

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20216992

· 论 著 ·

VAP 患者下呼吸道分离 CRKP 的临床及分子生物学流行特征

刘 周, 储雯雯, 李 昕, 汪雅婷, 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** 分析呼吸机相关肺炎(VAP)患者下呼吸标本分离的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)临床特征、基因型及主要毒力因子携带情况。**方法** 收集 2019 年 1—12 月某院 VAP 患者下呼吸道标本分离的非重复肺炎克雷伯菌(KP), 比较 CRKP 组与碳青霉烯非耐药 KP 组(nCRKP 组)感染患者的临床特征及耐药性, 多位点序列分型、荚膜 *wzi* 分型型别的差异, 分析 CRKP 毒力因子携带情况及同源性。**结果** 共收集 56 株 KP, 其中 60.7% (34 株) 为 CRKP。CRKP 组患者入住 ICU 日数 ≥ 20 d、死亡及自动出院患者的比例高于 nCRKP 组患者(均 $P < 0.05$)。CRKP 组菌株对常用抗菌药物耐药率高于 nCRKP 组(均 $P < 0.05$), CRKP 主要(97.1%)携带 *bla*_{KPC-2} 基因, 对替加环素以外的抗菌药物耐药率高。82.4% 的 CRKP 属于 ST11 型, K64 为主要荚膜型(50.0%); 45.4% 的 nCRKP 属于 ST11 型, 荚膜型以 K47 为主(40.9%); K64 型菌株在 CRKP 菌株中的比例高于 nCRKP 菌株($P < 0.01$)。CRKP 携带多种毒力因子, pLVPK-like 质粒介导的毒力因子 *rmpA2*、*iucA* 及 *iroN* 主要由 K64-ST11 型 CRKP 携带, 且 PFGE 分析结果显示 K64-ST11 型 CRKP 存在克隆传播。**结论** VAP 下呼吸道标本分离的 CRKP 呈现多重耐药, 其主要分子型别为 K64-ST11 型, 该型 CRKP 携带多种质粒介导的毒力因子并存在克隆传播, 应密切监控其临床流行趋势。

[关键词] 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 呼吸机相关肺炎; 基因型; 毒力因子

[中图分类号] R181.3⁺2

Clinical and molecular epidemiological characteristics of CRKP isolated from lower respiratory tract of patients with ventilator-associated pneumonia

LIU Zhou, CHU Wen-wen, LI Xin, WANG Ya-ting, ZHOU Qiang (Department of Laboratory Medicine, The Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the clinical characteristics, genotypes and major virulence factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) isolated from lower respiratory specimens of patients with ventilator-associated pneumonia (VAP). **Methods** Non-repetitive *Klebsiella pneumoniae* (KP) isolated from lower respiratory tract specimens of VAP patients in a hospital from January to December 2019 were collected, clinical characteristics, antimicrobial resistance, multilocus sequence typing and capsular *wzi* typing of patients were compared between CRKP group and non-CRKP (nCRKP) group, carrying status and homology of virulence factors of CRKP were analyzed. **Results** A total of 56 strains of KP were collected, 60.7% ($n = 34$) of which were CRKP. The proportion of patients with intensive care unit (ICU) stay ≥ 20 days, death and discharged voluntarily in CRKP group were all higher than those in nCRKP group (all $P < 0.05$). Resistance rate of CRKP group to commonly used antimicrobial agents was higher than that of nCRKP group (all $P < 0.05$). Most CRKP (97.1%) carried *bla*_{KPC-2} gene, resistance rates to antimicrobial agents other than tigeccycline were high. 82.4% of CRKP were ST11 type and K64 was the

[收稿日期] 2020-08-02

[基金项目] 安徽省自然科学基金(1908085QH366)

[作者简介] 刘周(1984-), 男(汉族), 安徽省合肥市人, 副主任技师, 主要从事细菌耐药机制及分子流行病学研究。

[通信作者] 刘周 E-mail: liuzhou0112@126.com

main capsule type (50.0%); 45.4% of nCRKP were ST11 type and K47 was the main capsule type (40.9%); proportion of K64 type in CRKP was higher than that of nCRKP strain ($P < 0.01$). CRKP carried a variety of virulence factors, virulence factors *rpmA2*, *iucA* and *iroN* mediated by pLVPK-like plasmid were mainly carried by K64-ST11 CRKP, PFGE analysis showed that there was clonal transmission of K64-ST11 CRKP. **Conclusion** CRKP isolated from VAP lower respiratory tract specimens shows multiple resistance, and its main molecular type is K64-ST11, this type carries a variety of plasmid-mediated virulence factors and has clonal transmission, clinical epidemic trend should be closely monitored.

