

• 论 著 •

某院 ST11 型耐碳青霉烯酶高毒力肺炎克雷伯菌分子流行病学研究^{*}

程瑞飞¹, 侯思南¹, 张春娇¹, 刘兆飞¹, 姜亚锋^{2△}

1. 南京中医药大学连云港附属医院/江苏省连云港市中医院检验科, 江苏连云港 222000;

2. 江苏省连云港市妇幼保健院医学遗传与产前诊断科, 江苏连云港 222000

摘要:目的 对连云港市某院 ST11 型耐碳青霉烯酶高毒力肺炎克雷伯菌(CR-HVKP)进行分子流行病学调查。方法 收集连云港市中医院 2017 年 1 月至 2019 年 6 月临床分离的 26 株耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(CRKP), 采用改良碳青霉烯酶灭活试验(mCIM)、EDTA-改良碳青霉烯酶灭活试验(eCIM)及 PCR 法分别检测菌株碳青霉烯酶耐药表型和碳青霉烯酶耐药基因。采用拉丝实验检测实验菌株的黏液表型。采用 3 种多重 PCR 进行检测, 第 1 体系对实验菌株进行 ST 分型, 第 2 体系检测最强毒力的荚膜血清型 *wzyK1*、*wzyK2*, 以及 K 位点 *wzyKL47*、*wzyKL64*, 第 3 体系检测 *rmpA*、*rmpA2*、*iroN*、*intA* 毒力相关基因, 并采用大蜡螟感染模型检测毒力表型, 采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行同源性分析。结果 26 株 CRKP 菌株, 携带以肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)为主的耐药基因菌株有 22 株, 结果与相对应的 22 株菌株的 mCIM 结果一致。ST 分型以 ST11 型为主, 占 73.1%(19/26), *wzyKL47*、*wzyKL64* 阳性率分别为 15.8%(3/19)、84.2%(16/19)。检出 8 株携带毒力相关基因且具有毒力表型的 ST11 型 CR-HVKP 以 KL64 为主, 康复科检出率最高。采用 PFGE 可分为 3 群, 带型相似度高于 85% 的有 2 株。结论 连云港市中医院检出 ST11 型 CR-HVKP 8 株, 可能存在克隆株的散在传播, 需加强对康复科院内感染的防控。

关键词:耐碳青霉烯酶; 高毒力; 肺炎克雷伯菌; pLVPK 质粒; 脉冲场凝胶电泳

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.02.009 中图法分类号:R446.5

文章编号:1673-4130(2021)02-0165-06 文献标志码:A

Molecular epidemiological study of ST11-CR-HVKP in a hospital^{*}

CHENG Ruifei¹, HOU Sinan¹, ZHANG Chunjiao¹, LIU Zhaofei¹, JIANG Yafeng^{2△}

1. Department of Clinical Laboratory, Lianyungang Hospital Affiliated to Nanjing University of Traditional Chinese Medicine/ Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Lianyungang, Jiangsu 222000, China; 2. Department of Medical Genetics and Prenatal Diagnosis, Lianyungang Municipal Maternal and Child Health Care Hospital, Lianyungang, Jiangsu 222000, China

Abstract: Objective To conduct the molecular epidemiological investigation of ST11 type carbapenems resistant high virulence *Klebsiella pneumoniae* (ST11-CR-HVKP) in a hospital of Lianyungang City. **Methods** Twenty-six strains of carbapenems resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) were collected in the Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2017 to June 2019. The resistance phenotype and carbapenem resistance gene were detected by adopting mCIM, eCIM and PCR respectively. The mucus phenotype of the experimental strains was detected by the wire-drawing test. Three kinds of multiplex PCR were used. The first system was used for conducting the ST typing of the experimental strains. The second system was used to detect the strongest virulent capsular serotypes *wzyK1*, *wzyK2*, *wzyKL47* and *wzyKL64*. The third system was used to detect the virulence related genes of *rmpA*, *rmpA2*, *iroN* and *intA*, and the virulence phenotype was detected by the infection model of the great wax moth, and the homology was analyzed by adopting PFGE. **Results** Among 26 strains of CRKP, 22 strains carried the resistance gene dominated by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases, which were consistent with the results of the corresponding 22 strains of mCIM. The ST typ-

