



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Engineering

journal homepage: www.elsevier.com/locate/eng

Research

Antimicrobial Resistance—Article

中国血流感染相关产碳青霉烯酶肠杆菌的基因组及表型多样性——一项多中心流行病学、微生物学和遗传学研究

郑培文^{a, #}, 徐浩^{a, #}, 郭丽华^a, 尉晓^a, 嵇金如^a, 应超群^a, 陈云波^a, 沈萍^a, 韩慧明^b, 黄晨^c, 张舜天^a, 吕涛^a, 肖永红^{a,*}

^a State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, Collaborative Innovation Center for Diagnosis and Treatment of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China

^b Medical College of Beihua University, Jilin 132013, China

^c Department of Infectious Diseases, Ningbo Medical Center Li Huili Hospital, Ningbo 315040, China

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 April 2020

Revised 7 September 2020

Accepted 9 October 2020

Available online 25 December 2020

关键词

碳青霉烯酶

产碳青霉烯酶肠杆菌

质粒介导

中国

产超广谱β-内酰胺酶

摘要

产碳青霉烯酶肠杆菌(CPE)是对全球公共卫生产生最严重威胁的病原菌之一。然而, 血流感染(BSI)中CPE分离株的种群结构和遗传特征在很大程度上尚不清楚。为解决这一认知差距, 将具有临床意义的由CPE引起的BSI患者纳入本研究, 并且于2014—2015年在中国26家哨点医院招募相关患者。对CPE分离株进行微生物学和基因组学表征, 包括耐药谱、分子分型、系统发育特征以及碳青霉烯酶编码基因的遗传背景分析。在采集的2569株BSI相关肠杆菌中, 发现42株(1.6%)为碳青霉烯酶阳性。此外, 对2242株大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌和产酸克雷伯菌进行了产超广谱β-内酰胺酶(ESBL)检测试验, 发现1111株(49.6%)产ESBL菌株。全基因组测序分析显示, 在收集的菌株中, 产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)-2的ST11型肺炎克雷伯菌和产新德里金属β-内酰胺酶(NDM)-5的ST167型大肠埃希菌在中国存在克隆扩散现象。质粒分析显示碳青霉烯酶编码基因位于多种类型的质粒上。此外, 观察到在肺炎克雷伯菌分离株中生物膜形成相关的3型菌毛簇基因和耶尔森菌素相关毒力基因的分离率较高。本研究证明了产ESBL菌株在中国BSI分离株中的高流行率及CPE菌株在其中的广泛传播, 凸显了上述两类病原菌在临床中产生的威胁。此外, 本研究首次全面表征了BSI CPE分离株的基因组特征。强调未来需密切监测产KPC-2的ST11型肺炎克雷伯菌和产NDM-5的ST167型大肠埃希菌克隆在中国的播散情况。

© 2020 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. 引言

碳青霉烯类抗生素耐药性的出现和传播[尤其在产超广谱β-内酰胺酶(ESBL)细菌中出现碳青霉烯耐药性]具有特殊的临床意义[1–2]。最近, 耐碳青霉烯肠杆菌

(CRE)被世界卫生组织列为最关键的病原体组之一[3], 表明CRE已成为抗生素时代的全球性威胁[4]。在此类微生物中, 产碳青霉烯酶肠杆菌(CPE)是最令人担忧的威胁, 因为针对这些病原菌的治疗和抑制播散的策略很有限[5–6]。有文献报道同时使用抗菌剂和质子泵抑制剂可以

* Corresponding author.

E-mail address: xiaoyonghong@zju.edu.cn (Y. Xiao).

These authors contributed equally to this manuscript.

延长CPE胃肠道定植的持续时间[7]。同时，最近的研究也表明抗生素暴露、手术史和CPE定植阳性率是密切相关的[8]。

血流感染（BSI）是全世界感染性疾病的主要诱因，亦成为发达国家患者的主要死亡原因之一[9–10]。在美国每年约有9300例与医疗保健相关的感染是由CPE引起的，而近一半因CPE住院的BSI患者死于感染[11]。但目前只有少数大规模耐药性监测项目可以专门针对BSI分离株开展检测[12]。

中国在过去10年中观察到CPE介导的感染发生率不断上升[13]。但迄今为止只有少数研究调查了国家层面的对CPE分离株的监测情况[13–15]。最近有报道称中国BSI中产ESBL肠杆菌感染率较高，但该研究未描述CPE的相关监测情况[16]。在之前的研究中，报道了中国肠杆菌诱发BSI的初步数据[17]。这些研究绝大多数基于流行病学数据或Sanger测序数据；因此，此类研究无法进行比较基因组学分析，并借此追踪此类菌株或抗生素耐药基因（ARG）的扩散和传播。

到目前为止，有关BSI相关CPE分离株的种群结构和遗传特征在很大程度上仍是未知的。为了解决这一知识差距，我们的团队在中国建立了由肠杆菌诱发的具有临床意义的BSI研究队列，并进一步对引起BSI的肠杆菌分离菌株进行了全面的表型鉴定；然后，采用全基因组测序（WGS）和质粒分析方法，以获得医院间和医院内CPE流行病学信息。研究结果有助于理解中国地理区域内以及不同肠杆菌科细菌种属之间耐药播散的意义。

2. 材料和方法

2.1. 研究设计、背景及菌株

血流感染细菌耐药监测联盟（BRICS）作为一个前瞻性、多中心和观察性的联盟，自2014年开始追踪中国BSI分离株的抗菌素耐药性[17]。具有临床意义的BSI患者的判定标准由哨点医院的临床微生物学家确定。作为该计划的一部分，本研究在2014年1月至2015年12月从位于21个城市的26家哨点医院收集了所有非重复的BSI分离株（图1）。排除门诊患者或数据不完整的患者。所有分离株均送至浙江大学医学院附属第一医院进行检测分析。临床数据从感染患者的临床和病历系统中提取。浙江大学医学院附属第一医院伦理委员会授予伦理认证。所有患者通过面对面或电话获得个人知情同意书。

