DOI:10.12138/j.issn.1671－9638.20262921

·论著·

无锡地区 ST15 型耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药及毒力特征分析

万　林,刘雨彤,李　雄,沈兰凤,胡仁静
(江南大学附属中心医院/无锡市第二人民医院检验科,江苏 无锡　214002)

[摘　要] **目的**　分析江苏无锡地区临床分离的 ST15 型耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的分子流行病学及基因组进化关系,为制定区域化精准防控策略提供科学依据。**方法**　收集 2021 年 1 月—2024 年 12 月无锡市某三级甲等医院临床分离的 18 株非重复 ST15 型 CRKP 进行菌种鉴定及药敏试验。应用 Illumina NovaSeq X Plus 平台对所有菌株进行全基因组二代测序。基于此,筛选出 2 株高毒力菌株,利用 Oxford Nanopore PromethION 平台获得高质量完成图基因组,分析菌株的耐药基因、毒力基因、质粒携带情况及基因组结构特征,并基于单核苷酸多态性(SNP)构建系统发育树。利用大蜡螟感染模型评估所选菌株的毒力。**结果**　药敏试验结果显示,所有菌株对碳青霉烯类等广谱抗菌药物普遍耐药,但对替加环素及多黏菌素均敏感。18 例感染患者中,年龄≥60 岁者占 77.8%,男性占 77.8%;标本来源以呼吸道标本(占 44.4%,包括痰 7 株、支气管肺泡灌洗液 1 株)及血标本(占 33.3%,6 株)为主,其余来源于胆汁、尿液及导管。基因组进化分析表明,菌株可分为 KL19-O1 和 KL112-O1 两个克隆群,分别携带 bla_{KPC-2}、bla_{NDM-5} 和 $bla_{OXA-232}$ 等碳青霉烯酶基因。其中,4 株菌为高毒力合并碳青霉烯类耐药,呈现独特的 $rmpA2^+/iutA^+/rmpA^-$ 毒力基因谱;大蜡螟感染模型证实其毒力高于非高毒力菌株($P=0.015$)。质粒分析显示,bla_{KPC-2} 位于 $IncFII_K$ 型质粒的 IS26-Tn4401b-IS26 复合转座子结构内,$bla_{OXA-232}$ 位于 ColKP3 型质粒,而毒力基因则由 IncHI1B(pNDM-MAR)/$IncFIB_{K37}$ 融合质粒携带。**结论**　无锡地区 ST15 CRKP 以 KL19-O1-bla_{KPC-2} 克隆流行为主,但已出现携带 $rmpA2^+/iutA^+/rmpA^-$ 特征、属于 KL112-O1 型的高毒力亚克隆。持续监测 ST15-CRKP 的基因组进化对指导临床用药和制定区域化精准防控策略至关重要。

[关　键　词] 肺炎克雷伯菌;ST15;碳青霉烯类耐药;高毒力表型;分子流行病学;全基因组测序
[中图分类号] R181.3+2

Characteristics of antimicrobial resistance and virulence in ST15 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Wuxi area

WAN Lin, LIU Yutong, LI Xiong, SHEN Lanfeng, HU Renjing (Department of Laboratory Medicine, Jiangnan University Medical Center/Wuxi No. 2 People's Hospital, Wuxi 214002, *China)*

[**Abstract**] **Objective**　To analyze the molecular epidemiology and genomic evolutionary relationship of clinically isolated ST15 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in Wuxi City of Jiangsu Province, and provide scientific basis for formulating regional precise prevention and control strategies. **Methods**　Eighteen clinically isolated non-repetitive ST15-CRKP strains from a tertiary first-class hospital in Wuxi City from January 2021 to December 2024 were collected. Bacterial strains were identified and underwent antimicrobial susceptibility testing. Whole genome next-generation sequencing via Illumina NovaSeq X Plus platform was performed on all strains. Based on the results, 2 highly virulent strains were screened and analyzed by the Oxford Nanopore PromethION platform to obtain high-quality complete genome maps. Resistance genes, virulence genes, plasmid carrying status, and genomic structural characteristics of the strains were analyzed, and the phylogenetic tree was constructed based

[收稿日期]　2025－08－29
[基金项目]　无锡市卫生健康委员会"双百"中青年医疗卫生拔尖人才基金项目(HB2023021)
[作者简介]　万林(1986－),女(汉族),江苏省无锡市人,主管技师,主要从事临床微生物毒力和耐药方面研究。
[通信作者]　胡仁静　　E-mail:weiweihuhu112@163.com

on single nucleotide polymorphisms (SNPs). Virulence of selected strains was evaluated by Galleria mellonella infection model. **Results** Antimicrobial susceptibility testing results showed that all strains were generally resistant to broad-spectrum antimicrobial agents such as carbapenems, but sensitive to tigecycline and polymyxin. Among the 18 infected patients, 77.8% were aged ≥ 60 years old, and 77.8% were male. The major specimens were respiratory specimens (accounting for 44.4%, including 7 sputum specimens and 1 bronchoalveolar lavage fluid) and blood specimens (33.3%, $n = 6$), the rest were from bile, urine, and ducts. Genomic evolutionary analysis showed that the strains could be divided into two clone groups, KL19-O1 and KL112-O1, carrying carbapenemase genes such as bla_{KPC-2}, bla_{NDM-5}, and $bla_{OXA-232}$. Among them, 4 strains were hypervirulent and resistant to carbapenems, exhibiting a unique $rmpA2^{+}/iutA^{+}/rmpA^{-}$ virulence gene profile. Galleria mellonella infection model confirmed that the virulence was higher than non-hypervirulent strains ($P = 0.015$). Plasmid analysis showed that bla_{KPC-2} was located within the IS26-Tn4401b-IS26 complex transposon structure of the $IncFII_K$ type plasmid, $bla_{OXA-232}$ was located in the ColKP3 type plasmid, and the virulence gene was carried by the IncHI1B (pNDM MAR)/$IncFIB_{K37}$ fusion plasmid. **Conclusion** ST15-CRKP in Wuxi area is dominated by KL19-O1-bla_{KPC-2} clone epidemic, but hypervirulent subclones carrying $rmpA2^{+}/iutA^{+}/rmpA^{-}$ and belonging to KL112-01 have emerged. Continuous monitoring on the genomic evolution of ST15-CRKP is crucial for guiding clinical medication as well as developing regional precision prevention and control strategies.

