

碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌的实验室研究及与临床转归相关危险因素分析

贾艳增¹, 马玉兰², 陈莹¹, 时东彦¹

(1. 河北医科大学第二医院检验科, 石家庄 050000; 2. 石家庄第四医院检验科, 石家庄 050017)

摘要: 目的 研究碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-HvKP)实验室检测及临床转归相关危险因素。方法 回顾性研究2016年12月~2017年12月河北医科大学第二医院CR-HvKP感染患者20例,对患者临床资料进行分析,采用PCR检测毒力基因(rmpA和rmpA2)、血清型(K1和K2)以及碳青霉烯酶基因(KPC-2, NDM-1, OXA, VIM和IMP)。结果 20例CR-HvKP感染患者中,毒力基因rmpA2均为阳性,拉丝试验阳性17例(85%),K2血清型16例(80%)和碳青霉烯酶基因KPC-2型18例(90%)。标本来源主要为痰/肺泡灌洗液16例(80%),治疗好转9例(45%)和治疗无效11例(55%)。患者使用气管插管辅助呼吸以及感染并发症危及生命的感染性休克治疗无效和好转比较,差异均具有统计学意义($\chi^2=5.690 \sim 7.593$, 均 $P<0.05$)。

结论 CR-HvKP感染临床治愈率低,传播性强,应引起高度重视。

关键词: 碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌;实验室检测;临床转归

中图分类号: R378.996; R446.5 文献标识码: A 文章编号: 1671-7414(2021)01-112-04

doi:10.3969/j.issn.1671-7414.2021.01.028

Laboratory Study and Analysis of Risk Factors Associated with Clinical Outcomes of Hypervirulent and Carbapenem-resistant *Klebsiella Pneumoniae*

JIA Yan-zeng¹, MA Yu-lan², CHEN Ying¹, SHI Dong-yan¹

(1. Department of Laboratory Medicine, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China;

2. Department of Laboratory Medicine, the Fourth Hospital of Shijiazhuang, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: Objective To study laboratory and risk factors associated with clinical outcomes of hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Methods** A retrospective study was conducted on 20 patients with CR-HvKP infection in the Second Hospital of Hebei Medical University from Dec.2016 to Dec.2017. The clinical data of patients were analyzed. The virulence genes (rmpA, rmpA2), capsular types (K1, K2) and carbapenemase genes (KPC-2, NDM-1, OXA, VIM and IMP) were detected by means of PCR. **Results** Among 20 patients with CR-HvKP infection, all the 20 patients with virulence gene rmpA2 were positive, the positive string test was 17 (85%), KPC-2 of carbapenemase genes was 18(90%) and K2 capsular type was 16 (80%). Sputum/bronchoalveolar lavage fluid (16, 80%) was the most common sources, and there were 9 (45%) strains of therapy effective group and 11(55%) of therapy ineffective group. Complication with mechanical ventilation septic shock between therapy effective group and therapy ineffective group ($\chi^2=5.690 \sim 7.593$, all $P<0.05$), and the difference was statistically significant. **Conclusion** CR-HvKP infection lead to low rate of clinical cure and strong transmission, and it is necessary for the hospital to attach great importance.

Keywords: CR-HvKP; laboratory test; clinical outcomes

肺炎克雷伯菌(*klebsiella pneumoniae*, KPN)是临床常见的条件致病菌,在新生儿、老年人和免疫功能低下的患者引起广泛的疾病,包括肺炎、尿路感染、血流感染等。然而,高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*, HvKP)是一种日益被认识的病原菌,比普通的肺炎克雷伯菌(classic *Klebsiella Pneumoniae*, cKP)更具有毒性,

可导致健康的年轻人致病,包括肝脓肿、肺炎、脑炎等严重的社区获得性感染,具有侵袭性^[1]。由于抗生素的不规范使用以及毒力质粒、耐药质粒在细菌之间快速传播,目前出现了高毒力碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌(hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, CR-HvKP)^[2], CR-HvKP具有HvKP的特性,极强的侵袭力,极