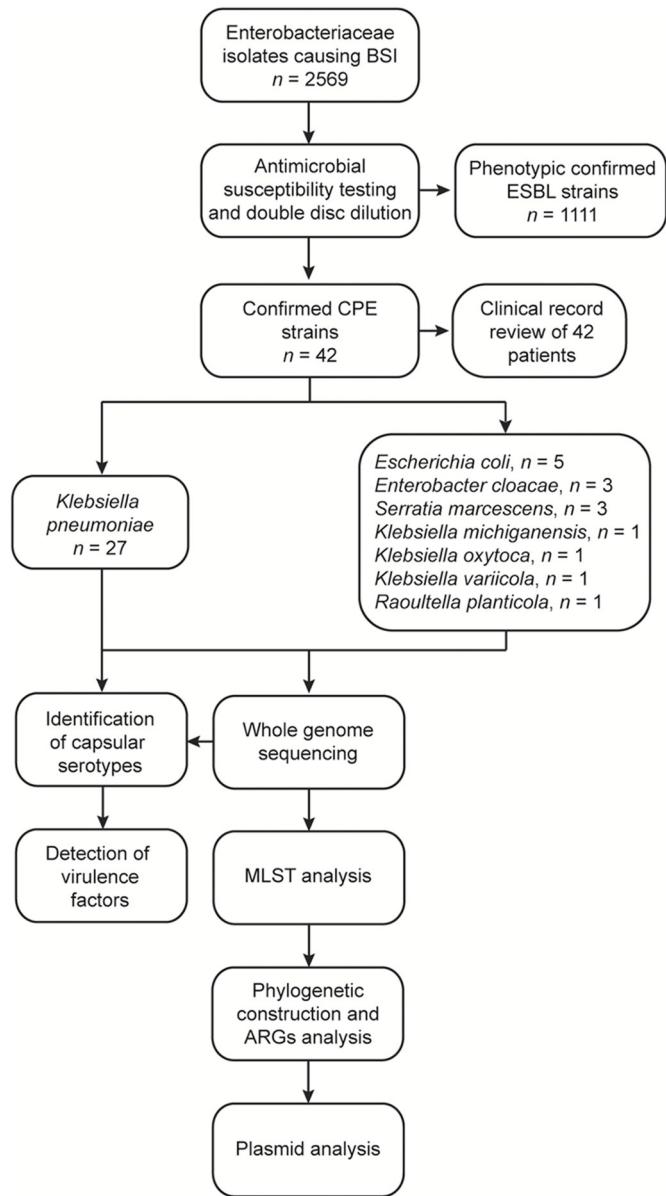


图1. 本研究流程图。

2.2. 菌种鉴定、抗菌药物敏感性试验和分子生物学研究

使用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱技术（MALDI-TOF-MS）（Bruker Daltonics，德国）进行细菌种类鉴定。根据美国临床和实验室标准协会（CLSI）标准，使用琼脂稀释法开展抗菌药物敏感性试验（AST）[18]。使用欧洲临床微生物和感染病学会药敏委员会（EUCAST）（<http://www.eucast.org/>）描述的微量肉汤稀释法对多黏菌素和替加环素进行AST试验。大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、奇异变形杆菌和产酸克雷伯菌产ESBL检测按照CLSI推荐的双纸片稀释法进行表型分析。如前所述，对碳青霉烯类非敏感菌株进行碳青霉烯酶（bla_{IMP}）、维罗纳整合素编码的金属β-内酰胺酶（bla_{VIM}）、肺炎克雷

伯菌碳青霉烯酶 (bla_{KPC})、苯唑西林酶 (bla_{OXA-48}) 和新德里金属 β -内酰胺酶 (bla_{NDM}) 编码基因的筛选[19]。

2.3. 全基因组测序和基因组学分析

为了描述CPE 菌株的遗传特征，对所有CPE 菌株开展 WGS。使用 Gentra Puregene Yeast/Bact. 试剂盒 (Qiagen, 德国) 提取细菌基因组 DNA。然后使用 Illumina Hiseq 2500 平台 (诺禾致源公司, 中国) 进行全基因组测序。下机后的测序数据使用 Velvet 1.1 [20] 进行组装。如前所述，对大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌 (*E. cloacae*) 和产酸克雷伯菌菌株进行多位点序列分型 (MLST) 分析 [4]。进一步使用 ResFinder 2.1 在线分析软件 [21] 开展 ARG 的鉴定。所有 CPE 分离株的基因组比对采用 progressive Mauver 软件 [22]，基于多重全基因组比对算法，估计每对输入基因组之间的共享基因含量。利用开放阅读框 (ORF) finder 程序 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)，通过手动方式对碳青霉烯酶编码基因和 *rmpA/rmpA2* 基因进行比对查询。

2.4. 质粒分析

利用核酸酶消化后的脉冲场凝胶电泳 (S1-PFGE) 和 Southern 杂交技术评估携带 bla_{NDM} / bla_{KPC} / bla_{IMP} / $rmpA/rmpA2$ 质粒的大小 [23]。使用拼接软件 SPAdes [24] 组装目标质粒序列。为了确定目标质粒的序列，利用基于局部序列比对算法的搜索工具 (BLAST) 在线比对软件对每个拼接后的 scaffold 在 GenBank 核酸数据库进行相似性搜索。质粒序列的确认基于 MUMmer 软件的比对结果，当本研究测序得到的 scaffold 70% 以上的长度与质粒序列匹配，且 30% 以下的长度与可移动元件或染色体序列相匹配时，该段序列被定义为质粒序列 [25]。进而使用细菌的完整序列质粒数据库 (PLSDB) [26] 手动检查每个 scaffold 序列最佳匹配的参考质粒。每个质粒的估计长度为所有与某个特定参考质粒相关的 scaffold 长度之和。当 scaffold 序列与参考质粒具有 99% 及以上的同一性且覆盖度大于 70% 时，认为该菌株中存在质粒。接着使用 Plasmid Finder 1.3 软件来识别质粒的不相容类型 [27]。同时，把相应的质粒序列与从美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 数据库中获取的其他质粒序列进行 BLAST 比较，并使用 BLAST Ring Image Generator (BRIG) (<http://brig.sourceforge.net/>) 进行质粒序列比较图谱的绘制。

2.5. 肺炎克雷伯菌分离株的系统发育分析

为了进一步描述产肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶 (KPC) - 2 肺炎克雷伯菌分离株的系统发育结构，创建一个基于核

心单核苷酸多态性的系统发育树，并利用 Illumina 测序后的 reads 比对参考基因组 (肺炎克雷伯菌株 HS11268, CP003200) 来识别 SNP。核心基因的定义如前所述 [28]。在去除重组位点后，使用广义时间可逆 (GTR) 模型来构建进化模型，使用 RAxML 程序 (8.2.10 版本) 进行基于最大似然法的系统发育树构建 [29]。最后使用 Interactive Tree of Life 软件 (<https://itol.embl.de/>) 实现系统发育树的可视化。

2.6. 肺炎克雷伯菌毒力基因和荚膜基因的鉴定

为了确定 27 株肺炎克雷伯菌分离株的毒力基因和荚膜基因，利用巴斯德研究所 (Institute Pasteur) 的肺炎克雷伯菌分离株基因组序列数据库 (BIGSdb) (<http://bigsdb.web.pasteur.fr>) 进一步筛选毒力基因和 *wzi* 基因等位基因序列。