[**Key words**] *Klebsiella pneumoniae*; ST15; carbapenem resistance; hypervirulent phenotype; molecular epidemiology; whole genome sequencing

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是医院和社区感染的重要病原菌,可引起多种严重感染,对免疫功能低下或受损的患者构成严重威胁。近年来,该病原菌在进化过程中出现高毒力(hypervirulence, Hv)与碳青霉烯类耐药性(carbapenem-resistance, Cr)融合现象,形成了兼具高毒力和广泛耐药性的"超级细菌"[1]。中国地区 KP 的流行特征呈现显著的地域性特点,虽然 ST11-CRKP 克隆长期以来占据 CRKP 主导地位[2-3],但 ST15 克隆的检出率和耐药率正呈现持续上升趋势,成为不可忽视的流行克隆。不同地区的 ST15 克隆展现出多样的表型和基因特征[4],ST15 型 KP 产碳青霉烯酶主要分为 KPC-2、NDM-5 和 OXA-48 like[5],具备强大的质粒传播能力和环境适应性。ST15 菌株通过获得携带 *rmpA2*、*iucABCD* 等毒力基因的质粒,最终进化为高毒力耐药菌株(hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, Hv-CRKP)。当前,我国 CRKP 的流行态势正从 ST11 单一主导,逐渐转向 ST11、ST15 等多克隆共存的复杂局面,预示着 CRKP 威胁正趋于多样化和扩大化。研究 2021—2024 年江苏无锡地区 ST15 临床分离株的分子流行病学特征,可为优化临床治疗方案提供支持。

1 资料与方法

1.1 菌株来源 收集无锡市第二人民医院 2021 年 1 月—2024 年 12 月临床分离的 18 株非重复 ST15 型 CRKP,菌株分离自患者血液、尿液、呼吸道等部位,以上菌株均于 -80℃保存。本研究已获得该院医学伦理委员会批准(批准文号:2021-Y-217),并获准豁免患者的知情同意。细菌鉴定和药敏试验:菌株鉴定采用法国生物梅里埃 VITEK MS v3.2 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)系统。药敏试验使用 VITEK 2 Compact 系统进行测定,补充药敏试验采用 Kirby-Bauer(K-B)纸片扩散法和肉汤微量稀释法。药敏结果判定依据美国临床实验室标准化协会(CLSI)M100-S34 标准,替加环素的折点参照美国食品药品监督管理局(FDA)规定。质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2 全基因组测序及生物信息学分析 使用天根生化科技 TIANamp Bacteria DNA Kit(DP302-02)提取菌株基因组 DNA。应用 Illumina NovaSeq X Plus 平台对所有菌株进行全基因组二代测序。选取 2 株高毒力 CRKP(KL19-ST15、KL112-ST15)在 Oxford Nanopore Technologies PromethION 平台上进行三代测序,以获得高质量完成图基因组。原始测序数据经质量控制后,利用以下在线数据库和工具进行深入分析:PathogenWatch (https://pathogen.watch/) 用于分析毒力基因、耐药基因及多位点序列分型(MLST);PlasmidFinder (https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/) 用于鉴定质粒复制子类型;ISfinder (https://

www-is.biotoul.fr/）用于识别插入序列（IS）。

1.3 基因组结构变异分析 采用 Easyfig 软件进行共线性可视化分析，以 pK2044 质粒（GenBank 登录号：AP006726）的序列作为参考序列，以深入解析菌株的基因组结构变异特征（如插入、缺失、倒位、易位等）。

1.4 系统发育分析 基于核心基因组多位点序列比对，利用 kSNP4 v4.0 软件进行 k-mer 分析以鉴定单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）位点。随后，采用最大似然法构建系统发育树。利用 IQ-TREE 软件的 ModelFinder 功能确定最优核苷酸替代模型为 GTR + F + I + G4。进一步采用 1 000 次 bootstrap 重复抽样评估系统发育树分支节点的支持率。以菌株 wx2368 作为参考菌株。

1.5 大蜡螟毒力试验 采用标准大蜡螟幼虫模型对 KP 毒力进行定量评估。选用体重 250～300 mg 的健康幼虫，通过右后足基节体腔注射 10 μL 菌悬液（含菌量 1.0×10^6 CFU/mL，相当于 10^4 CFU/虫），每株菌注射 10 只幼虫。实验设阴性对照（无菌 PBS）、空白对照（未处理幼虫）及低毒力对照 ATCC 70063 和高毒力对照（NTUH-K2044），根据基因谱的检出情况分为 ST15-CRKP 组（14 株）、ST15-Hv-CRKP（4 株）。注射后记录存活幼虫数量，在 24、48、72、96、120 和 144 h 观察记录幼虫生存状态。死亡判定标准：全身发黑、无刺激反应和无自主运动。每菌株实验均独立重复 3 次，计算每组的中位生存时间，并根据结果绘制生存曲线以评估各组毒力差异。

1.6 数据分析 应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行数据分析。大蜡螟生存曲线采用 Kaplan-Meier 法进行估计和绘制。组间生存率的差异比较采用 Log-rank（Mantel-Cox）检验，中位生存时间直接从 Kaplan-Meier 生存曲线中获取。组间死亡风险比（hazard ratio，*HR*）及其 95%置信区间（95%*CI*）通过 Cox 比例风险回归模型（cox proportional hazards regression model）进行估算，$P\leqslant0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 ST15 型 CRKP 感染患者临床特征 18 例患者年龄≥60 岁者占 77.8%（14 例），男性占 77.8%（14 例）。感染标本主要来源于呼吸道（占 44.4%，含痰 7 株、支气管肺泡灌洗液 1 株），其次为血（占 33.3%）、胆汁（11.1%）、尿（5.6%）和导管（5.6%）。感染病例主要集中在神经外科监护病房（占 27.8%），重症医学科、呼吸与危重症医学科并列其次（各占 22.2%）。患者常合并多种疾病，以呼吸系统疾病最常见（占 55.6%），其次为代谢性疾病（33.3%，主要为糖尿病）和循环系统疾病（27.8%，主要为高血压）。呼吸系统疾病中，慢性阻塞性肺疾病占 27.8%，肺炎占 16.7%，支气管扩张占 11.1%。预后不良比率占 38.9%，检出高毒力 ST15-CRKP 的 4 例患者转归均为预后不良，见表 1。

表 1 ST15 型 CRKP 感染患者的临床特征

Table 1 Clinical characteristics of patients with ST15-CRKP infection

临床特征	株数	构成比（%）
年龄（岁）		
≥60	14	77.8
<60	4	22.2
性别		
男	14	77.8
女	4	22.2
标本类型		
痰	7	38.9
血	6	33.3
支气管肺泡灌洗液	1	5.6
胆汁	2	11.1
尿	1	5.6
导管	1	5.6
病房分布		
神经外科监护室病房	5	27.8
重症医学科	4	22.2
呼吸与危重症医学科	4	22.2
其他科室	5	27.8
基础疾病		
呼吸系统疾病	10	55.6
神经系统疾病	3	16.7
血液系统疾病	3	16.7
泌尿系统疾病	1	5.6
消化系统疾病	1	5.6
代谢性疾病（含糖尿病）	6	33.3
循环系统疾病（如高血压）	5	27.8
患者预后		
预后良好	11	61.1
预后不良	7	38.9

