

· 病例报告 ·

米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染致不明原因发热一例并文献复习

刘铭¹ 闻赛² 李娜¹ 陈潇¹ 时玉雯¹ 王刚² 刘岚铮¹ 刘辉¹

【摘要】目的 探讨联合应用宏基因组学和培养组学技术对米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染所致不明原因发热患者的病原检测、分离和治理措施。**方法** 分析济南市疾病预防控制中心联合山东大学齐鲁医院对2019年7月1日收治的1例米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染导致的不明原因发热患者的诊疗过程,并复习相关文献。**结果** 该患者主动脉层术后持续间断发热,经抗真菌治疗后效果不佳,经宏基因组学测序联合培养组学技术分离病原提示疑似米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染,调整使用头孢哌酮钠舒巴坦钠联合卡泊芬净抗感染治疗后,患者发热症状消失,实验室指标恢复正常后出院。**结论** 米氏克雷伯菌感染较少见,且易误诊为其他克雷伯菌,应用宏基因组学联合培养组学技术可尽早明确该病原所致感染,以进行针对性的抗感染治疗。

【关键词】 米氏克雷伯菌; 白色念珠菌; 不明原因发热; 宏基因组学测序; 培养组学

Report and literature review of a case with fever of unknown origin caused by *Klebsiella michiganensis* complicated with *Candida Albicans* infection Liu Ming¹, Wen Sai², Li Na¹, Chen Xiao¹, Shi Yuwen¹, Wang Gang², Liu Lanzheng¹, Liu Hui¹. ¹Institute of Bacterial Disease Detection, Jinan Center for Disease Control and Prevention, Jinan 250021, China; ²Department of Infectious Diseases, Qilu Medical College of Shandong University, Qilu Hospital, Jinan 250012, China

Corresponding author: Liu Hui, Email: dahuilu1981@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the detection, isolation and treatment of a case with fever of unknown origin (FUO) caused by *Klebsiella michiganensis* and *Candida Albicans* infection by metagenomics and culturomics techniques. **Methods** The diagnosis and treatment process of a FUO patient with *Klebsiella michiganensis* and *Candida Albicans* infection admitted by Jinan Center for Disease Control and Prevention and Qilu Hospital of Shandong University on July 1st, 2019 was analyzed, and related literatures were reviewed. **Results** The patient had a FUO after the operation of aortic continuous, but the effect was not well after antifungal treatment. Metagenomics sequencing and culturomics techniques showed that the patient was infected with *Klebsiella michiganensis* and *Candida Albicans*. After timely administration of sulperazon and caspofungin for anti-infection, the fever symptoms disappeared and laboratory indexes of the patient restored. **Conclusions** *Klebsiella michiganensis* infection is relatively rare and easy to be misdiagnosed, metagenomics sequencing and culturomics techniques can be used to identify infection caused by *Klebsiella michiganensis* as soon as possible, and to carry out effective anti-infection treatment.

【Key words】 *Klebsiella michiganensis*; *Candida Albicans*; Fever of unknown origin; Metagenomic sequencing; Culturomics

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2022.01.010

基金项目: 济南市卫生健康委员会科技计划 (No. 2020-4-113)

作者单位: 250021 济南市, 济南市疾病预防控制中心细菌性疾病检验所¹; 250012 济南市, 山东大学齐鲁医学院, 齐鲁医院感染病科²

通信作者: 刘辉, Email: dahuilu1981@sina.com

米氏克雷伯菌 (*Klebsiella michiganensis*) 是一种新出现的人类致病菌, 其作为克雷伯菌属的新菌种, 于2013年被研究者从牙刷架表面涂抹样中分离而首次报道^[1]。由于该菌与产酸克雷伯菌 (*Klebsiella oxytoca*) 关系密切 (二者16S rRNA有99%的一致性), 因此易被误鉴定为产酸克雷伯菌。自被正式命名以来, 受传统病原学检验方法及水平的限制, 米氏克雷伯菌感染病例报道十分罕见。但随着近两年来高通量测序技术以及病原培养鉴定技术的不断进步, 国外陆续有从临床样本中分离到该菌并引发感染的报道, 如从患者腹腔引流液、血液和粪便样本中分离到米氏克雷伯菌, 导致患者腹腔、血液感染和腹泻^[2-5], 还引发了医院婴儿特护病房感染事件^[6]等。由于该菌临床罕见且易携带多重耐药基因, 越来越受到研究者关注。目前, 国内尚无该菌引起人体感染的相关报道。