^{*} 基金项目:江苏省连云港市中医院“赵化南”青年科技基金项目。

作者简介:程瑞飞,男,主管技师,主要从事临床检验诊断学研究。△ 通信作者, E-mail:384032189@qq.com。

本文引用格式:程瑞飞,侯思南,张春娇,等. 某院 ST11 型耐碳青霉烯酶高毒力肺炎克雷伯菌分子流行病学研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(2):165-170.

ing was mainly the ST11, accounting for 73.1% (19/26). The positive rates of wzyKL47 and wzyKL64 were 15.8% (3/19) and 84.2% (16/19), respectively. Eight strains carrying virulence related genes and virulence phenotype ST11 were detected and they were mainly KL64, the highest detection rate was in the rehabilitation department. The strains were divided into the three groups by adopting PFGE, and there were two strains with band similarity higher than 85%. **Conclusion** Eight strains of ST11-CR-HVKP detected in the Lianyungang Hospital of Traditional Chinese Medicine. The sporadic spread of clone strains may exist, so it is necessary to strengthen the prevention and control of hospital infection in the rehabilitation department.

Key words: carbapenems resistance; high virulence; *Klebsiella pneumoniae*; pLVKP plasmid; pulsed field gel electrophoresis

肺炎克雷伯菌是一种可对人产生较强致病性的条件致病菌,可通过多种途径感染人体。根据致病性和毒力,可将肺炎克雷伯菌分为 2 种:与多重耐药相关的经典型肺炎克雷伯菌(cKP)和高毒力肺炎克雷伯菌(HVKP)。随着碳青霉烯类抗菌药物的大量应用, cKP 大量地转变为耐碳青霉烯酶肺炎克雷伯菌(CRKP)。CRKP 的 ST 分型主要包括在亚洲尤其是中国流行的 ST11 型,以及在欧洲及北美地区流行的 ST258 型。HVKP 的毒力显著高于 cKP,可引起严重的社区获得性感染,常引起化脓性肝脓肿、严重肺炎、脑膜炎和坏死性筋膜炎等。HVKP 引起的疾病通常是因其过度分泌荚膜多糖所致^[1-2],感染对象主要为健康的年轻人群,主要 ST 分型包括 ST23、ST65 及 ST86 型等^[3]。该菌对除了氨苄西林外的其他大部分抗菌药物均敏感。有研究报道了我国东南地区某医院携带 bla_{KPC-2} 的耐碳青霉烯酶高毒力肺炎克雷伯菌(CR-HVKP)以 ST11 型克隆传播为主^[4]。随着抗菌药物耐药性的加重,CR-HVKP 分离株的报道越来越多^[5]。鉴于 ST11 型 CR-HVKP 日趋严峻的形势,本文分析了连云港市中医院(以下简称该院)ST11 型 CR-HVKP 的流行特点、耐药基因、毒力基因及毒力表型情况,并进行同源性分析,为耐药菌的监测和院内感染防控工作提供科学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集该院 2017 年 1 月至 2019 年 6 月临床分离的 26 株经过 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪鉴定的 CRKP 菌株,剔除同一患者重复分离的菌株,所有菌株实验前经质谱仪鉴定。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪、veriti 96 孔 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)、2720 型 PCR 扩增仪(美国 ABI 公司)、凝胶成像系统分析仪(美国 BIO-RAD)、CHEF Mapper 脉冲场电泳仪(美国 BIO-RAD)、冷凝泵(美国 BIO-RAD)、电泳仪(美国 BIO-RAD)、质谱仪(德国 Bruker)、水浴摇床、高速低温离心机、培养箱、水浴箱、微量加样枪、

电子天平、超纯水机(摩尔)。

1.2.2 试剂 美罗培南(MEM)药敏平板(自制)、MH 琼脂平板、DNA 标志物、PCR 扩增试剂(Mix、Taq 酶、dNTP Mix、Taq Buffer 等)、引物(上海生工)、灭菌去离子水、琼脂糖凝胶(英国 OXOID)、胰蛋白胨大豆肉汤(TSB,英国 OXOID)、限制性内切酶 Xba I (BioLabs)、蛋白酶 K、凝胶染色试剂 Gelred (Biotium)等。

