

文章编号: 1001-8689(2023)05-0563-10

## 肠道定植耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌分子特征及其感染相关研究

孟雪斐<sup>1</sup> 张鸿娟<sup>1</sup> 宋贵波<sup>1</sup> 马志刚<sup>1</sup> 李小凤<sup>1</sup> 梁媛<sup>1</sup> 刘涵禹<sup>2</sup> 单斌<sup>1,\*</sup>

(1 昆明医科大学第一附属医院 云南省医学检验临床医学研究中心, 昆明 650032; 2 云南省中医院, 昆明 650021)

**摘要:** 目的 通过对直肠拭子主动筛查出的耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*, CRE)和对应患者感染后分离出的CRE进行配对分析研究, 以探讨CRE定植和感染之间的分子特征异同, 为临床CRE感染的防控提供帮助和指导。方法 采集2021年1月至2021年12月住院患者直肠拭子标本进行CRE菌株筛查。监测筛查阳性患者的感染发生情况, 对感染菌株及其定植菌株同时进行多位点序列分型、耐药基因和毒力基因检测, 并进行测序分析。结果 CRE主动筛查定植率为2.41%(75/3116), 其感染率为45.3%(34/75)。碳青霉烯酶耐药基因检出以bla<sub>KPC</sub>为主: 定植组bla<sub>KPC</sub>(25/34)、bla<sub>OXA48</sub>(9/34), 感染组bla<sub>KPC</sub>(25/34)、bla<sub>OXA48</sub>(10/34), 检出率P>0.05; ST分型以ST11型检出率最高, 定植组ST11型(25/34)、ST231型(9/34), 感染组ST11型(25/34)、ST231型(9/34), 检出率P>0.05。毒力基因检出率较高的为: 定植组mrkD(34/34)、uge(32/34)、fimH(33/34)、wabG(32/34)、entB(32/34), 感染组mrkD(34/34)、fimH(31/34)、uge(34/34)、wabG(31/34)和entB(30/34), 检出率P>0.05。定植菌是否发生感染与毒力基因uge、iucA、iutA、rmpA和iroB相关, P≤0.05。结论 肠内定植CRE与其感染CRE之间高度同源, 主动筛查是防控CRE感染的重要举措, 通过CRE主动筛查对高危人群预防CRE感染意义重大。

**关键词:** 耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌; 肠道定植; 主动筛查; 分子特征

中图分类号: R987.1 文献标志码: A

## Molecular characteristics of intestinal carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteria and their correlation with infection

Meng Xue-fei<sup>1</sup>, Zhang Hong-juan<sup>1</sup>, Song Gui-bo<sup>1</sup>, Ma Zhi-gang<sup>1</sup>, Li Xiao-feng<sup>1</sup>, Liang Yuan<sup>1</sup>, Liu Han-yu<sup>2</sup>, and Shan Bin<sup>1</sup>

(1 First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Yunnan Medical Laboratory Medicine Research Center, Kunming 650032;  
2 Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650021)

**Abstract Objective** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) actively screened from rectal swabs and CRE isolated from corresponding patients after infection were analyzed by paired analysis to explore the relationship between CRE colonization and infection. The similarities and differences of molecular characteristics of CRE can provide help and guidance for the prevention and control of clinical CRE infection. **Methods** Rectal swab specimens from inpatients from January 2021 to December 2021 were collected for CRE strain screening. To monitor the occurrence of infection in patients with positive screening results, multi-locus sequence typing, drug resistance gene and virulence gene detection of infected strains and their colonized strains, and sequencing analysis

收稿日期: 2022-01-28

基金项目: 国家科技基础资源调查专项(No. 2019FY101200和No. 2019FY101209); 国家自然科学基金(No. 81460322)

作者简介: 孟雪斐, 女, 生于1991年, 在读硕士研究生, 主要研究方向为临床微生物与细菌耐药, E-mail: 657980641@qq.com

\*通讯作者, E-mail: shanbin6@139.com

were performed. **Results** The colonization rate of CRE active screening was 2.41% (75/3116), and the infection rate was 45.3% (34/75). Carbapenemase resistance genes were detected mainly as  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{KPC}$  (25/34) and  $bla_{OXA48}$  (9/34) in the colonization group, and  $bla_{KPC}$  (25/34) and  $bla_{OXA48}$  (10/34) in the infection group, with  $P>0.05$ ; ST type had the highest detection rate, ST11 type (25/34) and ST231 type (9/34) in the colonization group, and ST11 type (25/34) and ST231 type (9/34) in the infection group, with  $P>0.05$ . The higher detection rate of virulence genes were  $mrkD$  (34/34),  $uge$  (32/34),  $fimH$  (33/34),  $wabG$  (32/34), and  $entB$  (32/34) in the colonization group, and  $mrkD$  (34/34),  $fimH$  (31/34),  $uge$  (34/34),  $wabG$  (31/34), and  $entB$  (30/34) in the infection group, with  $P>0.05$ . Whether the colonization bacteria is infected or not is related to the virulence genes  $uge$ ,  $iucA$ ,  $iutA$ ,  $rmpA$ , and  $iroB$ , with  $P\leq 0.05$ . **Conclusion** There is a high degree of homology between colonized CRE and infected CRE. Active screening is an important measure to prevent and control CRE infection. Active screening of CRE is of great significance to prevent CRE infection in high-risk groups.