[**Key words**] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; ventilator-associated pneumonia; genotype; virulence factor

随着社会人口老龄化的日益加剧,慢性病患者不断增加,使得呼吸支持的临床应用日益广泛。由于多种因素的影响,接受呼吸机治疗的临床患者往往会继发呼吸机相关肺炎(ventilator-associated pneumonia, VAP)^[1]。VAP 是指气管插管或气管切开患者接受机械通气 48 h 后或撤机拔管 48 h 内发生的肺炎,是重症患者常见的严重并发症,更是常见医院获得性感染,其临床诊疗较为困难,且患者病死率高^[1-2]。耐碳青霉烯类革兰阴性杆菌是 VAP 的重要病原体,其中耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)是重要组成之一^[2-4]。CRKP 不仅呈现出多重耐药,近年来更进化出携带 pLVPK-like 毒力质粒的耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistance hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, CR-hvKP),严重威胁医院感染的防控效果^[5]。目前,新型冠状病毒全球蔓延,患者感染后主要受累器官是肺,病情危重时大多需接受机械通气治疗^[6]。为提高救治成功率,预防多重耐药菌导致的 VAP 是临床诊疗及医院感染防控中一项重要工作。因此,收集 2019 年 1—12 月某地区省级综合性三甲医院 VAP 患者下呼吸道标本分离的 CRKP 菌株,分析其感染与耐药情况、基因分型及毒力因子特征,为其医院感染防控提供实验室循证依据。

1 材料与方 法

1.1 菌株来源 2019 年 1—12 月某地区某三甲医院 VAP 患者下呼吸道合格标本分离的非重复肺炎克雷伯菌(KP),共计 75 株。

1.2 临床资料的收集 VAP 诊断标准按照《中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关肺炎诊断和治疗指南(2018 版)》^[2]进行。剔除机械通气之前已发生肺部感染者,机械通气治疗 48 h 内出院或 48 h 内

死亡以及临床资料不完整患者分离的菌株。最终纳入本研究共计 56 株 KP。收集患者的基本临床资料,包括性别、年龄、基础疾病、机械通气时间、入住 ICU 时间及临床转归。本研究通过该院伦理委员会审查同意。

1.3 菌株鉴定及药敏试验 采用 Microflex LT 型质谱仪(德国 BRUKER 公司)进行菌株鉴定。阿米卡星、氨苄西林/舒巴坦、氨基糖苷类、厄他培南、环丙沙星、哌拉西林/他唑巴坦、庆大霉素、头孢曲松、头孢他啶、头孢吡肟、妥布霉素、亚胺培南及左氧氟沙星采用 VITEK 2 Compact 型分析仪(法国 BioMérieux 公司)进行药敏检测;美罗培南及头孢哌酮/舒巴坦采用纸片扩散法进行药敏检测,纸片为美国 ThermoFisher 公司产品。替加环素(美国 Pfizer 公司)应用微量肉汤稀释法进行药敏检测,结果按 EUCAST 标准(<http://www.eucast.org>)判定,其他药敏结果按美国临床实验室标准化协会(CLSI) 2019 版标准判定^[7]。将对亚胺培南、美罗培南及厄他培南三者任意一种耐药的 KP 定义为 CRKP^[7],对上述三种药物均不耐药的 KP 定义为碳青霉烯非耐药 KP(non-carbapenem-resistant KP, nCRKP)。

1.4 碳青霉烯酶表型及耐药基因检测 采用改良碳青霉烯灭活试验(mCIM)及 EDTA 改良灭活试验(eCIM)检测碳青霉烯酶表型^[7]。煮沸法提取 CRKP 菌株 DNA 模板,聚合酶链反应(PCR)检测常见碳青霉烯酶基因 *bla_{KPC-2}*、*bla_{NDM-1}*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}*,引物序列及扩增条件参考文献^[8]。扩增产物用含 EB(0.2 μg/mL)1%琼脂糖凝胶电泳后,凝胶成像观察结果。阳性产物送 Sangon Biotech 公司进行测序,测序结果在 GenBank 数据库中比对查询。

