on virulence and drug resistance mechanism of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(5): 473–480.
- [2] Huang WZ, Qiao F, Deng YH, et al. Analysis of risk factors associated with healthcare-associated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in a large general hospital: a case-case-control study[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2023, 42(5): 529–541.
- [3] 龙华婧, 邱芳华, 刘道利, 等. 中国 2017—2019 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及流行克隆特征[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(11): 1008–1015.
Long HJ, Qiu FH, Liu DL, et al. Resistance genes and prevalence clone characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China from 2017 to 2019[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(11): 1008–1015.
- [4] Tian DX, Liu X, Chen WJ, et al. Prevalence of hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* under divergent evolutionary patterns[J]. Emerg Microbes Infect, 2022, 11(1): 1936–1949.
- [5] 任玉莲, 陈晓燕, 纪晓, 等. 神经外科重症监护室碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌医院感染暴发调查及防控策略研究[J/OL]. 中国热带医学. (2024-10-12)[2025-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1064.r.20241011.1736.004.html>.
Ren YL, Chen XY, Ji X, et al. Investigation and research of infection prevention and control strategy about carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* nosocomial outbreak in neuro-surgical intensive care unit[J/OL]. China Tropical Medicine. (2024-10-12)[2025-02-20]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1064.r.20241011.1736.004.html>.

- [6] 黄勋, 邓子德, 倪语星, 等. 多重耐药菌医院感染预防与控制中国专家共识[J]. 中国感染控制杂志, 2015, 14(1): 1–9.
Huang X, Deng ZD, Ni YX, et al. Chinese experts' consensus on prevention and control of multidrug resistance organism healthcare-associated infection[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2015, 14(1): 1–9.
- [7] Russo TA, Olson R, Fang CT, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00776–18.
- [8] Heng H, Yang XM, Ye LW, et al. Global genomic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: a spatio-temporal population structure analysis[J]. Int J Antimicrob Agents, 2024, 63(2): 107055.
- [9] Wang Q, Wang RB, Wang SY, et al. Expansion and transmission dynamics of high risk carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* subclones in China: an epidemiological, spatial, genomic analysis[J]. Drug Resist Updat, 2024, 74: 101083.
- [10] 刘晓杰, 孙利群, 王艳秋, 等. 医院环境表面病原菌分布调查[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(18): 4454–4455.
Liu XJ, Sun LQ, Wang YQ, et al. Distribution of pathogenic bacteria from object surfaces in hospital environment[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(18): 4454–4455.
- [11] Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, et al. Environmental contamination by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(1): 177–181.
- [12] 黄平平, 袁军, 高佳, 等. 神经外科 ICU 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染疑似暴发调查与控制[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(10): 1271–1278.
Huang PP, Yuan J, Gao J, et al. Investigation and control of a suspected outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection in neurosurgical intensive care unit[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2024, 23(10): 1271–1278.
- [13] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2019 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(3): 233–243.
Hu FP, Guo Y, Zhu DM, et al. CHINET surveillance of bacterial resistance across tertiary hospitals in 2019[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2020, 20(3): 233–243.
- [14] 郭燕, 胡付品, 朱德妹, 等. 2023 年 CHINET 中国细菌耐药监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2024, 24(6): 627–637.
Guo Y, Hu FP, Zhu DM, et al. Antimicrobial resistance profile of clinical isolates in hospitals across China: report from the CHINET Antimicrobial Resistance Surveillance Program, 2023[J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2024, 24(6): 627–637.
- [15] Zhou K, Xue CX, Xu TT, et al. A point mutation in recC associated with subclonal replacement of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11 in China [J]. Nat Commun, 2023, 14(1): 2464.
- [16] World Health Organization. Antimicrobial resistance, hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-global situation [EB/OL]. (2024-07-31) [2024-12-20]. <https://www.who.int/emergencies/diseases-outbreak-news/item/2024-DON527>.
- [17] Wang SY, Ding Q, Zhang YW, et al. Evolution of virulence, fitness, and carbapenem resistance transmission in ST23 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with the capsular polysaccharide synthesis gene wcaJ inserted via insertion sequence elements[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10(6): e0240022.
- [18] Wu CY, Huang Y, Zhou PY, et al. Emergence of hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from 2014–2021 in Central and Eastern China: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. BMC Microbiol, 2024, 24(1): 465.
- [19] Wang RB, Zhang AR, Sun SJ, et al. Increase in antioxidant capacity associated with the successful subclone of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11-KL64 [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 67.
- [20] Wang Q, Wang RB, Wang SY, et al. Expansion and transmission dynamics of high risk carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* subclones in China: an epidemiological, spatial, genomic analysis[J]. Drug Resist Updat, 2024, 74: 101083.
- [21] Wang RB, Zhang AR, Sun SJ, et al. Increase in antioxidant capacity associated with the successful subclone of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST11-KL64 [J]. Nat Commun, 2024, 15(1): 67.
- [22] 梁铃, 朱卫民. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染的治疗进展[J]. 中国现代医药杂志, 2024, 26(10): 97–101.
Liang L, Zhu WM. Progress in the treatment of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Modern Medicine Journal of China, 2024, 26(10): 97–101.
- [23] Su WY, Wang WJ, Li L, et al. Mechanisms of tigecycline resistance in Gram-negative bacteria: a narrative review[J]. Eng Microbiol, 2024, 4(3): 100165.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:杨博雯,王远萍,徐依盈,等.基于全基因组测序的 ICU 环境中肺炎克雷伯菌耐药及分子特征分析[J].中国感染控制杂志,2025,24(9):1229–1236. DOI: 10.12138/j.issn.1671–9638.20257358.

Cite this article as: YANG Bowen, WANG Yuanping, XU Yingying, et al. Antimicrobial resistance and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit environment based on whole genome sequencing[J]. Chin J Infect Control, 2025, 24(9): 1229–1236. DOI: 10.12138/j.issn.1671–9638.20257358.