

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20246543

· 论 著 ·

耐碳青霉烯类弗劳地柠檬酸杆菌的耐药基因及分子分型

林玉玲¹, 陈清清¹, 彭芃芃¹, 邱慧娜², 胡丽萍¹, 闫小利¹, 张建明¹

(1. 福建医科大学附属泉州第一医院检验科, 福建 泉州 362000; 2. 泉州市传染病防治医院检验科, 福建 泉州 362100)

[摘要] **目的** 分析耐碳青霉烯类弗劳地柠檬酸杆菌(CRCF)的检出率、分布特点、耐药机制及分子分型,为临床治疗与防控提供理论依据。**方法** 分析 2020—2023 年福建医科大学附属泉州第一医院分离 CRCF 的药敏结果,验证菌株耐药表型,扩增耐药基因,多位点序列分型(MLST)分析菌株同源性,全基因组测序分析同时携带 *bla*_{VIM-1}、*bla*_{NDM-1} 的 CF17 菌株。**结果** 共检出非重复弗劳地柠檬酸杆菌 119 株,其中 CRCF 27 株,占 22.7%。CRCF 主要分离自神经外科和泌尿外科,标本类型主要是中段尿;对碳青霉烯类和头孢菌素均耐药,对阿米卡星的耐药率较低,对替加环素及多黏菌素均敏感,对其余抗菌药物的耐药率 >50%。成功复苏的 22 株 CRCF 耐药表型均阳性,均携带耐药基因,其中 17 株(77.3%)携带单耐药基因,包括 14 株 *bla*_{NDM-1}, 2 株 *bla*_{KPC-2}, 1 株 *bla*_{NDM-5}; 5 株(22.7%)同时携带双耐药基因,包括同时携带 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{NDM-1} (共 3 株),同时携带 *bla*_{NDM-1}、*bla*_{IMP} 和同时携带 *bla*_{VIM-1}、*bla*_{NDM-1} (各 1 株);共检出 8 个 ST 型,ST116、ST532 分别有 8、6 株。CF17 为 ST116,携带的 *bla*_{VIM-1}、*bla*_{NDM-1} 位于不同的质粒上,分别为 IncA、IncX3。**结论** CRCF 以多重耐药为主,主要耐药机制是携带 *bla*_{NDM-1},部分菌株同时携带双耐药基因,以 ST116 和 ST532 为主,CF17 是目前已知国内首次分离报告同时携带 *bla*_{VIM-1} 及 *bla*_{NDM-1} 耐药基因的弗劳地柠檬酸杆菌。

[关键词] 耐碳青霉烯类弗劳地柠檬酸杆菌; *bla*_{NDM-1}; *bla*_{VIM}; *bla*_{IMP}; ST116; ST532; 耐药性; 碳青霉烯耐药基因; 碳青霉烯酶

[中图分类号] R181.3⁺2 R378

Antimicrobial resistance genes and molecular typing of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii*

LIN Yu-ling¹, CHEN Qing-qing¹, PENG Peng-peng¹, QIU Hui-na², HU Li-ping¹, YAN Xiao-li¹, ZHANG Jian-ming¹ (1. Departments of Laboratory Medicine, Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University, Quanzhou 362000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, The Infectious Disease Hospital of Quanzhou City, Quanzhou 362100, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the detection rate, distribution characteristics, resistance mechanism, and molecular typing of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* (CRCF), providing theoretical basis for clinical treatment and prevention. **Methods** Antimicrobial susceptibility testing results of CRCF isolated from Quanzhou First Hospital Affiliated to Fujian Medical University from 2020 to 2023 were analyzed. Resistance phenotypes of the strains were verified; resistance genes were amplified; strain homology was analyzed by multi-locus sequencing typing (MLST). Whole genome sequencing analysis was performed on CF17 strains carrying both *bla*_{VIM-1} and *bla*_{NDM-1}. **Results** A total of 119 strains of non-repetitive *Citrobacter freundii* were detected, 27 strains were CRCF, accounting for 22.7%. CRCF was mainly isolated from departments of neurosurgery and urology, and the specimen type was mainly midstream urine. Strains were resistant to both carbapenems and cephalosporins, less resistant to amikacin, susceptible to both tigecycline and polymyxin, and with a resistance rate of >50% to other

[收稿日期] 2024-05-06

[基金项目] 泉州市科技局计划项目(2018Z052,2022NS061)