1.5 荚膜 *wzi* 分型及毒力基因检测 煮沸法提取待测 KP 菌株 DNA 模板,PCR 扩增 *wzi* 基因,引物

序列及扩增条件参考文献[9]。扩增产物送 Sangon Biotech 公司测序后,登录 Web 数据库 (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>) 比对 *wzi* 型及相应荚膜血清型。扩增 9 种主要毒力因子(包括 *rmpA*、*rmpA2*、*iucA*、*iroN*、*entB*、*magA*、*mrkD*、*Kfu* 及 *ybtS*),引物序列及扩增条件参考文献[10-11]进行。扩增产物用含 EB(0.2 μg/mL)1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像观察结果。挑选代表性阳性结果送 Sangon Biotech 公司测序,比对确认后作为阳性对照。

1.6 多位点序列分型 参照多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)网站 (https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html)推荐序列合成 7 对管家基因检测 PCR 引物。扩增条件参考文献[8]。PCR 产物送 Sangon Biotech 公司测序,登录 Web 数据库 (<https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/>) 比对序列,明确待测菌株 ST 型。按照 *gapA-infB-mdh-pgi-phoE-rpoB-tonB* 顺序整理等位基因,并根据等位基因差异,将 ST 型分为单位点变异型(single-locus variants, SLVs)、双位点变异型(double-locus variants, DLVs)及三位点变异型(triple-locus variants, TLVs)。应用 Global optimal eBURST(goeBURST)软件分析各 ST 间的进化发育关系并构建最小生成树,确定 ST 型中的 group founder 及 sub-group founder,将 group founder 及其 SLVs(两种及以上)定义为克隆群(clonal complex, CC)[12]。

1.7 脉冲场凝胶电泳(PFGE) 待测 CRKP 菌株接种于 2 mL LB 肉汤管,37℃震荡培养 4 h,离心后用 EC 液混匀。加入等体积 2%低熔点琼脂糖凝胶,混匀后注入模具制成胶块。胶块置蛋白酶 K 于 50℃水浴过夜后,1×TE 清洗 4~6 次。胶块切至 5 mm 大小后 XbaI 酶 37℃酶切 4 h。电泳条件为:0.5×TBE,14℃、6 V/cm、线性梯度 5~35 s、22 h。染色成像后使用 BioNumerics 软件分析。PFGE 图谱相似性 > 90% 定义为同一分型(Pulsotype, PT)[13]。

1.8 统计分析 药敏检测结果应用 WHONET 5.6 软件进行分析,其他统计应用 SPSS 21.0 软件进行。Shapiro-Wilk 方法进行正态性检验,正态分布资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组定量数据均数比较采用 *t* 检验,两组样本率间的比较采用卡方检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床基本特征 本研究 56 株 KP 中,CRKP 34 株(60.7%,CRKP 组),nCRKP 22 株(39.3%,nCRKP 组)。CRKP 组患者以男性为主(70.6%),平均年龄(62.3 ± 16.4)岁。CRKP 组患者所在临床科室包括:综合重症监护病房 A(ICU_A, 13 株,38.2%)、呼吸重症监护病房(ICU_R, 8 株,23.5%)、综合重症监护病房 B(ICU_B, 6 株,17.6%)、神经外科(3 株,8.8%)、急诊重症监护病房(ICU_E, 2 株,5.9%)及呼吸内科和骨科(各 1 株,2.9%)。与 nCRKP 组相比,CRKP 组患者在年龄、性别、接受外科手术、机械通气时间及基础疾病方面差异均无统计学意义。但 CRKP 组入住 ICU 日数 ≥ 20 d 比例高于 nCRKP 组,同时死亡及自动出院患者的比例高于 nCRKP 组(均 $P < 0.05$),治疗病情好转比例低于 nCRKP 组($P < 0.01$)。见表 1。

表 1 CRKP 及 nCRKP 组 VAP 患者临床基本特征
Table 1 Basic clinical characteristics of VAP patients in CRKP and nCRKP groups