注：部分患者合并多种基础疾病，故各系统疾病例数之和大于总例数。

2.2　药敏试验结果　所有菌株对绝大多数 β-内酰胺类(含碳青霉烯类)100%耐药,对复方磺胺甲噁唑和氟喹诺酮类(环丙沙星、左氧氟沙星)的耐药率达 100%,对头孢他啶/阿维巴坦的耐药率达 16.7%,对替加环素和黏菌素均 100%敏感。对庆大霉素的耐药率为 94.4%,仅 1 株表现为中介(见表 2)。产 OXA-232 酶菌株 wx2343 表现出独特的耐药特征,对亚胺培南(抑菌圈 12 mm,MIC 8 μg/mL)、美罗培南(抑菌圈 6 mm,MIC>32 μg/mL)和厄他培南(抑菌圈 6 mm,MIC>32 μg/mL)均表现为耐药,但亚胺培南的抑菌圈大于其他两种药物,MIC 值更低,见表 3 和图 1。

表 2　18 株 ST15-CRKP 对抗菌药物的药敏结果[株(%)]

Table 2　Antimicrobial susceptibility testing results of 18 ST15-CRKP strains (No. of isolates [%])

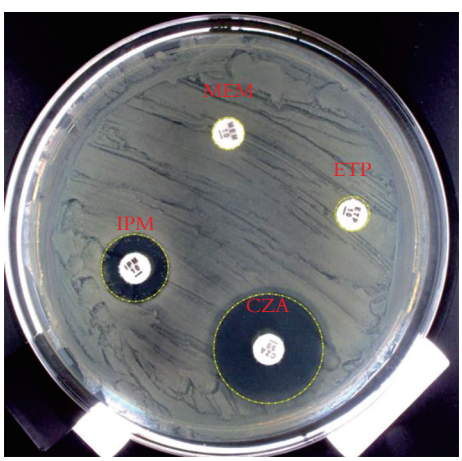
抗菌药物	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)	抗菌药物	耐药(R)	中介(I)	敏感(S)
哌拉西林/他唑巴坦	18(100)	0(0)	0(0)	厄他培南	18(100)	0(0)	0(0)
氨苄西林/舒巴坦	18(100)	0(0)	0(0)	阿米卡星	0(0)	0(0)	18(100)
头孢吡肟	18(100)	0(0)	0(0)	庆大霉素	17(94.4)	1(5.6)	0(0)
头孢他啶	18(100)	0(0)	0(0)	替加环素	0(0)	0(0)	18(100)
头孢他啶/阿维巴坦	3(16.7)	0(0)	15(83.3)	环丙沙星	18(100)	0(0)	0(0)
氨曲南	18(100)	0(0)	0(0)	左氧氟沙星	18(100)	0(0)	0(0)
亚胺培南	18(100)	0(0)	0(0)	复方磺胺甲噁唑	18(100)	0(0)	0(0)
美罗培南	18(100)	0(0)	0(0)	黏菌素	0(0)	0(0)	18(100)

表 3　ST15-CRKP 中 bla_{KPC-2} 和 $bla_{OXA-232}$ 菌株对抗菌药物药敏结果

Table 3　Antimicrobial susceptibility testing results of bla_{KPC-2} and $bla_{OXA-232}$ strains in ST15-CRKP

菌株	碳青霉烯酶种类	抑菌圈直径(mm)			E-test(MIC, μg/mL)		
		亚胺培南	美罗培南	厄他培南	亚胺培南	美罗培南	厄他培南
wx2312	bla_{KPC-2}	6/R	6/R	6/R	>32/R	>32/R	>32/R
wx2314	bla_{KPC-2}	6/R	6/R	6/R	>32/R	>32/R	>32/R
wx2343	$bla_{OXA-232}$	12/R	6/R	6/R	8/R	>32/R	>32/R
wx2368	bla_{KPC-2}	6/R	6/R	6/R	>32/R	>32/R	>32/R

注:R 表示耐药。

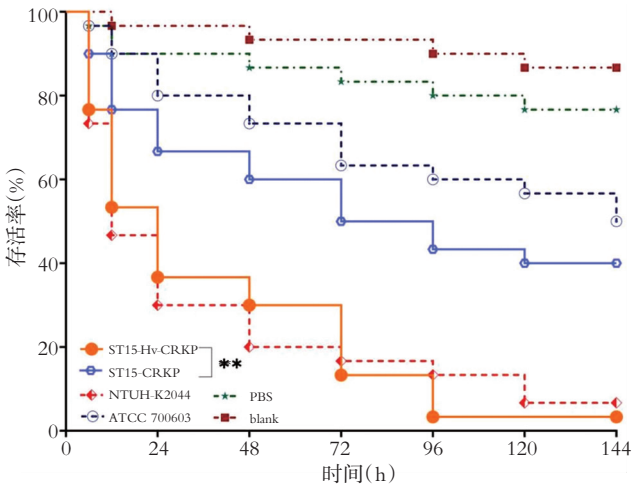


注:IPM 为亚胺培南,CZA 为头孢他啶/阿维巴坦,ETP 为厄他培南,MEM 为美罗培南。

图 1　wx2343 分离株的 K-B 法药敏结果

Figure 1　Antimicrobial susceptibility testing results of wx2343 isolates detected by K-B method

2.3　大蜡螟毒力试验　大蜡螟感染模型表明,ST15 型 KP 的毒力存在差异(图 2)。ST15-Hv-CRKP 组(n = 4)表现出高毒力表型,中位生存时间仅为 24 h,短于 ST15-CRKP 组的 84 h(Log-rank χ^2 = 5.878,P = 0.015);风险评估显示,ST15-Hv-CRKP 组大蜡螟的死亡风险为 ST15-CRKP 组的 2.63 倍(HR = 2.63,95%CI:1.18～5.83)。ST15-Hv-CRKP 组与标准高毒力菌株 NTUH-K2044 的毒力比较,差异无统计学意义(中位生存时间 24 h VS 12 h,Log-rank χ^2<0.001,P = 0.993)。ST15-CRKP 组与低毒力标准菌株 ATCC 700603 的毒力比较,差异无统计学意义(中位生存时间 84 h VS 144 h,Log-rank χ^2 = 1.075,P = 0.300)。结果显示,ST15-Hv-CRKP 亚克隆具有与经典高毒力菌株相当的侵袭性。