本文总结了济南市疾病预防控制中心联合山东大学齐鲁医院对1例由米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染导致的不明原因发热 (fever of unknown origin, FUO) 患者的病原检测、分离及诊疗过程并进行相关分析, 现报道如下。

一、病例资料

(一) 病史与体格检查

患者, 男性、59岁。因“间断发热8月余”, 于2019年7月1日入住山东大学齐鲁医院治疗。患者自述8月前因主动脉夹层行bentall术+孙氏术, 术后出现间断发热, 体温波动于38.0~39.5℃, 偶有畏寒、寒战, 自服布洛芬[化学名称: 2-甲基-4-(2-甲基丙基) 苯乙酸]体温仍有反复, 后多次于当地医院住院治疗, 体温仍反复。半月前于其他医院血培养示白色念珠菌, 于当地医院应用氟康唑静脉点滴抗真菌治疗7 d无好转。入本院7天前再次发热, 体温最高39.5℃, 伴畏寒、寒战, 至山东大学齐鲁医院感染科就诊, 收入院。既往高血压病史20余年。

体格检查: 腋下体温36.6℃, 心率76次/min, 呼吸18次/min, 血压125/61 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa), 体重57 kg。神志清, 精神萎靡。前胸可见长约20 cm手术疤痕, 愈合良好。双肺呼吸音粗, 未闻及干湿性啰音。心率76次/min、律齐, 未闻及病理性杂音。双下肢无水肿。

(二) 辅助检查

1. 血常规检查: 白细胞: $8.06 \times 10^9/L$, 中性粒细胞百分比: 74.5%, 红细胞: $3.52 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白: 95 g/L。1-3-β-D葡聚糖: 1 253.10 pg/ml, C-反应蛋白: 100.60 mg/L, 红细胞沉降率: 116 mm/h, 前降钙素: 0.224 ng/ml, 超敏肌钙蛋白: 2 156.9 ng/L, 肌酸激酶同工酶3.0 ng/ml。

2. 彩色多普勒超声: 经食道心脏超声, 显示符合主动脉瓣置换术后超声改变、二尖瓣返流 (中度)、左右心房及左右心耳内未探及明显血栓。

3. 血培养: 入院后血培养细菌阴性。

4. 胸腹盆部CT检查: 显示主动脉夹层术后, 升主动脉及主动脉三大分支壁略厚; 双肺局限性炎症; 心脏体积增大。

二、诊疗过程及病情演变

结合患者病史及化验检查, 入院初步考虑为白色念珠菌血症, 不排除植入物感染可能。给予卡泊芬净{化学名称: 1-[(4R, 5S) -5-[(2-氨基乙酸) 氨基]-N2-(10, 12-二甲基-1-羰基十四烷基) -4-羟基-L-鸟氨酸]-5-[(3R) -3-羟基-L-鸟氨酸]肺白菌素B0二乙酸盐} 50 mg/d, 静脉滴注1周, 同时给予华法林[化学名称: 3-(α-苯基丙酮) -4-羟基香豆素]抗凝及对症支持治疗, 患者仍有发热, 体温波动于35.5~38.3℃, 偶有畏寒、寒战。2019年7月5日复查血常规: 白细胞: $6.93 \times 10^9/L$, 中性粒细胞百分比: 66.5%, 红细胞: $3.29 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白含量90 g/L, C-反应蛋白: 70.16 mg/L, 红细胞沉降率: 113 mm/h, 前降钙素: 0.160 ng/ml, 同时采集外周血3 ml进行宏基因组学测序。

2019年7月7日宏基因组测序结果显示为米氏克雷伯菌、白色念珠菌, 考虑患者不排除米氏克雷伯菌感染, 于2019年7月8日加用头孢哌酮钠/舒巴坦钠3 g/12 h联合卡泊芬净抗感染治疗, 患者体温峰值渐下降, 2019年7月13日至8月2日开始体温波动于35.5~37.5℃, 8月3日后体温渐降至37℃以下, 2019年8月7日复查血常规: 白细胞: $6.39 \times 10^9/L$, 中性粒细胞百分比: 71.3%, 红细胞: $3.93 \times 10^{12}/L$, 血红蛋白: 110 g/L, C-反应蛋白: 24.66 mg/L, 红细胞沉降率: 8 mm/h, 前降钙素: 0.333 ng/ml。患者发热、畏寒、寒战症状消失出院。