1.3 方法

1.3.1 碳青霉烯酶耐药表型检测 通过改良碳青霉烯酶灭活试验(mCIM)进行碳青霉烯酶耐药表型检测:用 1.0 μ L 接种环取满环的过夜培养的纯实验菌株于 2.0 mL TSB 肉汤中混匀。每管放入 1 张含 10.0 μ g MEM 的无菌纸片,于 35 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 4 h。用 10.0 μ L 接种环将 MEM 纸片从 TSB 肉汤中取出,轻轻挤去纸片上水分,将纸片贴在已涂布大肠埃希菌 ATCC25922 的 MH 平板上。倒置平板,35 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 18~24 h 后量取抑菌圈直径。结果判断:抑菌圈直径为 6~15 mm,或直径为 16~18 mm 的抑菌圈内有针尖状菌落时为阳性;抑菌圈直径为 16~18 mm,或 ≥ 19 mm 的抑菌圈内有针尖状菌落时为不确定;抑菌圈直径 ≥ 19 mm 为阴性。同时进行 EDTA-改良碳青霉烯酶灭活试验(eCIM):取已标识好的第 2 支含 2.0 mL TSB 的肉汤管,加入 20.0 μ L 0.5 mmol/L EDTA 溶液,余下操作同 mCIM。两种试验同时进行,将 mCIM 和 eCIM 试管中的 MEM 贴于同一个已涂布有大肠埃希菌 ATCC25922 的 MH 平板。结果判断:当菌株 mCIM 阳性时,mCIM 和 eCIM 中 MEM 抑菌圈直径相差 ≥ 5 mm,eCIM 结果为阳性;直径差 ≤ 4 mm,eCIM 结果为阴性。

1.3.2 碳青霉烯酶耐药基因检测 采用 Vitek-2 Compact 全自动微生物鉴定药敏分析仪进行菌株鉴定及药敏试验。采用单重 PCR 检测 bla_{KPC}、bla_{NDM}、bla_{VIM}、bla_{IMP}、bla_{OXA-48} 等常见的碳青霉烯酶耐药基因,对扩增产物进行凝胶成像,观察有无目的条带。

1.3.3 ST 分型 采用多重 PCR 检测 Khe、Kphp、

pilV、*pilL*、ST23、ST65、ST86 等常见 ST 分型,并采用凝胶成像仪对 PCR 扩增产物进行显影成像。Khe 是肺炎克雷伯菌体外溶血毒素基因,是鉴定肺炎克雷伯菌的金标准,可作为一种 PCR 质控方法用于评价 DNA 模板的种类和质量。根据文献[6]判断结果,含 Khe 基因、*kphP* 基因、*pilL* 基因这 3 条目的基因条带为 ST11 型,含 Khe 基因、*kphP* 基因、*pilL* 基因、*PilV* 基因这 4 条目的基因条带为 ST258 型。

1.3.4 黏液表型检测 采用拉丝实验,用接种环接触培养基上的单个菌落,然后轻轻向上牵拉,观察有无黏液丝。如果有,且长度 ≥ 5 mm,实验结果即为阳性,判断该菌株的黏液表型为高黏液性菌株。

1.3.5 荚膜血清型及毒力基因检测 采用多重 PCR 检测实验菌株最强毒力的血清型 *wzyK1*、*wzyK2*,以及 K 位点 *wzyKL47*、*wzyKL64* 两个基因。采用另一多重 PCR 反应体系检测实验菌株 pLVPK 毒力质粒相关的 *rmpA*、*rmpA2*、*iroN*、*intA* 这 4 个毒力基因,分别对扩增产物进行凝胶成像并观察有无目的片段。

1.3.6 毒力表型实验 取含有毒力基因的 8 株对数期实验菌株分别用生理盐水配制成 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 CFU/mL 的悬液,分别用汉密尔顿注射器经大蜡螟后足注射 10.0 μ L 悬液进行毒力表型实验。将注射后的虫体分别置于无菌平皿中 72 h,每 12 小时记录 1 次大蜡螟是否死亡。同时用肺炎克雷伯菌标准菌株 ATCC700603 进行对照实验。若虫体僵硬、发黑、无活动度,则判断大蜡螟死亡。该实验重复 3 次,取 3 次实验的平均值。

