

DOI:10.16781/j.0258-879x.2020.10.1109

· 论 著 ·

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学特征及分子生物学研究

李雪娇[△], 马 炜[△], 郭 杰, 万玉香, 李亚周, 秦 琴*

海军军医大学(第二军医大学)长海医院实验诊断科, 上海 200433

[摘要] **目的** 了解医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的分布特点、耐药性和分子生物学特征, 为指导临床合理使用抗菌药物、防控CRKP院内传播提供依据。**方法** 收集我院2019年1月至12月临床分离的非重复CRKP菌株, 采用VITEK 2 Compact全自动微生物分析仪和纸片扩散法(Kirby-Bauer法)进行细菌鉴定和药物敏感试验, 采用WHONET 5.6软件对CRKP的检出率、标本来源、临床科室分布等进行统计分析。通过拉丝试验筛选高黏表型菌株, PCR检测碳青霉烯酶耐药基因、荚膜血清型和毒力基因。**结果** 共检出肺炎克雷伯菌532株, 其中CRKP 140株(26.3%)。CRKP菌株主要分离自痰/支气管肺泡灌洗液(66株, 47.1%), 其次为尿液(21株, 15.0%)。临床科室分布主要为心血管外科ICU(47株, 33.6%)、烧伤科ICU(18株, 12.9%)和急诊科(18株, 12.9%)。药物敏感试验结果显示CRKP除对替加环素敏感外, 对其他抗菌药物的耐药率均在50%以上, 其中对第1~4代头孢菌素类抗生素的耐药率均在85%以上, 对碳青霉烯类药物的耐药率最高可达100.0%。耐药基因检测结果显示, 121株CRKP中检出101株(83.5%)携带肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶2(KPC-2)1种基因, 7株(5.8%)携带苯唑西林酶48(OXA-48)1种基因, 2株(1.7%)携带新德里金属β-内酰胺酶1(NDM-1)1种基因, 1株同时携带KPC-2和NDM-1基因, 1株同时携带KPC-2和OXA-48基因, 9株未检出目的耐药基因。15株(12.4%, 15/121)CRKP拉丝试验阳性, 其中13株为K64荚膜型, 2株为K47荚膜型; 14株检测到至少1种毒力基因。**结论** 我院CRKP临床分离率高, 对多种抗菌药物耐药, 以K64荚膜型高毒力CRKP为主, 提示临床应进一步加强耐药监测, 合理使用抗菌药物, 以防止耐药菌株和高毒力菌株的传播和流行。

[关键词] 肺炎克雷伯菌; 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 细菌抗药性; 高黏表型; 毒力

[中图分类号] R 378.23 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2020)10-1109-06

Epidemiological characteristics and molecular biology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

LI Xue-jiao[△], MA Wei[△], GUO Jie, WAN Yu-xiang, LI Ya-zhou, QIN Qin*

Department of Laboratory Medicine, Changhai Hospital, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To investigate the distribution, drug resistance and molecular biological characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in our hospital, so as to provide reference for rational use of antibiotics and prevention and control of nosocomial CRKP infection. **Methods** Non-repetitive CRKP strains were collected from Jan. to Dec. 2019 in our hospital. VITEK 2 Compact automatic microbial analyzer and Kirby-Bauer test were used for bacterial identification and antimicrobial susceptibility analysis. WHONET 5.6 software was used to analyze CRKP detection rate, sample source and clinical department distribution. Hypermucoviscosity phenotype strains were screened by string test. Carbapenemase resistance genes, capsular serotype and virulence genes were detected by polymerase chain reaction (PCR). **Results** A total of 532 *Klebsiella pneumoniae* strains were detected, including 140 (26.3%) CRKP strains. The CRKP strains were mainly isolated from sputum and bronchoalveolar lavage fluid (66 strains, 47.1%), followed by urine (21 strains, 15.0%). The clinical departments of the isolates were mainly cardiovascular surgery intensive care unit (ICU) (47 strains, 33.6%), burn ICU (18 strains, 12.9%) and emergency department (18 strains, 12.9%). The antimicrobial susceptibility test showed that the CRKP strains were susceptible only to tigecycline, with resistance rates being over 50% to other common

[收稿日期] 2020-08-27 **[接受日期]** 2020-09-25

[基金项目] 海军军医大学(第二军医大学)长海医院青年启动基金(2019QNB08), 军队生物安全重点专项课题(19SWAQ06). Supported by Youth Initial Fund of Changhai Hospital of Naval Medical University (Second Military Medical University) (2019QNB08) and Special Research Project of Military Biosecurity (19SWAQ06).