三、病原学检测

(一) 宏基因组学检测

为尽快确定患者感染病原, 于2019年7月5日采集患者外周血3 ml行宏基因组学测序, 7月7日结果示阳性病原体: 米氏克雷伯菌序列数为1 966, 基因组覆盖度为4.22%; 白色念珠菌序列数为118, 基因组覆盖度为0.05%, 见图1。结果提示患者为细菌合并真菌感染。其中白色念珠菌前期血培养已提示, 但米氏克雷伯菌引起的感染较为罕见, 尚待进一步研究。

(二) 培养组学检测

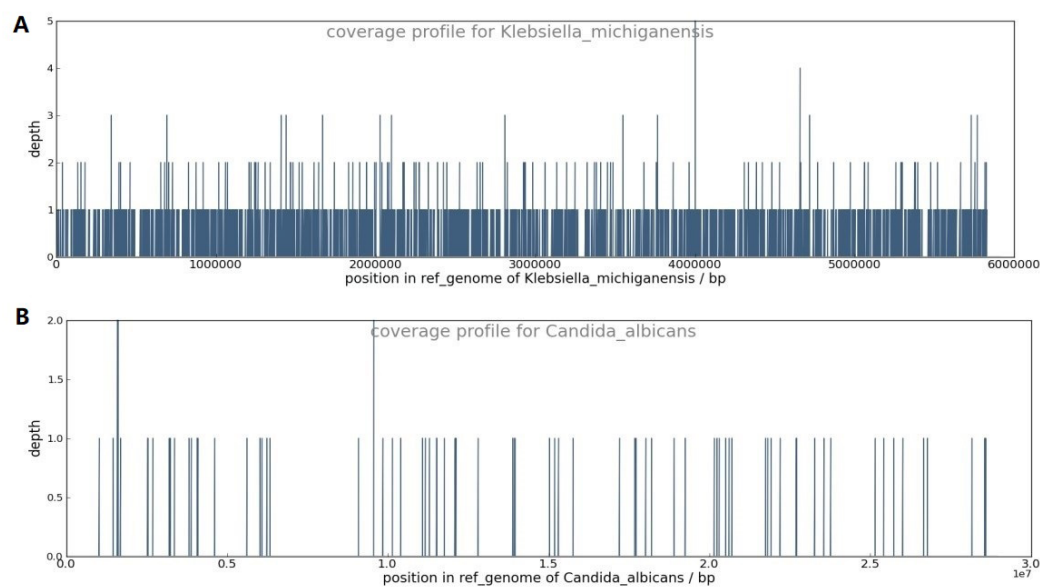
为尽可能地抓取到罕见病原米氏克雷伯菌, 参照相关文献^[5], 于2019年7月9日采集患者血液和粪便样本送济南市疾病预防控制中心采用培养组学技术进行进一步病原分离。培养方案如下: 5%脱纤维绵羊血+胰酪胨大豆琼脂 (trypticase soy agar, TSA); 麦康凯琼脂 (MacConkey, MAC) 培养基; 伊红美蓝琼脂培养基。培养条件均为37℃需氧培养24~48 h。样本接种培养后, 挑取平板上疑似克雷伯菌属菌落用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS) 仪进行鉴定, 其中

患者的粪便样本于MAC平板上分离出2株菌经质谱鉴定为产酸克雷伯菌（菌株编号：M21-5和M31-3），为疑似米氏克雷伯菌，拟对其作进一步鉴定。

（三）全基因组测序

对上述2株疑似米氏克雷伯菌进一步行全基因组测序，并通过SPAdes软件对细菌基因组进行拼接，将基因组序列上传至Type（Strain）Genome Server（TYGS）数据库^[7]，运用基于全基因组BLAST距离构建系统发育树的方法（Genome BLAST Distance Phylogeny approach, GBDP）^[8]，将其与数

据库中所有模式菌株进行比对，以确定其所属物种。结果显示，M31-3和M21-5与产酸克雷伯菌模式菌株（*Klebsiella oxytoca* NCTC 13727）的DNA-DNA杂交结果（DNA-DNA hybridization, DDH）均为48.2%，与米氏克雷伯菌的模式菌株（*Klebsiella michiganensis* DSM 25444 DDH）结果分别为90.4%和89.5%，两株菌值均> 70%，基于全基因组测序的GBDP树状图也显示其与米氏克雷伯菌模式菌株（*Klebsiella michiganensis* DSM 25444）归为一簇，置信度为100%，故确认M31-3和M21-2两株菌为米氏克雷伯菌^[1,9]，见图2。