1.3.7 同源性分析 对含有毒力基因的 8 株实验菌株采用脉冲场凝胶电泳(PFGE)进行同源性分析:制备 1%的低熔点胶,取 200.0 μ L 细胞悬液缓冲液(CSB),加入 20.0 μ L 蛋白酶 K(20 mg/mL),56 $^{\circ}$ C 水浴箱放置 3~5 min,取出后迅速加入已制备好的 1%低熔点胶 200.0 μ L 并迅速混匀,将其迅速加入模具中包埋细菌,记录模具每一孔对应的标本编号。加入一定的蛋白酶 K 和细胞裂解液(CLB),置于 54 $^{\circ}$ C 水浴摇床,孵育 2 h 进行细菌裂解。分别使用 50 $^{\circ}$ C 的 ddH₂O 和 TE 溶液清洗胶块。将胶块用 Xba I 进行酶切 8~12 h;配制 1%PFGE 凝胶并加样待胶块固定。在脉冲场电泳 18~19 h 后,洗胶脱色后用凝胶成像仪成像并保存图片。用 GelJ 软件对结果图片进行同源性分析。判断标准:不同菌株之间 PFGE 带型相似度 $\geq 85\%$ 即为同一克隆;带型相似度 $\geq 70\%$ 即为同一群[7]。

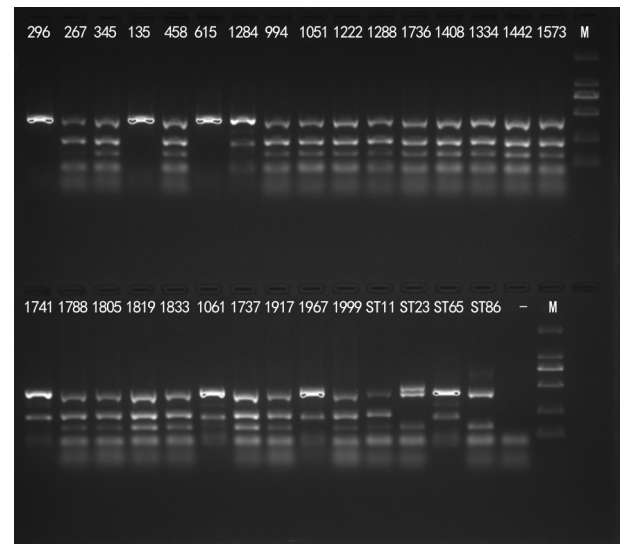
1.4 统计学处理 收集所有菌株的标本信息及实验结果,并采用 SPSS17.0 统计软件对实验结果进行统计,同源性分析采用 GelJ 软件进行分析,大蜡螟感染模型死亡率采用 Excel2016 进行统计。

2 结 果

2.1 碳青霉烯酶耐药表型结果 检测出 24 株实验菌株 mCIM 为阳性,可以判断为产生碳青霉烯酶,其中 3 株 eCIM 阳性。

2.2 药敏试验及耐药基因检测结果 所有实验菌株均表现为高水平耐药、多重耐药,具有耐碳青霉烯类抗菌药物的特点。单重 PCR 结果显示,bla_{KPC} 占 73.1%(19/26),bla_{NDM} 占 7.7%(2/26),bla_{IMP} 占 3.8%(1/26),而 bla_{VIM}、bla_{OXA-48} 未检出,另有 4 株为阴性结果,可能不含碳青霉烯酶耐药基因或含有其他不常见的碳青霉烯酶耐药基因。22 株携带碳青霉烯酶耐药基因的阳性菌株检测结果与相对应菌株 mCIM 结果一致。

