

DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222978

· 论 著 ·

临床分离 CRKP 耐药和毒力基因检测及分子进化分析

陈祖阳¹, 徐令清², 何倩君²

(广州医科大学附属第六医院/清远市人民医院 1. 检验医学部/输血科; 2. 检验医学部/检验科, 广东 清远 511500)

[摘要] **目的** 了解临床耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的耐药和毒力基因携带情况,为临床防治提供依据。**方法** 收集某院 2020 年 3 月—2021 年 3 月临床标本分离的 CRKP 36 株,对菌株进行药敏鉴定,采用聚合酶链反应(PCR)扩增检测耐药基因、荚膜血清型基因、毒力基因,采用多位点序列分型(MLST)方法对菌株进行序列分型(ST 分型),基于 *wzi* 测序结果进行血清型分型和分子进化分析。**结果** 36 株 CRKP 均检出 *bla_{KPC}* 基因,未检出 *bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}* 基因。黏液丝试验均为阴性,未检出 K1、K2、K5、K20、K57 五种常见荚膜血清型,36 株 CRKP *rmpA2*、*wcaG*、*ybtS*、aerobactin、*iutA*、*iroN*、*ycf*、*mrkD*、*mrkA*、*silS*、*uge*、*Plvpk*、*fimH*、*wzi* 基因检出率为 100%;*TerW* 为 86.11%;*fimA*、*magA* 均为阴性。MLST 结果分析显示,36 株均为 ST11 型。仅 32 株成功测序 *wzi* 基因,*wzi* 分型结果为 K14. K64 96.88%(31/32),K24 3.12%(1/32)。基于测序结果构建分子进化树,结果显示 32 株菌中 31 株 100%同源,1 株与浙江菌株 KP18069 99%同源。**结论** 该院 CRKP 对碳青霉烯类耐药的主要机制是携带 *bla_{KPC}* 基因,优势 ST 分型为 ST11,*wzi* 分型以 K14、K64 为主,且携带了大量的毒力基因。分子进化树提示存在同源性感染,怀疑有输入性传播,应及时采取防控措施,防止耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌医院传播。

[关键词] 耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌; 耐药基因; 毒力基因; 分子进化树

[中图分类号] R181.3⁺2

Antimicrobial resistance, virulence genes and molecular evolution of clinically isolated CRKP

CHEN Zu-yang¹, XU Ling-qing², HE Qian-jun² (1. Department of Laboratory Medicine/Division of Blood Transfusion; 2. Department of Laboratory Medicine/Division of Laboratory Medicine, The Sixth Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University/Qingyuan People's Hospital, Qingyuan 511500, China)

[Abstract] **Objective** To understand antimicrobial resistance and virulence gene carrying of clinically isolated carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP), so as to provide basis for clinical prevention and treatment. **Methods** 36 strains of clinically isolated CRKP in a hospital from March 2020 to March 2021 were collected, antimicrobial susceptibility identification of strains were performed, antimicrobial resistance genes, capsular serotype genes and virulence genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) amplification, sequence typing (ST) was performed by multilocus sequence typing, serotyping and molecular evolutionary tree analysis were performed based on *wzi* sequencing results. **Results** 36 CRKP strains were all detected *bla_{KPC}* gene, but *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, and *bla_{OXA-48}* genes were not found. String test was negative, four common capsule serotypes K1, K2, K5, K20, and K57 were not found, detection rates of *rmpA2*, *wcaG*, *ybtS*, aerobactin, *iutA*, *iroN*, *ycf*, *mrkD*, *mrkA*, *silS*, *uge*, *Plvpk*, *fimH*, and *wzi* genes of 36 CRKP strains were 100%; *TerW* was 86.11%; *fimA* and *magA* were both negative. MLST analysis showed that 36 strains were all ST11, only 32 strains were successfully sequenced *wzi* gene. *wzi* typing results were K14. K64 96.88% (31/32) and K24 3.12% (1/32). Molecular evolutionary tree

[收稿日期] 2022-06-06

[基金项目] 广东省卫计委广东省医学科学技术研究基金项目(A2021490);清远市人民医院医学科研基金项目(20190209)

[作者简介] 陈祖阳(1989-),男(汉族),广东省茂名市人,初级检验师,主要从事临床检验研究。

[通信作者] 徐令清 E-mail: lingqing_xu@126.com

analysis based on sequencing results showed that 31 of 32 strains were 100% homologous, and 1 strain was 99% homologous with Zhejiang strain KP18069. **Conclusion** The main mechanism of resistance of CRKP to carbapenems in this hospital is *bla_{KPC}* gene, the dominant ST is ST11, and *wzi* type is mainly K14, K64, which carries a large number of virulence genes. Molecular evolutionary tree indicates that there is homologous infection, and it is suspected that there is import transmission. Prevention and control measures should be taken in time to prevent the transmission of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (CR-hvKP) in the hospital.