基金项目: 河北医科大学第二医院科学研究基金资助项目(2h2017036)。

作者简介: 贾艳增(1990-),女,硕士研究生,主要从事细菌耐药机制的研究。

通讯作者: 时东彦, E-mail: shidongyan73@126.com。

易播散,造成血流感染、胸腔感染、腹腔及眼内炎、中枢神经系统的感染及其它器官的感染,导致严重的感染^[3-5]。CR-HvKP检出率不断增加,不但给治疗带来困难,同时显著增加了临床治疗难度,成为临床中导致患者死亡的重要因素^[1, 6]。不同地区CR-HvKP感染情况和致死情况不同,本研究针对河北医科大学第二医院CR-HvKP的实验室检测及临床转归相关危险因素分析。

1 材料及方法

1.1 研究对象 回顾性分析河北医科大学第二医院2016年12月~2017年12月高毒力碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌20例,其中来自痰/肺泡灌洗液标本16例,腹腔引流液1例,血培养3例。

1.2 仪器与试剂 全自动微生物鉴定仪:法国生物梅里埃公司Vitek2 Compact,聚合酶链反应(PCR)扩增仪(美国Bio-Rad公司),凝胶成像仪(美国Bio-Rad公司),电泳仪(上海康华公司),细菌DNA提取试剂盒(北京天根生化科技有限公司),2×Taq Master Mix(北京康为科技有限公司),50×TAE缓冲液(上海生工有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 收集临床资料:选取2016年12月~2017年12月CR-HvKP感染20例患者为研究对象,记录患者年龄、住院天数、临床抗生素治疗方案及治疗效果、感染严重程度(如感染性休克)评估等因素。

1.3.2 菌株鉴定及药敏试验:采用法国生物梅里埃公司全自动微生物鉴定仪Vitek2 Compact进行菌株鉴定及药敏试验,采用E-test法进行替加环素的药敏试验,药敏结果判定标准参照CLSI2016年进行判读药敏结果;质控菌株为肺炎克雷伯菌ATCC700603,大肠埃希菌ATCC25922。

1.3.3 高黏液表型检测:采用拉丝试验方法,用接种环挑取血琼脂平板上新鲜菌落进行牵拉,黏液丝形成且长度≥5 mm则判断为高黏液表型阳性,黏液丝形成且长度<5 mm判断为阴性。

1.3.4 高毒力肺炎克雷伯菌菌株:参考文献[7-8]资料,采用PCR检测毒力基因(rmpA, rmpA2)、血清型(K1, K2)、碳青霉烯酶基因(KPC-2, NDM-1, OXA, VIM和IMP)。

1.3.5 碳青霉烯酶表型检测:用接种环刮取受试菌株并加入2ml TSB中,再将10 μg美罗培南纸片浸入菌悬液中,然后用无菌棉签蘸取大肠埃希菌ATCC25922菌悬液(0.5麦氏浊度单位)均匀涂抹于M-H琼脂平板上,最后将药敏纸片从菌悬液中取出,贴在该M-H琼脂平板上。结果判读:抑菌圈直径6~15mm或在16~18mm抑菌圈内存在菌落,则碳青霉烯酶阳性。

1.3.6 血清杀伤试验:将肺炎克雷伯菌悬液中放入人血清抗体,接种于Mueller-Hinton琼脂板,接种后1h菌量在10%~100%之间,3h后<10%为高敏感;1h内过度生长>100%,2h后或3h后<100%为中敏感;1h,2h及3h后均过度生长>100%为抵抗组。

1.4 统计学分析 采用SPSS21.0统计软件对研究数据进行统计学分析,计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)(年龄、住院天数)表示,采用 t 检验;计数资料用频数表示,采用卡方(χ^2)检验或Fisher确切概率法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 20例CR-HvKP感染患者的实验室检测结果 见表1。20例CR-HvKP感染患者中男性17例,女性3例,标本来源主要为痰/肺泡灌洗液16例(80%)。毒力基因rmpA2均为阳性,拉丝试验阳性17例(85%),血清杀伤试验均为抵抗组,K2型血清型16例(80%),碳青霉烯酶基因KPC-2型18例(90%),碳青霉烯酶表型mCIM均为阳性。