2.3 ST 分型 所有实验菌株均检出肺炎克雷伯菌的标记基因 Khe,其 ST 分型以 ST11 型为主,占 73.1%(19/26),其次为 ST65 型,占 15.4%(4/26)。ST23、ST86、ST258 型未检出。见图 1。



注:M 为标志物;—为阴性对照;数字为菌株编号。

图 1 ST 分型电泳图

2.4 黏液表型结果 1288 号菌株和 1334 号菌株肉眼可见明显黏液,拉丝实验阳性,阳性率为 7.69%。其他菌株拉丝实验阴性。

2.5 荚膜血清型及毒力基因检测结果 615、1967 号菌株荚膜血清型为 *wzyK1* 的占 7.7%(2/26),*wzyK2* 未检出。19 株 ST11 型菌株中 *wzyKL47* 阳性率为 15.8%(3/19),*wzyKL64* 阳性率为 84.2%(16/19)。4 种毒力基因 *rmpA*、*rmpA2*、*iroN* 和 *iutA* 阳性率分别为 30.8%(8/26)、30.8%(8/26)、7.7%(2/26)、38.5%(10/26),*iutA* 阳性率较高(图 2)。其中 994 号及 1967 号菌株携带 *iutA* 这一种毒力基因,其 ST 分型分别为 ST11、ST65 型。至少携带 1 种毒力基因的菌株共 10 株,其中 8 株为 ST11 型,由康复科患者分离出的菌株占 87.5%(7/8),其中有 87.5%(7/8)荚

膜合成位点分型为 KL64。

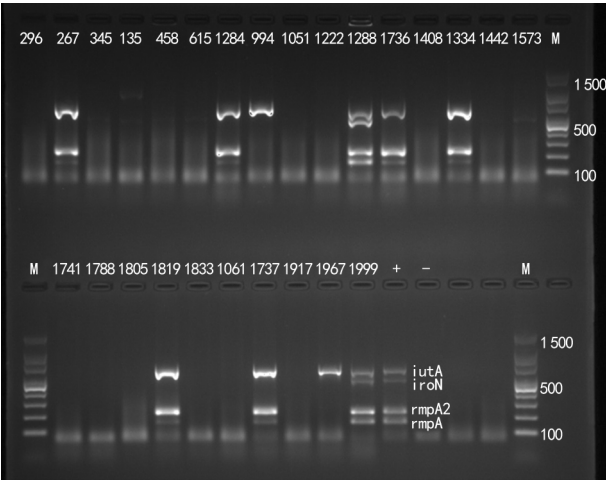
2.6 毒力实验结果 3 次实验中,大蜡螟在注射菌悬液水平为 10^4 、 10^5 CFU/mL 时,72 h 死亡率分别为 37.5%、62.5%,注射水平为 10^6 、 10^7 CFU/mL 时,24 h 死亡率均为 100.0%;而 3 次实验中肺炎克雷伯菌标准菌株(对照组)72 h 均未死亡,见图 3。大蜡螟感染模型结果显示,8 株携带毒力基因的实验菌株均

具有高毒力表型,可判断为 CR-HVKP。

8 株 CR-HVKP 菌株均为 ST11 型,所有携带毒力基因的菌株均携带 bla_{KPC} 基因,其荚膜血清型为非 K1、K2 的其他分型,2 株拉丝实验阳性。菌株的科室分布以康复科为主,痰液标本和尿液标本各占 50%,感染患者的平均年龄为 (64.5±19.4) 岁,男女各占 50%。见表 1。

表 1 高毒力的 ST11 型 CR-HVKP 菌株临床信息统计

菌株编号	科室	年龄(岁)	性别	标本类型	耐药基因	ST 分型	KL 分型	拉丝实验	毒力基因
267	康复科	47	男	尿液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阴性	rmpA、rmpA2、iutA
994	康复科	44	女	痰液	bla _{KPC}	ST11	KL47	阴性	iutA
1288	康复科	39	女	尿液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阳性	rmpA、rmpA2、iroN、iutA
1736	康复科	74	女	尿液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阴性	rmpA、rmpA2、iutA
1737	康复科	74	女	痰液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阴性	rmpA、rmpA2、iutA
1334	泌尿外科	95	男	尿液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阳性	rmpA、rmpA2、iutA
1819	康复科	67	男	痰液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阴性	rmpA、rmpA2、iutA
1999	康复科	76	男	痰液	bla _{KPC}	ST11	KL64	阴性	rmpA、rmpA2、iroN、iutA