[**Key words**] carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*; antimicrobial resistance gene; virulence gene; molecular evolutionary tree

肺炎克雷伯菌是一种常见的条件致病菌,容易引起医院感染,可导致呼吸系统、泌尿系统、创口及血流感染等。碳青霉烯类抗生素抗菌活性强,抗菌谱广,对宿主毒性小,对头孢菌素酶(AmpC 酶)和超广谱 β -内酰胺酶(extended-spectrum β -lactamases, ESBLs)作用效果良好,在临床上越来越广泛的用于治疗重症感染患者。但随着碳青霉烯类抗生素的广泛应用,耐碳青霉烯类细菌检出率不断增加,耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP)的检出率也在不断增加,多个国家和地区出现散发和(或)流行病例^[1-2]。高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*, hvKP)常表现为高侵袭性,预后差,病死率高的特点, hvKP 最早在东南亚发现,但全世界范围内报道病例越来越多,包括欧洲和美国,中国是 hvKP 感染的高发地区^[3]。近年来耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌(CR-hvKP)感染的研究报道越来越多,由于其广泛耐药,导致感染治疗缺乏可选择药物。研究^[4-5]表明,CR-hvKP 容易在医院环境中传播,研究临床 CR-hvKP 十分重要。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集某院 2020 年 3 月—2021 年 3 月临床各科室分离的 CRKP 共 36 株,菌株入选标准:(1)CRKP,至少对碳青霉烯类药物(亚胺培南、美罗培南、厄他培南)3 个药物中的一个药物耐药[亚胺培南、美罗培南最低抑菌浓度(MIC) $\geq 4 \mu\text{g/mL}$,厄他培南 MIC $\geq 2 \mu\text{g/mL}$],参照美国临床和实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standard Institute, CLSI)2020 年版标准。(2)多次培养出 CRKP,则纳入首次培养信息。菌株于灭菌脱脂牛奶-80℃中保存。36 株标本中以呼吸道标本为主,其中痰标本 25 株(69.44%),尿标本 5 株(13.89%),血标本 5 株(13.89%),腹腔引流液 1 株(2.78%)。质控菌株为

大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853、肺炎克雷伯菌 ATCC 700603。

1.2 仪器与试剂 BD phoenix M50(美国 BD)全自动细菌鉴定仪及其配套鉴定药敏卡,哥伦比亚血琼脂平板(安图),M-H 琼脂平板(江門凱林),S1000™ PCR 扩增仪(美国 BIO-RAD),Power Pac™ Basic 电泳仪(美国 BIO-RAD),Gel Dox™ XR⁺ 紫外凝胶成像系统(美国 BIO-RAD),高速离心机(赛默飞),CO₂ 培养箱(日本松下),布鲁克质谱仪。试剂选用天根科技有限公司(TIANGEN)生产的 Taq PCR MasterMix 及 GelRed 核酸染料,北京博迈德基因技术有限公司 DNA Marker II 成品,引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 黏液拉丝试验与药物敏感试验 菌株复苏后,分区划线接种于血平板,培养 18~24 h,质谱仪重新鉴定菌种。用无菌接种环挑取单个菌落,重复 3 次;拉丝长度 $\geq 5 \text{ mm}$ 为拉丝试验阳性,即为高黏液型肺炎克雷伯菌(HMKP)。采用 BD phoenix M50 全自动微生物鉴定系统对菌株进行药物敏感试验,药敏结果判断参照 2020 版 CLSI 标准进行。

1.3.2 细菌 DNA 提取 95℃金属浴 15 min, 12 000 r/min 离心 5 min,提取核酸,取适量上清液(DNA 提取产物)于灭菌的 1.5 mL EP 管中;使用核酸蛋白检测仪检测 DNA 的浓度和纯度,OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值应为 1.7~1.9,浓度调整为大约 50 ng/ μL ,合格后于-80℃冰箱保存。