**Key words** Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; Intestinal colonization; Active screening; Molecular characterization

耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌(CRE)是全球传播速度最快的多重耐药菌之一，也是医院获得性感染的主要原因<sup>[1]</sup>，全因死亡率可高达32%~65%<sup>[2-3]</sup>。严重危害患者生命健康。研究表明，CRE在肠道定植是继发其感染的高危因素<sup>[4]</sup>，此外肠道定植者由其他病原微生物导致血流感染的发生率也远远高于非定植者<sup>[5]</sup>。频繁有创操作、胃肠道功能紊乱、碳青霉烯类抗菌药物暴露<sup>[6-7]</sup>等因素促进CRE在肠道中定植。本文对高危人群采集直肠拭子<sup>[8]</sup>进行主动筛查并监测其后续感染情况，对CRE肠道定植率与继发感染率及定植菌与感染菌的分子特征进行分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株来源

收集2021年1—12月昆明医科大学第一附属医院CRE主动筛查阳性患者的直肠拭子和对应患者的感染标本中分离出的CRE菌株。纳入标准：入院48 h内采集直肠拭子进行CRE主动筛查的患者。对于多次住院，仅统计第一次筛查阳性结果；对于住院期间同一患者多次筛查有两次及以上阳性结果时仅统计第一次筛查结果。排除标准：未签署知情同意书、患者无法配合、腹泻患者。本研究已通过昆明医科大学第一附属医院伦理委员会批准，伦理号：(2021)伦审L第20号(No. L-20/2021)。

### 1.2 研究方法

#### 1.2.1 CRE主动筛查

根据美国CDC发布指南<sup>[8]</sup>患者入院48 h内、第7

天及之后每隔一星期采集患者直肠拭子采用碳青霉烯纸片法进行筛查，至患者出院或者死亡。使用基质辅助激光解吸电离飞行时间(MALDI-TOF)质谱仪对菌株进行菌种鉴定，MIC法对药敏结果进行复核。

#### 1.2.2 PCR扩增耐药基因

采用细菌基因组DNA提取试剂盒提取肺炎克雷伯菌基因组DNA作为PCR扩增模板，采用紫外分光光度法测定其浓度和纯度。采用PCR方法对68株CRKP进行耐药基因扩增，引物序列(表1)及反应条件参照文献[9]进行。耐药基因包括： $bla_{KPC}$ 、 $bla_{OXA48}$ 、 $bla_{NDM}$ 、 $bla_{IMP}$ 和 $bla_{VIM}$ 。PCR扩增产物送北京擎科生物科技有限公司昆明分公司测序，测序结果经BLAST与已知序列比对，确定其耐药基因型。

#### 1.2.3 多位点序列分型

根据肺炎克雷伯菌多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST)数据库(<http://bigsdb.web>.

表1 PCR引物序列  
Tab.1 PCR primer sequence

基因	引物序列(5'→3')	片段大小/bp
$bla_{KPC}$	F: CGTCAGGTTCTGCTGTCTTG R: CTTGTCATCCTGTTAGGCG	989
$bla_{OXA48}$	F: GCTTGATGCCCTCGATT R: GATTTGCTCCGTGGCCGAAA	1012
$bla_{NDM}$	F: GGTTTGGCGATCTGGTTTC R: CGGAATGGCTCATCACGATC	475
$bla_{IMP}$	F: TGAGCAAGTTATCTGTATT R: TTAGTTGCTTGGTTTGATG	740
$bla_{VIM}$	F: ATGGTGTGGTCGCATATC R: TGGGCCATTAGCCAGATC	435

pasteur.fr/klebsiella/primer\_used.html) 提供的引物序列和反应条件, 采用PCR法扩增7对管家基因(*gapA*、*mdh*、*phoE*、*tonB*、*infB*、*pgi*和*rpoB*), 将扩增产物的测序结果与MLST数据库进行比对, 得出ST分型结果。

#### 1.2.4 PCR扩增毒力基因

DNA提取方法同“1.2.2”, 采用PCR方法对68株CRKP进行耐药基因和毒力基因扩增, 引物序列(表2)及反应条件参照文献[11-12]进行。毒力基因包括: *rmpA*、*mrkD*、*silS*、*iroB*、*iucA*、*kfu*、*fimH*、*wabG*、*uge*、*iroN*、*iutA*、*alls*和*entB*; PCR扩增产物送北京擎科生物科技有限公司昆明分公司测序, 测序结果经BLAST与已知序列比对, 确定其毒力基因型。

#### 1.3 CRE定植与医院感染判定标准

CRE的定植: 在排除污染的情况下, 送检直肠

**表2 PCR引物序列**  
**Tab. 2 PCR primer sequence**

基因	引物序列(5'→3')	片段大小/bp
<i>rmpA</i>	F: CTTTATGTGCAATAAGGATGTT R: CCTCCTGGAGAGTAAGCATT	516
<i>mrkD</i>	F: AAGCTATCGCTGACTTCCGGCA R: GGCCTTGGCGCTCAGATAGG	945
<i>silS</i>	F: CATAGCAAACCTTCCAGGC R: ATCGGCAGAGAAATTGGC	504
<i>iroB</i>	F: ATCTCATCATCTACCCCTCCGCTC R: GGTCGCCGTCGTTTCAA	363
<i>iucA</i>	F: AATCAATGGCTATTCCGCTC R: CGCTTCACTTCTTCACTGACAGG	683
<i>kfu</i>	F: GAAGTGACGCTGTTCTGGC R: TTTCGTGTGGCCAGTGACTC	960
<i>fimH</i>	F: TGCTGCTGGGCTGGTCGATG R: GGGAGGGTGACGGTGACATC	909
<i>wabG</i>	F: ACCATCGGCCATTGATAGA R: CGGACTGGCAGATCCATATC	683
<i>uge</i>	F: TCTTCACGCCCTCCTTCACT R: GATCATCCGGTCTCCCTGTA	534
<i>iroN</i>	F: AAGTCAAAGCAGGGTTGCCCG R: GACGCCGACATTAAGACGCAG	992
<i>iutA</i>	F: GGCTGGACATCATGGAACTGG R: CGTCGGGAACGGGTAGAACATCG	300
<i>alls</i>	F: CCGAACATTACGCACCTTT R: ATCACGAAGAGGCCAGGTAC	508
<i>entB</i>	F: ATTCCTCAACTTCTGGGGC R: AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	371