注:M 为标志物;-为阴性对照;+为阳性对照;数字为菌株编号。

图 2 毒力基因凝胶电泳图

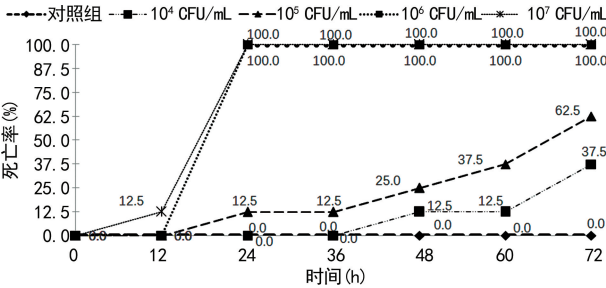


图 3 大蜡螟感染模型死亡情况

2.7 同源性分析结果 通过 GelJ 软件对 PFGE 结果进行分析,8 株 CR-HVKP 可分为 3 群,其中 1737 号和 1819 号菌株带型相似度高于 85%,可能存在同一克隆株的散在传播。见图 4。

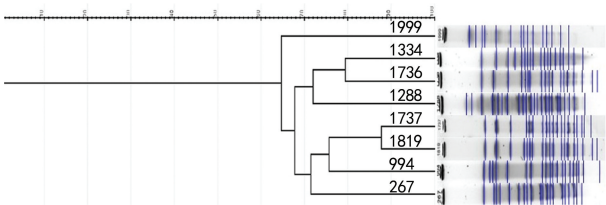


图 4 8 株 CR-HVKP 菌株的同源性分析

3 讨论

CRKP 主要的耐药机制是产碳青霉烯酶^[8], mCIM 是美国临床实验室标准化协会于 2017 年推荐的一种具有较高灵敏度和特异度的检测碳青霉烯酶表型的新方法^[9-10]。eCIM 与 mCIM 联合使用可以区分产金属酶和丝氨酸碳青霉烯酶的肠杆菌科细菌。mCIM 可以单独进行实验,但 eCIM 必须同时和 mCIM 联合进行实验。本次实验中检测出 mCIM 阳性的菌株有 24 例,其中有 22 株携带碳青霉烯酶耐药基因,以 bla_{KPC} 为主,另外 2 株可能携带其他的碳青霉烯酶耐药基因。

1986 年一种可形成长度>5 mm 黏液丝并导致社区获得性肝脓肿的肺炎克雷伯菌被报道出来。这种具有高黏液的肺炎克雷伯菌被认为是 HVKP^[11],是一种具有高侵袭性、可引起获得性肝脓肿的肺炎克雷伯菌^[1],其引起肝脓肿的主要荚膜血清型为 K1、K2。拉丝实验被认为是鉴定 HVKP 的标准方法。目前对于 HVKP 的定义,仍未达成共识。肺炎克雷伯菌的高黏液表型与高毒力表型存在较大的重叠,但近年来已发现有些菌株拉丝实验阴性却引起健康人群

侵袭性感染^[12]；一项研究也发现了具有高黏液表型却无毒性表达的克雷伯菌株^[13]。最近的研究发现，pLVPK 毒力质粒所携带的毒力相关基因 *rmpA*、*rmpA2*、*iutA*、*iucABCD* 和 *iroBCDN* 是导致高毒力表型的主要原因^[14-15]。本文结合分子生物学筛选出携带毒力基因的菌株，通过大蜡螟感染模型证实其具有高毒力表型，将携带相关毒力基因、具有毒力表型的肺炎克雷伯菌定义为 HVKP。HVKP 的毒力与荚膜多糖(K 抗原)、脂多糖(O 抗原)、铁载体系统、菌毛(如 1 型和 3 型菌毛)、非菌毛黏附蛋白及其他的毒力基因有关^[16-17]。

有研究认为肺炎克雷伯菌的高耐药性与高毒性不会重叠出现^[18]，然而近年来 CR-HVKP 菌株在世界范围内，特别是在我国被越来越多地检出^[19-20]。CR-HVKP 是由于经典的 CRKP 获得了 pLVPK 毒力质粒^[4]或 HVKP 获得了碳青霉烯酶的编码质粒^[21]而产生的。目前 CR-HVKP 在亚洲特别是我国最流行的 ST 分型是 ST11 型。