1.3.3 耐药基因、荚膜血清型及毒力基因检测 采用聚合酶链反应(PCR)扩增 4 种主要碳青霉烯酶耐药基因,包括 *bla_{KPC}*、*bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}*,碳青霉烯酶耐药基因引物序列见表 1;扩增肺炎克雷伯菌常见荚膜血清型及毒力基因,包括荚膜多糖相关基因 *magA*、*rmrA2*、*wcaG*,铁载体相关基因 *aerobactin*、*iutA*、*iroN*、*ybtS*、*ycf*。菌毛编码相关基因 *mrkA*、*mrkD*、*fimA*、*fimH*,毒力质粒 *Plvpk* 相关基因

*Plp*_{pk}、*sil*_S、*ter*_W、脂多糖表达相关基因 *uge*。同时通过扩增 *wzi* 基因检测肺炎克雷伯菌荚膜多糖血清型,确定待测菌株的 *wzi* 分型及荚膜血清型。引物序列参考相关文献^[6],见表 2。反应体系:总体积 25 μL,Taq PCR MasterMix 12.5 μL,上下游引物各 0.5 μL,DNA 模板 0.5 μL,ddH₂O 11 μL。所有 PCR 产物的纯化与分析均由生工生物工程(广州)股份有限公司完成,测序结果提交巴斯德网站 <https://bigsd.b.pasteur.fr> 比对确定其基因型。

表 1 碳青霉烯酶耐药基因引物序列及扩增产物大小
Table 1 Primer sequences and size of amplified products of carbapenemase resistance gene

基因	引物序列(5' - 3')	产物(bp)
<i>bla</i> _{KPC}	F:GATTCGCCGTCTAGTTCTGC R:GGTCGTGTTTCCCTTTAGCC	638
<i>bla</i> _{IMP}	F:CTACCGCAGCAGAGTCTTTG R:AACCAGTTTGCCTTACCAT	587
<i>bla</i> _{VIM}	F:GATGGTGTTTGGTTCGCATA R:CGAATGCGCAGCACCAG	390
<i>bla</i> _{OXA-48}	F:GCTTGATCGCCCTCGATT R:GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	281

表 2 肺炎克雷伯菌荚膜血清型及毒力基因引物序列及扩增产物大小

Table 2 Primer sequences and amplified product size of *Klebsiella pneumoniae* capsular serotypes and virulence genes

基因	引物序列(5' - 3')	退火温度(℃)	产物(bp)
<i>magA</i>	F:GGTGCTCTTTACATCATTGC R:GCAATGGCCATTTGCGTTAG	55	1 282
<i>rmpA2</i>	F:TGTGCAATAAGGATGTTACATTAGT R:TTTGATGTGCACCATTTTCA	60	580
<i>wcaG</i>	F:GGTTGGKTCAGCAATCGTA R:ACTATTCGCCAACTTTTGC	55	1 093
<i>uge</i>	F:TCTTCACGCCTTCCTTCACT R:GATCATCCGGTCTCCCTGTA	55	500
<i>ycf</i>	F:ATCAGCAGTCGGGTCAGC R:CTTCTCCAGCATTACAGCG	56	160
<i>aerobactin</i>	F:GCATAGGCGGATACGAACAT R:CACAGGGCAATTGCTTACCT	56	556
<i>iutA</i>	F:GGCTGGACATCATGGGAACCTGG R:CGTCGGGAACGGGTAGAAATCG	55	382
<i>iroN</i>	F:AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG R:GACGCCGACATTAAGACGCAG	60	665
<i>ybtS</i>	F:CACCGCAAACGCAATCTG R:GCCATAGACGCTGTTGTTGA	55	753
<i>fimA</i>	F:CGGACGGTACGCTGTATTTT R:GCTTCGGCGTTGTCTTTATC	60	500
<i>fimH</i>	F:TGCTGCTGGGCTGGTTCGATG R:GGGAGGGTGACGGTGACATC	60	527
<i>mrkA</i>	F:CGGTAAAGTTACCGACGTATCTTGTACTG R:GCTGTTAACCACCCGGTGGTAAC	56	444
<i>mrkD</i>	F:CCACCAACTATTCCTCGAA R:ATGGAACCCACATCGACATT	56	294
<i>terW</i>	F:ATGCAATTAACACCAGACAG R:CTCATTCTCTTGTAGTGTTTTC	55	205