注：* 表示差异有统计学意义。

图 2　KP 大蜡螟毒力模型中的生存曲线

Figure 2　Survival curves of Galleria mellonella virulence model for KP

2.4　耐药和毒力基因特征　全基因组测序结果显示，18 株 ST15-CRKP 菌株呈两种流行模式：KL19-O1 型占 83.3%（15 株），KL112-O1 型占 16.7%（3 株）。碳青霉烯酶基因 bla_{KPC-2}、bla_{NDM-5}、$bla_{OXA-232}$ 分别占 77.8%（14 株）、16.7%（3 株）和 5.6%（1 株）；超广谱 β-内酰胺酶基因 bla_{SHV-28}、bla_{TEM}、$bla_{CTX-M-15}$ 分别占 100%（18 株）、61.1%（11 株）和 55.6%（10 株）。氨基糖苷类耐药基因检出率较高，以 *aac*(6′)-I（66.7%，12 株）和 *aac*(3)-II（33.3%，6 株）为主。四环素类耐药基因 *tet*(A) 检出率为 50.0%（9 株），甲氧苄啶 *dfr*A27 为 27.8%（5 株），磺胺类 *sul* 为 33.3%（6 株）。外膜蛋白变异分析显示，83.3%（15株）的菌株存在*Omp*K35截短合并 *Omp*K36 GD 突变，16.7%（3 株）为单独 *Omp*K35 截短。ST15-CRKP 分离的高毒力菌株占 22.2%（4 株），呈现 $rmpA2^{+}/iutA^{+}/rmpA^{-}$ 的毒力基因特征。18 株菌的铁摄取系统基因簇中耶尔森菌素 *ybt*、肠杆菌素 *entA*、沙门菌素 *iroE* 携带率达 100%。耶尔森菌素（*ybt*）的基因型呈现克隆特异性：KL19-O1 型对应 *ybt*14 + ICEKp12，KL112-O1 型对应 *ybt*16 + ICEKp12。见图 3。

2.5　质粒检出情况分析　KL19-O1 与 KL112-O1 克隆在质粒谱系上表现出显著差异。KL19-O1 型以携带 $IncFII_{K34}$ + $IncFIB_{K}$ 为主，介导 bla_{KPC-2} 基因的传播。KL112-O1 型的质粒谱更为复杂，均携带 IncHI1B(pNDM-MAR) 和多种 Col 质粒，提示高毒力 ST15-CRKP 的质粒谱系具有克隆特异性（图 3）。KL19-O1-bla_{KPC-2} 菌株携带 $IncFII_{K34}$ + $IncFIB_{K}$ + IncFIB（pKPHS1）；而 KL112-O1 克隆中，携带 bla_{KPC-2} 的菌株除上述部分质粒外，还含有 IncHI1B（pNDM-MAR）、ColRNAI 及 Col440I 质粒，其携带 $bla_{OXA-232}$ 的菌株则进一步增加了 $IncFII_{K7}$、$IncFIB_{K}$、ColKP3 和 Col(pHAD28)。IncHI1B 毒力质粒和多样化的 Col 质粒可作为 KL112-O1 克隆的标志性特征（图 3）。

2.6　SNP 分析　核心基因组系统发育分析结果显示，18 株菌形成两个克隆群。KL19-O1 占 83.3%（15 株），为主要流行克隆，其中 KL19-O1-bla_{KPC-2} 型占 80.0%（12/15），KL19-O1-bla_{NDM-5} 型占 20.0%（3/15）；另一克隆群为 KL112-O1-bla_{KPC-2} 型、KL112-O1-$bla_{OXA-232}$ 型，分别占 11.1%（2 株）和 5.6%（1 株）。尽管 KL112-O1 组与其他 ST15 亲缘关系较远，但均为高毒力 CRKP（图 3）。

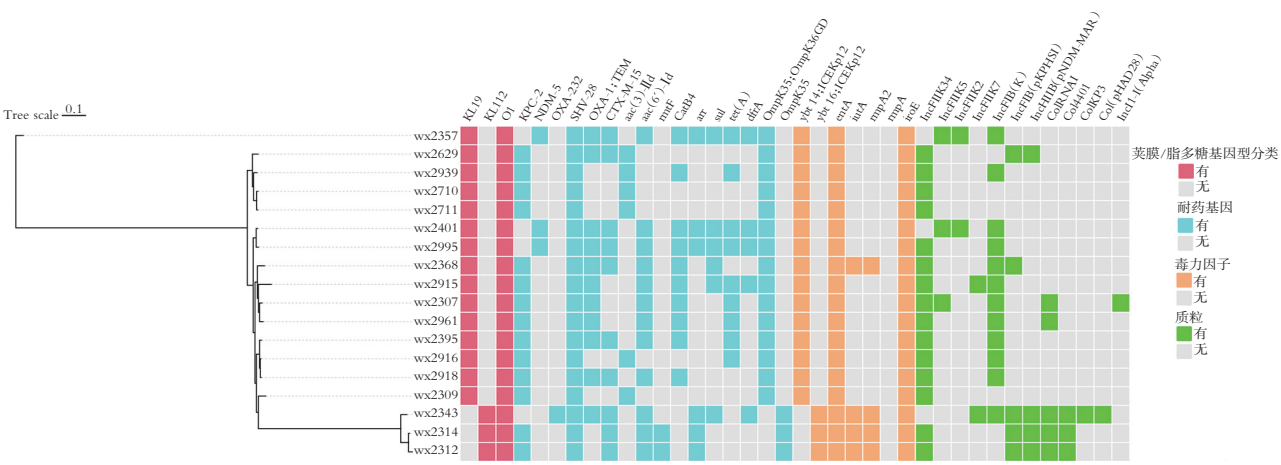
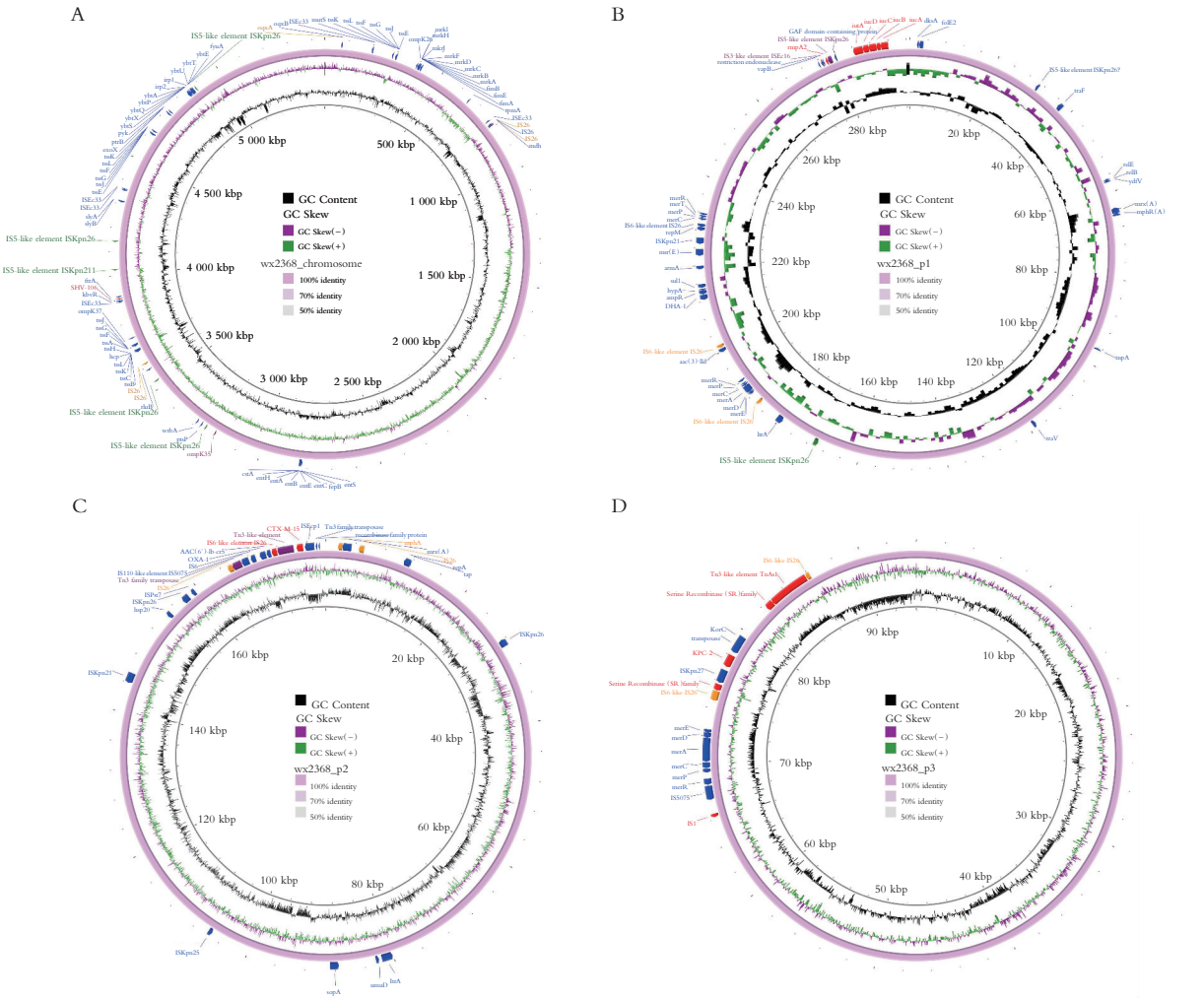