本研究通过多重 PCR 同时扩增了 *wzyK1*、*wzyK2*、*wzyKL47* 和 *wzyKL64*。肺炎克雷伯菌传统的荚膜血清型至少有 78 种，与 HVKP 相关的有 K1、K2、K5、K16、K20、K54、K57 等，其中最常见和最致命的荚膜血清型是 K1 和 K2^[11]。KL 是基于肺炎克雷伯菌全基因组数据的荚膜合成位点的一个新的命名方法，KL47 和 KL64 是 ST11 型菌株的 2 个最普遍的荚膜合成位点，也是我国目前分离的 ST11 型最常见的 KL 分型。通过对质粒图谱进化树的分析，发现 KL47 和 KL64 属于两个分支，所携带的质粒谱不同。KL47 *rmpA* 几乎全部定位于 210 Kb 质粒上，pLVPK 类似的毒力质粒之间发生重组的频率更高，而对于 KL64，*rmpA* 定位于大小相同的约 210 Kb 的质粒上，携带 KL64 的 pLVPK 质粒的毒力高于携带 KL47 的 pLVPK 质粒。本研究检测的 8 株 ST11 型 CR-HVKP 的 KL 分型以 KL64 为主(87.5%)，这与文献^[4]报道的 5 株携带毒力质粒的 ST11 型肺炎克雷伯菌全部为局部单克隆传播的 KL47 不相同，表明该院 ST11 型 CR-HVKP 并非单克隆传播，同时也说明了该院分离出的实验菌株的毒力比文献^[4]报道的菌株毒力更强。目前的研究表明，ST11 型 CR-HVKP 的 KL 分型更多的是 KL47^[22]。

本课题采用 3 种多重 PCR 用于 ST11 型 CR-HVKP 的快速检测：第 1 体系用于检测 CRKP 和 HVKP 常见的 ST 型，包括 ST11、ST258、ST23、ST86 和 ST65 型等。第 2 体系鉴别与 ST23、ST65、ST86 型相关荚膜血清型 K1、K2 以及 ST11 相关的 KL47 和 KL64 等。第 3 体系用于检测毒力质粒 pLVPK 相

关的 *rmpA*、*rmpA2*、*iroN*、*intA* 4 种毒力基因。

通过对该院 ST11 型 CR-HVKP 进行分子流行病学分析，发现该院的 CR-HVKP 菌株 87.5% 来源于康复科。一方面，康复科患者大多来自连云港地区各大医院，需长期住院康复治疗，而长时间住院是耐药的独立危险因素；另一方面，共用康复设备，可能存在院内感染的风险。需要加强对 CR-HVKP 检出科室的院内感染防控，减少 CR-HVKP 在患者之间的传播，科学合理用药。本研究的不足之处为没有进一步验证 pLVPK 毒力质粒的存在，可能存在一些 pLVPK 质粒携带的其他的毒力基因或毒力基因以外的毒力机制造成 HVKP 的高毒力。

综上所述，该院检出 ST11 型 CR-HVKP 8 株，以 KL64 为主，康复科检出率最高，可能存在克隆株的散在传播，需加强对康复科院内感染的防控。

参考文献

- [1] STRUVE C, ROE C C, STEGGER M, et al. Mapping the evolution of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. *mBio*, 2015, 6(4): e00630.
- [2] PACZOSA M K, MECSAS J. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2016, 80(3): 629-661.
- [3] BIALEK-DAVENET S, CRISCUOLO A, AILLOUD F, et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups [J]. *Emerg Infect Dis*, 2014, 20(11): 1812-1820.
- [4] GU D X, DONG N, ZHENG Z W, 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.
- [5] ZHAN L, WANG S S, GUO Y J, 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(1): 182.
- [6] YU F, LV J N, NIU S, 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): e00718-e00731.
- [7] TENOVER F C, ARBEIT R D, GOERING R V, et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(9): 2233-2239.
- [8] ZHANG R, LIU L Z, ZHOU H W, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant enterobacteriaceae (CRE) strains in China [J]. *Ebio Med*, 2017, 19(1): 98-106.

