

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20256485

· 论 著 ·

耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌全基因组测序及黏菌素耐药分析

储雯雯, 刘 周, 李 昕, 叶乃芳, 龚 真, 曾晓娇, 周 强

(安徽医科大学第二附属医院检验科, 安徽 合肥 230601)

[摘要] **目的** 通过全基因组测序分析临床耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的分子流行病学及黏菌素耐药基因,为临床诊疗提供参考。**方法** 收集 2021—2023 年安徽省某三级甲等综合医院住院患者临床标本分离的 57 株 CRKP,对所有菌株进行药敏试验。采用全基因组测序技术分析 CRKP 菌株多位点序列分型、荚膜血清型、耐药基因和毒力基因,并对所有菌株序列进行单核苷酸多态性分析,采用聚合酶链式反应(PCR)方法扩增与黏菌素耐药相关基因。**结果** 57 株 CRKP 对除替加环素外的 14 种抗菌药物均为耐药。测序结果显示,93.0%(53/57)的 CRKP 携带 *bla_{KPC-2}*,ST11 型 CRKP 菌株检出率最高(51/57, 89.5%)。单核苷酸多态性聚类分析表明,57 株 CRKP 分为 11 个克隆群,其中有 4 个克隆群均为 ST11-KL64 型 CRKP。40 株(70.2%)CRKP 携带多种毒力基因。5 株黏菌素耐药 CRKP,其耐药机制是在 *mgrB* 基因 70 位点处插入一个 ISKpn26 元件。**结论** CRKP 菌株以产 KPC-2 ST11-KL64 型为主要流行型,在重症监护病房有播散性流行。ISKpn26 元件插入引起 *mgrB* 基因突变与该地区 CRKP 黏菌素耐药有关。

[关键词] 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌;全基因组测序;单核苷酸多态性分析;黏菌素;耐药;ISKpn26

[中图分类号] R181.3⁺2 R378.99⁺6

Whole-genome sequencing and colistin resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*

CHU Wenwen, LIU Zhou, LI Xin, YE Naifang, GONG Zhen, ZENG Xiaojiao, ZHOU Qiang (Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the molecular epidemiology and colistin-resistant genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) by whole-genome sequencing, and to provide reference for clinical diagnosis and treatment. **Methods** 57 CRKP strains isolated from clinical specimens of hospitalized patients in a tertiary general first-class hospital in Anhui Province from 2021 to 2023 were collected and antimicrobial susceptibility testing was performed. Multilocus sequence typing, capsule serotype, resistance genes, and virulence genes of CRKP strains were analyzed by whole-genome sequencing technique, and single nucleotide polymorphism analysis was conducted on sequences of all strains. Colistin resistance-related genes were amplified by polymerase chain reaction (PCR). **Results** 57 CRKP strains exhibited resistance to 14 antimicrobial agents, with the exception of tigecycline. The sequencing results showed that 93.0% (53/57) of CRKP carried *bla_{KPC-2}*, and the ST11 type CRKP strain had the highest detection rate (51/57, 89.5%). Single nucleotide polymorphism clustering analysis showed that the 57 CRKP strains were divided into 11 clone groups, of which 4 clone groups were all ST11-KL64 type CRKP. 40 (70.2%) CRKP strains carried multiple virulence genes. Five strains of CRKP were colistin-resistant strains, the resistance mechanism involved the insertion of ISKpn26 element at site 70 of the *mgrB* gene. **Conclusion** The CRKP strain is

[收稿日期] 2024-05-11

[基金项目] 安徽医科大学第二附属医院临床研究培基计划项目(2021LCYB04);安徽省高校自然科学研究项目(2023AH053175);安徽省转化医学研究院科研基金项目(2023zhyx-C78);安徽省转化医学研究院科研基金项目(2021zhyx-C47)

[作者简介] 储雯雯(1984-),女(汉族),安徽省合肥市人,副主任技师,主要从事细菌耐药性监测方面研究。

[通信作者] 周强 E-mail: zhouqiang1973@163.com

primarily characterized by the production of KPC-2 ST11-KL64, with disseminated transmission in intensive care unit. The insertion of ISKpn26 element leading to *mgrB* gene mutation is related to resistance of CRKP to colistin in this region.