表1 20例CR-HvKP感染患者的实验室检测结果

| 类别 | | n (%) |
|---------|----------|------------|
| 性别 | 男 | 17 (85.0) |
| | 女 | 3(15.0) |
| 标本类型 | 痰/肺泡灌洗液 | 16(80.0) |
| | 血培养 | 3(15.0) |
| | 腹腔引流液 | 1(5.0) |
| 拉丝试验阳性 | | 17(85.0) |
| 血清型 | K1型 | 0(0.0) |
| | K2型 | 16(80.0) |
| | ND(未检测出) | 4(20.0) |
| 毒力基因 | rmpA | 0 (0.0) |
| | rmpA2 | 20 (100.0) |
| 血清杀伤试验 | 高敏感 | 0 (0.0) |
| | 中敏感 | 0 (0.0) |
| | 抵抗组 | 20 (100.0) |
| mCIM阳性 | | 20 (100.0) |
| 碳青霉烯酶基因 | KPC-2 | 18 (90.0) |
| | NDM-1 | 0 (0.0) |
| | VIM, IMP | 0 (0.0) |
| | OXA | 0 (0.0) |
| | ND(未检测出) | 2 (10.0) |

2.2 20例CR-HvKP感染患者临床转归相关危险因素分析 见表1。20例CR-HvKP感染患者中治疗好转9例,治疗无效11例,治疗有效率为45%,治疗好转组与治疗无效组年龄比较,差异无统计学

意义($t=1.446, P>0.05$); 两组在气管插管辅助呼吸、并发症危及生命的感染性休克比较, 差异均有统计学意义($\chi^2=7.593, 5.690$, 均 $P<0.05$)。

表2 20例CR-HvKP感染患者临床转归相关危险因素的分析

| 影响因素 | 治疗好转 (n=9) | 治疗无效 (n=11) | t/χ^2 | P |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|------------|-------|
| 年龄 ($\bar{x} \pm s$, 岁) | 61.78 \pm 17.21 | 49.18 \pm 20.96 | 1.446 | 0.165 |
| 住院天数 ($\bar{x} \pm s$, 天) | 40.44 \pm 18.92 | 33.73 \pm 23.84 | 0.686 | 0.502 |
| 气管插管呼吸机辅助呼吸 | 1 | 8 | 7.593 | 0.001 |
| 感染性休克 | 1 | 7 | 5.690 | 0.028 |
| 美罗培南 + 替加环素 | 6 | 8 | 0.087 | 1.000 |
| 美罗培南 + 多黏菌素 | 2 | 1 | 0.660 | 0.566 |
| 替加环素 + 头孢哌酮舒巴坦 | 1 | 2 | 0.194 | 1.000 |

3 讨论

目前国内外临床实验室判定 HvKP 主要根据拉丝试验阳性^[9-10], 但本研究显示并不是所有的 HvKP 拉丝试验均为阳性, 因此本研究根据文献[7-8]通过毒力基因 rmpA/rmpA2 阳性并通过血清杀伤试验抵抗组确定为 HvKP。

过去观点认为 HvKP 很少对抗生素产生耐药性, 除了天然耐药氨基苄西林, 大多数菌株对常用药物均敏感, 但近年来研究发现 HvKP 存在多种结合和整合元素, 使毒力基因 / 耐药基因在细菌之间通过质粒传播^[11-14]。目前, 主要有两种途径形成 CR-HvKP: 一种是碳青霉烯耐药高毒力肺炎克雷伯菌 (carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, CRKP) 通过质粒获得毒力基因而形成 CR-HvKP; 另一种为 HvKP 通过质粒获得碳青霉烯酶基因形成的^[13], 且可以在细菌之间快速传播^[14-15]。CR-HvKP 具有高毒性、耐多药和传播性的特点被称为真正超级细菌, 给临床治疗和医院感染控制带来巨大的挑战, 因此需要迫切的对这种新型菌进行实验室检测及临床转归相关危险因素分析是十分必要的。