[作者简介] 李雪娇, 硕士, 初级技师. E-mail: 316483906@qq.com; 马 炜, 初级技师. E-mail: 327550447@qq.com

[△]共同第一作者(Co-first authors).

*通信作者(Corresponding author). Tel: 021-31162075, E-mail: qinq78@163.com

antibiotics. The resistance rates to the first to fourth generation cephalosporin antibiotics were above 85%, and the resistance rates to carbapenems were up to 100.0%. We also found that out of the 121 CRKP strains, 101 (83.5%) carried *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2 (*KPC-2*) gene, seven (5.8%) with oxacillinase-48 (*OXA-48*) gene, and two (1.7%) with New Delhi metallo- β -lactamase 1 (*NDM-1*) gene; while one carried both *KPC-2* and *NDM-1* genes, and one carried both *KPC-2* and *OXA-48* genes; and nine carried no target drug-resistance genes. Fifteen (12.4%, 15/121) CRKP strains were positive for string test, with 13 being *K64* capsular type and two being *K47* capsular type; and 14 strains carried at least one virulence gene.

Conclusion The clinical isolation rate of CRKP is high in our hospital, and the CRKP strains (mainly *K64* capsular high virulence) are resistant to multiple antibiotics, suggesting that we should further strengthen the monitoring of drug resistance and rational use of antibiotics, so as to prevent the spread and prevalence of drug-resistant and highly virulent strains.

[Key words] *Klebsiella pneumoniae*; carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; bacterial drug resistance; hypermucoviscosity phenotype; virulence

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2020, 41(10): 1109-1114]

肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 是常见的机会性致病菌, 是引起社区获得性感染和医院获得性感染的重要病原菌之一, 可引发肠外感染, 包括呼吸道感染、尿路感染、肝脓肿、内源性眼内炎、手术部位软组织感染和血流感染等, 严重者可危及生命^[1-2]。随着碳青霉烯类抗菌药物的广泛使用, 临床上耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌 (carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) 的检出率不断增加, 2018 年中国细菌耐药监测网数据显示 CRKP 检出率高达 26.3%^[3], 给公共卫生和临床抗感染治疗带来严峻挑战。本研究回顾性分析了本院 2019 年 1 月至 12 月 CRKP 的临床分布、耐药性和分子生物学特征, 以期为指导临床合理使用抗菌药物、防控 CRKP 院内传播提供依据。

1 材料和方法

1.1 菌株来源 收集 2019 年 1 月至 12 月本院临床分离的 CRKP 菌株。入选标准: 药物敏感试验结果显示至少对美罗培南、亚胺培南、厄他培南中的 1 种药物耐药。利用 WHONET 5.6 软件进行统计学分析, 剔除同一患者同一部位分离的重复菌株。本研究通过本院伦理委员会审批。

1.2 细菌鉴定与药物敏感性分析 采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪 (法国生物梅里埃公司) 和 Microflex 飞行时间质谱仪 (德国布鲁克公司) 对分离菌株进行鉴定。采用 VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪对菌株进行体外药物敏感试验, 用纸片扩散法 (Kirby-Bauer 法, 纸片购自英国 Oxoid 公司) 进行药物敏感补充试验, 试验结果严格参照美国临床和实验室标准协会 (Clinical and

Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S29 标准^[4]判读。质控菌株为大肠埃希菌 (ATCC25922) 和铜绿假单胞菌 (ATCC27853), 均由上海市临床检验中心提供。