[Key words] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; whole-genome sequencing; single nucleotide polymorphism analysis; colistin; antimicrobial resistance; ISKpn26

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是一种临床上常见的革兰阴性条件病原菌,可感染人类和多种家畜,是医疗保健相关感染和新生儿败血症的主要病原菌^[1]。在健康人群中,KP 主要定植于胃肠道,口咽部浓度较低^[2]。在免疫功能低下或免疫缺陷的患者中,KP 可侵入血液或组织并引起多种感染,包括尿路感染、菌血症、肺炎和肝脓肿^[3]。此外,KP 是呼吸机相关肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)和重症监护病房(intensive care unit, ICU)获得性肺炎的主要病原体^[4],因此 KP 受到广泛关注。

碳青霉烯类药物被认为是治疗严重 KP 感染的有效抗生素。然而,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)因其快速传播而被认为是一个重大的公共卫生问题^[5]。2022 年我国 KP 对亚胺培南和美罗培南的平均耐药率分别为 22.6%、24.2%,*bla*_{KPC} 和 *bla*_{NDM} 编码的 KP 碳青霉烯酶(KPC)和新德里金属 β-内酰胺酶(NDM)是全球大多数国家导致 KP 耐碳青霉烯类药物的最常见因素,而苯唑西林酶-48(oxacillinase-48)在非洲最常见^[6-8]。此外,美国和中国均有报道,*bla*_{KPC} 和 *bla*_{NDM} 在 KP 中共存^[9-10]。虽然黏菌素被认为是治疗临床多重耐药 KP 感染的最后一道防线,但黏菌素耐药已成为世界范围内的一个重要问题^[11]。已有研究^[12]报道,KP 对黏菌素耐药,其耐药性是通过遗传变异介导的相关染色体突变。鉴于多重耐药菌感染临床治疗的障碍和对公共卫生的负面影响,了解 KP 的全基因组特征有助于更全面地评估其风险^[13]。

全基因组测序技术现已广泛应用于细菌学研究^[14]。细菌基因组的功能注释可以在遗传水平上产生丰富的数据^[15]。该技术在监测病原基因组进化和研究致病机制方面发挥着积极作用。本研究对安徽某省级三级甲等综合医院 2021—2023 年临床分离 CRKP 菌株全基因组进行测序,分析菌株克隆关系、耐药性和毒力基因分布,以期制定控制 CRKP 传播的有效策略和降低医院重症感染发病率提供重要依据。

1 对象与方法

1.1 研究对象 收集 2021 年 1 月 1 日—2023 年 12 月 31 日安徽省某三级甲等综合医院住院患者临床标本分离的非重复 KP 1 022 株,对所有 KP 临床分离株进行传代培养,通过药敏试验筛选出 57 株 CRKP 作为研究对象。以上菌株均在 -80℃ 保存。

1.2 研究方法

1.2.1 细菌鉴定及药敏试验 所有 KP 均采用德国布鲁克基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)仪鉴定。使用美国 BD Phoenix M50 全自动微生物药物敏感性分析及配套药敏卡分析各种抗菌药物的最低抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC)。质控菌株为 KP ATCC 700603 和 KP ATCC BAA-1705。药敏试验结果参照 2023 年美国临床实验室标准化协会(CLSI) M100 文件进行判读。替加环素药敏结果的判读按照美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)指南:MIC≤2 μg/mL,敏感;4 μg/mL,中介;≥8 μg/mL,耐药。黏菌素药敏结果判读按照欧洲药敏试验委员会(European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST)指南(第 10 版):MIC>2 μg/mL,耐药;≤2 μg/mL,敏感。

1.2.2 拉丝试验 拉丝试验用于识别 KP 高黏液性表型^[16]。将接种 KP 菌株的哥伦比亚血琼脂培养基置于 37℃ 培养 24 h 后,使用一次性接种环拉伸 KP 菌落的黏液线。如果黏液线长度>5 mm,则为拉丝试验阳性。

1.2.3 细菌全基因组测序、组装和注释 对收集的 CRKP 临床分离株进行全基因组测序。将 CRKP 的单菌落置于卢尼亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani, LB)肉汤中,37℃ 摇动过夜。采用经少量修饰的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)方法提取基因组 DNA^[17],使用 TruSeq DNA 样品制备试剂盒(Illumina, 美国)和模板制备试剂盒(Pacific Biosciences, 美国)测定 DNA

的浓度、质量和完整性,并生成测序文库。随后,由上海生物技术公司使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行基因组测序。使用 AdapterRemoval^[18] 和 SOAPec^[19] 去除适配器污染和数据过滤后进行数据组装。过滤后的读数由 SPAdes^[20] 和 A5-miseq^[21] 组装以构建支架和重叠群。

1.2.4 测序结果分析 将测序结果上传至相关网站进行分析。使用 ResFinder(<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>) 鉴定耐药基因,应用 <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/> 分析多位点序列分型(Multilocus Sequence Typing, MLST)。使用 <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/v5/main.cgi> 在线数据库分析相关毒力基因,并将携带两种以上毒力基因的 CRKP 定义为耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP)。