图 3　18 株 ST15-CRKP 分离菌的系统发育树与热图分析

Figure 3　Phylogenetic tree and heatmap analysis of 18 ST15-CRKP strains

2.7　ST15-Hv-CRKP 基因组特征分析　KL19-O1-*bla*$_{KPC-2}$ 基因型菌株 wx2368 基因组由一条染色体(图 4A)和三个闭合环状质粒组成(图 4B～D)。在毒力基因方面,毒力基因 *rmp*A2 与 IS3、ISKpn26 共同形成可移动单元,位于 IncFIB$_{K37}$/IncHI1B(pNDM-MAR)型杂合质粒 wx2368_p1(图 4B)上。在耐药基因方面,碳青霉烯酶基因 *bla*$_{KPC-2}$ 与超广谱 β-内酰胺酶基因 *bla*$_{CTX-M-15}$ 分别位于两个 IncFII$_{K34}$ 型质粒 wx2368_p2(图 4C)和 wx2368_p3(图 4D)上。遗传环境分析显示:*bla*$_{KPC-2}$ 嵌入在 IS26-Tn4401b-IS26 复合结构中,*bla*$_{CTX-M-15}$ 位于复合转座子结构 Tn3-IS6-IS26-Tn3-*bla*$_{CTX-M-15}$-ISEcp1-Tn3-IS26 中。