1.3 耐药基因检测 采用多重 PCR 技术检测相关耐药基因, 其中碳青霉烯酶金属酶耐药基因包括新德里金属 β -内酰胺酶 (New Delhi metallo- β -lactamase, *NDM*)、亚胺培南酶 (imipenemase, *IMP*)、维罗纳整合子编码金属 β -内酰胺酶 (Verona integron-encoded metallo- β -lactamase, *VIM*)、圣保罗金属 β -内酰胺酶 (Sao Paulo metallo- β -lactamase, *SPM*)、非金属酶耐药基因包括肺炎克雷伯杆菌碳青霉烯酶 (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, *KPC*)、*BIC*、苯唑西林酶 48 (oxacillinase-48, *OXA-48*)。采用加热煮沸法获取细菌 DNA: 挑取 1~2 个新鲜菌落至含 0.5 mL 灭菌双蒸水的 1.5 mL 离心管中, 震荡混匀后将离心管置于 100 °C 沸水浴中煮 10 min, 然后放入 4 °C 冰箱冷却, 待离心管内液体冷却后以 11 000×g 离心 5 min, 然后吸取上清液至 1.5 mL 灭菌离心管中, -20 °C 冰箱保存备用。引物序列和具体 PCR 体系参照文献^[5], 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司代为合成, PCR 所需试剂购自日本 TaKaRa 公司。反应条件: 94 °C 5 min, 94 °C 30 s、55 °C 40 s、72 °C 50 s 循环 30 次, 72 °C 7 min。扩增结束后吸取 5 μ L 扩增产物与 1 μ L 上样缓冲液混匀, 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。阳性扩增产物由上海凌恩生物科技有限公司测序, 测序结果与 GenBank 数据库比对以证实扩增产物为目的基因片段。

1.4 菌株高黏表型分析 应用拉丝试验 (string test) 检测 CRKP 高黏表型。将 CRKP 接种于 5%

血琼脂平板, 35 °C 孵育过夜, 次日用一次性接种环挑取新鲜单个菌落, 形成的黏液丝长度 > 5 mm 定义为拉丝试验阳性。

1.5 菌株荚膜血清型和毒力基因检测 采用多重PCR技术检测相关基因的表达, CRKP 荚膜多糖基因包括 *K1*、*K2*、*K5*、*K20*、*K47*、*K54*、*K57*、*K64*, 毒力基因包括黏液表型调节基因 A (regulator of mucoid phenotype A, *rmpA*)、*rmpA2*、铁载体中气杆菌素受体基因 (ferric aerobactin receptor, *iutA*)、铁载体中沙门菌素受体基因 (siderophore salmochelin receptor, *iroN*)。引物序列参照文献[6], 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司代为合成, PCR 所需试剂购自日本 TaKaRa 公司。细菌 DNA 模板制备、PCR 条件、琼脂糖凝胶电泳等操作均同 1.3 项。阳性扩增产物由上海凌恩生物科技有限公司测序, 测序结果与 GenBank 数据库比对以证实扩增产物为目的基因片段。

1.6 统计学处理 应用 WHONET 5.6 软件进行数据处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料以菌株数和百分数表示。

2 结果

2.1 CRKP 总体分布 2019 年 1 月至 12 月, 我院共检出肺炎克雷伯菌 532 株, 其中 CRKP 140 株 (26.3%)。CRKP 来源于 140 例患者, 其中男性患者 101 株 (72.1%), 来源于 50 岁以上患者 99 株 (70.7%)。患者年龄为 14~91 岁, 平均年龄为 (57.7 ± 16.5) 岁。男性患者平均年龄为 (56.2 ± 16.9) 岁, 女性患者平均年龄为 (61.4 ± 14.9) 岁。

2.2 CRKP 标本来源与临床科室分布 140 株 CRKP 主要分离自痰/支气管肺泡灌洗液 (66 株, 47.1%), 其次为中段尿 (21 株, 15.0%), 分离自血液 13 株 (9.3%)、分泌物 12 株 (8.6%)、引流液 11 株 (7.9%)、静脉导管 4 株 (2.9%)、胆汁 2 株 (1.4%) 及其他标本 11 株 (7.9%)。

ICU 检出 CRKP 最多 (65 株, 46.4%), 包括心血管外科 ICU 47 株 (33.6%) 和烧伤科 ICU 18 株 (12.9%); 其次为急诊科 (18 株, 12.9%)、呼吸科病区 (9 株, 6.4%)、消化科病区 (9 株, 6.4%)、心血管科病区 (6 株, 4.3%)、神经内科病区 (6 株, 4.3%)、泌尿外科门诊 (5 株, 3.6%)、器官移植

科 (3 株, 2.1%) 和其他科室 (19 株, 13.6%)。

2.3 CRKP 耐药率分析 抗菌药物敏感试验结果显示, CRKP 对大多数抗菌药物有较高的耐药率, 对第 1~4 代头孢菌素类抗生素的耐药率均在 85% 以上, 对碳青霉烯类药物 (厄他培南、亚胺培南、美罗培南) 的耐药率最高可达 100.0%, 仅对替加环素的耐药率较低 (<10%)。见表 1。