注：A：米氏克雷伯菌；B：白色念珠菌

图1 宏基因组学测序病原鉴定

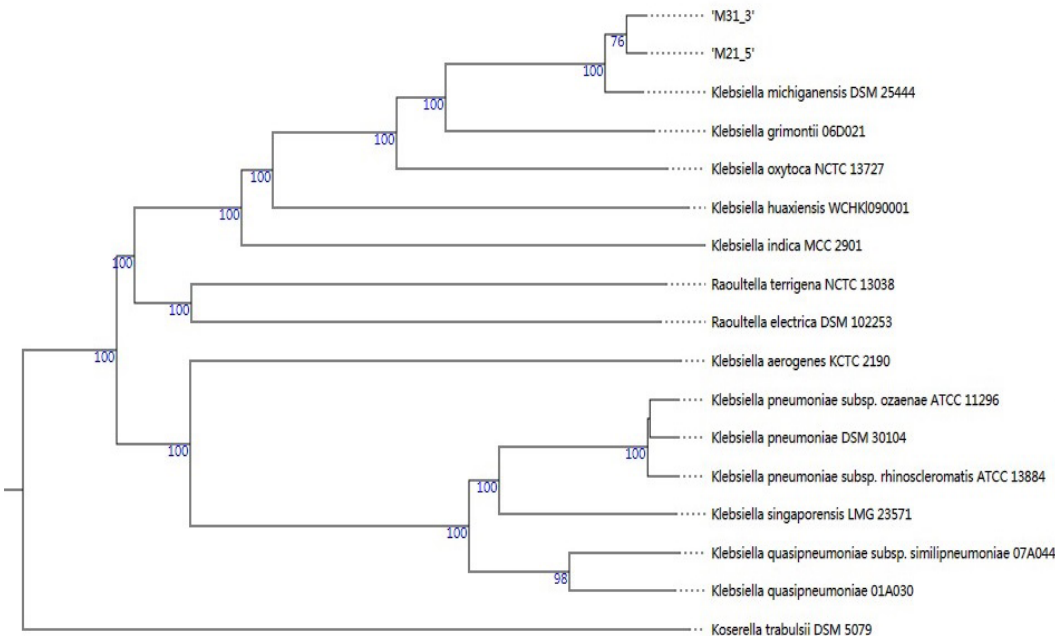
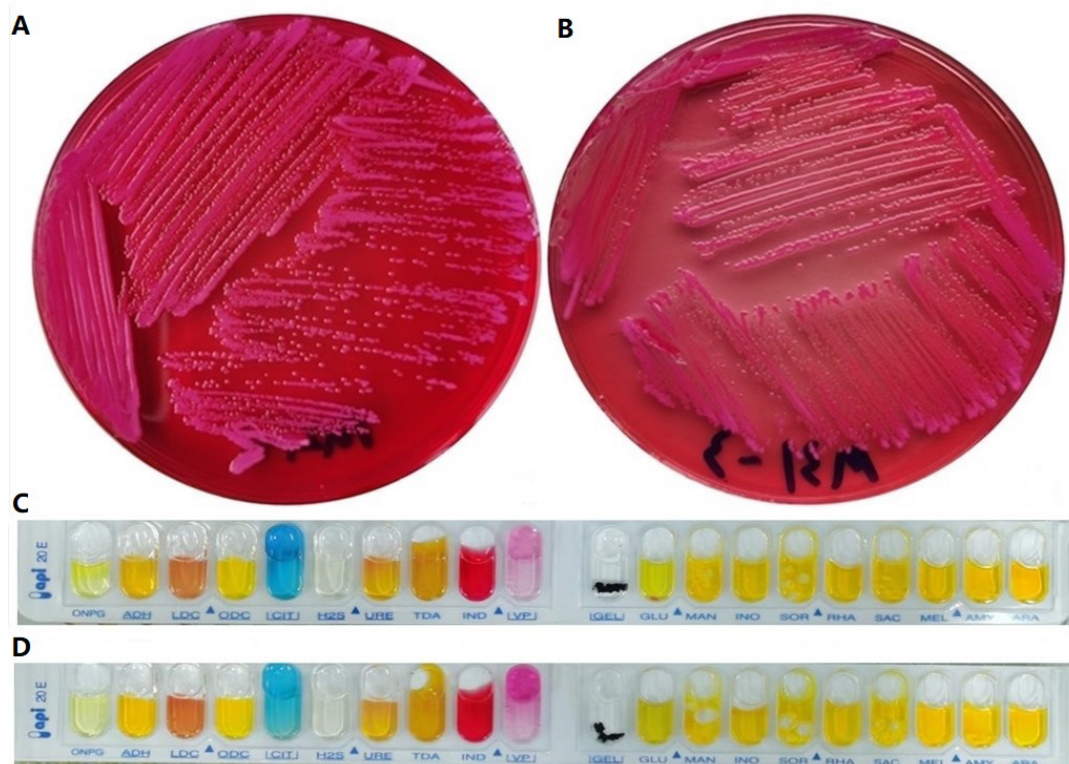