3. 结果

3.1. BSI 分离株中 ESBL 的高流行率

在为期两年的研究中，共收集中国 21 个城市的 26 家医院共 4801 例独特的 BSI 病例。前瞻性地收集了非重复的 2569 株肠杆菌，占所有革兰氏阴性菌血症病例的 53.5% (2569/4801)。在肠杆菌科细菌中，大肠埃希菌 ($n = 1617$) 是主要物种，其次是肺炎克雷伯菌 ($n = 570$)。在 2242 株开展产 ESBL 检测的菌株中，一共有 1111 株 (49.6%) 被确认为产 ESBL 的菌株。产 ESBL 的大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、产酸克雷伯菌和奇异变形杆菌的总比例分别为 57.0% (922/1617)、30.0% (171/570)、33.3% (8/24) 和 35.7% (10/28)。虽然大多数菌株对联磺甲氧苄啶 (50.3%)、多黏菌素 (98.0%)、美罗培南 (96.8%) 和亚胺培南 (95.9%) 敏感，但对阿莫西林 (88.6%)、头孢唑林 (60.6%) 和头孢呋辛 (53.7%) 有较高比例的耐药情况。

3.2. CPE 菌株的识别和分布

共鉴定出 66 株美罗培南非敏感菌株和 73 株亚胺培南非敏感菌株，其中 42 株经聚合酶链反应 (PCR) 和 Sanger 测序被证实为碳青霉烯酶阳性菌株。在这些菌株中，肺炎克雷伯菌占 27 株，其次是大肠埃希菌 ($n = 5$)、黏质沙雷菌 ($n = 3$)、阴沟肠杆菌 ($n = 3$)、密歇根克雷伯菌 ($n = 1$)、变栖克雷伯氏菌 ($n = 1$)、产酸克雷伯菌 ($n = 1$) 和植生拉乌尔菌 ($n = 1$)。这些菌株对头孢噻肟和哌拉西林-他唑巴坦的总耐药率为 100.0%，对氨曲南的

耐药率为95.2%，对头孢他啶的耐药率为92.9%。因此，对CPE分离株最有效的抗菌药物是替加环素、多黏菌素B和联苯甲氧苄啶。所有菌株均对替加环素敏感，且只有一株黏质沙雷菌对多黏菌素B耐药。

Sanger测序进一步显示，*bla*_{KPC-2}是最常见的碳青霉烯酶编码基因，共31株，占比为91.3%；其次是*bla*_{NDM-5}(n=5)、*bla*_{NDM-1}(n=4)、*bla*_{IMP-4}(n=1)和*bla*_{IMP-8}(n=1)。有趣的是，570株肺炎克雷伯菌和1617株大肠埃希菌中分别有27株(4.7%)和5株(0.3%)存在碳青霉烯酶基因。此外，这些CPE分离株来自12个城市的14家医院，其中皖南医学院第一附属医院的CPE比率最高，为17.4%。

3.3. CPE阳性患者的临床描述

所有CPE感染患者均需住院治疗。42例患者的平均年龄为61.1岁，年龄范围为1~90岁，其中男性占66.7%(28/42)。21名(50.0%)患者入住重症监护病房(ICU)[包括急诊ICU(EICU)和新生儿ICU(NICU)]。42例患者中有15例(35.7%)最终死亡。值得注意的是，感染产*rmpA/rmpA2*的肺炎克雷伯菌分离株的6名患者中5名(83.3%)已死亡，表明感染这种高致病性病原体的风险很高。

3.4. ST11型肺炎克雷伯菌和ST167型大肠埃希菌的克隆传播

将42株CPE分离株的所有基因组组装结果存放在GenBank中，注册的登录号为PRJNA393804。表1总结了WGS数据的结果。通过对每个物种和序列类型(ST)进行比较基因组分析，确定了8个CPE分支(图2)，这与物种鉴定一致。值得注意的是，在10家和4家哨点医院分别检测到产KPC-2的ST11型肺炎克雷伯菌菌株和产新德里金属β-内酰胺酶(NDM)-5的ST167型大肠埃希菌菌株。这些数据表明在本研究中，产KPC-2的ST11型肺炎克雷伯菌和产NDM-5的ST167型大肠埃希菌存在克隆传播现象。

3.5. ARG的特性

利用WGS数据，确定了一系列与多种抗菌药物相关的ARG：氨基糖苷类、β-内酰胺类、磷霉素、碳青霉烯类、喹诺酮类、磺胺类、甲氧苄啶和苯尼考(图2)。此外，42株携带碳青霉烯酶的菌株中有33株(78.6%)也含有预测的ESBL。有趣的是，在这些ESBL中，头孢噻肟水解β-内酰胺酶CTX-M-65是最主要的集群(47.6%, 20/42)，其次是CTX-M-14(23.8%, 10/42)。另有7株分离株

表1 基于组装数据的CPE组装统计和基因组覆盖率概况

Isolate ID	Contigs	N50 (bp)	Assembled bases (bp)	× Coverage	Accession No.
EN3287	56	153 355	4 797 988	385	NPGJ00000000
EN3600	139	132 334	5 391 491	234	NPGK00000000
E987	90	138 052	5 170 714	300	NPGF00000000
E4219	158	113 310	5 139 090	292	NPHP00000000
E834	138	100 008	5 095 123	257	NPHS00000000
E2619	182	119 182	5 158 320	222	NPHR00000000
E2239	146	136 971	5 024 459	314	NPHO00000000
E4903	107	136 972	4 982 100	285	NPHQ00000000
K1439	84	314 574	6 135 809	141	NPHU00000000
K3678	103	215 513	6 273 403	217	NPHT00000000
K3657	105	170 401	5 663 831	283	NPHN00000000
K2147	115	203 939	5 659 063	268	NPHH00000000
K604	65	340 693	5 669 428	242	NPHL00000000
K4803	108	164 600	5 829 038	228	NPHG00000000
K3175	99	192 313	5 643 629	189	NPHF00000000
K5012	86	160 075	5 478 142	288	NPHE00000000
K1433	90	203 939	5 505 326	262	NPHI00000000
K3893	96	185 914	5 628 838	274	NPHA00000000
K3871	98	185 914	5 632 206	293	NPHB00000000
K5014	95	157 792	5 483 445	274	NPHD00000000
K3862	104	203 938	5 553 192	362	NPHC00000000
K85	95	176 166	5 810 616	217	NPHM00000000
K666	96	144 277	5 451 010	262	NPHK00000000
K669	96	160 072	5 447 971	189	NPHJ00000000
K3902	98	171 014	5 618 419	362	NPGZ00000000
K2646	100	192 313	5 545 597	271	NPGX00000000
K950	79	203 695	5 675 827	307	NPGM00000000
K1177	107	192 313	5 733 347	359	NPGU00000000
K2080	104	203 896	5 585 536	139	NPGS00000000
K3194	94	192 313	5 636 447	184	NPGW00000000
K4280	99	192 313	5 726 611	270	NPGV00000000
K2701	89	203 896	5 581 788	219	NPGR00000000
K5065	63	291 843	5 822 605	273	NP GT00000000
K4311	115	222 925	5 529 081	263	NPGP00000000
K4307	83	203 939	5 525 783	246	NPGQ00000000
K4324	93	203 939	5 530 708	192	NPGN00000000
K4314	84	203 939	5 524 464	242	NPGO00000000
K2631	208	241 238	6 293 921	187	NPGY00000000
R3467	63	357 979	6 138 099	229	NPGL00000000
SE768	55	227 823	5 499 067	334	NPGI00000000
SE3605	57	288 863	5 412 855	298	NPGH00000000
SE4145	73	202 460	5 427 821	242	NPGG00000000

bp: base pair.