续表 2 (Table 2, Continued)

基因	引物序列(5'-3')	退火温度(°C)	产物(bp)
<i>silS</i>	F:CATAGCAAACCTTCCAGGC R:ATCGGCAGAGAAATTGGC	55	782
<i>Plvbk</i>	F:GCTGGATGTCAACAGTACC R:TCAATTTTCCGGCTTCAT	60	916
<i>wzi</i>	F:GTGCCGCGAGCGCTTTCTATCTTGGTATTCC R:GAGAGCCACTGGTTCCAGAAYTTSACCGC	55	508
K1	F:GGTGCTCTTTACATCATTGC R:GCAATGGCCATTTGCGTTAG	55	1 283
K2	F:GACCCGATATTCATACTTGACAGAG R:CCTGAAGTAAAATCGTAAATAGATGGC	56	641
K5	F:TGGTAGTGATGCTCGCGA R:CCTGAACCCACCCCAATC	55	580
K20	F:CGGTGCTACAGTGCATCATT R:GTTATACGATGCTCAGTCGC	58	741
K57	F:CTCAGGGCTAGAAGTGTTCAT R:CACTAACCAGAAAGTCGAC	58	1 037

1.3.4 *hvKP* 的判定 目前暂时没有 *hvKP* 统一的判断标准。参考相关文献[7],本研究将同时携带 *rpmA/rpmA2*、*aerobactin*、*iroN* 基因的菌株,判定为 *hvKP*。

1.3.5 多位点序列分型(MLST) MLST 引物序列和反应条件参照 <http://bigsdB.Pasteur.fr>,再将测序结果提交 MLST 数据库网站(<http://bigsdB.Pasteur.fr>)比对,获得等位基因编码,再将获得的等位基因编码按照 *gapA*、*infB*、*mdH*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB* 的顺序组合,获得相应的 ST 型。

1.3.6 *wzi* 分型 将测序结果提交于 MLST 数据库网站中(<http://bigsdB.Pasteur.fr>)比对获得相应的血清型。

1.3.7 基于 *wzi* 构建分子进化树 从 NCBI 下载浙江菌株 KP18069(GCF_014123345.1)、安徽菌株 11219(GCF_003285145.1)、北京菌株 H11(GCF_002761515.1)、香港菌株 GD4(GCF_002893825.1) 基因组数据包,找到 *wzi* 基因 CDS 序列,连同 32 株 CRKP *wzi* 基因测序结果,应用 MEGA 7.0 软件,经 ClustalW 全局对比后,构建 Maximum-likelihood 进化树,模型采用 Kimura2-Parameter model,Bootstrap 值设为 1 000,缺失值处理为 partial deletion,cutoff:70%。

2 结果

2.1 患者基本情况 36 株 CRKP 分离自危重医学病科 21 株,脑科 11 株,呼吸内科 3 株,康复医学科 1 株。患者基本情况:36 例均有深静脉置管、引流管、气管插管或气管切开操作,使用抗菌药物 ≥ 3 种 26 例,合并诊断肺部感染 18 例。1 例上报医院感染监控系统疑似医院感染,疑似程度 86%,另有 30 例通过查阅医院病历系统和检验系统,呈不同程度怀疑医院感染,医院感染判断标准参照 WS/T 524—2016 医院感染暴发控制指南。

2.2 CRKP 对常见抗菌药物的耐药情况 36 株 CRKP 对美罗培南、亚胺培南耐药率均为 97.22%,对其他临床常见抗菌药物也呈现高度耐药,如头孢他啶、头孢噻肟、头孢吡肟、阿莫西林/克拉维酸、哌拉西林/他唑巴坦、头孢哌酮/舒巴坦、氨苄西林/舒巴坦、庆大霉素、氨基糖苷、环丙沙星、阿米卡星、左氧氟沙星、氯霉素、复方磺胺甲噁唑、哌拉西林。见图 1。