| 基本特征 | CRKP 组 (n = 34) | nCRKP 组 (n = 22) | χ^2 / t | P |
|-------------------------|--------------------|---------------------|--------------|--------|
| 年龄(岁, $\bar{x} \pm s$) | 62.3 ± 16.4 | 62.0 ± 13.9 | 0.059 | 0.953 |
| 性别 [例(%)] | | | | |
| 男性 | 24(70.6) | 17(77.3) | 0.304 | 0.581 |
| 女性 | 10(29.4) | 5(22.7) | | |
| 外科手术 [例(%)] | 21(61.8) | 12(54.5) | 0.288 | 0.592 |
| 入住 ICU 日数 ≥ 20 d [例(%)] | 24(70.6) | 9(40.9) | 4.861 | 0.027 |
| 机械通气日数 ≥ 7d [例(%)] | 25(73.5) | 12(54.5) | 2.147 | 0.143 |
| 基础疾病 [例(%)] | | | | |
| 颅脑外伤及神经系统疾病 | 13(38.2) | 11(50.0) | 0.755 | 0.385 |
| 慢性肺部疾病 | 5(14.7) | 3(13.6) | 0.012 | 0.911 |
| 糖尿病 | 3(8.8) | 2(9.1) | 0.001 | 0.973 |
| 恶性肿瘤 | 1(2.9) | 3(13.6) | 2.304 | 0.129 |
| 其他疾病* | 5(14.7) | 3(13.6) | 0.012 | 0.911 |
| 临床转归 [例(%)] | | | | |
| 好转 | 6(17.6) | 15(68.2) | 14.554 | <0.001 |
| 自动出院 | 17(50.0) | 5(22.7) | 4.165 | 0.041 |
| 死亡 | 11(32.4) | 2(9.1) | 4.055 | 0.044 |

注: * 包括胰腺炎、多发伤、上消化道出血、消化道穿孔、心血管疾病、高血压及慢性肾病。

2.2 药敏试验及耐药检测结果 体外药敏试验结果显示,CRKP 组菌株对常用抗菌药物耐药率高于 nCRKP 组(均 $P < 0.05$)。CRKP 对头孢菌素类及碳青霉烯类抗生素的耐药率均为 100.0%,仅对氨基曲南耐药率为 97.1%,对环丙沙星及左氧氟沙星耐药率均为 94.1%;对阿米卡星、妥布霉素及庆大霉素的耐药率分别为 70.6%、94.1%、94.1%。未检出耐替加环素的菌株。见表 2。经 mCIM 和 eCIM 检测,97.1%(33 株)CRKP 菌株 mCIM 试验为阳性,2.9%(1 株)菌株 eCIM 为阳性。PCR 检测表明,mCIM 阳性菌株均携带 bla_{KPC-2} ,eCIM 阳性株携带 bla_{NDM-1} 。

表 2 CRKP 组及 nCRKP 组菌株对抗菌药物耐药率(%)

Table 2 Resistance rates of CRKP and nCRKP isolates to antimicrobial agents (%)

| 抗菌药物 | CRKP 组 (n = 34) | nCRKP 组 (n = 22) | χ^2 | P |
|-----------|--------------------|---------------------|----------|--------|
| 氨苄西林/舒巴坦 | 100.0 | 40.9 | 26.17 | <0.001 |
| 哌拉西林/他唑巴坦 | 100.0 | 4.5 | 51.93 | <0.001 |
| 头孢曲松 | 100.0 | 36.4 | 28.85 | <0.001 |
| 头孢他啶 | 100.0 | 13.6 | 44.44 | <0.001 |
| 头孢吡肟 | 100.0 | 13.6 | 44.44 | <0.001 |
| 头孢哌酮/舒巴坦 | 100.0 | 9.1 | 48.08 | <0.001 |
| 氨基曲南 | 97.1 | 31.8 | 27.86 | <0.001 |
| 亚胺培南 | 100.0 | 0.0 | 56.00 | <0.001 |
| 美罗培南 | 100.0 | 0.0 | 56.00 | <0.001 |
| 厄他培南 | 100.0 | 0.0 | 56.00 | <0.001 |
| 阿米卡星 | 70.6 | 4.5 | 23.57 | <0.001 |
| 庆大霉素 | 94.1 | 31.8 | 27.86 | <0.001 |
| 妥布霉素 | 94.1 | 18.2 | 33.55 | <0.001 |
| 替加环素 | 0.0 | 0.0 | - | - |
| 环丙沙星 | 94.1 | 18.2 | 33.55 | <0.001 |
| 左氧氟沙星 | 94.1 | 13.6 | 36.91 | <0.001 |