- [9] PIERCE V M, SIMNER P J, LONSWAY D R, et al. Modified carbapenem inactivation method for phenotypic detection of carbapenemase production among enterobacteriaceae[J]. J Clin Microbiol, 2017, 55(8): 2321-2333.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute. The performance stands for antimicrobial susceptibility testing: M100-S28[S]. Wayne, PA: CLSI, 2017.
- [11] YAO B, XIAO X Y, WANG F, et al. Clinical and molecular characteristics of multi-clone carbapenem-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in a tertiary hospital in Beijing, China[J]. Int J Infect Dis, 2015, 37(1): 107-112.
- [12] CUBERO M, GRAU I, TUBAU F, et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones causing bacteraemia in adults in a teaching hospital in Barcelona, Spain (2007—2013)[J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(2): 154-160.
- [13] LUO Y, WANG Y, YE L, et al. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China[J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(11): 818-824.
- [14] CATALÁN-NÁJERA C J, GARZA-RAMOS U, BARRIOS-CAMACHO H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes[J]. Virulence, 2017, 8(7): 1111-1123.
- [15] YANG X, CHAN E W C, ZHANG R, et al. A conjugative plasmid that augments virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Nature Microbiol, 2019, 4(12): 2039-2043.
- [16] CHOBY J E, HOWARD-ANDERSON J, WEISS D S. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: clinical and molecular perspectives[J]. J Intern Med, 2020, 287(3): 283-300.
- [17] LIU P, LI P, JIANG X, et al. Complete genome sequence of *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, a multidrug-resistant strain isolated from human sputum [J]. J Bacteriol, 2012, 194(7): 1841-1842.
- [18] HENNEQUIN C, ROBIN F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2016, 35(3): 333-341.
- [19] LEE C R, LEE J H, PARK K S, et al. Antimicrobial resistance of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, hypervirulence-associated determinants, and resistance mechanisms[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2017, 7(1): 483.
- [20] ARENA F, DE ANGELIS L H, D'ANDREA M M, et al. Infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* with hypermucoviscous phenotype: a case report and literature review [J]. Virulence, 2017, 8(8): 1900-1908.
- [21] SHON A S, BAJWA R P S, RUSSO A T. Hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed[J]. Virulence, 2013, 4(2): 107-118.
- [22] 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.

(收稿日期: 2020-07-19 修回日期: 2020-10-26)

(上接第 164 页)

- fibrosis and leukoplakia using methyl green-pyronin Y, Feulgen staining and exfoliative brush cytology[J]. Biotech Histochem, 2015, 90(1): 8-13.
- [10] LI B, WU Y, GAO X M. Pyronin Y as a fluorescent stain for paraffin sections [J]. Histochem J, 2002, 34(6/7): 299-303.
- [11] MEYERHOLZ D K, RODGERS J, CASTILOW E M, et al. Alcian blue and pyronine Y histochemical stains permit assessment of multiple parameters in pulmonary disease models[J]. Vet Pathol, 2009, 46(2): 325-328.
- [12] MOHTASHAM N, MAHDAVI-SHAHRI N, SALEHINEJAD J, et al. Detection of nucleoproteins in squamous cell carcinoma, and dysplastic and normal mucosa in the oral cavity by methyl green-pyronin staining[J]. J Oral Sci, 2010, 52(2): 239-243.
- [13] RAMAN R K, KAMBOJ M, NARWAL A. The diagnostic role of methyl green-pyronin Y staining in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an exfoliative cytology-based cytomorphometric analysis[J]. Acta Cytol, 2019, 63(5): 401-410.
- [14] SUMEDHA S, KOTRASHETTI V S, SOMANNAVAR P, et al. A histochemical comparison of methyl green-pyronin, and hematoxylin and eosin for detecting apoptotic cells in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, oral submucous fibrosis and normal oral mucosa[J]. Biotech Histochem, 2015, 90(4): 264-269.
- [15] NAYAK A, RAIKAR A, KOTRASHETTI V, et al. Histochemical detection and comparison of apoptotic cells in the gingival epithelium using hematoxylin and eosin and methyl green-pyronin: a pilot study[J]. J Indian Soc Periodontol, 2016, 20(3): 294-298.
- [16] 刘同慎, 李冰, 罗慧琼, 等. 尼氏体的甲苯胺蓝组织块染色法[J]. 解剖学杂志, 2018, 41(4): 474-476.

(收稿日期: 2020-06-12 修回日期: 2020-10-20)