本研究结果显示, 碳青霉烯酶基因以 KPC-2 型为主, 与 DONG 等^[16]报道一致。血清型以 K2 为主, 与 SIU 等^[17]报道一致, 而 ZHANG 等^[18]在 2016 年报道过 5 例 K1 血清型的 CR-HvKP, 而杜芳玲等^[19]在 2019 年报道过 2 例 K1 型 CR-HvKP 与 2 例 K2 型的 CR-HvKP, 提示目前 K1、K2 血清型均出现了 CR-HvKP, 而在本院以 K2 血清型为主, 这种 K2 型 CR-HvKP 存在的具体机制有待进一步深入研究。mCIM 试验用于检测碳青霉烯酶表型确认的方法, 具有非常高的敏感度和特异度^[20]。研究结果显示, 20 例 CR-HvKP 菌株中均为阳性, 其中 2 株未检测出携带碳青霉烯酶基因, 与文献[21]报道一致, 具体原因尚不清楚。

研究结果显示, 20 例 CR-HvKP 感染患者中,

治疗好转为 45%, 目前临床对 CR-HvKP 抗感染治疗选择的药物非常有限, 往往选择联合治疗。美罗培南联合替加环素病例最多, 治愈率为 42.9%, 低于 WU 等^[22-24]报道替加环素治疗碳青霉烯耐药的肠杆菌治愈率为 51.6%, 提示美罗培南联合替加环素临床治疗效果没有预期理想, 可能和患者的基础疾病及药物的联合治疗药效有关, 其机制有待进一步研究。美罗培南联合多黏菌素由于例数较少, 临床意义不足。尽管体外药敏试验对替加环素敏感, 但长期使用这种抗生素 (单独使用或与其他几种抗生素联合使用), 甚至多黏菌素 B, 都不能从血液中根除这种微生物, 导致致命的结果^[21]。目前有一些新的药物逐渐上市 (头孢他定 - 阿维巴坦等), 希望对此类细菌有更好的体内杀菌效果。

进一步分析临床资料显示 20 例 CR-HvKP 感染患者住院天数平均 > 30 天, 住院时间较长。本研究还进行了治疗好转与治疗无效患者使用气管插管呼吸机辅助呼吸、感染性休克比较差异有统计学意义, 提示气管插管呼吸机辅助呼吸以及引起危及生命的感染性休克并发症影响治疗效果, 因此该医院 20 例 CR-HvKP 的临床治愈率极差, 即使治愈, 治愈的用药天数、感染严重程度远高于普通肺炎克雷伯菌感染。因此对于此类患者的预后评估非常复杂, 要综合基础疾病, 辅助治疗, 药物选择等综合判断。

CR-HvKP 具有高侵袭性、致病力强以及高耐药限制了临床有效药物治疗, 使临床面对治疗 CR-HvKP 感染相当的困难, 造成 CR-HvKP 感染的高死亡率且细菌的传播性强, 因此应引起高度重视。

参考文献:

- [1] GU Danxia, DONG Ning, ZHENG Zhiwei, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study [J]. The Lancet Infectious Diseases, 2018, 18(1):37-46.
- [2] ZHOU Yun, WANG Xing, SHEN Jun, et al. Endogenous endophthalmitis caused by carbapenem-resistant

- hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*: A case report and literature review [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2019, 27(7):1099-1104.
- [3] MARR C M, RUSSO T A. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a new public health threat[J]. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2018, 17(2):71-73.
- [4] CHOBY J E, HOWARD-ANDERSON J, WEISS D S et al. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* -clinical and molecular perspectives(Review) [J]. Intern Med, 2020, 287(3):283-300.
- [5] LI Jiayang, REN Jianan, WANG Gefei, et al. Risk factors and clinical outcomes of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* induced bloodstream infections. [J]. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 2018, 37(4):679-689.
- [6] ZHAO Yajie, ZHANG Xiucui, TORRES V V L, et al. An outbreak of carbapenem-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in an intensive care unit of a Major Teaching Hospital in Wenzhou, China(Article) [J]. Frontiers in Public Health, 2019, 7:229.
- [7] SOHEI H, YOHEI D. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*: a call for consensus definition and international collaboration [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2018, 56(9):e00959-18.
- [8] RUSSO T A, MARR C M. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*[J]. Clin Microbiol Rev, 2019, 32(3):e00001-19.
- [9] LIU Chao, GUO Jun. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* (hypermucoviscous and aerobactin positive) infection over 6 years in the elderly in China: antimicrobial resistance patterns, molecular epidemiology and risk factor [J]. Ann Clin Microbiol Antimicrob, 2019, 18(1):4.
- [10] CATÁN-NÁJERA J C, GARZA-RAMOS U, BARRIOS-CAMACHO H. Hypervirulence and hypermucoviscosity: Two different but complementary *Klebsiella spp.* phenotypes [J]. Virulence, 2017, 8(7):1111-1123.
- [11] LAM M M C, WYRES K L, DUCHÊNE S, et al. Population genomics of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clonal-group 23 reveals early emergence and rapid global dissemination[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):2703.
- [12] ZHAN Lingling, WANG Shanshan, GUO Yinjuan, 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.
- [13] WONG M H Y, SHUM H P, CHEN J H K, et al. Emergence of carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella Pneumoniae*[J]. Lancet Infect Dis, 2018, 18(1):24.
- [14] 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, 7:483.
- [15] ZHOU Kai, XIAO Tingting, 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.
- [16] DONG Ning, LIN Dachuan, ZHANG Rong, et al. Carriage of blaKPC-2 by a virulence plasmid in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* [J]. Antimicrob Chemother, 2018, 73(12):3317-3321.
- [17] SIU L K, HUANG D B, CHIANG T. Plasmid transferability of KPC into a virulent K2 serotype *Klebsiella pneumoniae* [J]. BMC Infect Dis, 2014, 14:176.
- [18] ZHANG Rong, LIN Dachuan, CHAN E W C, et al. Emergence of carbapenem-resistant serotype k1 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* strains in China[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2015, 60(1):709-711.
- [19] 杜芳玲, 龙丹, 魏丹丹, 等. K1和K2血清型肺炎克雷伯菌耐药性与可移动遗传元件研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(8):1127-1130.
- DU Fangling, LONG Dan, WEI Dandan, et al. Study on drug resistance and mobile genetic elements of *Klebsiella pneumoniae* of K1 and K2 serotypes [J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(8):1127-1130.
- [20] Clinical and Laboratory Standards Institute. CLSI M100-S2: The performance standards for antimicrobial susceptibility testing[S]. Wayne: PA, CLSI M100-S27, 2017.
- [21] 李军, 黄紫嫣, 谭媛, 等. 血液分离碳青霉烯类耐药肺炎克雷伯菌耐药机制及同源性研究 [J]. 中华医院感染学杂志, 2019, 29(17):2561-2565, 2593.
- LI Jun, HUANG Ziyang, TAN Yuan, et al. Drug resistance mechanisms and homology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood specimens[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2019, 29(17):2561-2565, 2593.
- [22] WU Xiaomai, ZHU Yefei, CHEN Qiuying, et al. Tigecycline therapy for nosocomial pneumonia due to carbapenem-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients who received inappropriate initial antibiotic treatment: a retrospective case study[J]. Int, 2016, 2016:8395268.
- [23] MORITZ F, CAN I, SUSANNE H, et al. Treatment options for carbapenem-resistant gram-negative infections [J]. Dtsch Arztebl Int, 2018, 115(20-21):345-352.
- [24] YANG Ping, CHEN Yunbo, JIANG Saiping, et al. Association between antibiotic consumption and the rate of carbapenem-resistant gram-negative bacteria from China based on 153 tertiary hospitals data in 2014[J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2018, 7:137.

收稿日期: 2020-08-11

修回日期: 2020-08-26