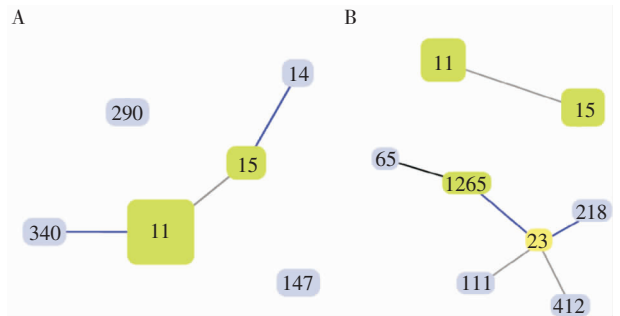
2.3 MLST 及 PFGE 分型 MLST 结果显示,34 株 CRKP 菌株共分为 6 个 ST 型,主要为 ST11 (82.4%);22 株 nCRKP 菌株分为 8 个 ST 型,主要为 ST11 (45.4%)。见表 3。GoeBURST 分析可见,CRKP 菌株中,ST11 及 ST15 均为 sub-group founder,ST340 为 ST11 的 SLVs,ST14 为 ST15 的 SLVs,且 ST15 为 ST11 的 TLVs;nCRKP 菌株中,

ST23 为 group founder,ST218 与 ST1265 均为 ST23 的 SLVs,ST111 和 ST412 均为 ST23 的 TLVs。ST23 和 ST218、ST1265 共同构成 CC23。见图 1。进一步通过 PFGE 分析显示,34 株 CRKP 分为 26 个 PT 型,其中 PT05、PT15、PT16、PT18 和 PT20 型菌株分别为 2、3、4、2、2 株,且 PT15 及 PT16 型克隆株主要分布在 ICU_A 病区。见图 2。

表 3 CRKP 组及 nCRKP 组菌株 MLST 结果

Table 3 MLST results of CRKP and nCRKP isolates

| MLST | CRKP 组(n = 34) | | nCRKP 组(n = 22) | |
|--------|----------------|--------|-----------------|--------|
| | 株数 | 构成比(%) | 株数 | 构成比(%) |
| ST11 | 28 | 82.4 | 10 | 45.5 |
| ST15 | 2 | 5.9 | 4 | 18.2 |
| ST14 | 1 | 2.9 | 0 | 0.0 |
| ST147 | 1 | 2.9 | 0 | 0.0 |
| ST290 | 1 | 2.9 | 0 | 0.0 |
| ST340 | 1 | 2.9 | 0 | 0.0 |
| ST412 | 0 | 0.0 | 2 | 9.1 |
| ST111 | 0 | 0.0 | 2 | 9.1 |
| ST23 | 0 | 0.0 | 1 | 4.5 |
| ST65 | 0 | 0.0 | 1 | 4.5 |
| ST218 | 0 | 0.0 | 1 | 4.5 |
| ST1265 | 0 | 0.0 | 1 | 4.5 |