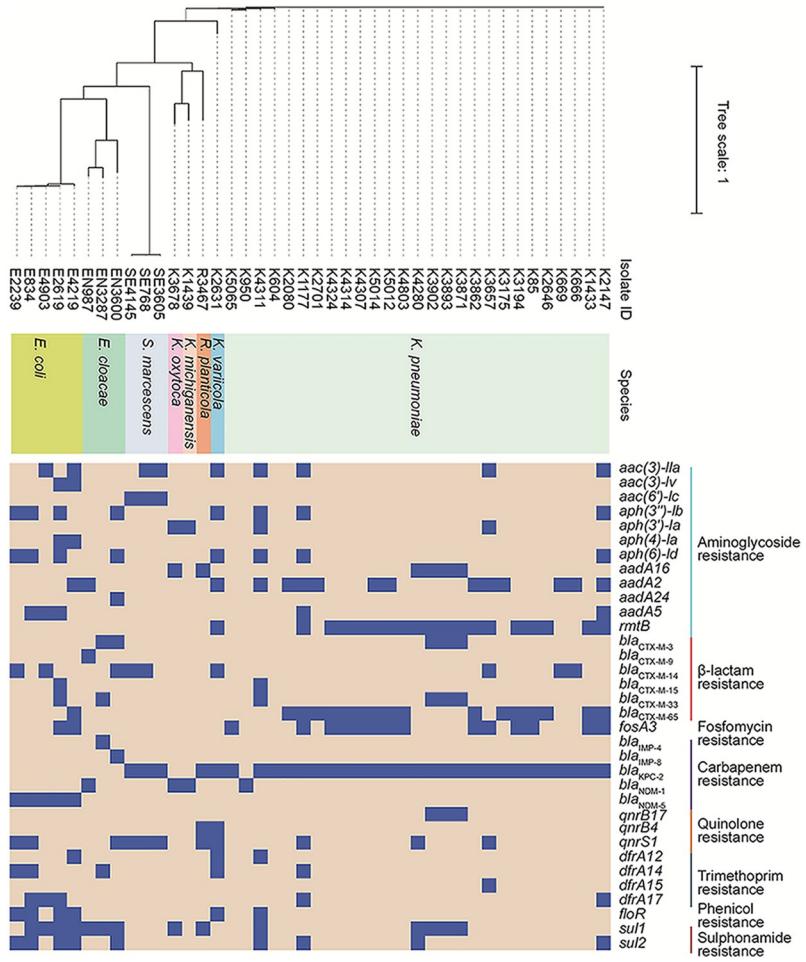


图2. 42株CPE分离株的全基因组序列比对以及通过全基因组测序鉴定的耐药基因。

同时具有两个 *bla_{CTX-M}* 等位基因。与预期的结果一致，在30株克雷伯菌分离物中发现了至少一种去巯基（SHV）酶。在这些菌株中，22株携带 *bla_{SHV-11}*，另有11株携带 *bla_{SHV-17}*。

3.6. 碳青霉烯酶编码基因的遗传环境

S1-PFGE、Southern杂交和复制子分型分析表明，所有碳青霉烯酶编码基因都是质粒介导的（见表2及附录A中的图S1）。含有 *bla_{KPC-2}* ($n = 31$) 的质粒在遗传上存在差异，可分为以下几类：大小为79~260 kb的IncFII质粒、大小约55 kb的IncR质粒和大小约38 kb的IncP-6质粒（见附录A中的图S1）。虽然 *bla_{KPC}* 主要与Tn3转座子相关，且有三个主要结构，但研究发现它们共享一个类似的保守结构，即 *ISKpn27-bla_{KPC-2}-ISKpn6-korC-hp-klcA*；这意味着该移动元件对 *bla_{KPC-2}* 基因在中国的广泛传播起到了关键作用[图3 (a)]。

此外，*bla_{IMP-4}* 和 *bla_{IMP-8}* 分别位于大小约55 kb的IncN和大小约73 kb的不可分型质粒上[见表2及附录A中的图S1 (e)]。生信分析显示，*bla_{IMP-4}* 由 pEN987-IMP 上 *bla_{IMP-4}-l*

trA-qacED1-sull 盒阵列中的I类整合子携带，该序列与肺炎克雷伯菌质粒 p19501-IMP (MF344565) 的序列相似 [图3 (b)]。相比之下，*bla_{IMP-8}* 被 pEN3600-IMP 上的 *bla_{IMP-8}-aac(6')-Ib-bla_{OXA-1}-catB3-arr-3-qacEdelta1-sull* 盒阵列中的I类整合子携带。有趣的是，这种结构与 *bla_{KPC-2}* 质粒 p112298-KPC 的序列具有高度相似性，尽管该质粒中不存在 *bla_{IMP-8}* [图3 (c)]。

携带大肠埃希菌 ($n = 5$) 和阴沟肠杆菌 ($n = 1$) 的 *bla_{NDM}* 的质粒均属于IncX3，大小约46 kb；然而，两株克雷伯菌分离株携带由大小约55 kb的IncFI质粒编码的 *bla_{NDM}* 基因和大小约220 kb的不可分型质粒[见表2和附录A中的图S1 (d)]。尽管在所有携带 *bla_{NDM}* 的质粒中都观察到由 *dsbC-trpF-ble_{MBL}-bla_{NDM}* 组成的片段，但有8个质粒表现出三种不同类型的 *bla_{NDM-1}* 基因背景[图3 (d) 、(e)]。另外，三个质粒 (pK950-NDM、pK3287-NDM 和 E4219-NDM) 缺少插入序列 *Aba125* (IS*Aba125*)；除了含 *bla_{NDM}* 的区域外，pK3287-NDM 与其他质粒的相似性较低。

表2 从BSI中鉴定的42个碳青霉烯酶编码质粒的特征

Replicon type	No. of plasmids	Approximate size (kb)	Species	Carbapenemase genes	ST(s) ^a carrying plasmids
IncN	1	55	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{IMP-4}	ST97
Non-typeable	1	73	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{IMP-8}	ST25
IncFII	1	260	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11
IncFII	6	170	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11
IncFII	1	170	<i>K. variicola</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND
IncFII	8	146	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11
IncFII	1	125	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11
IncFII	5	106	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11/ST268
IncFII	1	106	<i>R. ornithinolytica</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND
IncFII	2	106	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND
IncFII	2	95	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11/ST23
IncFII	2	79	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11/ST15
IncR	1	55	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ND
IncP-6	1	38	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	ST11
IncX3	1	46	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	ST600
IncFI	1	55	<i>K. michiganensis</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	ND
Non-typeable	1	220	<i>K. oxytoca</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	ND
IncFI	1	55	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM-1}	ST23
IncX3	5	46	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{NDM-5}	ST167/new ST

ND: not determined; kb: kilobase.