拭子培养出CRE, 且无感染相关的临床表现, 判定为CRE的定植。根据国家卫生部颁布的《医院感染诊断标准》<sup>[12-13]</sup>判定CRE的医院感染, 患者有以下临床表现及实验室检查, 如临床表现: 发热、寒战、咳嗽、咳痰、尿频、尿急、尿痛、肾区叩痛、腹痛、腹部压痛或反跳痛; 体征: 肺部湿啰音、皮疹、出血点、肝脾肿大、收缩压低于90 mmHg, 或较原收缩压下降40 mmHg; 实验室检查: 白细胞总数增多和(或)中性粒细胞增多伴核左移、痰细胞病原菌 $\geq 10^6$  CFU/mL、清洁中段尿培养菌落计数 $>10^5$  CFU/mL、新鲜尿液离心相差显微镜检查30个视野中有半数视野见到细菌、全血和腹水细菌培养阳性或者检测到病原体抗原物质、腹水为渗出液; 影像学表现: X线显示肺部有炎性浸润性病变。

#### 1.4 统计分析

采用SPSS 23.0软件进行统计分析, 计数资料采用例数和百分比表示,  $n \geq 40$ 且 $T \geq 1$ 采用 $\chi^2$ 检验,  $n < 40$ 或 $T < 1$ 采用Fisher确切概率法检验,  $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CRE检出情况

共有3116例患者进行了直肠拭子筛查, 阳性患者共75例, 筛查阳性率为2.41%(75/3116)。其中肺炎克雷伯菌65株(占86.7%)、大肠埃希菌8株(占10.7%)、阴沟肠杆菌2株(占2.6%)。直肠拭子筛查阳性的患者, 在后续的监测中有34例患者发生感染, 并分别在痰、全血、尿液、腹水中检出CRE, 定植菌与感染菌均为肺炎克雷伯菌, 集中分布于中心重症监护室、老年呼吸科、神经外科。CRE主动筛查阳性患者与继发感染患者科室分布情况以及检出细菌菌种情况见表3; 患者直肠拭子CRE主动筛查阳性及继发感染标本检出CRE的时间关系见表4。

### 2.2 耐药基因、MLST分型及毒力基因结果

对75例定植患者中继发感染的34例患者直肠拭子检出的CRE菌株和感染标本的CRE菌株的耐药基因、MLST分型、毒力基因进行检测, 并分组比较。直肠拭子检出CRE菌株归为“定植组”, 感染标本检出CRE菌株归为“感染组”。

**表3** 直肠拭子CRE主动筛查阳性与继发感染患者科室分布和菌种检出情况**Tab. 3** Department distribution and bacterial species detection of patients with positive CRE rectal swab active screening and secondary infection

科室类别	肺炎克雷伯菌		大肠埃希菌		阴沟肠杆菌	
	定植	感染	定植	感染	定植	感染
中心重症监护室	38	23	-	-	1	-
老年呼吸科	9	8	6	-	1	-
神经外科	9	2	-	-	-	-
呼吸与重症医学科	3	-	-	-	-	-
急诊监护室	3	-	-	-	-	-
新生儿重症监护室	2	-	-	-	-	-
心脏外科	1	-	-	-	-	-
神经外科重症监护室	-	1	2	-	-	-

“-”表示无数据

**表4** 直肠拭子CRE主动筛查阳性及继发感染标本检出CRE的时间关系**Tab. 4** Time relationship between positive CRE screening in rectal swabs and CRE detected in secondary infection specimens

	例数	痰液	全血	尿液	腹水
直肠拭子筛查阳性后	23	15	6	1	1
直肠拭子筛查阳性同一天	11	6	2	2	1
直肠拭子筛查阳性	41	-	-	-	-

“-”表示无数据

### 2.2.1 耐药基因检出情况

PCR检测结果显示，耐药基因检出情况为：定植组： $bla_{KPC}$ (73.5%)、 $bla_{OXA48}$ (29.4%)，感染组： $bla_{KPC}$ (73.5%)、 $bla_{OXA48}$ (26.5%)；总体以A类酶 $bla_{KPC}$ 为主，其次为D类 $bla_{OXA48}$ ，均未检出 $bla_{NDM}$ 、 $bla_{IMP}$ 、 $bla_{VIM}$ 等碳青霉烯酶基因，定植组与感染组之间差异没有统计学意义， $P>0.05$ 。结果见表5。

### 2.2.2 MLST分型结果

MLST分型结果显示，68株CRKP菌株中，共分出2个MLST型别，其中定植组ST11型占73.5%，ST231型占26.5%，感染组ST11型占73.5%，ST231型占26.5%；定植组与感染组之间差异没有统计学意义( $P>0.05$ )。结果见表6。

**表5** 34例继发感染患者定植组与感染组耐药基因检出情况**Tab. 5** Detection of drug resistance genes in colonization group and infection group in 34 patients with secondary infection

耐药基因	合计 (n=68)	定植组 (n=34)	感染组 (n=34)	$\chi^2$	P值
$bla_{KPC}$	50	25(73.5)	25(73.5)	0.000	1.000
$bla_{OXA48}$	19	10(29.4)	9(26.5)	0.073	0.787

**表6** 34例继发感染患者定植组与感染组MLST分型结果**Tab. 6** MLST typing results of colonization group and infection group in 34 patients with secondary infection

ST分型	合计(n=68)	定植组(n=34)	感染组(n=34)	$\chi^2$	P值
ST11	50	25(73.5)	25(73.5)	0.000	1.000
ST231	18	9(26.5)	9(26.5)	0.000	1.000