1.2.5 单核苷酸多态性(single-nucleotide poly-

morphism, SNP)分析 将所有菌株序列提交 CSI Phylogeny (<https://cge.food.dtu.dk/services/CSIPhylogeny/>) 进行 SNP 分析。将分析结果导入 FigTree 1.4.3 软件(<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) 生成最大似然树,根据近与远的关系对菌株进行分组。进化树使用 iTOL^[22] (<https://itol.embl.de>) 美化加工。

1.2.6 黏菌素耐药相关基因检测和分析 检测 CRKP 菌株质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr-1~9*, 以及染色体介导的双组分系统(*phoP/Q* 和 *pmrA/B*)、*mgrB* 基因。采用聚合酶链式反应(PCR)扩增黏菌素耐药相关基因^[23-25](见表 1)。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳显示并送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序,测序结果随后使用国家生物信息中心网站上的基本局部比对搜索工具(blaST)程序进行分析,插入序列(insertion sequence, IS)通过 IS finder 网站进行评估。

表 1 黏菌素耐药相关基因引物序列及扩增产物大小

Table 1 Primer sequences of colistin resistance-related genes and size of amplified products

基因	序列(5' - 3')	产物大小 (bp)	参考文献	基因	序列(5' - 3')	产物大小 (bp)	参考文献
<i>mcr-1</i>	AGTCCGTTTGTCTCTGTGGC AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	320	[23]	<i>mcr-8</i>	TTGTCGTCGTGGGCGAAAC CTGTCGCAAGTTGGGCTAAAG	514	[23]
<i>mcr-2</i>	AGCCGAGTCTAAGGACTTGATGAATTTG GCGGTATCGACATCATAGTCATCTTG	576	[23]	<i>mcr-9</i>	CGGCGAACTACGCTTACAG CGCACAGTTTCGGGTTATCAC	465	[23]
<i>mcr-3</i>	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG AATGGAGATCCCCGTTTTT	929	[23]	<i>phoP</i>	ATTGAAGAGGTTGCCGCCCGC GCTTGATCGGCTGGTCATTACC	136	[24]
<i>mcr-4</i>	AATTGTCGTGGGAAAAGCCGC CTGCTGACTGGGCTATTACCGTCAT	1 062	[23]	<i>phoQ</i>	ATATGCTGGCGAGATGGGAAAACGG CCAGCCAGGGAACATCACGCT	138	[24]
<i>mcr-5</i>	GTGAAACAGGTGATCGTGACTIONTACC CGTGCTTTACACCGATCATGTGCT	271	[23]	<i>pmrA</i>	TACGCCGAAAGAGTATGCC GGATCCGCGATTGCCAATC	170	[24]
<i>mcr-6</i>	ACTGACCAAGCCGAGTCTAAG GCATCACGGGATTGACATAGC	259	[23]	<i>pmrB</i>	TGCCAGCTGATAAGCGTCTT TTCTGGTTGTTGTGCCCTTC	95	[24]
<i>mcr-7</i>	GCGACCTCCTACCTGAATG CCCTTTGGCGACGACTTTG	345	[23]	<i>mgrB</i>	AAGGCGTTCATTCTACCACC TTAAGAAGCCGTGCTATCC	253	[25]

2 结果

2.1 CRKP 感染患者临床特征 临床分离的 57 株 CRKP,患者主要为男性(71.9%),年龄≥60岁的患

者占 56.1%,其中≥75 岁的患者占 22.8%,中位年龄 66 岁。CRKP 感染患者主要来自 ICU(52.6%)和呼吸内科(21.1%)。标本来源以呼吸道和血标本为主,分别占 56.1%、24.6%。CRKP 患者的人口和临床统计学特征见表 2。

表 2 CRKP 患者的人口和临床统计学特征

Table 2 Demographic and clinical statistic characteristics of CRKP patients

临床特征	例数(n = 57)	百分比(%)
年龄≥60 岁	32	56.1
性别		
男性	41	71.9
女性	16	28.1
标本类型		
痰	22	38.6
血	14	24.6
气管抽吸物	6	10.5
腹腔积液/腹腔引流液	6	10.5
支气管肺泡灌洗液	4	7.0
尿	3	5.3
穿刺液	2	3.5
病房		
ICU	30	52.6
呼吸内科	12	21.1
感染病科	4	7.0
神经外科	4	7.0
血液内科	3	5.3
肾脏内科	2	3.5
其他病房	2	3.5
基础疾病		
呼吸系统疾病	32	56.1
消化系统疾病	8	14.0
神经系统疾病	5	8.8
肿瘤	4	7.0
血液病	3	5.3
心血管疾病	2	3.5
泌尿系统疾病	2	3.5
其他疾病	1	1.8