图2 GBDP树状图



注: A: M21-5在MAC平板上36 °C培养24 h的菌落形态; B: M31-3在MAC平板上36 °C培养24 h的菌落形态; C: M21-5的API 20E试验; D: M31-3的API 20E试验

图3 M21-5和M31-3在MAC平板上的菌落形态及API 20E试验

(四) 生化反应

M31-3和M21-5在MAC平板上形态为圆形、发酵乳糖的粉红色菌落, 见图3A和图3B。API 20E结果为 β -半乳糖苷酶(+)、精氨酸双水解酶(-)、赖氨酸脱羧酶(+)、鸟氨酸脱羧(-)、柠檬酸盐利用(+)、产硫化氢(-)、脲酶(-)、色氨酸脱氨酶(-)、吲哚产生(+)、VP试验(+)、明胶酶(-)、葡萄糖发酵(+)、甘露醇发酵(+)、肌醇发酵(+)、山梨醇发酵(+)、鼠李糖发酵(+)、蔗糖发酵(+)、密二糖发酵(+)、苦杏仁苷发酵(+)、阿拉伯糖发酵(+)、细胞色素氧化酶(-), 见图3C和图3D。上述API 20E结果与文献报道的米氏克雷伯菌结果一致^[1]。

(五) 药敏试验

采用微量肉汤稀释法对M31-3和M21-5两株菌进行药敏检测, 抗菌药物折点参考CLSI M100第27版, 结果发现该两株菌对大部分抗菌药物(氨苄西林/舒巴坦、四环素、氯霉素、复方新诺明、头孢唑林、头孢噻肟、头孢他啶、头孢西丁、庆大霉素、亚胺培南、萘啶酸、环丙沙星、阿莫西林/克拉维酸、头孢噻肟/克拉维酸、头孢他啶/克拉维酸、多黏菌素E、多黏菌素B、米诺环素、阿米卡星、氨基糖苷类、左氧氟沙星、链霉素、吉米沙星)敏感, 但对氨苄西林均表现为耐药, 对卡那霉素表现为中介耐药。

讨论 不明原因发热的鉴别诊断一直是困扰感染病科

医生的问题之一, 其常见病因为感染、风湿免疫性疾病和恶性肿瘤等^[10]。临床上准确识别感染性发热对合理用药, 尤其抗菌药物的应用具有重要意义^[11]。本报道为国内首次由米氏克雷伯菌伴白色念珠菌引起感染所致不明原因发热的病例。米氏克雷伯菌是一种罕见的病原, 报道其主要来自环境^[1, 12-13], 且为肠道菌群的一部分^[14-15]。但如果转移到身体其他部位, 则会引发感染, 如败血症等^[15]。本研究通过运用宏基因组学测序联合培养组学技术对1例不明原因反复发热患者进行分析, 患者前期仅经过抗真菌疗效不佳, 血液样本经宏基因组学测序提示为米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染, 且参照参考文献^[5], 从患者粪便样本采用培养组学方法成功分离到2株米氏克雷伯菌, 为患者病原学诊断及治疗方案的选择和调整提供了重要依据。患者根据宏基因组学测序结果第一时间针对克雷伯菌调整了抗菌药物, 并取得了良好疗效, 导致血液中病原微生物不易培养, 本研究未能从患者血液样本中成功分离到米氏克雷伯菌, 故推测该菌感染源可能来源于患者肠道排泄物。