^a STs were determined for *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *E. cloacae* complex isolates.

3.7. ST11型肺炎克雷伯菌菌株的遗传多样性

鉴于肺炎克雷伯菌是42株碳青霉烯酶阳性菌株中最主要的病原菌，进一步分析了肺炎克雷伯菌菌株的系统发育。在27个肺炎克雷伯菌基因组中共鉴定出21 711个核心基因组SNP[图4(a)]。然后，基于RAxML对核心基因最大似然树的分析，将这些基因组划分为4个不同的系统发育分支。此外，SNP分析确定了两名患者携带的三对密切相关的菌株(K4314和K4324、K666和K559，以及K3871和K3902)，这表明这些菌株可能在医院传播。荚膜多糖(cps)位点分析表明，27株肺炎克雷伯菌菌株含有6种不同的wzi等位基因[图4(b)]。根据BIGSdb-Kp数据库，这些wzi等位基因对应不同的K类型：KL47(n=16)、KL64(n=6)、K1(n=2)、K20(n=1)、K19(n=1)和KL13(n=1)。有趣的是，在ST11分离株中检测到5种K型(n=23)。对ST11型肺炎克雷伯菌克隆的分析也表明，成对SNP距离的中位数为15(范围：0~42)[图4(b)]。这些数据表明ST11谱系之间的遗传多样性。

3.8. 肺炎克雷伯菌毒力因子的分布

在分离的肺炎克雷伯菌中共检测到76种已知的毒力因子(图5)。在这些菌株中观察到编码mrk基因簇和ybt基因的高流行率。27株肺炎克雷伯菌均编码mrk基因，

26株携带ybt基因。此外，分别在7株、2株、3株、3株、2株、2株、2株和2株分离株中检测到气杆菌素、尿囊素酶、大肠埃希菌素、铁摄取操纵子、小菌素、*KPI_1364*和*KPI_1371*以及salmochelin相关基因。令人惊讶的是，除了ybbW和mceJ基因，分离株K950拥有最多的毒力基因，编码了74个毒力因子。

3.9. 携带rmpA/rmpA2基因的质粒分析

此外，还分别在3株和6株菌株中鉴定了黏液表型rmpA和rmpA2基因的调节因子(见附录A中的图S2)。S1-PFGE和Southern杂交显示rmpA由大小约200 kb的IncHIB和约260 kb的IncHIB质粒所携带[见附录A中的图S2(a)]。与rmpA相比，rmpA2编码质粒在结构上更不相同，因为rmpA2基因位于大小约370 kb、260 kb、218 kb、200 kb和150 kb的IncHIB质粒上[见附录A中的图S2(b)]。值得注意的是，rmpA和rmpA2在分离株K950、K3175和K4803的质粒上共存(见表3和附录A中的图S2)。通过序列分析表明，与K4803不同，K950和K3175共享rmpA基因的保守遗传背景[见附录A中的图S2(c)]。进一步分析发现，在K950和K3175中，染色体编码的salmochelin相关基因iroBCDN在K4803中缺失(图5)。生信分析还发现rmpA2基因上下游的核心结构总体相似[见附录A中的图S2(d)]。这些数据表明，携带