### 2.2.3 毒力基因检出情况

PCR检测结果显示，毒力基因检出情况为：定植组 $mrkD$ (100%)、 $uge$ (94.1%)、 $fimH$ (97.11%)、 $wabG$ (94.1%)、 $entB$ (94.1%)、 $iucA$ (38.2%)、 $iutA$ (32.4%)、 $rmpA$ (20.6%)、 $silS$ (17.6%)、 $iroB$ (17.6%)、 $kfu$ (17.6%)、 $iroN$ (0%)；感染组 $mrkD$ (100%)、 $uge$ (100%)、 $fimH$ (91.2%)、 $wabG$ (91.2%)、 $entB$ (88.2%)、 $iucA$ (29.4%)、 $iutA$ (29.4%)、 $rmpA$ (17.6%)、 $silS$ (14.7%)、 $iroB$ (14.7%)、 $kfu$ (11.8%)和 $iroN$ (2.9%)。未检出毒力基因 $alls$ ；定植菌与感染菌之间差异没有统计学意义， $P>0.05$ 。结果见表7。

### 2.3 34对肺炎克雷伯菌耐药基因、毒力基因、ST分型分布情况

图1为34对由定植继发为感染的患者其定植菌与感染菌检出 $bla_{KPC}$ 、 $entB$ 、 $wabG$ 、 $fimH$ 、 $mrkD$ 、 $uge$ 、 $silS$ 、 $iroN$ 、 $rmpA$ 、 $iroB$ 、 $bla_{OXA48}$ 、 $kfu$ 、 $iucA$ 和*iuta*等基因的分布情况。

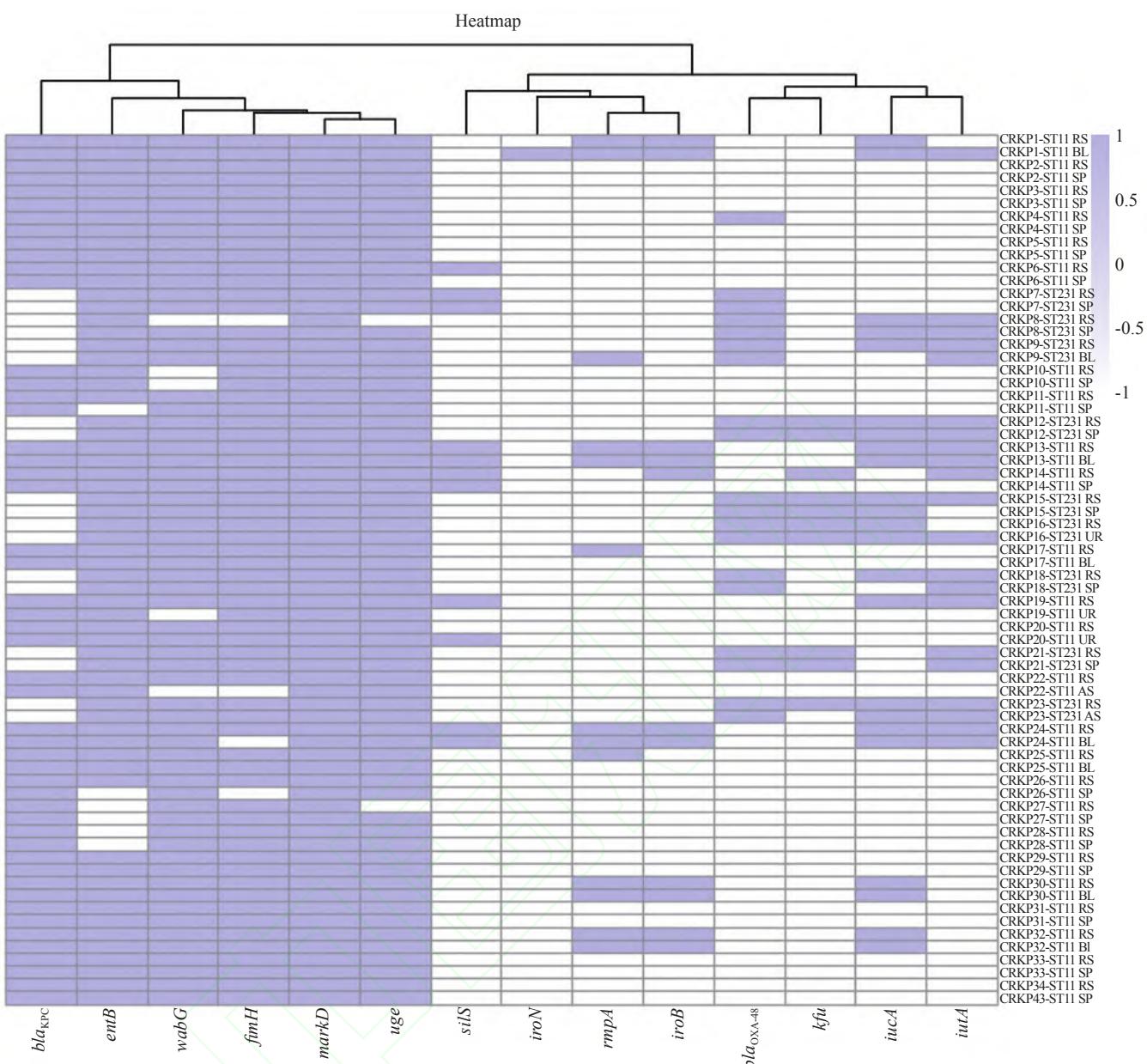
### 2.3.1 耐药基因

除1例患者定植菌携带耐药基因为 $bla_{KPC}$ 和

**表7** 34例继发感染患者定植组与感染组毒力基因检出情况**Tab. 7** Detection of virulence genes in colonization group and infection group in 34 patients with secondary infection

毒力基因	合计	定植组(n=34)	感染组(n=34)	$\chi^2$	P值
$uge$	66	32(94.1)	34(100)	0.515	0.473
$fimH$	64	33(97.1)	31(91.2)	0.266	0.606
$wabG$	63	32(94.1)	31(91.2)	0.000	1.000
$entB$	62	32(94.1)	30(88.2)	0.183	0.669
$iucA$	23	13(38.2)	10(29.4)	0.591	0.442
$iutA$	21	11(32.4)	10(29.4)	0.69	0.793
$rmpA$	13	7(20.6)	6(17.6)	0.095	0.758
$silS$	11	6(17.6)	5(14.7)	0.108	0.742
$iroB$	11	6(17.6)	5(14.7)	0.108	0.742
$kfu$	10	6(17.6)	4(11.8)	0.469	0.493
$iroN$	1	0(0)	1(2.9)	-	1.000