[作者简介] 林玉玲(1988-),女(汉族),福建省泉州市人,主管技师,主要从事细菌耐药机制研究。

[通信作者] 张建明 E-mail: 0591350004@163.com

antimicrobial agents. 22 CRCF strains were successfully recovered and all were positive for antimicrobial resistance phenotype and genes. 17 strains (77.3%) carried single resistance genes, including 14 strains carrying bla_{NDM-1} , 2 strains carrying bla_{KPC-2} , and 1 strain carrying bla_{NDM-5} . 5 strains (22.7%) carried dual antimicrobial resistance genes, including strains carrying both bla_{KPC-2} and bla_{NDM-1} ($n=3$), strain carrying both bla_{NDM-1} and bla_{IMP} ($n=1$), and strain carrying both bla_{VIM-1} and bla_{NDM-1} ($n=1$). A total of 8 ST types were detected, with 8 and 6 strains being ST116 and ST532, respectively. CF17 was ST116, carrying bla_{VIM-1} and bla_{NDM-1} on different plasmids, namely IncA and IncX3, respectively. **Conclusion** CRCF strains are mostly multidrug-resistant, with the presence of bla_{NDM-1} being the major resistance mechanism. Some strains also carry dual resistance genes, mainly ST116 and ST532. CF17 is currently the first isolated and reported *Citrobacter freundii* that carries both bla_{VIM-1} and bla_{NDM-1} resistance genes in China.

[Key words] carbapenem-resistant *Citrobacter freundii*; bla_{NDM-1} ; bla_{VIM} ; bla_{IMP} ; ST116; ST352; antimicrobial resistance; carbapenem-resistant gene; carbapenemase

弗劳地柠檬酸杆菌属于革兰阴性肠杆菌目细菌,广泛存在于水、土壤等环境及人类的肠道系统,是人类机会致病菌,可引起腹腔感染、菌血症、肺炎、皮肤软组织和尿路感染等^[1]。抗菌药物的大量使用导致耐碳青霉烯类弗劳地柠檬酸杆菌(carbapenem-resistant *Citrobacter freundii*, CRCF)出现,给临床治疗带来了巨大挑战,使患者的疾病负担加重,医院总病死率升高。既往研究^[1-2]多针对肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌,对弗劳地柠檬酸杆菌的研究报道较少,虽然其毒力相对较低,但对于免疫低下的患者,亦能引起严重感染。

弗劳地柠檬酸杆菌是环境常见细菌,也被认为是抗菌药物耐药基因的重要储存库^[3],碳青霉烯耐药基因如 bla_{KPC} 、 bla_{NDM} 可存在于质粒上,并借此在不同菌种间传播^[4]。本研究通过分析 CRCF 菌株的分离率、耐药表型、耐药基因及分子分型,探讨其主要耐药机制及流行病学特征,为临床合理用药及感染防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源 2020—2023 年福建医科大学附属泉州第一医院临床分离的弗劳地柠檬酸杆菌(剔除同一患者的重复菌株),依据药物敏感性(药敏)试验结果收集 CRCF 菌株。对成功复苏的 22 株 CRCF 菌株进行耐药表型、耐药基因及分子分型研究。

1.1.2 仪器及试剂 Phoenix100 全自动细菌鉴定仪及药敏系统(美国 BD 公司),MALDI-TOF 微生

物质谱仪(德国布鲁克公司),DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂),凝胶成像仪(美国 Omega Fluor 公司),梯度 PCR 仪(新加坡 ProFlex),美罗培南、亚胺培南纸片(英国 OXOID 公司),MH 琼脂平板(广州迪景微生物科技有限公司),PCR 试剂盒(厦门万和信生物科技有限公司),引物(上海生工生物工程有限公司),Ezup 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒(上海生工生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 菌株鉴定及药敏试验 采用 Phoenix100 全自动细菌鉴定仪及药敏系统对弗劳地柠檬酸杆菌进行鉴定及药敏试验,采用 MALDI-TOF 微生物质谱仪及纸片扩散法进行鉴定及药敏复核,结果判断参照美国临床实验室标准化协会(CLSI)2022 年版本标准进行折点判读,药敏试验质控菌株为大肠埃希菌 ATCC 25922。

1.2.2 耐药表型检测 采用改良碳青霉烯类失活法(modified carbapenem inactivation method, mCIM)及 EDTA 碳青霉烯类失活法(EDTA-modified carbapenem inactivation method, eCIM)进行耐药表型检测,具体参照 CLSI M100S32^[5]介绍的步骤操作。mCIM 试验阳性提示为产碳青霉烯酶菌株,若 eCIM 试验阴性,则为产 A 类丝氨酸酶菌株;若同时 eCIM 试验阳性,则为产金属酶阳性菌株。