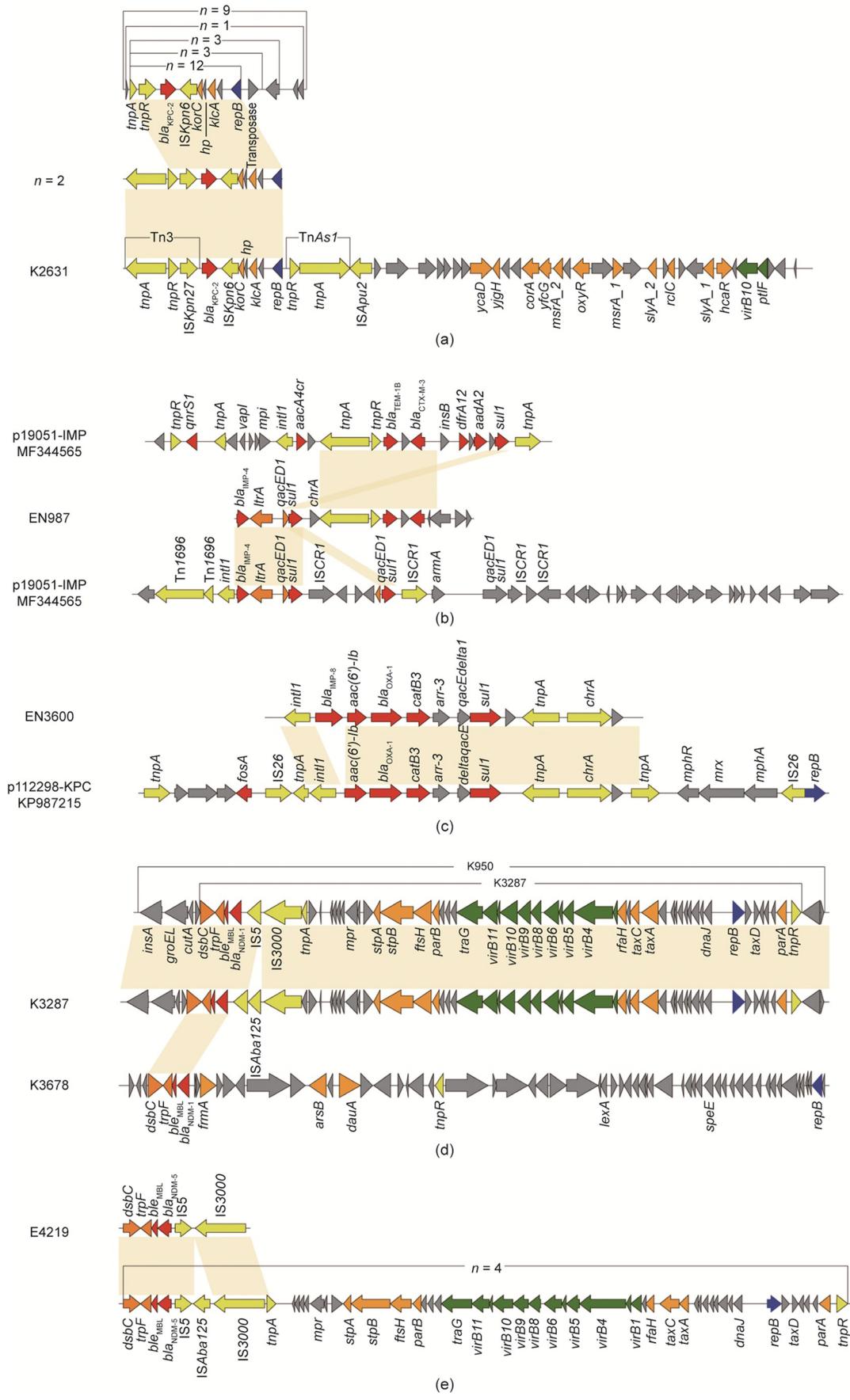


图3. 42株CPE菌株携带的碳青霉烯酶编码基因的遗传环境。

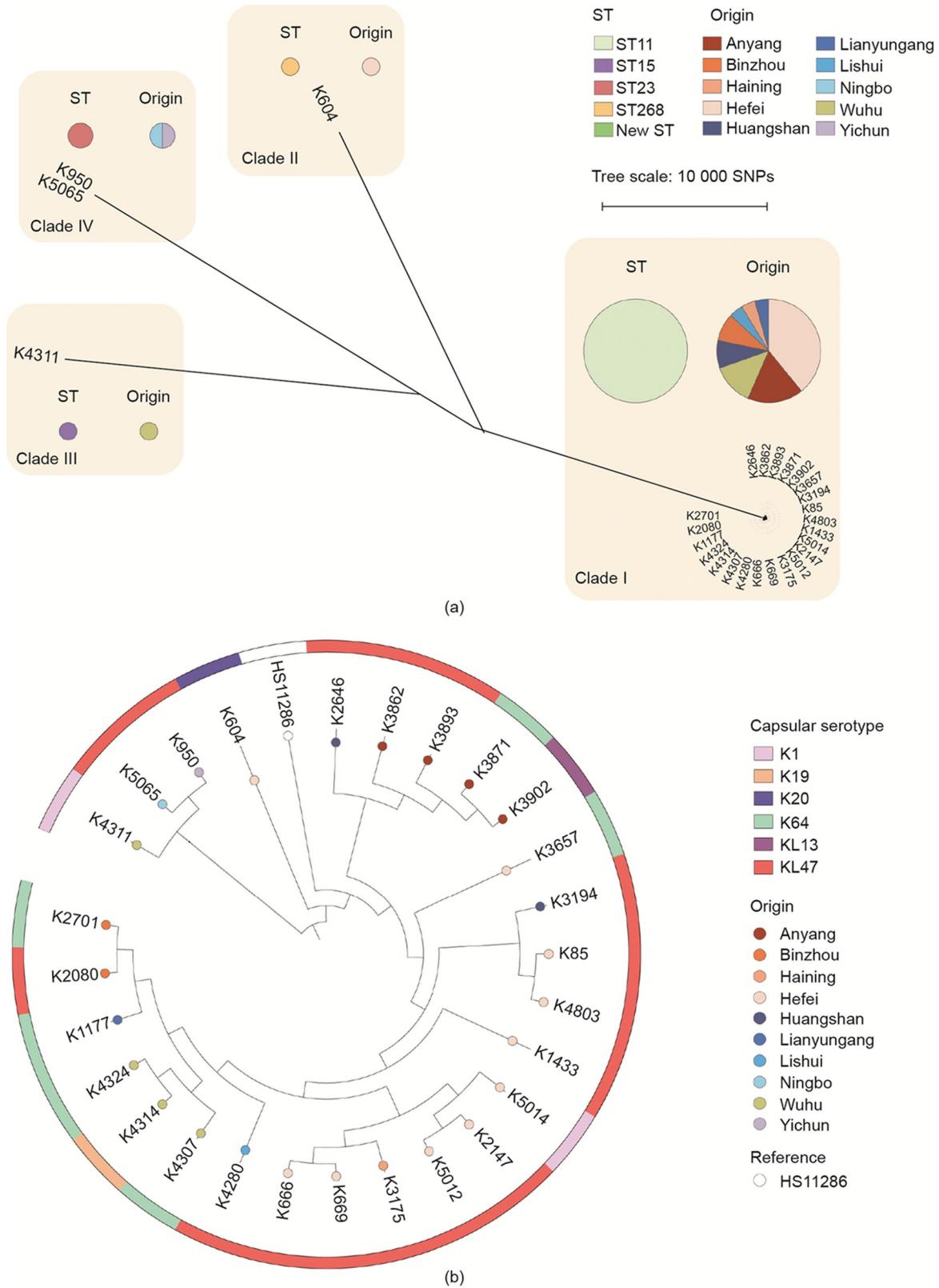


图4. 27株产KPC-2肺炎克雷伯菌的比较基因组学分析。

*rmpA2*的质粒在遗传环境上具有多样性，尽管这些质粒在*rmpA2*周围具有相似的结构，提示这种结构在*rmpA2*基因的传递中起着关键作用。

4. 讨论

在过去10年中，中国见证了CRE在一些地区的出现



图5. 肺炎克雷伯菌毒力相关基因的分布情况。

表3 编码rmpA/rmpA2基因的质粒概况

Plasmid	Status	Inc type	rmpA/rmpA2 gene type	Plasmid size (kb)
pK85-rmpA2	Contig	IncHII1B	rmpA2	~218
pK604-rmpA2	Contig	IncHII1B	rmpA2	~370
pK950-rmpA	Contig	IncHII1B	rmpA/rmpA2	~260
pK3175-rmpA	Contig	IncHII1B	rmpA/rmpA2	~200
pK4803-rmpA	Contig	IncHII1B	rmpA/rmpA2	~200
pK5065-rmpA2	Contig	IncHII1B	rmpA2	~150

和快速增长[13,15]。鉴于CRE感染的负荷日益增加，迫切需要加强了解中国CRE菌株基因组特征，这对于监测碳青霉烯类耐药性以及制定控制和管理CRE感染的相关政策至关重要。此外，由CRE引起的BSI通常与治疗失败率增加、死亡率高和住院费用高相关，并逐渐成为真正的临床挑战[30–31]。以往国内对CPE引起的BSI的调查主要基于回顾性研究[14]和小样本量病例的流行病学结果[32–33]。迄今为止，来自菌血症患者的CPE菌株的基因

组特征尚不清楚。本研究对中国多中心BSI监测中的CPE菌株进行了首次高分辨率基因组分析。

研究描述了CPE在中国BSI中广泛存在，占肠杆菌科分离株的1.6%，在本研究筛查的54%医院中检出了CPE。本研究和前人研究的结果表明CPE已在中国广泛存在。正如研究所观察到的，BSI分离株中CPE的传播，引起了医护人员对革兰阴性脓毒症患者治疗的关注，并提示有必要降低选择性压力和控制耐药菌的传播[34]。

本研究发现 bla_{KPC-2} 和 bla_{NDM-5} 是介导CPE碳青霉烯耐药表型的主要碳青霉烯酶基因。中国大多数CRE感染是由携带 bla_{KPC-2} 碳青霉烯酶的ST11型肺炎克雷伯菌引起的，该碳青霉烯酶与国际流行性克隆ST258密切相关[35]。在之前的一次全国CRE调查中，发现产KPC-2的肺炎克雷伯菌是主要的CRE分离株[13]，这与本研究发现的CPE分离株中80%的产KPC-2率是一致的。此外， bla_{KPC-2} 的快速传播主要是由ST11型肺炎克雷伯菌菌株的克隆传播引起的。先前的调查描述了中国ST11-KL47和ST11-KL64的高患病率和死亡率[36–37]。本研究检测到的ST11被分成5个分支，其中ST11-KL47是主要的亚克隆。另外，还注意到在ST11-KL64菌株上 $rmpA$ 和 $rmpA2$ 共存，这与最近的观察结果[8,37]一致。