“-”表示无法计算 $\chi^2$ 值



图中横坐标表示耐药基因和毒力基因(紫色色块代表检出该种基因, 白色色块代表未检出该种基因); 纵坐标每一个编号从左到右依次为: 患者号、MLST分型、标本类型, 其中CRKP后面的数字一致代表的是同一患者的定植菌和感染菌; MLST分型有ST11型和ST231型; 标本类型分别为: RS-直肠拭子、BL-全血、UR-尿、SP-痰、AS-腹水

**图1** 34例继发感染患者定植组与感染组耐药基因、毒力基因、ST分型分布情况

**Fig. 1** Distribution of drug resistance genes, virulence genes and ST types in colonization group and infection group of 34 patients with secondary infection

*bla*<sub>OXA48</sub>、感染菌携带的耐药基因为*bla*<sub>KPC</sub>, 其余患者定植菌与感染菌携带的耐药基因呈现一一对应的关系。

### 2.3.2 毒力基因

同一患者定植菌与感染菌携带毒力基因一致的比例: *entB*(32/34, 94.1%)、*wabG*(31/34, 91.2%)、*fimH*(30/34, 88.2%)、*mrkD*(34/34, 100%)、*uge*(32/34, 94.1%)、*silS*(31/34, 91%)、*iroN*(33/34, 97.1%)、

*rmpA*(31/34, 91.2%)、*iroB*(33/34, 97.1%)、*kfu*(32/34, 94.1%)、*iucA*(32/34, 94.1%)和*iutA*(30/34, 88.2%), 均大于80%。

### 2.3.3 MLST分型

同一患者的定植菌与感染菌MLST分型呈现一一对应的关系。

### 2.4 患者结局转归情况与耐药基因和毒力基因的关系

75例CRE肠道定植患者有34例在入院时和后续监测中发生感染，感染率为45.3%(34/75)。将75例定植患者分为两个组：定植未发生感染组和定植并感染组，将两组患者检出的耐药基因和毒力基因进行统计分析：毒力基因 $uge$ 、 $iucA$ 、 $iutA$ 、 $rmpA$ 、 $iroB$ 有统计学意义， $P \leq 0.05$ ；耐药基因 $bla_{KPC}$ 和 $bla_{OXA48}$ 和毒力基因 $fimH$ 、 $wabG$ 、 $entB$ 、 $silS$ 、 $kfu$ 和 $iroN$ 无统计学意义， $P > 0.05$ 。定植并感染的34例患者中仅4例(11.8%)好转出院，30例((88.2%)结局不良(包括23例死亡、7例自动出院)。将其分为两个组：感染好转组、感染结局不良组并对感染菌携带的耐药基因和毒力基因进行统计分析：好转组耐药基因和毒力基因与结局不良组之间之间差异没有统计学意义， $P > 0.05$ 。结果见表8。

### 3 讨论

CRE的流行趋势严峻，对公共健康造成了严重的威胁，给治疗与防控带来了巨大的挑战。欧洲CDC和世界卫生组织发布的指南《预防耐碳青霉烯类肠杆菌科进入医疗机构的防控指南》和《医疗机构耐碳青霉烯的肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌防控指南》<sup>[14-15]</sup>把CRE列为紧急威胁并推荐对于高风险人群进行主动筛查，对携带者进行干预有助于降低CRE的发生率。研究指出CRE的感

染可以在经过治疗后得以控制，但其肠道定植状态甚至可达1年以上<sup>[16-17]</sup>，48%的CRE感染发生于先前有肠道定植的患者，相比之下仅12%的感染是由于院内传播引起<sup>[18]</sup>。本研究中，3116例住院患者中筛选出CRE携带患者有75例，定植率为2.41%，筛选出细菌以肺炎克雷伯菌为主占86.7%(65/75)其次为大肠埃希菌和阴沟肠杆菌分别占10.6%(8/75)、2.7%(2/75)，说明院内耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的肠道定植情况较为严重。65例检出CRKP的患者中有34例在入院时和后续的监测中发生身体其他部位的感染，分别在痰、尿液、全血、腹水中检出CRKP。全国细菌耐药监测网2014—2019年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学变迁监测报告显示CRKP检出率从2014年的6.4%上升到2019年的10.9%<sup>[19]</sup>，提示应重点加强CRKP的防控。据于定植CRKP中较高的感染发生率，通过主动筛查发现定植患者定位及其所在科室，并尽早干预。

产碳青霉烯酶是CRE主要的耐药机制，目前报道的有A、B、D 3种类型。本次共检出两种碳青霉烯酶以KPC型为主其次为OXA-48型，未检出NDM、IPM、VIM型，定植组与感染组之间差异没有统计学意义， $P > 0.05$ ；并且过热图对比可以看出仅一个配对株之间不一致。我国最常见碳青霉烯酶的是A类酶中的KPC型<sup>[20]</sup>，作为最普遍和广泛传播的碳青霉烯

**表8** 75例直肠拭子CRE主动筛查阳性患者继发感染以及感染后的结局转归与耐药基因和毒力基因的关系

**Tab. 8** Relationship between drug resistance genes and virulence genes of secondary infection in 75 patients with positive CRE active screening in rectal swabs, the relationship between drug resistance genes and virulence genes in the outcome of infected patients