表 1 CRKP 对抗菌药物的耐药率和敏感率
Tab 1 Resistant and sensitive rates of CRKP to antimicrobial agents

Antibacterial agent	N	n (%)	
		Drug-resistant	Drug-sensitive
Cefoperazone/sulbactam	140	138 (98.6)	1 (0.7)
Ampicillin/sulbactam	140	140 (100.0)	0
Piperacillin/tazobactam	140	132 (94.3)	2 (1.4)
Cefazolin	140	140 (100.0)	0
Cefuroxime	139	139 (100.0)	0
Ceftazidime	140	139 (99.3)	1 (0.7)
Ceftriaxone	140	138 (98.6)	2 (1.4)
Cefepime	140	136 (97.1)	3 (2.1)
Cefotetan	131	117 (89.3)	8 (6.1)
Cefoxitin	122	122 (100.0)	0
Aztreonam	140	138 (98.6)	2 (1.4)
Ertapenem	140	140 (100.0)	0
Imipenem	140	125 (89.3)	10 (7.1)
Meropenem	133	125 (94.0)	3 (2.3)
Amikacin	134	83 (61.9)	51 (38.1)
Gentamicin	140	104 (74.3)	33 (23.6)
Tobramycin	140	100 (71.4)	32 (22.9)
Ciprofloxacin	140	136 (97.1)	2 (1.4)
Levofloxacin	140	136 (97.1)	4 (2.9)
Compound trimethoprim	140	105 (75.0)	35 (25.0)
Fosfomycin	140	73 (52.1)	40 (28.6)
Tigecycline	140	13 (9.3)	76 (54.3)

CRKP: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

2.4 CRKP 耐药基因检测结果 对 140 株 CRKP 进行分离培养, 去除污染菌株和缺失菌株, 最终成功分离培养 CRKP 121 株。PCR 检测碳青霉烯酶耐药基因结果显示, 121 株 CRKP 共检出 101 株 (83.5%) 携带 *KPC* 1 种基因, 7 株 (5.8%) 携带 *OXA-48* 1 种基因, 2 株 (1.7%) 携带 *NDM* 1 种基因, 1 株同时携带 *KPC* 和 *NDM* 基因, 1 株同时携带 *KPC* 和 *OXA-48* 基因; 9 株未检测出目的耐药基因。挑取部分阳性产物测序, 测序结果与 GenBank 数据库比

对证实均为目的耐药基因,其中KPC为KPC-2,NDM为NDM-1。

2.5 CRKP高黏表型毒力分析 121株CRKP中15株(12.4%)拉丝试验阳性。荚膜血清型检测结果显示13株为K64型,2株为K47型。毒力基因检测发现14株检测到毒力基因,其中*rmpA*、*rmpA2*阳性各14株,*iroN*阳性10株,*iutA*阳性9株。见表2。

表2 15株拉丝试验阳性CRKP荚膜血清型及毒力基因检测结果

Tab 2 Detection of capsular serotype and virulence genes of 15 string test positive CRKPs

ID	Genotype	String test	Capsular serotype	Virulence gene			
				<i>rmpA</i>	<i>rmpA2</i>	<i>iutA</i>	<i>iroN</i>
9K-2	KPC-2	+	K64	+	+	-	+
9K-7	Unknown	+	K64	+	+	+	-
9K-23	KPC-2	+	K64	+	+	-	-
9K-29	KPC-2	+	K64	+	+	-	-
9K-44	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-57	KPC-2	+	K47	-	-	-	-
9K-62	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-74	KPC-2	+	K64	+	+	-	+
9K-76	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-78	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-80	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-89	KPC-2	+	K47	+	+	-	+
9K-100	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-104	KPC-2	+	K64	+	+	+	+
9K-118	KPC-2	+	K64	+	+	+	-

CRKP: Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; KPC-2: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2; *rmpA*: Regulator of mucoid phenotype A; *iutA*: Ferric aerobactin receptor; *iroN*: Siderophore salmochelin receptor. “+” indicates positive result; “-” indicates negative result