1.2.3 耐药基因检测 采用聚合酶链式反应(PCR)法检测 bla_{KPC} 、 bla_{IMP} 、 bla_{NDM} 、 bla_{VIM} 、 bla_{OXA-48} 碳青霉烯耐药基因^[6],扩增产物送上海生工生物工程有限公司进行测序。PCR 引物及扩增产物大小见表 1。

ST 型,其中 8 株为 ST116,6 株为 ST532,ST18、ST107 各 2 株,ST118、ST129、ST257、ST328 各 1 株。ST532 是本实验室检出的新 ST 型,见表 3。

表 3 22 株 CRCF 的耐药基因型及 ST 型

Table 3 Antimicrobial resistance genes types and ST types of 22 CRCF strains

菌株编号	耐药基因	ST 型	标本来源科室	标本
CF1	NDM-1	532	感染科	中段尿
CF2	NDM-1	257	神经外科	痰
CF3	NDM-1	116	泌尿外科	脓液
CF4	NDM-5	129	泌尿外科	中段尿
CF5	NDM-1	532	神经外科	中段尿
CF6	NDM-1	18	神经外科	中段尿
CF7	KPC-2、NDM-1	116	神经外科	中段尿
CF8	NDM-1	532	神经外科	中段尿
CF9	NDM-1	118	神经内科	中段尿
CF10	NDM-1	116	神经外科	中段尿
CF11	KPC-2、NDM-1	116	神经外科	中段尿
CF12	NDM-1	116	神经外科	中段尿
CF13	NDM-1	18	泌尿外科	中段尿
CF14	KPC-2	116	肾内科	静脉全血
CF15	KPC-2	107	ICU	胆汁
CF16	NDM-1	116	老年病科	中段尿
CF17	VIM-1、NDM-1	116	ICU	胸腔积液
CF18	KPC-2、NDM-1	107	肾内科	中段尿
CF19	NDM-1	532	血液内科	中段尿
CF20	IMP、NDM-1	532	ICU	痰
CF21	NDM-1	328	泌尿外科	中段尿
CF22	NDM-1	532	神经外科	中段尿

2.5 CF17 菌株全基因组序列分析 全基因组测序分析显示,CF17 菌株同时携带的 β -内酰胺酶耐药基因有 *bla*_{CMY-135}、*bla*_{SHV-12}、*bla*_{OXA-1}、*bla*_{VIM-1} 及 *bla*_{NDM-1} 等。*bla*_{VIM-1}、*bla*_{NDM-1} 位于不同的质粒上,分别为质粒 IncA、IncX3。该菌株全基因组上传到 NCBI,登录号为 CP150627。

3 讨论

弗劳地柠檬酸杆菌广泛存在于自然环境中,可引起人类和动物感染,带来伤害和高病死率^[7-8],而 CRCF 感染使治疗更加复杂。2020—2023 年该院分离的 CRCF 检出率高达 22.7% (27/119),高

于 2014—2019 年全国细菌耐药监测网^[9] 报道的 5.4%~6.9%,与重庆某院报道的 23.2% 接近^[10]。本次分离的菌株主要来自神经外科、泌尿外科,标本类型以中段尿为主。

本研究中,多数 CRCF 菌株多重耐药,与 CSCF 相比,其对氨基糖苷类、喹诺酮类及磺胺类等抗菌药物表现出更高的耐药率,这使得临床抗感染治疗的选择更少;对阿米卡星的耐药率较低(18.5%),对多黏菌素及替加环素的敏感率为 100%,与既往报道^[11] 相似。但多黏菌素的肾毒性及神经毒性较大,限制了其在临床的使用,替加环素可作为基础,联合其他药物治疗耐碳青霉烯类肠杆菌目细菌感染,对于产丝氨酸酶的菌株感染优先选择头孢他啶/阿维巴坦,对于产金属酶或双酶的菌株感染,可考虑氨曲南联合头孢他啶/阿维巴坦^[12]。