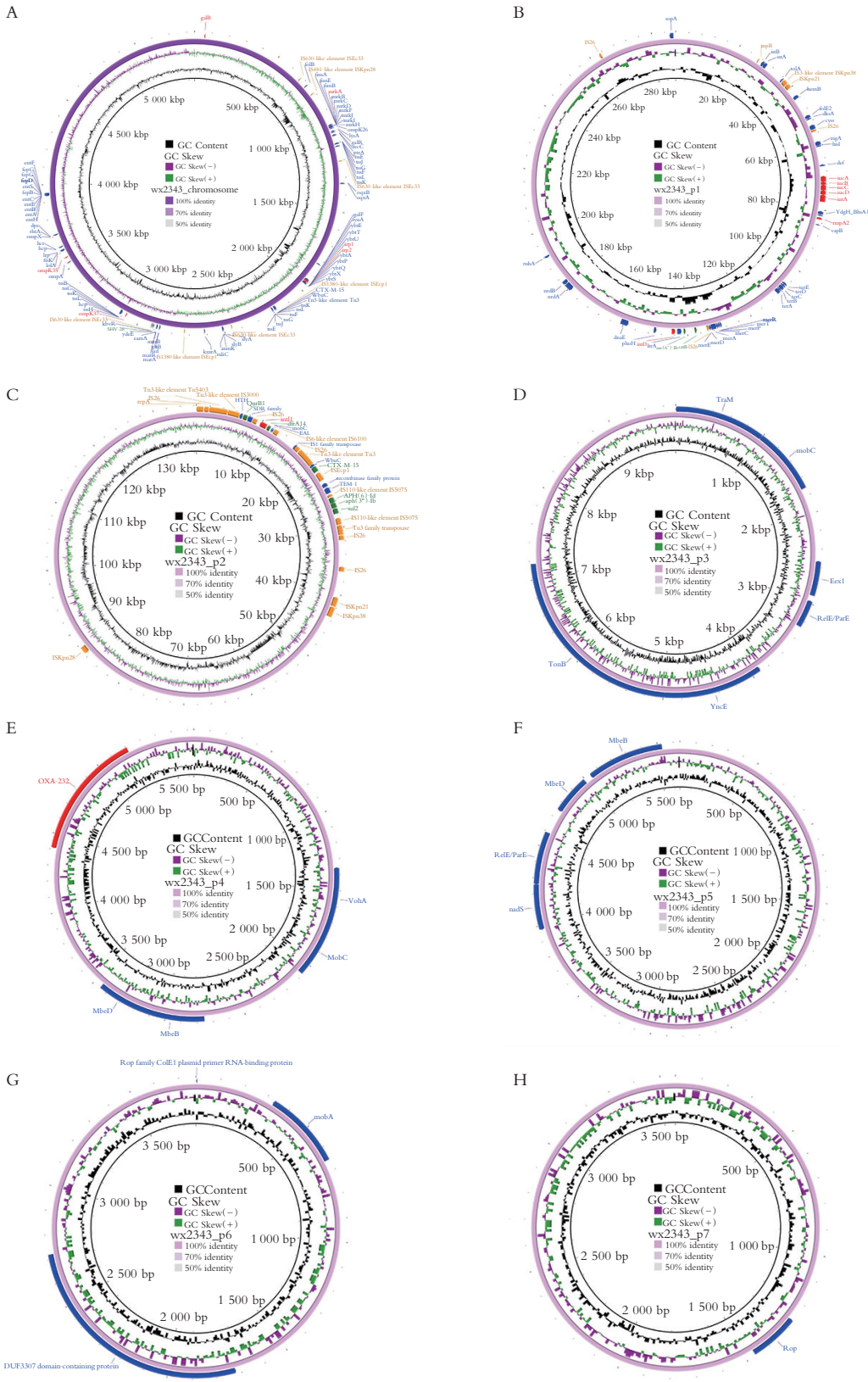


注:A 为染色体的基因图谱;B 为携带毒力基因的 IncFIB$_{K37}$/IncHI1B(pNDM-MAR) 型质粒(wx2368_p1),大小 296 813 bp;C 为携带 *bla*$_{CTX-M-15}$ 的 IncFII$_{K34}$ 质粒(wx2368_p2),大小 178 493 bp;D 为携带 *bla*$_{KPC-2}$ 的 IncFII$_{K34}$ 型质粒(wx2368_p3),大小为 94 082 bp。

图 4　ST15-KL19-O1 型菌株 wx2368 基因组及质粒圈图

Figure 4　Circle diagrams of genome and plasmid of ST15-KL19-O1 strain wx2368

全基因组分析显示,KL112-O1-*bla*$_{OXA-232}$ 基因型菌株 wx2343 的基因组由 1 条染色体(图 5A)和 7 个闭合环状质粒组成(图 5B～H),呈现出高度复杂的遗传背景。最大的质粒 wx2343_p1(图 5B)为 IncFIB$_{K37}$/IncFIB(pKPHS1)/IncHI1B(pNDM-MAR)型融合质粒,携带关键毒力基因 *iut*A 和 *rmp*A2。wx2343_p2 质粒属于 IncFII$_{K7}$ 型(图 5C),协同介导对氨基糖苷类、利福平、喹诺酮类和第三代头孢菌素的多重耐药。碳青霉烯类耐药由 ColKP3 型小质粒 wx2343_p4(图 5E)编码,该质粒携带碳青霉烯酶基因 *bla*$_{OXA-232}$ 基因。此外,该菌株还携带 2 个 ColRNAI 型质粒(wx2343_p3,图 5D;wx2343_p7,图 5H),以及 2 个未检测到明确复制子类型的质粒(wx2343_p5,图 5F;wx2343_p6,图 5G)。

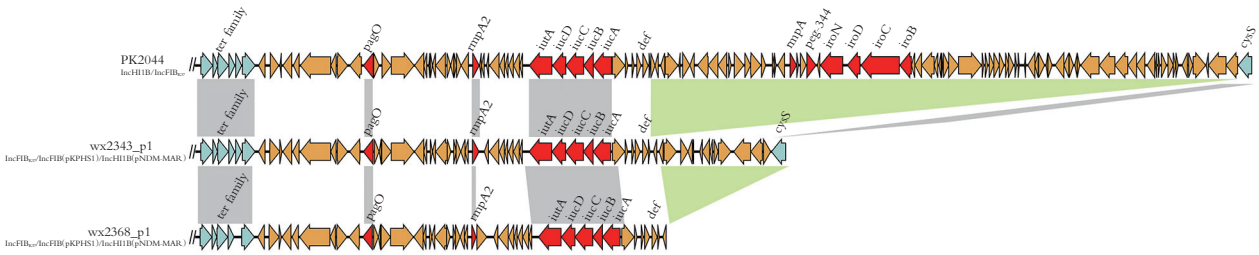


注：A 为 wx2343 染色体圈图；B 为 $IncFIB_{K37}$/IncFIB(pKPHS1)/IncHI1B(pNDM-MAR)型质粒 wx2343_p1，大小 287 317 bp；C 为 $IncFII_{K7}$ 型质粒 wx2343_p2，大小 136 348 bp；D 为 ColRNAI 型质粒 wx2343_p3，大小 9 730 bp；E 为 ColKP3 型质粒 wx2343_p4，大小 6 141 bp；F 为未分型质粒 wx2343_p5，大小 5 640 bp；G 为未分型质粒 wx2343_p6，大小 3 770 bp；H 为 ColRNAI 型质粒 wx2343_p7，大小 3 559 bp。

图 5　菌株 wx2343(KL112-O1-$bla_{OXA-232}$)的染色体及质粒圈图

Figure 5　Circle diagrams of chromosome and plasmid of strain wx2343 (KL112-O1-$bla_{OXA-232}$)

2.8　毒力质粒比较基因组分析　ST15-Hv-CRKP 与携带完整 pK2044 样毒力质粒的经典 hvKP 菌株不同，均携带 IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB$_{K37}$ 类似毒力质粒，其显著特征表现为 *rmp*A 普遍缺失，*iro* 基因簇仅存在 *iro*E。wx2343_p1、wx2368_p1 与 pK2044 毒力质粒的线性比对发现，*rmp*A + *peg*344 + *iro*N + *iro*D + *iro*C + *iro*B 可移动元件模块缺失，提示这些菌株所携带的毒力质粒可能经历了大规模的基因缺失或重组事件(见图 6)。



注：毒力基因用红色箭头表示，蓝色箭头表示序列的起始与终止基因，灰色阴影为共同存在部分，绿色阴影为缺失部分。

图 6　wx2343_p1、wx2368_p1 与 pK2044 菌株毒力质粒的线性比对

Figure 6　Linear comparison among virulence plasmids from wx2343_p1, wx2368_p1 and pK2044 strains

3　讨论

近年来，ST15 型 KP 作为全球范围内广泛传播的高风险克隆[6]，已在世界范围内广泛传播[7]。ST15 型 KP 已从传统的多重耐药病原体(multi-drug-resistant organism，MDRO)，演变为兼具碳青霉烯类耐药和高毒力特征的 Hv-CRKP[8]。本研究首次系统阐明无锡地区 ST15 型 CRKP 的流行特征：该菌株兼具克隆多样性与广泛的碳青霉烯类耐药性，主要耐药基因为 *bla*$_{KPC-2}$、*bla*$_{NDM-5}$ 及 *bla*$_{OXA-232}$；其中 22.2% 为高毒力菌株，呈现独特的 *rmp*A2^{+}/*iut*A^{+}/*rmp*A^{-} 毒力基因谱。*rmp*A2 等关键毒力基因位于 IncHI1B(pNDM-MAR)/IncFIB$_{K37}$ 融合型大质粒上，而碳青霉烯酶基因 *bla*$_{KPC-2}$ 与 *bla*$_{OXA-232}$ 则分别由 IncFIB$_{K}$ + IncFII$_{K}$ 和 ColKP3 型质粒携带。