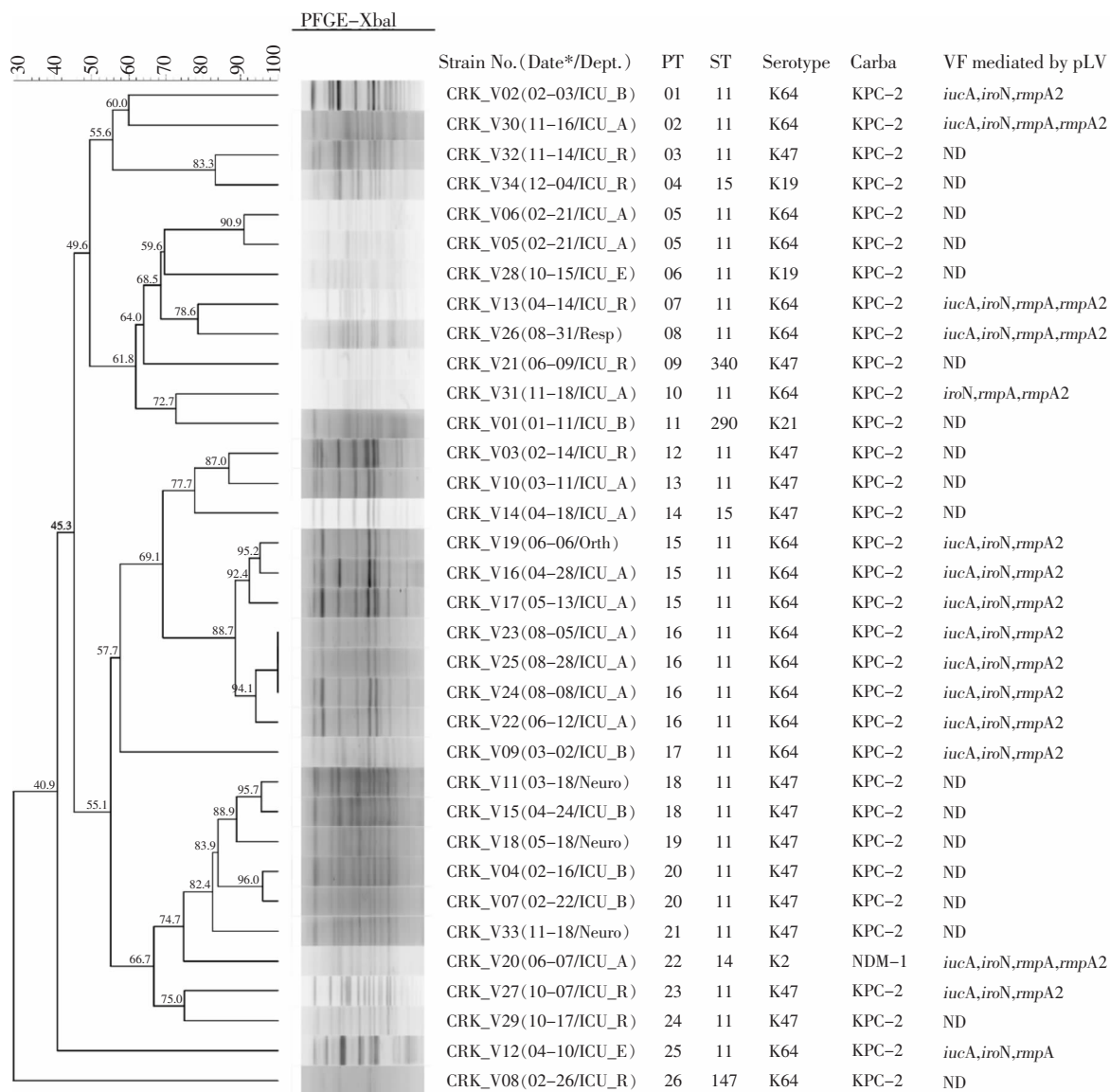
注:每个节点代表一个 ST 型,节点大小与该 ST 型菌株数量成正比。黄色节点为 group founder,绿色节点为 sub-group founder,紫色节点为 common node。节点间蓝色连线提示两 ST 型为 SLVs、黑色连线提示为 DLVs、灰色连线提示为 TLVs、无连线提示该 ST 型与其他型差异大于 3 个位点。

图 1 CRKP 菌株(A)及 nCRKP 菌株(B)ST 型的 goeBURST 分析图

Figure 1 GoeBURST analysis of sequence type of CRKP and nCRKP isolates

2.4 荚膜 *wzi* 分型及毒力因子分析 荚膜 *wzi* 分型可见,CRKP 菌株共分为 5 种荚膜型,以 K64 型为主(50.0%),其次为 K47 型(38.3%);nCRKP 菌株则分为 7 种,以 K47 为主(40.9%)。K64 型菌株在 CRKP 菌株中的比例高于 nCRKP 菌株($P < 0.01$),且 PT05、PT15 及 PT16 型 CRKP 菌株荚膜均属于 K64 型。毒力因子检测结果显示,CRKP 菌

株携带多种毒力因子,其中 pLVPK-like 质粒介导的毒力因子 *rmpA*、*rmpA2*、*iucA* 及 *iroN* 检出率分别为 17.6%、44.1%、44.1% 及 47.1%,而 *rmpA2*、*iucA* 及 *iroN* 的检出率高于 nCRKP 菌株(均 $P < 0.05$),上述质粒介导的毒力因子主要由 K64-ST11 型 CRKP 菌株携带。见表 4、图 2。



注:Carba 为 carbapenemase; ND 为 no detection; Neuro 为 neurosurgery; Orth 为 orthopedics; pLV 为 pLVPK-like plasmid; PT 为 pulsotype; Resp 为 respiratory medicine; ST 为 sequence type; VF 为 virulence factor; * Date 中日日期格式为 MM-DD。