不同地区不同菌种间流行的碳青霉烯酶基因存在一定差异^[13-14],我国弗劳地柠檬酸杆菌以 *bla*_{NDM-1} 为主要流行的耐药基因,本研究结果与其相似,但 2015—2017 年全球范围内则以 *bla*_{KPC-2}、*bla*_{VIM} 和 *bla*_{IMP} 为主^[15]。既往文献^[4,16] 报道 CRCF 同时携带 *bla*_{NDM-1} 和 *bla*_{KPC-2} 两个耐药基因,大部分存在于两个不同的质粒上,亦有少数存在于同一个质粒的报道。本研究共检出 3 株 CRCF 同时携带 *bla*_{NDM-1} 和 *bla*_{KPC-2},其质粒特征有待进一步研究,其中 2 株属于 ST116,来自神经外科的不同患者,1 株 ST107,来自肾内科患者。国内报道的 CRCF 菌株携带的 *bla*_{NDM-1} 主要位于 33.3~54.7 kb 大小的质粒上,并可通过质粒在不同菌种间进行水平转移,*bla*_{KPC-2} 可能通过转座酶插入其他转座子,使 *bla*_{KPC-2} 在细菌间进行转移^[17-18]。*bla*_{IMP}、*bla*_{VIM} 均属于 B 类金属碳青霉烯酶,最早在铜绿假单胞菌中被发现,并在铜绿假单胞菌、肠杆菌目细菌及鲍曼不动杆菌中流行,但国内两者的报道^[19-20] 较少。同时携带两个碳青霉烯耐药基因的报道很少,Qiao 等^[20] 首次报道了 1 株弗劳地柠檬酸杆菌同时携带 *bla*_{IMP-4}、*bla*_{OXA-1} 和 *bla*_{NDM-1} 3 种基因共存于可转移的杂交质粒上,并携带有许多其他耐药基因及插入序列。同时携带 *bla*_{NDM-1} 和 *bla*_{VIM-1} 的弗劳地柠檬酸杆菌在国外少见报道,*bla*_{NDM-1} 可通过接合试验转移成功,*bla*_{VIM-1} 接合试验失败,但可通过电转导入受体菌^[21-22]。本研究检出 CF17 同时携带 *bla*_{NDM-1} 和 *bla*_{VIM},属于 ST116,目前国内尚未见报道,其耐药基因位于 IncA 及 IncX3 两个不同质粒上,质粒传播功能仍有待进一步探讨。CF20 同时携带 *bla*_{NDM-1} 和 *bla*_{IMP},属于 ST532,为新

ST 型。CF17 和 CF20 虽然属于不同 ST 型,但均分离自 ICU。ICU 患者病情严重、病程长、抗菌药物使用强度大,检出的耐药基因很可能存在于质粒上,能够在菌种间传播,故应警惕携带多种耐药基因的菌株,对其加强监测及感染防控。

MLST 分析显示共 8 个 ST 型,主要以 ST116 和 ST532 为主,ST532 是该院检出的新 ST 型。两个 ST 型均从神经外科、泌尿外科、肾内科及 ICU 中检出,说明这两个克隆株在医院内可能存在克隆传播现象。其他 ST 型菌株呈散在流行,未发现存在克隆传播。

综上所述,CRCF 在弗劳地柠檬酸杆菌中的比例较高,多呈多重耐药,以携带 *bla*_{NDM-1} 为主,有些菌株携带双碳青霉烯耐药基因,增加了临床治疗难度,同时可能通过质粒传播耐药基因,因此,临床应高度重视 CRCF 的检测,为临床合理使用抗菌药物提供依据。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

[参考文献]

- [1] Liu LH, Wang NY, Wu AYJ, et al. *Citrobacter freundii* bacteremia: risk factors of mortality and prevalence of resistance genes[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2018, 51(4): 565-572.
- [2] Zhang YW, Wang Q, Yin YY, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections: report from the China CRE network [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2018, 62(2): e01882-17.
- [3] Hem S, Cummins ML, Wyrsh ER, et al. Genomic analysis of *Citrobacter* from Australian wastewater and silver gulls reveals novel sequence types carrying critically important antibiotic resistance genes [J]. Sci Total Environ, 2024, 909: 168608.
- [4] Zhang FL, Li ZY, Liu XM, et al. Carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* harboring *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1}: a study on their transferability and potential dissemination via generating a transferrable hybrid plasmid mediated by IS 6100[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1239538.
- [5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: M100, 32nd edition[S]. Malvern, PA, USA: CLSI, 2022.
- [6] Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes[J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2011, 70(1): 119-123.
- [7] Bandeira Junior G, Dos Santos AC, Souza CDF, et al. *Citrobacter freundii* infection in silver catfish (*Rhamdia quelen*): He-

matological and histological alterations[J]. Microb Pathog, 2018, 125: 276-280.