2.3 黏液丝试验 36 株 CRKP 黏液丝试验均为阴性。

2.4 耐药基因、荚膜血清型及毒力基因检测结果 未检出 K1、K2、K5、K20、K57 五种常见荚膜血清型。

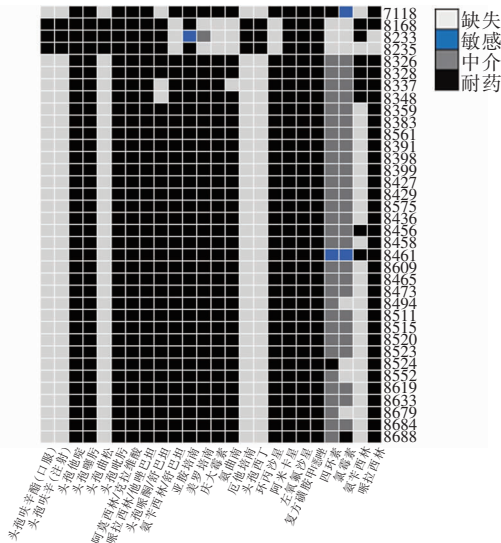
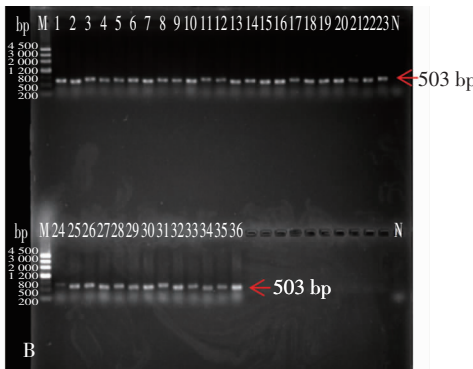
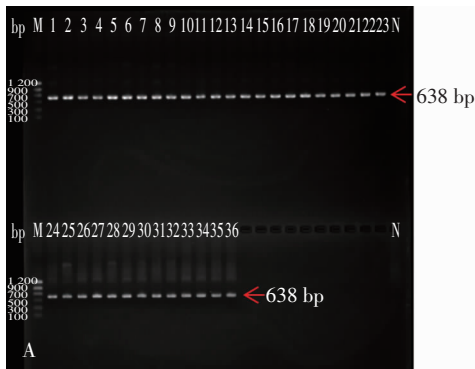


图 1 36 株 CRKP 药敏结果矩阵图

Figure 1 Matrix of 36 strains of CRKP antimicrobial susceptibility results



注:A 为 *bla_{kpc}* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果;B 为 *wzi* 基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果;M 为 DNA Marker;N 为阴性对照。

图 2 部分基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Figure 2 Gel electrophoresis results of PCR amplification products of partial genes

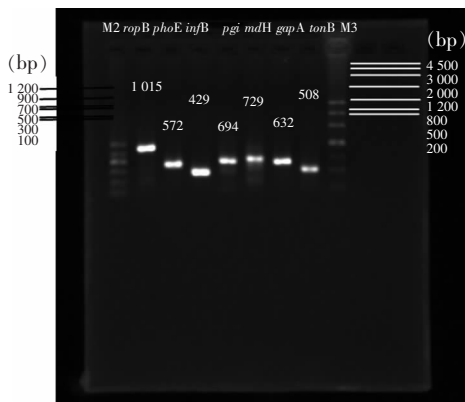


图 3 CRKP 管家基因 PCR 扩增产物凝胶电泳结果

Figure 3 Gel electrophoresis results of PCR amplification products of housekeeping genes

wzi 荚膜血清分型显示,32 株 CRKP 中 31 株为 K14、K64 型,1 株为 K24 型。耐药基因检测结果显示:36 株 CRKP 均检出 *bla_{KPC}* 基因,PCR 扩增产物电泳结果。见图 2。未检出 *bla_{IMP}*、*bla_{VIM}*、*bla_{OXA-48}* 基因。毒力基因检测结果显示:36 株 CRKP 均携带 *rmpA2*、*wcaG*、*ybtS*、*aerobactin*、*iutA*、*iroN*、*ycf*、*mrkD*、*mrkA*、*silS*、*uge*、*Plvpk*、*fimH* 基因, *TerW* 基因检出率为 86.11%,未检出 *magA* 和 *fimA* 基因。36 株 CRKP 均携带 *rmpA2*、*iroN* 和 *aerobactin* 基因,判定本研究中 36 株 CRKP 均为 CR-hvKP。