3 讨论

近年来随着碳青霉烯类抗菌药物在临床上的大量应用,耐碳青霉烯类病原菌的比例不断增加,2017年WHO将其列为关键(紧急)级别,因此耐碳青霉烯类病原菌已成为全球公共卫生的严重威胁。本研究回顾性分析了2019年我院临床分离的CRKP情况,共检出CRKP 140株,占检出肺炎克雷伯菌总数的26.3%(140/532),较我院2014—2017年的检出率(17.3%)有所升高^[7]。本研究标本主要来源于50岁以上患者(70.7%,99/140)及

ICU患者(46.4%,65/140),男性患者居多(72.1%,101/140),分离自呼吸道标本(47.1%,66/140)最多,其次为尿液(15.0%,21/140)、血液(9.3%,13/140)等,与既往报道^[7-9]一致。分析原因可能在于高龄患者通常免疫力低下,容易发生CRKP感染;ICU患者病情危重,呼吸机安置和导尿管留置等侵入性操作较多,且ICU患者住院时间长,长期使用抗菌药物等均增加了CRKP感染的风险^[10-11]。研究表明ICU患者中男性相较于女性更易发生院内感染^[12],而我院CRKP主要分离自ICU,这可能是导致我院CRKP感染患者中男性居多的原因。今后应重点关注临床ICU患者和高龄患者,并加强环境卫生和医疗器械消毒,重视医护人员无菌操作,从而防止CRKP医源性感染和院内传播。

本研究药物敏感试验结果显示,我院2019年检出的CRKP对临床绝大多数抗菌药物耐药,其中对碳青霉烯类药物厄他培南、美罗培南、亚胺培南的耐药率分别为100.0%、94.0%和89.3%,高于我院2014—2017年的耐药率(分别为82.1%、88.3%、65.5%)^[7]。对第1~4代头孢菌素类抗生素的耐药率均在85%以上,对环丙沙星、左氧氟沙星的耐药率均为97.1%,仅对替加环素相对敏感[敏感率为54.3%(76/140)]。这在很大程度上限制了临床用药选择,长期替加环素单一治疗也会导致细菌耐药^[13]。目前国内外研究表明采用多黏菌素、替加环素和碳青霉烯类为基础的药物联合应用治疗CRKP感染的疗效明显优于单药治疗^[14-16],对CRKP感染可增做多黏菌素等药物敏感试验。本研究未对多黏菌素的耐药情况进行分析。近年来,多黏菌素因其耐药率低、治疗效果显著等优势已成为临床上治疗多重耐药革兰阴性菌感染的最后一道屏障^[16]。但研究表明多黏菌素的耐药率有上升趋势^[17-18],因此防范多黏菌素耐药也至关重要。

CRKP的耐药机制复杂,包括产碳青霉烯酶、产高水平的AmpC酶或超广谱β-内酰胺酶(extended-spectrum β-lactamase, ESBL)、外膜蛋白编码基因缺失或突变、药物作用靶点改变和外排泵系统高表达等^[19],其中最主要的是产碳青霉烯酶^[20]。本研究对临床常见的碳青霉烯酶基因检测发现,83.5%(101/121)的CRKP携带KPC-2 1种基因,这与胡付品等^[3]报道的中国各地区CRKP以KPC-2基因为主的结果一致。检出7株

CRKP 携带 *OXA-48* 1 种基因, 占 5.8% (7/121), 较我院 2015—2017 年的检出率 (43.9%) 显著降低^[21]。检出 2 株 CRKP 携带 *NDM-1* 1 种基因, 占 1.7% (2/121), 其检出率较低的原因是携带 *NDM* 基因的耐药细菌主要在中东地区流行, 而在中国等国家检出率较低^[22]。本研究另检出同时携带 *KPC-2* 和 *NDM-1* 基因及同时携带 *KPC-2* 和 *OXA-48* 基因的 CRKP 各 1 株。近年有关于 *KPC-2* 和 *OXA-48* 基因共存于 CRKP 的报道^[23]。此外, 全基因组测序发现 *KPC-2* 和 *NDM-1* 基因可分布于不同的质粒中, CRKP 可包含多种耐药质粒^[24]。以上研究结果均证实 CRKP 有多种碳青霉烯酶耐药基因并存情况。本研究中有 9 株 CRKP 未检测出目的耐药基因, 是因为本研究仅对部分常见的碳青霉烯酶基因进行了检测, 这些菌株可能为非产碳青霉烯酶类 CRKP, 后续实验将进一步完善其他耐药机制检测, 如是否产 AmpC 酶或 ESBL、外膜蛋白编码基因是否缺失等。由于 *KPC*、*NDM*、*OXA-48* 等耐药基因大多存在于质粒等可移动基因元件中, 通过质粒或转座子进行菌株间的水平或垂直传播^[22], 这些耐药基因可能具有同源性, 后续可通过脉冲场凝胶电泳和多位点序列分型等实验对 CRKP 进行同源性分析, 以便更好地了解菌株的耐药传播机制, 减少产碳青霉烯酶菌株的产生及播散, 预防院内感染。