2.2 CRKP 菌株耐药表型分析 57 株 CRKP 对多种抗菌药物耐药,所有菌株对碳青霉烯类、β-内酰胺类抗生素以及头孢哌酮/舒巴坦耐药,对环丙沙星和左氧氟沙星耐药率分别为 91.2%、87.7%,对妥布霉素和阿米卡星的耐药率分别为 21.2%、15.8%。见表 3、4。

表 3 57 株 CRKP 药敏试验结果[株(%)]

Table 3 Antimicrobial susceptibility testing results of 57 CRKP strains (No. of isolates [%])

抗菌药物	R	I	S
哌拉西林他/唑巴坦	45(78.9)	5(8.8)	7(12.3)
头孢他啶	57(100)	0(0)	0(0)
头孢曲松	57(100)	0(0)	0(0)
头孢吡肟	57(100)	0(0)	0(0)
头孢哌酮/舒巴坦	57(100)	0(0)	0(0)
氨曲南	4(7.0)	0(0)	53(93.0)
厄他培南	57(100)	0(0)	0(0)
亚胺培南	57(100)	0(0)	0(0)
美罗培南	57(100)	0(0)	0(0)
妥布霉素	12(21.1)	0(0)	45(78.9)
阿米卡星	9(15.8)	0(0)	48(84.2)
替加环素	0(0)	0(0)	57(100)
环丙沙星	52(91.2)	1(1.8)	4(7.0)
左氧氟沙星	50(87.7)	0(0)	7(12.3)
黏菌素	5(8.8)	0(0)	52(91.2)

注:R 为耐药;S 为敏感;I 为中介。

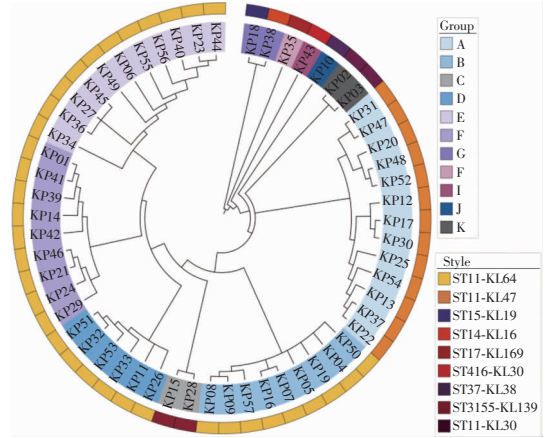
表 4 5 株黏菌素耐药 CRKP 的 MIC 值(μg/mL)

Table 4 MIC values of 5 colistin-resistant CRKP strains (μg/mL)

抗菌药物	KP02	KP17	KP20	KP46	KP47
哌拉西林/他唑巴坦	≥128	≥128	≥128	≥128	≥128
头孢他啶	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
头孢曲松	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
头孢吡肟	≥32	≥32	≥32	≥32	≥32
头孢哌酮/舒巴坦	≥64	≥64	≥64	≥64	≥64
氨曲南	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16
厄他培南	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8
亚胺培南	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16
美洛培南	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16
妥布霉素	≤1	≥16	≥16	≥16	≥16
阿米卡星	≤2	≥64	≥64	≥64	≥64
替加环素	1	1	1	1	1
环丙沙星	≥4	≥4	≥4	≥4	≥4
左氧氟沙星	≥8	≥8	≥8	≥8	≥8
黏菌素	16	32	8	16	16

2.3 CRKP 单核苷酸多态性分析 全基因组测序和核心基因组系统发育分析结果显示,57 株菌株以 ST11 型 CRKP 菌株为主(51 株,89.5%),分别是 ST11-KL64,ST11-KL47,ST11-KL30。其中 ST11-KL64 型 CRKP 形成 B、D、E、F 四个克隆群,从 2021 年 12 月—2023 年 8 月由外科 ICU、内科 ICU 和神经外科等科室检出。13 株 ST11-KL47 型 CRKP 形成克隆群 A,该克隆群菌株均是 2021 年 3—5 月从外科 ICU 患者标本中分离。同时还发现其他 ST 型别呈散在分布。见图 1。