米氏克雷伯菌易携带染色体编码的OXY型 β -内酰胺酶和多种碳青霉烯酶耐药基因, 其表现为对氨基和羧基青霉素以及碳青霉烯类抗菌药物耐药, 增加了临床抗感染治疗困难^[3, 6]。Seiffert等^[5]报道了欧洲首例产KPC-3酶米氏克雷伯

菌感染的病例,其分离到的米氏克雷伯菌对1~4代头孢菌素和美罗培南表现耐药;Founou等^[4]首次报道了从南非1例经氯唑西林治疗的癌症患者出院粪便中分离到的同时携带NDM-1和OXA-181碳青霉烯酶耐药基因的米氏克雷伯菌,其对氨苄西林、头孢西丁、头孢噻肟、头孢他啶、亚胺培南、美罗培南、庆大霉素、阿米卡星、环丙沙星、氧氟沙星和甲氧苄啶均表现为耐药;Zheng等^[2]首次报道了自1例经造血干细胞移植后发生急性腹泻患者粪便中分离到同时携带KPC-2、NDM-1和NDM-5碳青霉烯酶基因的米氏克雷伯菌,患者经过复方新诺明治疗1周后恢复;Chapman等^[6]报道了一起由产超广谱 β -内酰胺酶米氏克雷伯菌引起的医院新生儿特护病房暴发事件。虽然本研究分离的2株米氏克雷伯菌药敏试验显示仅对氨苄西林表现为耐药,对卡那霉素表现为中介耐药,且患者经过头孢哌酮钠/舒巴坦钠联合卡泊芬净抗感染治疗后疗效良好,但由于肠道细菌易发生耐药基因水平转移^[15],对米氏克雷伯菌的耐药监测依然需要持续关注,以降低耐药基因在多重耐药菌间的水平传播和院内传播风险^[16]。此外,由于米氏克雷伯菌和产酸克雷伯菌的蛋白质光谱相似,可能会被误鉴定为产酸克雷伯菌。因此,需要进一步研究精确、简单、特异的鉴定方法^[17]。

宏基因组学技术对感染性疾病病原的快速检测和识别,尤其是对难培养和罕见病原的识别发挥了辅助作用^[18-19],且其可从微生物群落角度,通过鉴定特定的差异物种及群落的特征变化,用于疾病的早期诊断^[20-21],但目前由于缺乏标准且对结果的解读需要丰富的经验,其应用还存在一定局限性^[22-23];而病原体的分离和培养仍然是感染性疾病诊断的金标准^[24],但某些微生物目前不可培养或培养周期长,不利于临床疾病的诊断和治疗^[25]。本例中宏基因组学和培养组学的联合应用可弥补各自不足之处,对感染者尽早明确病原并开展精准治疗发挥重要作用。同时医院与疾病预防控制中心密切合作,发挥各自优势,共同致力于对不明原因发热患者的诊断和治疗,为探索疾控系统与医疗机构合作而实现新发再发传染病的早期预警以及精准医疗提供了一定借鉴。