本研究发现拉丝试验阳性菌株 15 株 (12.4%, 15/121), 为高黏表型肺炎克雷伯菌。其中 13 株为 *K64* 荚膜型, 2 株为 *K47* 荚膜型, 与既往报道的高毒力肺炎克雷伯菌 (hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP) 多为 *K1*、*K2* 荚膜型的观点^[25] 不同。高黏表型与肺炎克雷伯菌高毒力密切相关, 临床上通常将拉丝试验阳性的肺炎克雷伯菌菌株定义为 hvKP^[26], 但有研究指出, 并非所有的 hvKP 都表现高黏表型, 拉丝试验阳性和血清型检测不能作为鉴定 hvKP 的确切标准^[27]。

目前多认为高黏表型合并检出毒力基因的肺炎克雷伯菌为 hvKP。本研究对 15 株拉丝试验阳性菌株进行常见的毒力基因检测发现有 14 株检测到毒力基因, 其中 *rmpA*、*rmpA2*、*iroN* 和 *iutA* 均有不同比例的表达, 说明至少有 14 株为耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌 (carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP)。*rmpA*、*rmpA2*

是高黏表型调节基因, 能调控荚膜合成, 是形成高黏表型的重要因子^[28]。*iroN* 和 *iutA* 是铁载体系统相关基因, 铁载体系统被认为是 hvKP 具有高毒力的重要原因之一。高毒力与高耐药性并存给临床治疗和基础研究带来严峻挑战, Gu 等^[29] 报道了一起致命性院内 CR-hvKP 暴发事件。在中国以外的其他地区也有 CR-hvKP 感染的报道^[30]。因此, CR-hvKP 可能成为下一个“超级细菌”, 其传播机制和流行特征有待明确。本研究仅初步筛选了 CRKP 中的 CR-hvKP, 明确了荚膜血清分型, 但這些 CR-hvKP 的具体形成机制尚不明确, 菌株之间是否存在亲缘关系, 毒力基因是否存在毒力质粒上, 以及毒力质粒是否为 pLVPK 等, 也需进一步研究。

综上所述, 了解 CRKP 耐药分布和分子生物学特征、加强防控 CRKP 的院内传播具有重要意义。建立完善的细菌耐药检测体系, 规范使用抗生素, 必要时加做分子生物学检测确定具体耐药基因型, 有利于指导临床个体化用药; 加强院内消毒及隔离措施, 规范医护人员无菌操作, 有利于减少和控制 CRKP 院内交叉感染。

[参 考 文 献]

- [1] 许立, 郭英华, 刘长庭. 肺炎克雷伯菌对临床常见抗生素耐药机制研究进展[J]. 解放军医学院学报, 2019, 40:186-189.
- [2] SHON A S, BAJWA R P, RUSSO T A. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. Virulence, 2013, 4: 107-118.
- [3] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 汪复, 蒋晓飞, 徐英春, 等. 2018 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20: 1-10.
- [4] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 29th ed. CLSI supplement M100-S29 [S]. Wayne: CLSI, 2019.
- [5] POIREL L, WALSH T R, CUVILLIER V, NORDMANN P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70: 119-123.
- [6] YU F, LV J, NIU S, DU H, TANG Y W, PITOUT J D D, et al. Multiplex PCR analysis for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenem-resistant (sequence type 258 [ST258] and ST11) and hypervirulent (ST23, ST65, ST86, and ST375) strains[J/OL]. J Clin Microbiol, 2018, 56: e00731-18. doi: 10.1128/JCM.00731-18.
- [7] 万玉香, 刘云, 李亚周, 马炜, 黄晓春, 秦琴. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的分布与耐药性分析[J]. 第二军