2.4 CRKP 耐药和毒力基因分布情况 57 株 CRKP 均携带碳青霉烯类耐药基因,以携带 *bla*_{KPC-2} (53/57,93.0%)最为常见,其次是 *bla*_{NDM-1} (7.0%, 4/57)。此外,53 株(93.0%)CRKP 菌株携带 5 种以上耐药基因。菌株 *iucA*、*iroN*、*rmpA* 和 *rmpA2* 毒力基因检测显示,40 株(70.2%)携带两种及以上毒力基因,均为 CR-HvKP,其中 4 株携带 4 种毒力基因。见图 2。



注:最大似然系统发育树基于 57 株 CRKP 分离株核心基因组的单核苷酸多态性,基因簇和分型用不同的颜色表示。

图 1 CRKP 分离株的核心基因组系统发育、ST 型和荚膜型分布

Figure 1 Distribution of core genome phylogeny, ST and capsule types of CRKP strains

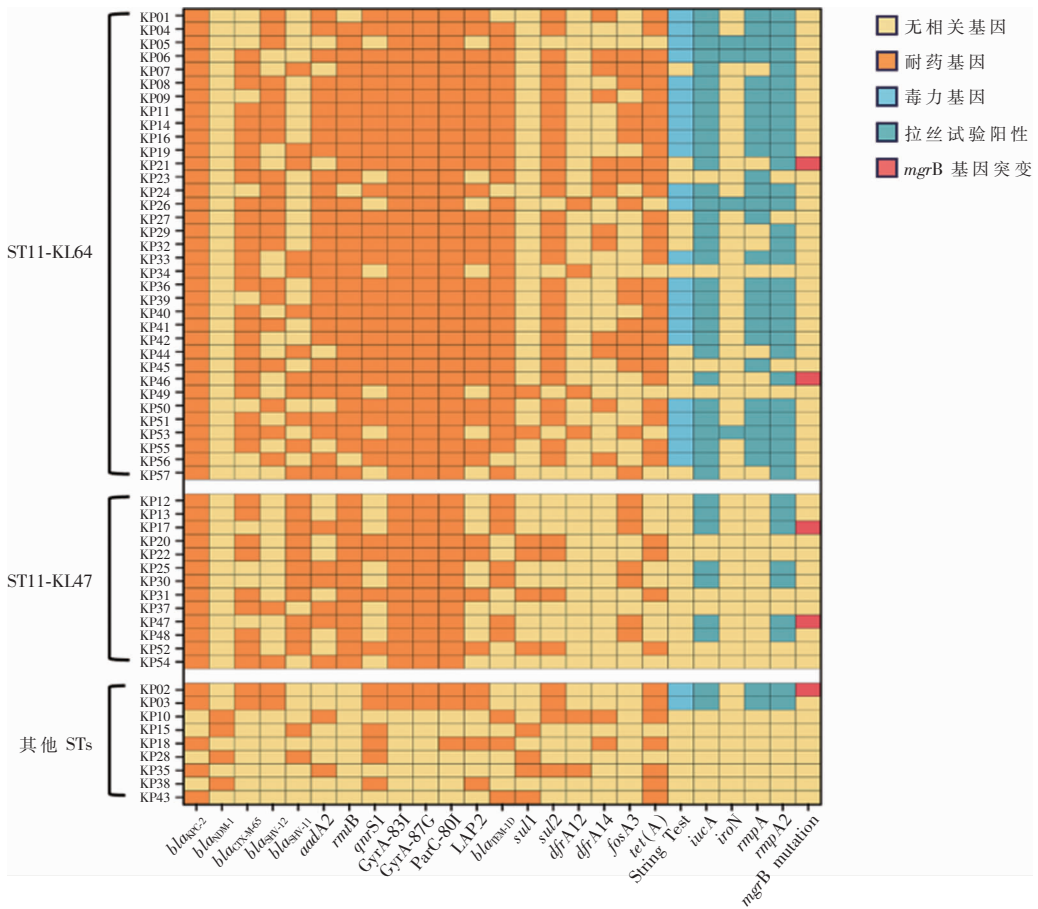
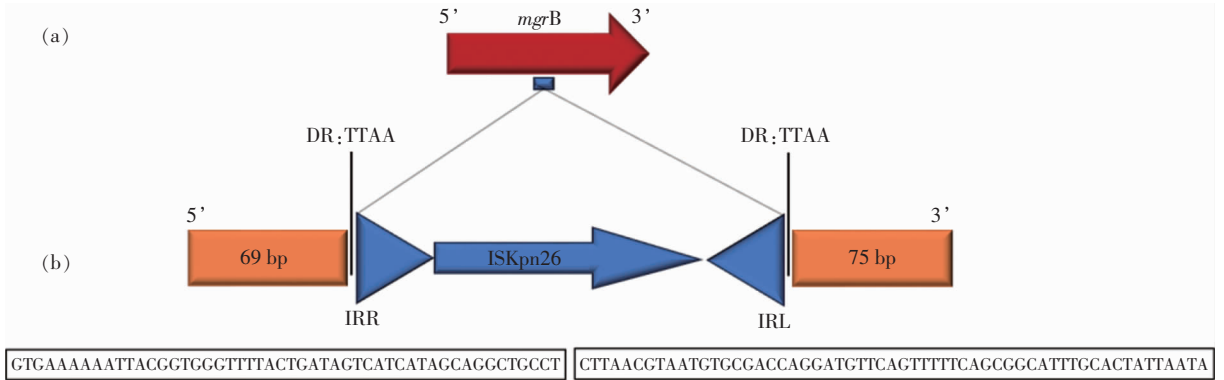