相比之下，先前的一项全国调查显示，由携带碳青霉烯酶的大肠埃希菌引起的CRE感染与全球分布的ST131谱系有关，该谱系占该研究分离株的33.0%，因此在中国占主导地位[13]。然而近年来有关在中国临床感染中检测到产NDM-5的大肠埃希菌ST167谱系的报道越来越多[13,38–39]。ST167型是本研究收集的最常见的大肠埃希菌类型，这一观察结果符合这一趋势。除了ST167型大肠埃希菌在中国的广泛传播外，一些欧洲国家也报道了携带 bla_{NDM} 的ST167型大肠埃希菌的出现[40–43]，具有广泛流行的潜力。需要采取适当措施有效控制产KPC-2的ST11型肺炎克雷伯菌和产NDM-5的ST167型大肠埃希菌的传播，以防止其在中国进一步传播及造成的严重公共卫生后果。

在肠杆菌中检测到的大多数 $bla_{KPC-2}/bla_{NDM}/bla_{IMP}$ 基因位于可传播的质粒上[13]。本研究结果与以往研究一致，采集的碳青霉烯酶携带的质粒的特征表明，临床CPE菌株中所有碳青霉烯酶编码基因都是质粒介导的。本研究在4种细菌和33个不同的ST中发现了由11种质粒复制子类型携带的KPC基因，表明质粒传播和质粒之间的迁移在中国KPC酶的传播中起重要作用。即使在ST11型肺炎克雷伯菌中，也发现了至少8种不同的KPC质粒复制子类型，表明该克隆成功成为KPC质粒的宿主。与 bla_{KPC} 基因相比， bla_{NDM} 基因(bla_{NDM-1} 和 bla_{NDM-5})经常被报道位于

多个肠道细菌物种携带的IncX3质粒上，这意味着IncX3质粒可能成为 bla_{NDM} 在人类菌株和种间有效播散的载体[13,44]。本文的观察结果进一步说明了IncX质粒在碳青霉烯耐药性传播中的临床意义。

值得注意的是，本研究中的肺炎克雷伯菌携带铁载体耶尔森菌素的概率较高，而铁载体耶尔森菌素是最常见的肺炎克雷伯菌高毒力决定簇，与引起侵袭性人类感染的肠杆菌科菌株的毒力密切相关[45–46]。此外，与非侵入性或携带分离株相比， $rmpA$ 和 $rmpA2$ 基因与侵入性人类感染显著相关，这一点已得到充分证明[28]。因此，这些基因在BSI分离的产KPC的ST11型肺炎克雷伯菌中的情况令人担忧，因为它们同时具有多重耐药性、高传播性和高毒性[47]。此外，在同一分离菌株中检测到了毒力基因的组合，如气杆菌素、尿囊素酶、大肠埃希菌素、铁摄取操纵子、小菌素、*salmochelin*、 $rmpA2$ 和耶尔森氏菌素。这一发现可能解释了本研究中与肺炎克雷伯菌感染相关的高死亡率，也说明这些分离株在BSI中可能具有高致病性(可能还需要通过进一步的实验研究来证实)。

本研究存在几个局限性。首先，尽管有许多医院参与了这项研究，但本研究仅获得和调查了有限数量的CPE菌株。因此，这些数据可能无法真正代表整个中国CPE的患病率和特征。其次，需谨慎解释有关携带碳青霉烯酶质粒的研究；鉴于本研究只纳入了引起BSI的菌株，因此需要进行进一步研究，完善这项工作的相关成果。

5. 结论

综上所述，本研究报道了中国BSI患者中产ESBL和CPE分离株的广泛传播。这项工作表明ST11型肺炎克雷伯菌和ST167型大肠埃希菌在中国已成为严重的临床问题。研究还揭示了中国侵袭性CPE感染的基因组图谱，表明国家级BSI监测的重要性。质粒分析表明，质粒在碳青霉烯酶编码基因的传播过程中发挥了重要作用。在中国应持续密切监测BSI中CPE的流行情况。此外，还特别需要对具有潜在高致病性的流行性ST11型肺炎克雷伯菌进行大规模、详细的微生物学和基因组研究，进一步了解 bla_{KPC-2} 基因和毒力基因的传播，完善制定国家控制CPE感染的有效策略。

致谢

感谢国家重点研发计划课题(2017YFC1200203和

2016YFD050105)、传染病重大专项(2018ZX10733402-004和2018ZX10712001-005)、国家自然科学基金项目(81741098和81711530049)、浙江省重点研发计划(2015C0032)以及浙江省自然科学基金项目(LY17H190003)的资助。

Compliance with ethics guidelines

Beiwen Zheng, Hao Xu, Lihua Guo, Xiao Yu, Jinru Ji, Chaoqun Ying, Yunbo Chen, Ping Shen, Huiming Han, Chen Huang, Shuntian Zhang, Tao Lv, and Yonghong Xiao declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.10.015>.