2.5 MLST 结果 36 株 CRKP 均为 ST11 型。见图 3。

2.6 *wzi* 基因分子进化结果 32 株 CRKP 中 31 株 100%同源,1 株与浙江菌株 KP18069 99%同源,见图 4。

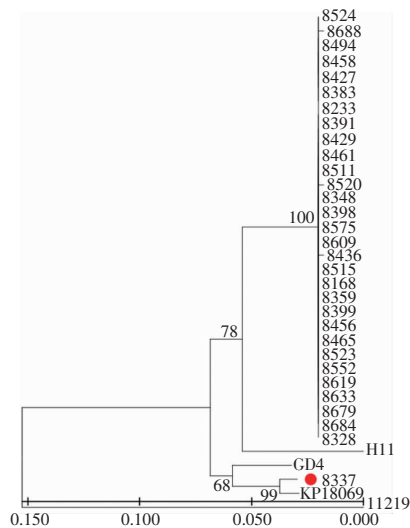


图 4 CRKP *wzi* 基因分子进化分析结果图

Figure 4 Evolutionary tree based on *wzi* gene sequencing results

3 讨论

根据全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告^[8]结果显示,肺炎克雷伯菌在革兰阴性杆菌中检出率为 13.9%~14.4%,仅次于大肠埃希菌(20.1%~21.2%)。肺炎克雷伯菌对亚胺培南耐药率从 4.8% 升至 10.5%。CRKP 检出率逐年上升,给抗感染治疗带来巨大挑战,控制 CRKP 医院传播,了解其耐药机制已成为医务人员及研究人员的关注焦点。本研究中 CRKP 对美罗培南、亚胺培南耐药率均为 97.22%,对其他临床常见抗菌药物也呈现高度耐药。本研究中 36 例患者均有深静脉置管、引流管、气管插管或气管切开操作,使用抗菌药物 ≥ 3 种 26 例,合并诊断肺部感染 18 例。长期入住重症监护病房(ICU),病情危重,免疫力低下,执行侵入性操作,抗菌药物不合理使用都可能是 CRKP 感染的易感因素,与 kiddee 等^[9] 研究一致。本研究中痰标本占 69.44%,表明 CRKP 可能主要定植于呼吸道,而患者频繁地通过呼吸机辅助通气时侵入呼吸道,造成进一步感染^[10]。如果 CRKP 获得了 hvKP 的毒力质粒,进化为 CR-hvKP,在抵抗力低下患者中传播流行,会导致病死率与治疗成本增加^[11]。

本研究中 36 株 CRKP 均携带 *rmpA2*、*iroN* 和 *aerobactin* 基因,判定本研究中 36 株 CRKP 均为 CR-hvKP。36 株 CRKP 均携带 *rmpA2*、*wcaG*、*ybtS*、*aerobactin*、*iutA*、*iroN*、*ycf*、*mrkD*、*mrkA*、*silS*、*uge*、*Plvpk*、*fimH* 基因;TerW 基因检出率为 86.11%;均未检出 *magA* 和 *fimA* 基因。*rmpA* 基因是黏液性调节因子,能有效激活荚膜的产生,使菌株表现出较高的黏液性和更强的毒力性。本研究中黏液丝试验均为阴性,但 36 株菌株均携带 *rmpA2* 基因。研究^[12] 表明,*rmpA2* 与 *rmpA* 有 80% 的同一性,*rmpA2* 通常位于毒力质粒中,*rmpA/rmpA2* 基因可作为确定 hvKP 菌株的可靠生物学标志之一。*magA* 基因编码荚膜血清型 KI 特异性 Wzy 聚合酶,只存在于 K1 血清型的菌株中,携带 *magA* 基因的菌株具有黏性的胞外多糖网状结构,可抗吞噬血清补体抵抗,导致进一步的侵袭性感染。本研究中 36 株均未携带 *magA* 基因,也未检出 K1 荚膜血清型。研究^[13] 表明,*wcaG* 基因是肺炎克雷伯菌菌血症分离株生物膜形成的独立危险因素,*wcaG* 编码的蛋白质参与了岩藻糖的生物合成,*wcaG* 缺失突

变会影响大部分荚膜多糖基因的表达,表明 *wcaG* 可能通过改变微生物多糖荚膜的组成促进肺炎克雷伯菌生物膜形成。36 株菌株均携带 *rmpA2* 和 *wcaG* 基因,两者之间是否共同促进激活荚膜多糖的合成,进而促进生物膜的形成,还需要进一步研究。