图 2 57 株 CRKP 检出耐药和毒力基因分布情况

Figure 2 Distribution of resistance and virulence genes detected in 57 CRKP strains

2.5 黏菌素耐药相关基因的分子分析 40 株 CR-hvKP 中,5 株对黏菌素耐药。为探讨潜在的黏菌素耐药机制,研究分析 *pmrA*、*pmrB*、*phoP*、*phoQ* 和 *mgrB* 基因的核苷酸序列,并与质控菌株 KP ATCC 700603 和 1 株黏菌素敏感 KP 临床菌株的基因序列进行比较,均未发现 *mcr-1~9* 阳性和 *pmrA*、

pmrB、*phoP*、*phoQ* 相关基因突变,但 5 株黏菌素耐药 CR-hvKP *mgrB* 基因均被插入相同的 1 200 bp 的 ISKpn26 序列,且均是插在相同的位置,即 *mgrB* 基因序列的 69 和 70 个核苷酸之间,并且方向相同。见图 3。



注:(a)为野生型菌株的 *mgrB* 基因;(b)为黏菌素耐药菌株中的完整 *mgrB* 基因,+70 位插入 ISKpn26 序列;与插入序列相对应的左倒置重复序列和右倒置重复序列分别表示为 IRR 和 IRL,并用左右反向重复三角形表示。

图 3 *mgrB* 基因插入序列示意图

Figure 3 Schematic diagram of the insertion sequence of *mgrB* gene

3 讨论

CRKP 对全世界公共卫生安全构成重大威胁,了解本地 CRKP 克隆株流行病学数据,对于制定和评估相关临床治疗方案必不可少。本研究前瞻性调查 2021—2023 年安徽某三级甲等教学医院收集的 57 株 CRKP 菌株,报告其分子流行特征和相关基因分布。本研究中,患者年龄 ≥ 60 岁者占 56.1%, ≥ 75 岁以上的患者占 22.8%,可能与老年患者免疫功能下降有关。耐药表型结果显示,CRKP 对碳青霉烯类、头孢菌素和氟喹诺酮类药物的耐药率较高,对替加环素和黏菌素的耐药率较低。

MLST 是一种基于核苷酸序列分型的方法,可以表明细菌之间的遗传关系^[26],了解 CRKP 菌株的进化起源和传播。本研究中,ST11 仍是最常见序列类型,占 89.5%(51/57),表明 ST11 型产 KPC-2 KP 克隆正在以惊人的速度传播^[27]。同时菌株携带 4 个具有代表性毒力基因,检测显示,40 株产 KPC-2 的 CRKP(40/57,70.2%)携带多个毒力基因,与华中地区三级甲等医院发现 59.3%(83 株)的 CRKP 分离株携带 *rpmA*、*rpmA2*、*iroN* 和 *iucA* 4 个毒力基因的研究^[28]结果基本一致。目前,此 4 种

毒力基因在产 KPC-2 ST11 型 CRKP 菌株中高检出比例存在的机制尚不清楚,需要进一步研究。

本研究通过 MLST 和荚膜型检测,40 株 CR-HvKP 出现了以 ST11-KL64(31/40,77.5%)为主和 ST11-KL47(7/40,17.5%)为主的两类克隆群。其中与 ST11-KL47 型 CR-HvKP 相比,ST11-KL64 型 CR-HvKP 携带的耐药基因和毒力基因更丰富,表明两种发育不同序列可能已经形成。通过系统发育树分析,ST11-KL47 型和 ST11-KL64 型 CRKP 流行的科室涉及外科 ICU、内科 ICU 和神经外科等高风险科室,已成为医院传播的主要流行菌株。尤其 ST11-KL64 型 CRKP 在无症状 CRKP 携带者检出极高,是导致患者发生 CRKP 感染的主要型别^[29],应是临床感染防控的重点监测对象。除此之外,本研究检出 2 株产 KPC-2 的 ST11-KL30 型 CR-HvKP,而该类型 CR-HvKP 尚未被报道,表明 CR-HvKP 进化的多样性。