- 医大学学报,2019,40:716-720.
- WAN Y X, LIU Y, LI Y Z, MA W, HUANG X C, QIN Q. Distribution and drug resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40: 716-720.
- [8] 周开矿,邹杨,毕茹茹,顾兵.耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的分子流行特点及耐药机制[J].中华医院感染学杂志,2018,28:795-800.
- [9] 孙晔佳,顾克菊.某院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌检出与耐药表型分布[J].中国感染控制杂志,2017,16:130-133,137.
- [10] 鲁艳,刘东华.呼吸机相关性肺炎患者耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌病原菌分析及耐药性监测[J].临床肺科杂志,2020,25:853-856.
- [11] 马红映,汪丽,虞亦鸣,吕婉飞,丁群力,吕丹,等.院内获得耐碳青霉烯类抗菌药物肺炎克雷伯菌感染的危险因素分析[J].中华医院感染学杂志,2017,27:1456-1458.
- [12] 苗慧慧,杨立明,张艳丽.重症患者院内感染率的性别年龄差异性研究[J].实用医技杂志,2016,23:481-483.
- [13] CHOI M J, PECK K R, KO K S. Mutant prevention concentration of tigecycline for *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates[J]. J Antimicrob Chemother, 2015, 70: 621-622.
- [14] ZARKOTOU O, POURNARAS S, TSELIOTI P, DRAGOUMANOS V, PITIRIGA V, RANELLOU K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment[J]. Clin Microbiol Infect, 2011, 17: 1798-1803.
- [15] TUMBARELLO M, VIALE P, VISCOLI C, TRECARICHI E M, TUMIETTO F, MARCHESE A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy[J]. Clin Infect Dis, 2012, 55: 943-950.
- [16] 王影,李艳然,韩鏖竹,高铎,李欣南.多粘菌素耐药性的研究进展[J].微生物学通报,2017,44:200-206.
- [17] HAWLEY J S, MURRAY C K, JORGENSEN J H. Colistin heteroresistance in acinetobacter and its association with previous colistin therapy[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2008, 52: 351-352.
- [18] LIU Y Y, WANG Y, WALSH T R, YI L X, ZHANG R, SPENCER J, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16: 161-168.
- [19] GOODMAN K E, SIMNER P J, TAMMA P D, MILSTONE A M. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE)[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2016, 14: 95-108.
- [20] PATEL G, BONOMO R A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects[J]. Expert Rev Anti Infect Ther, 2011, 9: 555-570.
- [21] LI X, MA W, QIN Q, LIU S R, YE L Y, YANG J Y, et al. Nosocomial spread of OXA-232-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 in a teaching hospital, Shanghai, China[J/OL]. BMC Microbiol, 2019, 19: 235. doi: 10.1186/s12866-019-1609-1.
- [22] KUMARASAMY K K, TOLEMAN M A, WALSH T R, BAGARIA J, BUTT F, BALAKRISHNAN R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study[J]. Lancet Infect Dis, 2010, 10: 597-602.
- [23] LU M C, TANG H L, CHIOU C S, WANG Y C, CHIANG M K, LAI Y C. Clonal dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: two distinct sub-lineages of sequence type 11 carrying *bla_{KPC-2}* and *bla_{OXA-48}* [J]. Int J Antimicrob Agents, 2018, 52: 658-662.
- [24] FU L, WANG S M, ZHANG Z K, HU X Y, ZHANG L H, ZHU B L, et al. Whole genome sequence of *bla_{NDM}* and *bla_{KPC}* co-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate KSH203 with capsular serotype K25 belonging to ST11 from China[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 20: 272-274.
- [25] YU W L, KO W C, CHENG K C, LEE C C, LAI C C, CHUANG Y C. 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: 1-6.
- [26] SHON A S, RUSSO T A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: the next superbug?[J]. Future Microbiol, 2012, 7: 669-671.
- [27] 叶璟,黄金伟.致肝脓肿高毒力肺炎克雷伯菌的表型及分子特征[J].中国微生态学杂志,2019,31:638-641,646.
- [28] RUSSO T A, OLSON R, FANG C T, STOESSER N, MILLER M, MACDONALD U, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J/OL]. J Clin Microbiol, 2018, 56: e00776-18. doi: 10.1128/JCM.00776-18.
- [29] GU D, DONG N, ZHENG Z, LIN D, HUANG M, WANG L, 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: 37-46.
- [30] BEAN D C, AGARWAL A, CHERIAN B P, WAREHAM D W. Hypermucoviscous polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Kolkata, India: genomic and phenotypic analysis[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 17: 1-2.