References

- [1] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009;9(4):228–36.
- [2] Grundmann H, Glasner C, Albiger B, Aanensen DM, Tomlinson CT, Andrasevic' AT, et al. Occurrence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in the European survey of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE): a prospective, multinational study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(2):153–63.
- [3] WHO. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics [Internet]. Geneva: WHO; 2017 [cited 2020 Nov 25]. Available from: https://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf?ua=1.
- [4] Cerqueira GC, Earl AM, Ernst CM, Grad YH, Dekker JP, Feldgarden M, et al. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017;114(5):1135–40.
- [5] Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psichogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012;25(4):682–707.
- [6] Rojas LJ, Salim M, Cober E, Richter SS, Perez F, Salata RA, et al. Colistin resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: laboratory detection and impact on mortality. *Clin Infect Dis* 2017;64(6):711–8.
- [7] Cheng VCC, Chen JHK, So SYC, Wong SCY, Chau PH, Wong LMW, et al. A novel risk factor associated with colonization by carbapenemase-producing enterobacteriaceae: use of proton pump inhibitors in addition to antimicrobial treatment. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2016;37(12):1418–25.
- [8] Zheng B, Xu H, Lv T, Guo L, Xiao Y, Huang C, et al. Stool samples of acute diarrhea inpatients as a reservoir of ST11 hypervirulent KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. *mSystems* 2020;5(3):e00498–20.
- [9] Laupland KB, Church DL. Population-based epidemiology and microbiology of community-onset bloodstream infections. *Clin Microbiol Rev* 2014;27(4):647–64.
- [10] Satlin MJ, Chavda KD, Baker TM, Chen L, Shashkina E, Soave R, et al. Colonization with levofloxacin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk of bacteremia in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2018;67(11):11.
- [11] CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013 [Internet]. Atlanta: CDC; 2013 [cited 2020 Nov 25]. Available from: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>.
- [12] White AR. The British society for antimicrobial chemotherapy resistance surveillance project: a successful collaborative model. *J Antimicrob Chemother* 2008;62(Suppl 2):ii3–14.
- [13] Zhang R, Liu L, Zhou H, Chan EW, Li J, Fang Y, et al. Nationwide surveillance of clinical carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) strains in China. *EBioMedicine* 2017;19:98–106.
- [14] Xu A, Zheng B, Xu YC, Huang ZG, Zhong NS, Zhuo C. National epidemiology of carbapenem-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative bacteria isolated from blood samples in China in 2013. *Clin Microbiol Infect* 2016;22(Suppl 1):S1–8.
- [15] Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, et al. Epidemiology of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections: report from the China CRE network. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(2):e01882–17.
- [16] Quan J, Zhao D, Liu L, Chen Y, Zhou J, Jiang Y, et al. High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China. *J Antimicrob Chemother* 2017;72(1):273–80.
- [17] Zheng B, Chen Y, Violetta L, Xiao Y, Li L. Bloodstream infections caused by Enterobacteriaceae in China. *Lancet Infect Dis* 2019;19(8):810–1.
- [18] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 27th ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
- [19] Zheng B, Zhang J, Ji J, Fang Y, Shen P, Ying C, et al. Emergence of *Raoultella ornithinolytica* coproducing IMP-4 and KPC-2 carbapenemases in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59(11):7086–9.
- [20] Zerbino DR, Birney E. Velvet: algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graphs. *Genome Res* 2008;18(5):821–9.
- [21] Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O, et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *J Antimicrob Chemother* 2012;67(11):2640–4.
- [22] Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Res* 2004;14(7):1394–403.
- [23] Zheng B, Dong H, Xu H, Lv J, Zhang J, Jiang X, et al. Coexistence of MCR-1 and NDM-1 in clinical *Escherichia coli* isolates. *Clin Infect Dis* 2016;63(10):1393–5.
- [24] Antipov D, Hartwick N, Shen M, Raiko M, Lapidus A, Pevzner PA. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. *Bioinformatics* 2016;32(22):3380–7.
- [25] Delcher AL, Salzberg SL, Phillip AM. Using MUMmer to identify similar regions in large sequence sets. *Curr Protoc Bioinformatics* 2003; Chapter 10: Unit 10.3.
- [26] Galata V, Fehlmann T, Backes C, Keller A. PLSDB: a resource of complete bacterial plasmids. *Nucleic Acids Res* 2019;47(D1):D195–202.
- [27] Carattoli A, Zankari E, García-Fernández A, Voldby Larsen M, Lund O, Villa L, et al. *In silico* detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58(7):3895–903.
- [28] Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D, et al. Genomic analysis of diversity, structurepopulation, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. *Proc Natl Acad Sci USA* 2015;112(27):E3574–81.
- [29] Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics* 2014;30(9):1312–3.
- [30] Gutiérrez-Gutiérrez B, Salamanca E, de Cueto M, Hsueh PR, Viale P, Pañó-Pardo JR, et al. Effect of appropriate combination therapy on mortality of patients with bloodstream infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (INCREMENT): a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis* 2017;17(7):726–34.
- [31] Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis* 2012;55(7):943–50.
- [32] Liu L, Feng Y, Long H, McNally A, Zong Z. Sequence type 273 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{NDM-1} and *bla*_{IMP-4}. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62(6):AAC.00160–18.
- [33] Zhao F, Zhang J, Fu Y, Ruan Z, Xie X. Dissemination of extensively drug-resistant and KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from bloodstream infections. *J Infect Dev Countries* 2015;9(9):1016–21.
- [34] Myat TO, Hannaway RF, Zin KN, Htike WW, Win KK, Crump JA, et al. ESBL- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in patients with bacteremia, Yangon, Myanmar, 2014. *Emerg Infect Dis* 2017;23(5):857–9.
- [35] Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011;66

- (2):307–12.
- [36] Shen P, Berglund B, Chen Y, Zhou Y, Xiao T, Xiao Y, et al. Hypervirulence markers among non-ST11 strains of carbapenem- and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with bloodstream infections. *Front Microbiol* 2020;11:1199.
- [37] Zhou K, Xiao T, David S, Wang Q, Zhou Y, Guo L, et al. Novel subclone of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 with enhanced virulence and transmissibility, China. *Emerg Infect Dis* 2020;26(2):289–97.
- [38] Huang Y, Yu X, Xie M, Wang X, Liao K, Xue W, et al. Widespread dissemination of carbapenem-resistant *Escherichia coli* sequence type 167 strains harboring *bla*_{NDM-5} in clinical settings in China. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60(7):4364–8.
- [39] Zong Z, Fenn S, Connor C, Feng Y, McNally A. Complete genomic characterization of two *Escherichia coli* lineages responsible for a cluster of carbapenem-resistant infections in a Chinese hospital. *J Antimicrob Chemother* 2018;73(9):2340–6.
- [40] Cuzon G, Bonnin RA, Nordmann P. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. *PLoS One* 2013;8(4):e61322.
- [41] Grönthal T, Österblad M, Eklund M, Jalava J, Nykäsenoja S, Pekkanen K, et al. Sharing more than friendship-transmission of NDM-5 ST167 and CTX-M-9 ST69 *Escherichia coli* between dogs and humans in a family, Finland, 2015. *Euro Surveill* 2018;23(27):1700497.
- [42] Paskova V, Medvecky M, Skalova A, Chudejova K, Bitar I, Jakubu V, et al. Characterization of NDM-encoding plasmids from Enterobacteriaceae recovered from Czech hospitals. *Front Microbiol* 2018;9:1549.
- [43] Giuffrè M, Errico G, Accogli M, Monaco M, Villa L, Distasi MA, et al. Emergence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 167 clone in Italy. *Int J Antimicrob Agents* 2018;52(1):76–81.
- [44] Sun J, Yang RS, Zhang Q, Feng Y, Fang LX, Xia J, et al. Co-transfer of *bla*_{NDM-5} and *mcr-1* by an IncX3-X4 hybrid plasmid in *Escherichia coli*. *Nat Microbiol* 2016;1(12):16176.
- [45] Schubert S, Cuenca S, Fischer D, Heesemann J. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in Enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *J Infect Dis* 2000;182(4):1268–71.
- [46] Lam MMC, Wick RR, Wyres KL, Gorrie CL, Judd LM, Jenney AWJ, et al. Genetic diversity, mobilisation and spread of the yersiniabactin-encoding mobile element ICEKp in *Klebsiella pneumoniae* populations. *Microb Genom* 2018;4(9):e000196.
- [47] Gu D, Dong N, Zheng Z, Lin D, Huang M, Wang L, et al. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2018;18(1):37–46.