对 5 株黏菌素耐药 CRKP 的分子机制进行研究,发现菌株特异性 *mgrB* 基因被破坏性插入 ISKpn26 元件,该元件已被证实因其插入 *mgrB* 序列是 KP 黏菌素耐药的普遍机制^[30-31]。本研究中 5 株菌的感染者也存在长时间使用黏菌素的治疗过程,具有 ISKpn26 插入序列的 5 株菌被分为 3 个不同的

克隆群(A、F、K),由此推测 ISKpn26 插入元件可能具有水平和克隆双重遗传传播模式。Zhu 等^[32]研究指出,IS 元件的插入位点以 +74 位点为优先插入点,与本研究中发现的插入位置为 +70 位点有所区别,说明 IS 元件插入 *mgrB* 基因的位点具有可变性。

本研究的关键发现是 IS 元件在 ST11-CRKP 菌株的 *mgrB* 基因失活或突变中的普遍作用。此前有文献^[33]报道 ISkpn14 对 *mgrB* 基因的插入失活并证明插入序列起源于含有碳青霉烯酶基因的质粒,特别是 *bla_{KPC-2}*,这也表明 IS 元件可能在介导耐药中起作用。迫切需要进一步的研究来阐明病原体从多重耐药病原体升级为泛耐药表型的机制^[34-35]。当然本研究样本量非常有限,未来需要更大规模或多中心的研究成果来支持上述结果。

综上所述,ST11-KL64 CR-HvKP 已成为最普遍的高毒力 CRKP,该菌在医院环境中具有较高的适应性,可以造成医院感染的传播,感染防控人员需要对此引起足够的重视。同时在黏菌素的压力下,会进一步导致 CRKP 对黏菌素耐药。由于黏菌素是治疗多重耐药菌感染的最后一道防线,一旦对黏菌素耐药的 CR-HvKP 在医院环境中大量扩散,将会对临床造成威胁。因此,临床需要采取感染控制措施和使用更严格的政策控制此类病原菌的传播,预防和控制耐黏菌素 KP 的传播。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Sands K, Carvalho MJ, Portal E, et al. Characterization of antimicrobial-resistant Gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries[J]. Nat Microbiol, 2021, 6(4): 512–523.
- [2] Sequeira RP, McDonald JAK, Marchesi JR, et al. Commensal bacteroidetes protect against *Klebsiella pneumoniae* colonization and transmission through IL-36 signalling[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(2): 304–313.
- [3] Liang XX, Chen P, Deng BG, et al. Outcomes and risk factors of bloodstream infections caused by carbapenem-resistant and non-carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China [J]. Infect Drug Resist, 2022, 15: 3161–3171.
- [4] Zhou M, Xiao M, Hou RY, et al. Bundles of care for prevention of ventilator-associated pneumonia caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the ICU[J]. Am J Transl Res, 2021, 13(4): 3561–3572.
- [5] 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.
- [6] Hammer CC, Brainard J, Hunter PR. Risk factors and risk factor cascades for communicable disease outbreaks in complex humanitarian emergencies: a qualitative systematic review[J]. BMJ Glob Health, 2018, 3(4): e000647.
- [7] Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, 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(9): 597–602.
- [8] van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* [J]. Virulence, 2017, 8(4): 460–469.
- [9] Fu L, Wang SM, Zhang ZK, 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.
- [10] Felipe Vásquez-Ponce, Dantas K, Becerra J, et al. Detecting KPC-2 and NDM-1 coexpression in *Klebsiella pneumoniae* complex from human and animal hosts in South America[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(5): 01159–22.
- [11] Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, et al. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline[J]. Int J Antimicrob Agents, 2011, 37(5): 415–419.
- [12] Cheong HS, Kim SY, Wi YM, et al. Colistin heteroresistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates and diverse mutations of PmrAB and PhoPQ in resistant subpopulations[J]. J Clin Med, 2019, 8(9): 1444.
- [13] Wyres KL, Holt KE. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria[J]. Curr Opin Microbiol, 2018, 45: 131–139.
- [14] Rossen JWA, Friedrich AW, Moran-Gilad J, et al. Practical issues in implementing whole-genome-sequencing in routine diagnostic microbiology[J]. Clin Microbiol Infect, 2018, 24(4): 355–360.
- [15] Balloux F, Brønstad Brynildsrud O, van Dorp L, et al. From theory to practice: translating whole-genome sequencing (WGS) into the clinic[J]. Trends Microbiol, 2018, 26(12): 1035–1048.
- [16] Li G, Shi JM, Zhao Y, et al. Identification of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates using the string test in combination with *Galleria mellonella* infectivity[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2020, 39(9): 1673–1679.
- [17] Kelley WS, Stump KH. A rapid procedure for isolation of large quantities of *Escherichia coli* DNA polymerase I utilizing a lambda_dpolA transducing phage[J]. J Biol Chem. 1979. 254(9): 3206–3210.
- [18] Lindgreen S. AdapterRemoval: easy cleaning of next-generation sequencing reads[J]. BMC Res Notes, 2012, 5: 337.
- [19] Luo RB, Liu BH, Xie YL, et al. SOAPdenovo2: an empirica-