基因类别	定植未感染组 (n=41)	定植并感染组 (n=34)	$\chi^2$	P值	感染好转组 (n=4)	感染结局不良组 (n=30)	$\chi^2$	P值	
耐药基因	$bla_{KPC}$	35(85.4)	25(73.5)	1.628	0.202	3(75)	22(73.3)	-	1.000
	$bla_{OXA48}$	6(14.6)	9(26.5)	1.628	0.202	1(25)	8(26.7)	-	1.000
毒力基因	$Uge$	29(70.7)	32(94.1)	6.695	0.010	4(100)	29(96.7)	-	1.000
	$fimH$	40(97.6)	33(97.1)	-	1.000	4(100)	28(93.3)	-	1.000
	$wabG$	35(85.4)	32(94.1)	0.717	0.397	3(75)	29(96.7)	-	0.225
	$entB$	38(92.7)	32(94.1)	0.000	1.000	4(100)	27(90)	-	1.000
	$iucA$	4(9.7)	13(38.2)	8.600	0.003	1(25)	11(36.7)	-	1.000
	$iutA$	4(9.7)	11(32.4)	5.932	0.015	1(25)	9(30)	-	1.000
	$rmpA$	1(2.4)	7(20.6)	4.662	0.031	1(25)	6(20)	-	1.000
	$silS$	3(7.3)	6(17.6)	1.027	0.311	0(0)	6(20)	-	1.000
	$iroB$	0(0)	6(17.6)	5.650	0.017	0(0)	5(16.7)	-	1.000
	$Kfu$	1(2.4)	6(17.6)	3.442	0.064	0(0)	5(16.7)	-	1.000
	$iroN$	1(2.4)	0(0)	-	1.000	1(25)	0(0)	-	0.118

“-”表示无法计算 $\chi^2$ 值

酶，与高死亡率相关<sup>[21]</sup>。相关研究<sup>[22]</sup>指出定植CRE产KPC型碳青霉烯酶或亚胺培南MIC≥32是定植患者在后续发展为感染风险较大的危险因素。OXA48型主要流行于拉丁美洲和欧洲<sup>[23]</sup>，但近年来OXA48型碳青霉烯酶开始在我国流行<sup>[24]</sup>，其通过colkp3质粒在不同菌株之间以较快的速度传播。通过MLST对68株CRKP进行同源性分析，共检出两种ST分型，以ST11为主占，其次为ST231型，总体ST11型的检出率为73.5%，ST231型的检出率为26.5%。热图显示配对菌株之间ST分型一致，这部分患者主要分布于中心重症监护室、老年呼吸科和神经外科存在集中流行的趋势。并且这部分患者伴有严重的基础疾病、抵抗力较差。国内一项关于肠道定植CRE的分子流行病学研究共分离出15株CRKP并且ST分型全部为ST11型<sup>[25]</sup>。可以看出ST11型耐碳青霉烯类肺炎克雷伯(ST11-CRKP)在肠道定植中占居主要地位。近10年来，(ST11-CRKP)引起医院感染的数量迅速增加<sup>[26]</sup>，肠道定植的CRKP成为碳青霉烯酶编码基因的重要储存库。

由CRKP引发的机体感染，不仅治疗花费较大，细菌携带的毒力作用于机体容易留下严重的后遗症。菌毛(I型fimH、III型mrkD)，三价铁离子摄取(kfu)，脂多糖(uge、wabG)，氮利用(sil)，铁载体(肠杆菌素entB、气杆菌素iucA、iutA和沙门菌素iroB、iroN)等，均在CRKP的致病过程中发挥着重要作用，菌毛介导细菌黏附于肠道或其他感染部位是细菌感染人体的关键一步，以及随后在肠道定植和建立感染起到重要作用<sup>[27]</sup>。脂多糖是革兰阴性杆菌产生的内毒素可导致机体发生全身炎症反应综合征、脓毒症、休克等毒性反应，其中相关研究<sup>[28]</sup>指出缺乏uge的肺炎克雷伯菌不易引起肺部感染、泌尿系感染和败血症等。铁是细菌生长繁殖所必需的微量元素，铁载体系统可吸收运输铁，其中气杆菌素帮助细菌从宿主内环境获得铁离子，明显提高肺炎克雷伯菌在腹水和血清中的生存率<sup>[29]</sup>，容易导致定植菌迁移引发血流感染。一项回顾性分析指出携带iutA是肺炎克雷伯菌血流感染患者死亡的独立危险因素<sup>[30]</sup>。本次检出率较高的毒力基因是mrkD、fimH、entB、uge和wabG检出率均在90%以上，其次为iucA、iutA、

kfu、rmpA、silS、iroB和iroN。34例并发感染的患者中定植组与感染组之间差异没有统计学意义，与相关研究<sup>[31]</sup>一致。

CRKP引发的感染当中以血流感染最为凶险，一项国内的研究指出CRKP血流感染14 d死亡率为46.8%<sup>[32]</sup>。本研究中检测到全血标本来源的CRKP与其配对的肠道定植菌均携带有rmpA、iucA和iroB等基因，其与高毒力相关并携带于pIVPK质粒上，它是一种大约170 000 bp、可移动的毒力元件，可与碳青霉烯酶耐药基因整合，获得pIVPK质粒的CRKP具有高毒力、高耐药、高传播的特点<sup>[33]</sup>，相关研究指出iucA、iroB和rmpA与肺炎克雷伯菌引起感染的严重程度相关<sup>[34]</sup>。本文通过对定植患者是否并发感染两组患者携带的耐药基因和毒力基因进行比较：其中毒力基因uge、iucA、iutA、rmpA和iroB有差异与研究<sup>[35]</sup>一致。说明这5个毒力基因在感染的进程起到关键促进作用。定植是否发生感染与fimH、wabG、entB、silS、kfu和iroN不相关与研究<sup>[35-36]</sup>一致。感染好转组与感染结局不良组耐药基因和毒力基因之间差异性分析得出其与感染患者的转归和预后不相关。同时Remya等<sup>[37]</sup>通过单因素分析得出多重耐药与非多重耐药肺炎克雷伯菌感染患者携带的毒力基因与患者的预后和死亡率之间无显著相关性。但是相关研究显示bla<sub>KPC</sub>在预测CRKP所致血流感染14 d死亡率方面具有价值<sup>[38]</sup>。Bakr等<sup>[39]</sup>也通过检测100例脓毒血症患者毒力基因并分析与死亡率之间的关系得出毒力基因rmpA与脓毒血症所致的死亡率具有显著相关性，基于本研究中发生血流感染的患者例数较少需扩大样本量进行检测，进一步需要细分毒力基因与不同感染类型的关系。