图 2 CRKP 菌株 PFGE 聚类分析图

Figure 2 PFGE cluster analysis on CRKP isolates

表 4 CRKP 及 nCRKP 菌株荚膜分型及毒力因子检测结果
Table 4 Capsular serotype and virulence factor analysis on CRKP and nCRKP isolates

| 项目 | CRKP (n = 34) | nCRKP (n = 22) | χ^2 | P |
|--------------------|------------------|-------------------|----------|-------|
| 荚膜分型 [株(%)] | | | | |
| K1 | 0(0.0) | 2(9.1) | 3.205 | 0.073 |
| K2 | 1(2.9) | 1(4.5) | 0.100 | 0.752 |
| K19 | 2(5.9) | 4(18.2) | 2.112 | 0.146 |
| K21 | 1(2.9) | 3(13.6) | 2.304 | 0.129 |
| K27 | 0(0.0) | 1(4.5) | 1.574 | 0.210 |
| K47 | 13(38.3) | 9(40.9) | 0.040 | 0.841 |
| K64 | 17(50.0) | 2(9.1) | 9.972 | 0.002 |
| 毒力因子 [株(%)] | | | | |
| <i>rmpA</i> * | 6(17.6) | 4(18.2) | 0.003 | 0.959 |
| <i>rmpA2</i> * | 15(44.1) | 4(18.2) | 4.008 | 0.045 |
| <i>iucA</i> * | 15(44.1) | 4(18.2) | 4.008 | 0.045 |
| <i>iroN</i> * | 16(47.1) | 4(18.2) | 4.851 | 0.028 |
| <i>entB</i> | 33(97.1) | 22(100.0) | 0.659 | 0.417 |
| <i>magA</i> | 0(0.0) | 2(9.1) | 3.205 | 0.073 |
| <i>mrkD</i> | 30(88.2) | 21(95.5) | 0.856 | 0.355 |
| <i>Kfu</i> | 19(55.9) | 10(45.5) | 0.582 | 0.446 |
| <i>ybtS</i> | 18(52.9) | 9(40.9) | 0.774 | 0.379 |

注：* 由 pLVPK-like 质粒介导的毒力因子。

3 讨论

作为临床常见条件致病菌，KP 易于获得外源耐药基因并出现耐药表型，是医院感染重点防控的多重耐药菌。根据全国细菌耐药监测网统计数据^[14]显示，我国 CRKP 检出率逐年攀升，从 2013 年的 4.9% 上升至 2018 年的 10.1%，临床流行趋势十分严峻。本研究 56 株 KP 中，CRKP 的比率高达 60.7%，与感染患者均存在 ICU 住院史有关。与我国某三甲医院 2018 年 ICU CRKP 临床分离率为 63.7%，且主要来源于呼吸道标本的研究^[15]结果基本一致。本组资料中 CRKP 组患者入住 ICU 日数 ≥ 20 d 的比例高于 nCRKP 组，进一步提示 ICU 是 CRKP 流行播散的重点科室。

入住 ICU 患者大多患有严重基础疾病，一旦继发 CRKP 感染，往往预后不良。研究^[16]表明，感染 CRKP 患者病死率远高于感染非耐药株患者。本研究中，CRKP 组与 nCRKP 组 VAP 患者在年龄、性别及基础疾病种类方面差异均无统计学意义，但其

死亡及自动出院患者比例远高于 nCRKP 组。其 CRKP 菌株呈现多重耐药表型，对除替加环素之外的所有临床常用抗菌药物耐药率均高于 70%；所有菌株均产碳青霉烯酶，且以 KPC-2 为主。KPC-2 属于 A 类丝氨酸 β -内酰胺酶，其临床流行范围最广泛，通常由质粒携带在肠杆菌目细菌间水平传播^[17]。此类质粒常同时携带多种耐药基因，导致 CRKP 菌株表现为多重耐药，给临床抗感染治疗带来极大挑战^[17]。因此，严格落实医院感染防控措施，预防 VAP 患者发生 CRKP 感染更显得尤为重要。

ST11 型是中国大陆地区 CRKP 的主要流行克隆群，占比在 60% 以上^[17]。比较基因组学研究^[18]表明，由于包括荚膜多糖合成位点在内的基因组片段发生的重组，导致该型出现不同的进化分支，从而呈现不同的荚膜分型。本研究中，ST11 型 CRKP 菌株共分成 K64 和 K47 两种荚膜型，以 K64 型为主，且 K64 型 CRKP 的构成比高于 nCRKP 组 ($P < 0.05$)。2013—2017 年浙江地区一项回顾性研究发现，K64-ST11 型 CRKP 在 2016 年取代了 K47 型，成为主要流行亚克隆。通过毒力因子检测发现，CRKP 菌株携带的毒力因子比例较高，且其中 *rmpA2*、*iucA* 及 *iroN* 检出率高于 nCRKP 菌株^[19]。上述三种毒力因子均由 pLVPK-like 毒力质粒携带，是 CR-hvKP 的重要分子标志^[5]。而携带 pLVPK-like 质粒的 K64 型亚克隆，更易于在医院环境中存活^[19]。本研究 PFGE 分型结果显示，出现 3 例以上克隆传播的 PT15 和 PT16 型，均属于 K64 型 ST11-CRKP，提示该亚克隆在医院环境中具有较强的定植及播撒能力，可能与携带 pLVPK-like 质粒后毒力增强相关。另一方面，由于本研究纳入研究的菌株及病例数量较少，且菌株来源为单中心，研究结果存在一定的局限性。后续将继续扩充研究中心并增加菌株数量，系统分析携带 pLVPK-like 质粒与 CRKP 菌株医院内定植播撒之间的关联性。