- lly improved memory-efficient short-read *de novo* assembler [J]. *Gigascience*, 2012, 1(1): 18.
- [20] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing[J]. *J Comput Biol*, 2012, 19(5): 455 - 477.
- [21] Coil D, Jospin G, Darling AE. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data[J]. *Bioinformatics*, 2015, 31(4): 587 - 589.
- [22] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life v2; online annotation and display of phylogenetic trees made easy[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(S2): W475 - W478.
- [23] 肖晓, 杭修兵, 王梦, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌耐药性、临床感染特征及 *mcr* 基因分析[J]. *中国感染控制杂志*, 2023, 22(1): 31 - 37.
- Xiao X, Hang XB, Wang M, et al. Antimicrobial resistance, clinical infection characteristics and *mcr* genes of carbapenem-resistant *Enterobacteriales* [J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2023, 22(1): 31 - 37.
- [24] Kong YY, Li C, Chen HF, et al. *In vivo* emergence of colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* mediated by premature termination of the *mgrB* gene regulator [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 656610.
- [25] Cannatelli A, D'Andrea MM, Giani T, et al. *In vivo* emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP *mgrB* regulator [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2013, 57(11): 5521 - 5526.
- [26] Zeng LY, Yang CR, Zhang JS, et al. An outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit of a major teaching hospital in Chongqing, China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 656070.
- [27] 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.
- [28] Xiang YT, Tian HP, Chen QS, et al. Clinical and molecular characteristics of *Klebsiella pneumoniae* infection in a tertiary general hospital of Wuhan, China [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2024, 43(2): 269 - 278.
- [29] Chu WW, Hang XB, Li X, et al. Bloodstream infections in patients with rectal colonization by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a prospective cohort study [J]. *Infect Drug Resist*, 2022, 15: 6051 - 6063.
- [30] Poirer L, Jayol A, Bontron S, et al. The *mgrB* gene as a key target for acquired resistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2015, 70(1): 75 - 80.
- [31] Bray AS, Smith RD, Hudson AW, et al. *MgrB*-dependent colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with an increase in host-to-host transmission [J]. *mBio*, 2022, 13(2): e0359521.
- [32] Zhu LL, Li P, Zhang GY, et al. Role of the ISKpn element in mediating *mgrB* gene mutations in ST11 hypervirulent colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Front Microbiol*, 2023, 14: 1277320.
- [33] Li Z, Lei Z, Liu X, et al. Disruption of *mgrB* gene by ISKpn14 sourced from a *bla*_{KPC-2} carrying plasmid mediating polymyxin resistance against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* during treatment: study on the underlying mechanisms [J]. *BMC Microbiol*, 2024, 24(1): 422.
- [34] Lv LC, Wan M, Wang CZ, et al. Emergence of a plasmid-encoded resistance-nodulation-division efflux pump conferring resistance to multiple drugs, including tigecycline, in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *mBio*, 2020, 11(2): e02930 - 19.
- [35] Sun SJ, Gao H, Liu YD, et al. Co-existence of a novel plasmid-mediated efflux pump with colistin resistance gene *mcr* in one plasmid confers transferable multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Emerg Microbes Infect*, 2020, 9(1): 1102 - 1113.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式: 储雯雯, 刘周, 李昕, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌全基因组测序及黏菌素耐药分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2025, 24(1): 37 - 44. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256485.

Cite this article as: CHU Wenwen, LIU Zhou, LI Xin, et al. Whole-genome sequencing and colistin resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Chin J Infect Control*, 2025, 24(1): 37 - 44. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20256485.