本文分别对同一患者配对菌株进行了对比分析得出34例CRE筛查阳性并继发感染的患者定植组与感染组检出细菌均为肺炎克雷伯菌；ST分型一致、碳青霉烯酶基因和本次所测毒力基因均无明显差异，两者之间高度同源，并且所携带的耐药基因和毒力基因具有较高致病性。与相关研究报道的定植菌与感染菌之间的相似性达80%以上相一致<sup>[40]</sup>。推测从肠内定植迁徙为感染，CRE的分子特征未发生明

显改变。如果定植状态持续存在，会在机体免疫力低下的情况下发生感染。目前国内不推荐对医务工作者常规进行CRE的直肠拭子筛查，而国外一项针对医护人员肠道定植菌的筛查可以看出耐药革兰阴性菌易在重症监护病房的护理工作者的肠道定植<sup>[41]</sup>，并且ICU内医护人员污染的手套和防护服<sup>[42]</sup>也是耐药菌在患者之间传播的主要原因，尤其是与ICU住院患者密切接触的呼吸科治疗师的手套和防护服必须重点消毒以及接触隔离。本研究经监测一半的CRE肠道定植患者在后续发生了严重的感染，各部门应严格按照指南要求对CRE进行主动筛查并采取预防接触隔离措施、环境消毒、加强手卫生等来降低CRE传播<sup>[41]</sup>，对于定植者本身尽可能减少不必要的医疗暴露<sup>[43]</sup>降低内源性感染的发生。一项针对儿童重症监护室CRE主动筛查的研究发现在进行主动筛查并干预后CRE的感染率由8.5%下降到5.7%<sup>[44]</sup>。

综上，医院重症监护室是CRE肠道定植最高的科室，定植后继发的感染率较高并且感染患者预后较差，临床治愈率较低。同一患者定植菌与感染菌之间具有很高的相关性，其菌种一致、ST分型一致、所携带的耐药基因和毒力基因之间高度同源。本次研究存在不足之处，样本量少无法准确通过耐药基因和毒力基因评估患者的预后和转归。CRE在肠道定植是感控的难点和重点，医院各部门应积极配合主动筛查并进行干预，可有效控制CRE的传播与感染。

## 参 考 文 献

- [1] Zhong H, Chen F, Li Y J, et al. Global trends and hotspots in research of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE): A bibliometric analysis from 2010 to 2020[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(6): 6079-6091.
- [2] Zhong H, Zhao X, Zhang Z, et al. Evaluation of the efficacy and safety of ceftazidime/avibactam in the treatment of Gram-negative bacterial infections: A systematic review and meta-analysis[J]. *Int J Antimicrob Ag*, 2018, 52(4): 443-450.
- [3] Yi L, Hui S, Cheng Z, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections among ICU admission patients in central China: Prevalence and prediction model[J]. *Biomed Res Int*, 2019, 3(27): 1-10.
- [4] Gato E, Rosalowska A, Martínez-Guitián M, et al. Anti-adhesive activity of a *vaccinium corymbosum* polyphenolic extract targeting intestinal colonization by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 132(132). doi: 10.1016/j.bioph.2020.110885.
- [5] Korach-Rechtman H, Hreish M, Fried C, et al. Intestinal dysbiosis in carriers of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*[J]. *Msphere*, 2020, 5(2). doi: 10.1128/mSphere.00173-20.
- [6] Jung H J, Littmann E R, Seok R, et al. Genome-wide screening for enteric colonization factors in carbapenem-resistant ST258 *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Mbio*, 2019, 10(2): 1-44.
- [7] Goodman K E, Simner P J, Klein E Y, et al. Predicting probability of perirectal colonization with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) and other carbapenem-resistant organisms (CROs) at hospital unit admission[J]. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 2019, 40(5): 541-550.
- [8] Zhou M, Kudinha T, Du B, et al. Active surveillance of carbapenemase-producing organisms (CPO) colonization with xpert carba-r assay plus positive patient isolation proves to be effective in CPO containment[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 5(9): 162-169.
- [9] Xu X, Li X, Luo M, et al. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella*[J]. *Microb Pathogenesis*, 2017, 5(104): 164-170.
- [10] Liu C, Shi J, Guo J. High prevalence of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* infection in the genetic background of elderly patients in two teaching hospitals in China[J]. *Infect Drug Resist*, 2018, 11: 1031-1041.
- [11] 杨敏, 李欣, 王敏, 等. 82株肺炎克雷伯菌β-内酰胺耐药性与基因型相关性分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2018, 13(8): 848-854.
- [12] 医院感染诊断标准(试行)摘登(1)[J]. 新医学, 2005, (8): 495.
- [13] 医院感染诊断标准(试行)[J]. 现代实用医学, 2003, (7): 460-465.
- [14] 乔甫, 宗志勇. 世界卫生组织《医疗机构耐碳青霉烯的肠杆菌科细菌、铜绿假单胞菌和鲍曼不动杆菌防控指南》介绍[J]. 华西医学, 2018, 33(3): 259-263.
- [15] Magiorakos A P, Burns K, Baño J R, et al. Infection prevention and control measures and tools for the prevention of entry of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* into healthcare settings: Guidance from the european centre for disease prevention and control[J]. *Antimicrob Resist In*, 2017, 6(1): 113-130.
- [16] Sun Y, Yu L, Gao W, et al. Investigation and analysis of the colonization and prevalence of carbapenem-resistant