铁的摄入对细菌的生长非常重要, Fe^{3+} 生理条件下溶解度低,难以利用,且无法直接透过细胞膜主动转运到细胞内,细菌需合成并分泌铁载体摄取铁来满足生长需求。气杆菌素、耶尔森菌素、沙门菌素、肠杆菌素是肺炎克雷伯菌中重要的四种铁载体。研究^[14] 表明,气杆菌素(aerobactin)是肺炎克雷伯菌主要的毒力决定因子,能显著提高肺炎克雷伯菌在人腹腔积液、血清及小鼠全身和肺部感染中的存活率,仅表达气杆菌素就能明显提高肺炎克雷伯菌毒力。本研究 36 株菌株均携带铁载体相关基因 *aerobactin*、*iutA*、*iroN*、*ybtS*、*ycf*,进一步证明本研究中 36 株 CRKP 均为 CR-hvKP。

黏附于宿主细胞表面是细菌感染宿主的关键一步。研究^[15] 表明,菌毛普遍存在于肺炎克雷伯菌,cKP 与 hvKP 间分布并无明显差异。肺炎克雷伯菌的黏附因子主要有 I 型和 III 型菌毛,I 型菌毛由 *fimA* 和 *fimH* 基因编码调控,*fimA* 基因编码的蛋白质构成主要亚基,FimH 蛋白是位于菌毛尖端的黏附素,主要黏附表面含有甘露糖成分的物质,如泌尿生殖道上皮细胞,促进生物膜形成,导致难治性尿路感染;III 型菌毛由 *mrkABCDF* 操纵子编码,主要由菌毛亚单位 *mrkA* 和小分子黏附素 *mrkD* 组成,*mrkD* 促进 kpn 黏附不同类型的细胞,如气管上皮细胞、肾小管上皮细胞等。*mrkA* 主要黏附于非生物材料表面,启动 kpn 在留置的导管上形成生物膜^[16-17]。本研究中 36 例患者均有深静脉置管、引流管、气管插管或气管切开病史,可能是 CR-hvKP 定植于呼吸机表面导致医院传播。*uge* 基因促进脂多糖的表达,研究^[18-19] 表明,缺乏 *uge* 基因的肺炎克雷伯菌株毒性较低,并且不太可能引起尿路感染、肺炎或败血症,*uge* 基因突变降低了肺炎克雷伯菌感染尿路的毒力。

结合质粒(p17ZR-91-Vir-KPC)是由非结合 *Plvpk* 样质粒和结合 *bla_{KPC-2}* 载体质粒融合而成,并与其他两种非融合质粒动态存在。p17ZR-91-Vir-KPC 与其他敏感型肺炎克雷伯菌结合,可以使敏感型肺炎克雷伯菌快速表达碳青霉烯类耐药性和高毒力的表型^[7]。毒力质粒可以从含有 hvKP 的结合型 IncF 质粒转移到大肠埃希菌中。含有毒力和 IncF

质粒的大肠埃希菌转导子, 无论是否形成杂合质粒, 都可以通过不同的方式将毒力质粒或杂合质粒进一步转移到 CRKP, 将 hvKP 中的 pLVPK 样非结合毒力质粒动员到 CRKP 和大肠埃希菌株中。抗菌药物的不合理使用可能会促进编码抗生素耐药性的结合质粒的转移和非结合毒力质粒的传播, 导致 CR-hvKP 的传播^[19-20]。

研究^[21]表明, wzi 基因检测可高效检测肺炎克雷伯菌的荚膜血清型。本研究成功测序 32 株 CRKP 的 wzi 基因, 血清型分型 K14. K64 型 31 株, K24 型 1 株。基于 wzi 基因测序结果构建分子进化树, 结果显示临床分离的 CRKP 高度同源, 32 株 100% 同源, 表明存在医院传播; 另外, 1 株与浙江报道菌株 KP18069 99% 同源, 通过查看病例发现 8337 菌株分离患者为省外务工人员, 不排除有输入性传播, 应引起高度重视。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