综上所述，本研究结果显示，K64-ST11 型 CRKP 是临床 VAP 患者下呼吸道分离 CRKP 重要分子亚克隆。不仅表现为多重耐药，而且携带大量由 pLVPK-like 质粒介导的毒力因子。与对照组相比，CRKP 组患者临床预后不佳。应加强临床、实验室及感染管理部门的协作，密切监控 K64 型 ST11-CRKP 菌株亚克隆的流行趋势，防控其导致的医院感染事件发生。

[参考文献]

- [1] 李婧闻, 朱仕超, 张慧, 等. 呼吸机相关事件及其预防的研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(2): 175-180.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版)[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2018, 41(4): 255-280.
- [3] Gao B, Li XD, Yang FM, et al. Molecular epidemiology and risk factors of ventilator-associated pneumonia infection caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae[J]. Front Pharmacol, 2019, 10: 262.
- [4] Huang Y, Jiao Y, Zhang J, et al. Microbial etiology and prognostic factors of ventilator-associated pneumonia: a multicenter retrospective study in Shanghai[J]. Clin Infect Dis, 2018, 67 (Suppl 2): S146-S152.
- [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] 周娟, 李丹, 龙云铸. 新型冠状病毒(2019-nCoV)相关研究进展[J]. 中国感染控制杂志, 2020, 19(3): 288-292.
- [7] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 29th ed[EB/OL]. [2020-01-20]. https://community.clsi.org/media/2663/m100ed29_sample.pdf.
- [8] 储雯雯, 刘周, 杨凯, 等. 碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及分子流行病学研究[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(6): 809-813.
- [9] Brisse S, Passet V, Haugaard AB, et al. *wzi* gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for *Klebsiella* strains[J]. J Clin Microbiol, 2013, 51(12): 4073-4078.
- [10] Yu FY, Lv JN, Niu SQ, 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]. J Clin Microbiol, 2018, 56(9): e00731-18.
- [11] Zhan LL, Wang SS, Guo YJ, et al. Outbreak by hypermucoviscous *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates with carbapenem resistance in a tertiary hospital in China[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7: 182.
- [12] Francisco AP, Bugalho M, Ramirez M, et al. Global optimal eBURST analysis of multilocus typing data using a graphic matroid approach[J]. BMC Bioinformatics, 2009, 10: 152.
- [13] Liu Z, Gu Y, Li X, et al. Identification and characterization of NDM-1-producing hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Ann Lab Med, 2019, 39(2): 167-175.
- [14] 全国细菌耐药监测网. 2018年全国细菌耐药监测报告(简年版)[EB/OL]. (2019-11-19)[2020-01-20]. <http://www.carss.cn/Report/Details? aId=648>.
- [15] 欧阳娜, 童德军, 王敏, 等. 2009—2018年10 075株肺炎克雷伯菌临床分布及其耐药变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2019, 18(6): 546-551.
- [16] Xu LF, Sun XX, Ma XL. Systematic review and Meta-analysis of mortality of patients infected with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2017, 16(1): 18.
- [17] Zhang R, Liu LZ, Zhou HW, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China[J]. EBioMedicine, 2017, 19: 98-106.
- [18] Dong N, Zhang R, Liu LZ, et al. Genome analysis of clinical multilocus sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* from China [J]. Microb Genom, 2018, 4(2): e000149.
- [19] 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.

(本文编辑:文细毛)

本文引用格式:刘周, 储雯雯, 李昕, 等. VAP患者下呼吸道分离CRKP的临床及分子生物学流行特征[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(5): 403-409. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20216992.

Cite this article as: LIU Zhou, CHU Wen-wen, LI Xin, et al. Clinical and molecular epidemiological characteristics of CRKP isolated from lower respiratory tract of patients with ventilator-associated pneumonia[J]. Chin J Infect Control, 2021, 20(5): 403-409. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20216992.