- Enterobacteriaceae* in pediatric liver transplant recipients[J]. *Infect Drug Resist*, 2021, 14(14): 1957-1966.
- [17] Temkin E, Adler A, Lerner A, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Biology, epidemiology, and management[J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2014, 1323(1): 22-42.
- [18] Gorrie C L, Mirceta M, Wick R R, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(2): 208-215.
- [19] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网2014—2019年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学变迁[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(2): 175-179.
- [20] Zuo Y, Zhao D, Song G, et al. Risk factors, molecular epidemiology, and outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection for hospital-acquired pneumonia: A matched case-control study in eastern China during 2015-2017[J]. *Microb Drug Resist*, 2020, 27(2): 204-211.
- [21] Salomão M C, Guimarães T, Duailibi D F, et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in patients admitted to the emergency department: New risk factors and occurrence in patients coming directly from the community[J]. *J Hosp Infect*, 2017, 97(3): 241-246.
- [22] Lin Q, Wang Y, Yu J, et al. Bacterial characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) colonized strains and their correlation with subsequent infection[J]. *Bmc Infect Dis*, 2021, 21(1): 638-670.
- [23] Gona F, Bongiorno D, Aprile A, et al. Emergence of two novel sequence types (3366 and 3367) NDM-1- and OXA-48-co-producing *K. pneumoniae* in Italy[J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2019, 38(9): 1687-1691.
- [24] 龙华婧, 邱芳华, 刘道利, 等. 中国2017—2019年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌耐药基因及流行克隆特征[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(11): 1008-1015.
- [25] 储雯雯, 李昕, 叶乃芳, 等. 肠道定植耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌的主动筛查及分子流行病学[J]. 中华传染病杂志, 2021, 39(8): 485-490.
- [26] Zheng B, Xu H, Lv T, et al. Stool samples of acute diarrhea inpatients as a reservoir of ST11 hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Msystems*, 2020, 5(3): 498-527.
- [27] Hsieh P F, Lu Y R, Lin T L, et al. *Klebsiella pneumoniae* type VI secretion system contributes to bacterial competition, cell invasion, type-1 fimbriae expression, and *in vivo* colonization[J]. *J Infect Dis*, 2019, 219(4): 637-647.
- [28] Gu D, Dong N, Zheng Z, 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: 37-46.
- [29] 马立艳, 孙伟, 夏帅, 等. 腹腔感染耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的毒力特征[J]. 首都医科大学学报, 2021, 42(5): 733-738.
- [30] Wu X, Shi Q, Shen S, et al. Clinical and bacterial characteristics of *Klebsiella pneumoniae* affecting 30-day mortality in patients with bloodstream infection[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 688989.
- [31] Higashino-Hermes R, Marchi-Ana P, Ruedas-Martins R, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection is associated with lower overall survival in a cohort of haematopoietic stem-cell transplantation patients: Mechanism of resistance and virulence by whole-genome sequencing[J]. *J Med Microbiol*, 2021, 70(10). doi: 10.1099/jmm.0.001422.
- [32] 尹章勇, 周华, 符一骐, 等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌血流感染的临床特征和死亡危险因素分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2020, 20(4): 388-395.
- [33] Gu D, Dong N, Zheng Z, 等. ST11高毒力碳青霉烯耐药肺炎克雷伯菌在院内的致命性爆发: 分子流行病学研究[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(4): 377.
- [34] Russo T A, Olson R, Fang C T, et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9): 1-12.
- [35] Ikeda M, Mizoguchi M, Oshida Y, et al. Clinical and microbiological characteristics and occurrence of *Klebsiella pneumoniae* infection in Japan[J]. *Int J Gen Med*, 2018, 11: 293-299.
- [36] Higashino H R, Marchi A P, Ruedas Martins R C, et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection is associated with lower overall survival in a cohort of haematopoietic stem-cell transplantation patients: mechanism of resistance and virulence by whole-genome sequencing[J]. *J Med Microbiol*, 2021, 70(10). doi: 10.1099/jmm.0.001422.
- [37] Remya P A, Shanthi M, Sekar U, et al. Characterisation of virulence genes associated with pathogenicity in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Indian J Med Microbiol*, 2019, 37(2): 210-218.
- [38] Xu M, Fu Y, Kong H, et al. Bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: Prevalence of *bla*<sub>KPC</sub>, virulence factors and their impacts on clinical outcome[J]. *BMC Infect Dis*, 2018, 18(1): 358.
- [39] Bakr A O, Zaki M E S. Molecular study of *Klebsiella*

- pneumoniae* virulence genes from patients with hospital acquired sepsis[J]. *Clin lab*, 2019, 65(1). doi: 10. 7754/Clin. Lab. 2018. 180709.
- [40] Gorrie C L, Mirceta M, Wick R R, et al. Gastrointestinal carriage is a major reservoir of *Klebsiella pneumoniae* infection in intensive care patients[J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 65(2): 208-215.
- [41] Thuy D B, Cuong D M, James C, et al. Antibiotic-resistant Gram-negative bacteria carriage in healthcare workers working in an intensive care unit[J]. *Infect & Chemother* 2021, 53(3): 304-313.
- [42] O'Hara L M, Nguyen M H, Calfee D P, et al. Risk factors for transmission of carbapenem-resistant Enterobacteriales to healthcare personnel gloves and gowns in the United States[J]. *J Hosp Infect*, 2020, 5(109): 58-64.
- [43] Sequeira R P, McDonald J A K, Marchesi J R, et al. Commensal bacteroidetes protect against *Klebsiella pneumoniae* colonization and transmission through IL-36 signalling[J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(2): 304-313.
- [44] 管红艳, 刘婧娴, 陈峰, 等. 儿童重症监护病房耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌主动筛查及临床资料分析[J]. 中国感染与化疗杂志, 2021, 21(4): 444-448.