本研究临床特征分析显示，ST15-CRKP 主要累及患有基础呼吸系统疾病的老年男性。与此特征一致，安徽省重症监护病房(ICU)监测数据显示，ST15 已成为该区域第二大 CRKP 克隆[9]，其他研究[10]也提示 ST15-CRKP 在 ICU、老年及器官移植等高风险人群中存在显著流行风险。本研究揭示无锡地区 ST15-CRKP 流行特征，是 ST15-CRKP 克隆在全球范围内加速扩散的局部体现[11]。国内外的流行数据显示，ST15 克隆已在上海[12]、浙江[13-14]、东北[15]乃至欧洲[16-17]、北美[18]和东南亚[19]成为 CRKP 的优势菌株。数据表明，ST15 已成为继 ST11 之后，全球 CRKP 防控亟须关注的另一高风险克隆。

本研究中的 ST15 菌株主要分为两个克隆群，KL19-O1 型为绝对优势克隆，其次为 KL112-O1 型。KL19-O1 携带 *bla*$_{KPC-2}$ 或 *bla*$_{NDM-5}$ 基因，与既往研究[20]结果一致，ST15-KL19 主要与耐药性相关，提示该克隆在本地医院环境中定植或传播风险增高。次要克隆 KL112-O1 兼具高毒力与碳青霉烯类耐药性[21]，其高黏液性表型进一步证实了其高毒力特征。本研究观察到无锡地区主要流行 KL19-O1 克隆，结果与长江三角洲地区已报道的 KL112-O1 主流谱系[22-23]不同，提示 ST15 克隆在该区域内可能正沿不同演化路径发展。

无锡地区 ST15 型 CRKP 以产 KPC-2 型酶为主，同时存在 *bla*$_{NDM-5}$ 和 *bla*$_{OXA-232}$ 等其他耐药基因的传播，该结果与 Feng 等[22]报道一致。作为 *bla*$_{OXA-48}$ 型碳青霉烯酶的重要变体，*bla*$_{OXA-232}$ 与 ST15 克隆高度相关。近年来，在我国 *bla*$_{OXA-232}$ 检出率显著上升，其全球传播态势也引起广泛关注[24]。本研究中产 *bla*$_{OXA-232}$ 的菌株 wx2343 对亚胺培南的 MIC 值低于美罗培南和厄他培南，提示该酶对不同碳青霉烯底物的水解效率存在差异。这种“隐形”耐药在检测中可能被误判为敏感，存在低估耐药风险并误导治疗的潜在威胁。本研究所有菌株均携带 *bla*$_{SHV-28}$，与报道的 ST15 克隆共携带 *bla*$_{KPC-2}$、*bla*$_{CTX-M-15}$ 和 *bla*$_{SHV-28}$ 结果相符[25]。

本研究显示，bla_{KPC-2} 主要由 $IncFII_{K34}$ 和 IncFII(PHN7A8)质粒携带。bla_{KPC} 基因通常被发现嵌入在 Tn3 家族的 Tn4401 转座子中，可“跳跃”到不同的质粒或细菌染色体上[26]。此外，在菌株 wx2343 中，$bla_{OXA-232}$ 位于 ColKP3 型质粒上。该质粒虽缺乏自主接合能力，但由于其拷贝数高，可通过基因剂量效应显著增强菌株的耐药水平，在 bla_{OXA-48} 类碳青霉烯酶的传播中扮演关键角色[27]。

在 18 株 CRKP 中共筛查出 4 株 ST15-Hv-CRKP。这些菌株均缺失经典毒力基因 *rmp*A 及部分 *iro* 基因簇，提示 ST15 毒力质粒可能存在地域特异性的进化变异[6]。*rmp*A 的缺失可能与质粒重组事件或 IS26 等移动元件介导的基因丢失相关[28]。尽管缺失 *rmp*A，大蜡螟感染模型显示这些菌株仍具有高毒力，提示 *rmp*A2 足以独立维持其致病潜力。这一发现提醒临床：仅依赖 *rmp*A 作为高毒力分子标志物可能低估 ST15 克隆的实际致病风险。此外，ST15 菌株的铁载体系统仅保留 *iro*E 基因，缺乏 *iro*B、*iro*C、*iro*N、*iro*D 等负责糖基化、转运与加工的核心组分，提示其铁载体功能严重受损。这种“$rmpA2^{+}/rmpA^{-}$”与“铁载体基因簇残缺”共存的毒力基因谱，共同指向该类 ST15-Hv-CRKP 可能代表了一类正在演化中的“非典型”或“中间型”毒力谱系，其致病机制值得持续关注。

本研究为单中心研究，所纳入的 ST15 型 KP 样本量有限，结果可能受该中心特定患者人群、抗菌药物使用策略及感染控制措施的影响，限制了结论在其他地区或医疗机构的普适性。此外，尽管基因组分析提示了质粒在耐药与毒力基因传播中的作用，但尚未通过接合试验直接验证其水平转移能力，相关机制有待进一步确认。尽管如此，本研究首次系统阐明了无锡地区 ST15 型 CRKP 中独特的 $rmpA2^{+}/iutA^{+}/rmpA^{-}$ 毒力基因谱和高毒力 KL112-O1 亚克隆的存在，并明确了小型 ColKP3 质粒在 $bla_{OXA-232}$ 传播中的关键作用，为理解 ST15 型 CRKP 的区域性进化特征提供了重要证据。未来需通过多中心、大样本研究，并结合功能试验，进一步阐明本地区 ST15-CRKP 的传播动力学与进化趋势。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Jia XM, Zhu Y, Jia PY, et al. The key role of iroBCDN-lacking pLVPK-like plasmid in the evolution of the most prevalent hypervirulent carbapenem-resistant ST11-KL64 *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Drug Resist Updat, 2024, 77: 101137.

[2] 毕菁，陈雯杰，田靓，等. 上海市医疗机构 ST11 型耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌分子流行病学特征与高毒力进化研究[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(8)：1075－1082.
Bi J, Chen WJ, Tian L, et al. Molecular epidemiological characteristics and hypervirulence evolution of ST11 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in medical institutions in Shanghai[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2025, 24(8): 1075－1082.

[3] 黄珊珊，施博文，魏丹丹，等. 江西地区某综合医院 ST11 型耐碳青霉烯类高毒力肺炎克雷伯菌的分子流行病学研究[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(1)：30－36.
Huang SS, Shi BW, Wei DD, et al. Molecular epidemiological study on ST11 carbepenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a general hospital in Jiangxi Province[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2025, 24(1): 30－36.