- [8] Inurria A, Suárez-Pérez A, Calabuig P, et al. *Citrobacter freundii*-associated lesions in stranded loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*) [J]. Vet Pathol, 2024, 61(1): 140-144.
- [9] 全国细菌耐药监测网. 全国细菌耐药监测网 2014—2019 年支气管肺泡灌洗液细菌耐药监测报告[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(1): 60-68.
China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Antimicrobial resistance of bacteria from bronchoalveolar lavage fluid: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance System in 2014-2019[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(1): 60-68.
- [10] 林美芳. 重庆某医院耐碳青霉烯类弗劳地枸橼酸杆菌感染危险因素、耐药性及同源性分析[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2020.
Lin MF. The clinical risk factors, drug resistance and homology analysis of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* isolates from a hospital in Chongqing[D]. Chongqing: Chongqing Medical University, 2020.
- [11] 宁长秀, 汪红, 钟桥石, 等. 耐碳青霉烯类抗菌药物肠杆菌科细菌耐药特性的分析[J]. 中国抗生素杂志, 2013, 38(10): 788-790.
Ning CX, Wang H, Zhong QS, et al. Analysis of drug resistance to carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2013, 38(10): 788-790.
- [12] 任艳丽, 王云英, 蒋敏, 等. 不同碳青霉烯酶型肠杆菌科细菌感染的治疗策略研究[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(4): 339-345.
Ren YL, Wang YY, Jiang M, et al. Treatment strategies of infections with *Enterobacteriaceae* producing different types of carbapenemases types [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2021, 46(4): 339-345.
- [13] 林玉玲, 张建明, 陈清清, 等. 某院耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌的耐药基因分析[J]. 海峡预防医学杂志, 2020, 26(5): 39-41.
Lin YL, Zhang JM, Chen QQ, et al. Antimicrobial resistance gene analysis of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* bacteria in a hospital[J]. Strait Journal of Preventive Medicine, 2020, 26(5): 39-41.
- [14] Wang JT, Wu UI, Lauderdale TLY, et al. Carbapenem-non-susceptible *Enterobacteriaceae* in Taiwan [J]. PLoS One, 2015, 10(3): e0121668.
- [15] Nobrega D, Peirano G, Matsumura Y, et al. Molecular epidemiology of global carbapenemase-producing *Citrobacter spp.* (2015-2017) [J]. Microbiol Spectr, 2023, 11(2): e0414422.
- [16] Huang JZ, Zhao JX, Yi M, et al. Emergence of tigecycline and carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* co-carrying *tmexCD1-topr1*, *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{NDM-1} from a sepsis patient [J]. Infect Drug Resist, 2023, 16: 5855-5868.
- [17] 林迪, 方颖, 张嵘, 等. 弗劳地枸橼酸杆菌中质粒介导的 KPC-2 和 NDM-1 型碳青霉烯酶基因结构分析[J]. 临床检验

杂志, 2016, 34(6): 423 - 427.

Lin D, Fang Y, Zhang R, et al. Gene structure analysis of plasmid-mediated KPC-2 and NDM-1 type of carbapenem in *Citrobacter freundii*[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2016, 34(6): 423 - 427.

- [18] 杜娜, 林云, 刘淑敏, 等. 碳青霉烯类耐药弗劳地枸橼酸杆菌中质粒介导 *bla*_{NDM-1} 基因的研究[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(6): 604 - 607.

Du N, Lin Y, Liu SM, et al. Study on plasmid-mediated *bla*_{NDM-1} gene in carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* [J]. Chinese Journal of Infection and Chemotherapy, 2018, 18(6): 604 - 607.

- [19] Hishinuma T, Uchida H, Tohya M, et al. Emergence and spread of VIM-type metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2020, 23: 265 - 268.

- [20] Qiao J, Chen YY, Ge HY, et al. Coexistence of *bla*_{IMP-4}, *bla*_{NDM-1} and *bla*_{OXA-1} in *bla*_{KPC-2}-producing *Citrobacter freundii* of clinical origin in China[J]. Front Microbiol, 2023, 14: 1074612.

- [21] Biez L, Bonnin RA, Naas T, et al. Characterization of VIM-1-, NDM-1- and OXA-48-producing *Citrobacter freundii* in

France[J]. J Antimicrob Chemother, 2022, 77(4): 1200 - 1202.

- [22] Dziri R, Kuşku MA, Arfaoui A, et al. Whole genome sequencing of a *Citrobacter freundii* strain isolated from the hospital environment: an extremely multiresistant NDM-1 and VIM-48 coproducing isolate[J]. Microb Drug Resist, 2022, 28(1): 18 - 22.

(本文编辑: 翟若南)

本文引用格式: 林玉玲, 陈清清, 彭芃芃, 等. 耐碳青霉烯类弗劳地枸橼酸杆菌的耐药基因及分子分型[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(12): 1486 - 1491. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20246543.

Cite this article as: LIN Yu-ling, CHEN Qing-qing, PENG Peng-peng, et al. Antimicrobial resistance genes and molecular typing of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* [J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(12): 1486 - 1491. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20246543.