- [1] Tang Y, Shen PH, Liang W, et al. A putative multi-replicon plasmid co-harboring beta-lactamase genes *bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M-14}* and *bla_{TEM-1}* and trimethoprim resistance gene *dfrA25* from a *Klebsiella pneumoniae* sequence type (ST) 11 strain in China [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0171339.
- [2] Satlin MJ, Chen L, Patel G, et al. Multicenter clinical and molecular epidemiological analysis of bacteremia due to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) in the CRE epicenter of the United States [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2017, 61(4): e02349-16.
- [3] Lee CR, Lee JH, Park KS, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017, 7: 483.
- [4] Huang YH, Chou SH, Liang SW, et al. Emergence of an XDR and carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strain in Taiwan [J]. *J Antimicrob Chemother*, 2018, 73(8): 2039-2046.
- [5] Feng Y, Lu Y, Yao ZH, et al. Carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 36 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(7): e02644-17.
- [6] 管红艳, 刘婧娴, 刘瑛. 分离自血培养肺炎克雷伯菌的毒力基因及患者临床特征分析 [J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2020, 40(2): 235-241.
- Guan HY, Liu JX, Liu Y. Virulence genes of *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures and clinical characteristics of the patients [J]. *Journal of Shanghai Jiaotong University(Medical Science)*, 2020, 40(2): 235-241.
- [7] Xie MM, Yang XM, Xu Q, et al. Clinical evolution of ST11 carbapenem resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Commun Biol*, 2021, 4(1): 650.
- [8] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年细菌耐药性监测报告 [J]. *中国感染控制杂志*, 2021, 20(1): 15-31.
- China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial resistance of bacteria: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014-2019 [J]. *Chinese Journal of Infection Control*, 2021, 20(1): 15-31.
- [9] Kiddee A, Assawatheptawee K, Na-Udom A, et al. Risk factors for gastrointestinal colonization and acquisition of carbapenem-resistant gram-negative bacteria among patients in intensive care units in Thailand [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2018, 62(8): e00341-18.
- [10] Magiorakos AP, Burns K, Rodriguez Baño J, et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* into health-care settings: guidance from the European Centre for Disease Prevention and Control [J]. *Antimicrob Resist Infect Control*, 2017, 6: 113.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Zheng JX, Lin ZW, Chen C, et al. Biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* bacteremia strains was found to be associated with CC23 and the presence of *wcaG* [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8: 21.
- [14] Russo TA, Olson R, Macdonald U, et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Infect Immun*, 2014, 82(6): 2356-2367.
- [15] Leavitt A, Chmelnitsky I, Carmeli Y, et al. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(10): 4493-4496.
- [16] Boddicker JD, Anderson RA, Jagnow J, et al. Signature-tagged mutagenesis of *Klebsiella pneumoniae* to identify genes that influence biofilm formation on extracellular matrix material [J]. *Infect Immun*, 2006, 74(8): 4590-4597.

- [17] Willsey GG, Ventrone S, Schutz KC, et al. Pulmonary surfactant promotes virulence gene expression and biofilm formation in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Infect Immun, 2018, 86(7): e00135 - 18.
- [18] Regué M, Hita B, Piqué N, et al. A gene, *uge*, is essential for *Klebsiella pneumoniae* virulence [J]. Infect Immun, 2004, 72(1): 54 - 61.
- [19] Li RC, Wong MHY, Zhou YJ, et al. Complete nucleotide sequence of a conjugative plasmid carrying *bla*(PER-1) [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 59(6): 3582 - 3584.
- [20] Xu YP, Zhang JF, Wang M, et al. Mobilization of the non-conjugative virulence plasmid from hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Genome Med, 2021, 13(1): 119.
- [21] 范沁榕, 沈兰凤, 胡仁静. *wzi* 测序在粪便携带肺炎克雷伯菌的血清型检测中的应用 [J]. 临床与病理杂志, 2020, 40(11): 2844 - 2850.
- Fan QR, Shen LF, Hu RJ. Application of *wzi* gene sequen-

cing in the detection of serotypes for *Klebsiella pneumoniae* in feces [J]. Journal of Clinical and Pathological Research, 2020, 40(11): 2844 - 2850.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:陈祖阳,徐令清,何倩君. 临床分离 CRKP 耐药和毒力基因检测及分子进化分析 [J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(11): 1060 - 1067. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222978.

Cite this article as: CHEN Zu-yang, XU Ling-qing, HE Qian-jun. Antimicrobial resistance, virulence genes and molecular evolution of clinically isolated CRKP [J]. Chin J Infect Control, 2022, 21(11): 1060 - 1067. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20222978.