[4] Tang B, Meng TJ, Tian LJ, et al. Within-host resistance evolution of ST15 *Klebsiella pneumoniae* in an ICU immunosuppressed patient under antibiotic pressure of polymyxins, ceftazidime-avibactam, and meropenem[J]. Int J Antimicrob Agents, 2025, 66(4): 107554.

[5] Halder G, Chaudhuri BN, Veeraraghavan B, et al. Antimicrobial resistance and phylogenetic lineages of KPC-2-producing blood-borne *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae from Kolkata, India during 2015－2024: emergence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. pneumoniae with bla_{KPC-2}, bla_{NDM}, and $bla_{OXA-48-like}$ triple carbapenemases[J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(8): e0012625.

[6] Lopes BS, Altayb HN, Mahdy K, et al. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections from Aberdeen, Scotland, and their comparison to isolates from England[J]. Microb Genom, 2025, 11(6): 001413.

[7] Ewers C, Stamm I, Pfeifer Y, et al. Clonal spread of highly successful ST15-CTX-M-15 *Klebsiella pneumoniae* in companion animals and horses[J]. J Antimicrob Chemother, 2014, 69(10): 2676－2680.

[8] Gu YH, Wang X, Zhang W, et al. Dissemination of bla_{NDM}-harboring plasmids in carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(3): e0196824.

[9] Wu YL, Chu WW, Hu XQ, et al. Genomic characteristics and phylogenetic analyses of colonization and infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in multicenter intensive care units: a cohort study[J]. Microbiol Spectr, 2025, 13(4): e0158424.

[10] Fan RL, Zuo Y, Wang BW, et al. Clinical characteristics, virulence profile, and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* infections in kidney transplant recipients[J]. Infect

Drug Resist, 2025, 18: 1303 - 1311.

[11] 曹若楠, 李小宁, 阮欣然, 等. 阿奇霉素联合左氧氟沙星对不同 ST 型肺炎克雷伯菌生物膜的抑制和清除作用的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2023, 28(12): 1347 - 1356.
Cao RN, Li XN, Ruan XR, et al. Inhibitory and clearance effect of azithromycin combined with levofloxacin on biofilm of different ST types of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics, 2023, 28(12): 1347 - 1356.

[12] Tian DX, Pan F, Wang C, et al. Resistance phenotype and clinical molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among pediatric patients in Shanghai[J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 1935 - 1943.

[13] Jia HY, Zhang Y, Ye JZ, et al. Outbreak of multidrug-resistant OXA-232-producing ST15 *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in Wenzhou, China[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 4395 - 4407.

[14] Gao H, Tu YY, Li QC, et al. Molecular prevalence and geographical variations of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 isolates in a tertiary hospital in Ningbo, China[J]. Med Sci Monit, 2024, 30: e943596.

[15] Chen JJ, Hu C, Wang RX, et al. Shift in the dominant sequence type of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection from ST11 to ST15 at a medical center in Northeast China, 2015 - 2020[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 1855 - 1863.

[16] Vázquez-Ucha JC, Seoane-Estévez A, Rodiño-Janeiro BK, et al. Activity of imipenem/relebactam against a Spanish nationwide collection of carbapenemase-producing *Enterobacterales*[J]. J Antimicrob Chemother, 2021, 76(6): 1498 - 1510.

[17] Afolayan AO, Oaikhena AO, Aboderin AO, et al. Clones and clusters of antimicrobial-resistant *Klebsiella* from southwestern Nigeria[J]. Clin Infect Dis, 2021, 73(Suppl_4): S308 - S315.

[18] Chatzidimitriou M, Kavvada A, Kavvadas D, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Balkans: clonal distribution and associated resistance determinants[J]. Acta Microbiol Immunol Hung, 2024, 71(1): 10 - 24.

[19] Berglund B, Hoang NTB, Lundberg L, et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among patients at admission and discharge at a Vietnamese neonatal intensive care unit[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2021, 10(1): 162.

[20] Du QQ, Xu Q, Pan F, et al. Association between intestinal colonization and extraintestinal infection with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in children[J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2): e0408822.

[21] Song S, Zhao SL, Wang W, et al. Characterization of ST11 and ST15 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from patients with ventilator-associated pneumonia[J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 6017 - 6028.

[22] Feng L, Zhang MC, Fan ZY. Population genomic analysis of clinical ST15 *Klebsiella pneumoniae* strains in China[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1272173.

[23] 吴晓燕, 李小四, 李红胜, 等. 嘉兴地区 ST15 型耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌分子流行病学研究[J]. 浙江医学, 2024, 46(21): 2292 - 2296, 2305.
Wu XY, Li XS, Li HS, et al. Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 in Jiaxing[J]. Zhejiang Medical Journal, 2024, 46(21): 2292 - 2296, 2305.

[24] Lutgring JD, Zhu WM, de Man TJB, et al. Phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacteriaceae* producing oxacillinase-48-like carbapenemases, United States[J]. Emerg Infect Dis, 2018, 24(4): 700 - 709.

[25] Han YP, Huang L, Liu CC, et al. Characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 clone coproducing KPC-2, CTX-M-15 and SHV-28 spread in an intensive care unit of a tertiary hospital[J]. Infect Drug Resist, 2021, 14: 767 - 773.

[26] David S, Mentasti M, Sands K, et al. Genomic surveillance of multidrug-resistant *Klebsiella* in Wales reveals persistent spread of *Klebsiella pneumoniae* ST307 and adaptive evolution of pOXA-48-like plasmids[J]. Microb Genom, 2023, 9(5): mgen001016.

[27] Shankar C, Mathur P, Venkatesan M, et al. Rapidly disseminating $bla_{OXA-232}$ carrying *Klebsiella pneumoniae* belonging to ST231 in India: multiple and varied mobile genetic elements[J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 137.

[28] Shankar C, Basu S, Lal B, et al. Aerobactin seems to be a promising marker compared with unstable RmpA2 for the identification of hypervirulent carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: *in silico* and *in vitro* evidence[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2021, 11: 709681.

(本文编辑:左双燕)

本文引用格式:万林,刘雨彤,李雄,等.无锡地区 ST15 型耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药及毒力特征分析[J].中国感染控制杂志,2026,25(3):325 - 334. DOI:10.12138/j.issn.1671 - 9638.20262921.

Cite this article as: WAN Lin, LIU Yutong, LI Xiong, et al. Characteristics of antimicrobial resistance and virulence in ST15 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Wuxi area[J]. Chin J Infect Control, 2026, 25(3): 325 - 334. DOI: 10.12138/j.issn.1671 - 9638.20262921.