参 考 文 献

- [1] Saha R, Farrance CE, Verghese B, et al. *Klebsiella michiganensis* sp. nov. A new bacterium isolated from a tooth brush holder[J]. Curr Microbiol, 2013, 66(1): 72-78.
- [2] Zheng B, Xu H, Yu X, et al. Identification and genomic characterization of a KPC-2-, NDM-1- and NDM-5-producing *Klebsiella michiganensis* isolate[J]. J Antimicrob Chemother, 2018, 73(2): 536-538.
- [3] Hazen TH, Roberta M, McElheny CL, et al. Diversity among blaKPC-containing plasmids in *Escherichia coli* and other bacterial species isolated from the same patients[J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 10291-10301.
- [4] Founou RC, Founou LL, Allam M, et al. Genomic characterisation of *Klebsiella michiganensis* co-producing OXA-181 and NDM-1 carbapenemases isolated from a cancer patient in uMgungundlovu District, KwaZulu-Natal Province, South Africa[J]. S Afr Med J, 2018, 109(1): 7-8.
- [5] Seiffert SN, Wüthrich D, Gerth Y, et al. First clinical case of KPC-3-producing *Klebsiella michiganensis* in Europe[J]. New Microb New Infect, 2019, 29(No. C): 29-31.
- [6] Chapman P, Forde BM, Roberts LW, et al. Genomic investigation reveals contaminated Detergent as the source of an extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella michiganensis* outbreak in a neonatal unit[J]. J Clin Microbiol, 2020, 58(5): e01980-19.
- [7] Meier-Kolthoff JP, Göker M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy[J]. Nat Commun, 2019, 10(1): 2182.
- [8] Auch AF, Henz SR, Holland BR, et al. Genome BLAST distance phylogenies inferred from whole plastid and whole mitochondrion genome sequences[J]. BMC Bioinformatics, 2006, 7(1): 350.
- [9] Lefort V, Desper R, Gascuel O. FastME 2.0: A comprehensive, accurate, and fast distance-based phylogeny inference program[J]. Mol Biol Evol, 2015, 32(10): 2798-2800.
- [10] 《中华传染病杂志》编辑委员会. 发热待查诊治专家共识[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(11): 641-655.
- [11] 王明贵译. 广泛耐药革兰阴性菌感染的实验诊断, 抗菌治疗及医院感染控制: 中国专家共识[J]. 中国感染与化疗杂志, 2017, 17(1): 82-92.
- [12] Wang T, Wang X, Tian W, et al. Screening of heavy metal-immobilizing bacteria and its effect on reducing Cd²⁺ and Pb²⁺ concentrations in water spinach (*Ipomoea aquatica* Forsk.)[J]. Int J Environ Res Public Health, 2020, 17(9): 3122.
- [13] Ccorahua-Santo R, Cervantes M, Duran Y, et al. Draft genome sequence of *Klebsiella michiganensis* 3T412C, harboring an arsenic resistance genomic island, isolated from mine tailings in Peru. Genome Announc, 2017, 5(28): e00611-17.
- [14] Oliveira RA, Ng KM, Correia MB, et al. *Klebsiella michiganensis* transmission enhances resistance to *Enterobacteriaceae* gut invasion by nutrition competition[J]. Nat Microbiol, 2020, 5(4): 630-641.
- [15] Chen Y, Brook TC, Soe CZ, et al. Preterm infants harbour diverse *Klebsiella* populations, including atypical species that encode and produce an array of antimicrobial resistance- and virulence-associated factors[J]. Microb Genom, 2020, 6(6): 1-20.
- [16] Edgar IC, Thomas S, Ursula MF, et al. First report of a bla_{VIM-1} metallo- β -lactamase-possessing *Klebsiella michiganensis*[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2021, 25(6): 310-314.
- [17] Zhang Y, Gu D, Yang X, et al. Emergence and genomic characterization of a KPC-2-, NDM-1-, and IMP-4-Producing *Klebsiella michiganensis* isolate[J]. Front Microbiol, 2022, 12(1): 762509.
- [18] Long Y, Ni PX, Sun RX, et al. Rapid detection and identification of infectious pathogens based on high-throughput sequencing[J]. Chin Med J, 2015, 128(7): 877-883.
- [19] Simner PJ, Miller S, Carroll KC. Understanding the promises and hurdles of metagenomic next-generation sequencing as a diagnostic

- tool for infectious diseases[J]. Clin Infect Dis,2018,66(5):778-788.
- [20] 郑微, 赵鹏, 张永宏, 等. 宏基因组测序技术分析原发性肝癌患者肠道菌群特征[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版),2021,15(3):149-157.
- [21] 李欣霖, 刘齐, 陈旭, 等. 不明原因发热患者肺泡灌洗液病毒群落解析[J]. 江苏大学学报(医学版),2020,30(5):395-401.
- [22] 徐智察, 赵冬冬, 周华, 等. 宏基因组测序在感染性疾病病原学诊断中的应用[J]. 中华临床感染病杂志,2019,12(4):302-308.
- [23] 刘韦萍, 夏惠, 陶志勇. 宏基因组测序技术在感染性疾病诊断中的应用[J]. 中国病原生物学杂志,2021,16(5):614-618.
- [24] 张彬, 张弦, 赵华, 等. 宏基因组学二代测序在不明原因发热患者病原体检测中的应用[J]. 交通医学,2020,34(2):131-135.
- [25] 刘悦, 朱小亚, 蒋析文. 基于NGS的宏基因组学在微生物病原体鉴定中的应用[J]. 热带医学杂志,2019,19(11):1446-1449.
- (收稿日期: 2021-03-27)
(本文编辑: 孙荣华)

刘铭, 闻赛, 李娜, 等. 米氏克雷伯菌合并白色念珠菌感染致不明原因发热一例并文献复习[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2022,16(1):65-70.