

DOI: 10. 12138/j. issn. 1671-9638. 20244493

· 论 著 ·

## 新生儿肠道 CRKP 定植和继发感染的影响因素

翟 誉, 李庆蓉, 李 江, 何 薇, 和平安, 吕 梅, 杨 旭

(昆明医科大学第二附属医院检验科, 云南 昆明 650032)

**[摘要]** **目的** 分析新生儿耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)肠道定植与定植后继发感染的影响因素, 为制定 CRKP 感染的防控策略提供依据。**方法** 选取 2021 年 1 月—2022 年 10 月入住某院新生儿病房的新生儿为研究对象, 入院后 48 h 内进行 CRKP 首次筛查, 此外在住院期间每周进行一次耐碳青霉烯类肠杆菌(CRE)肛拭子主动筛查, 并监测 CRKP 菌株感染情况。分析定植组、非定植组和感染组新生儿临床数据。对肠道定植菌及定植后继发感染新生儿临床标本中分离的非重复 CRKP 菌株进行碳青霉烯酶基因检测与多位点序列分型(MLST)和脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析。**结果** 共有 1 438 例新生儿进行了 CRE 主动筛查, 174 例新生儿 CRKP 阳性, CRKP 定植率为 12.1%。174 例定植新生儿中有 35 例继发感染, 发病率为 20.1%。新生儿 CRKP 肠道定植的独立危险因素为剖宫产( $OR = 2.050, 95\%CI: 1.200 \sim 3.504, P = 0.009$ )、使用头孢菌素类抗生素( $OR = 1.889, 95\%CI: 1.086 \sim 3.288, P = 0.024$ )、鼻胃管喂养( $OR = 2.317, 95\%CI: 1.155 \sim 4.647, P = 0.018$ ); 保护因素为母乳喂养( $OR = 0.506, 95\%CI: 0.284 \sim 0.901, P = 0.021$ )、口服益生菌( $OR = 0.307, 95\%CI: 0.147 \sim 0.643, P = 0.002$ )、灌肠( $OR = 0.334, 95\%CI: 0.171 \sim 0.656, P = 0.001$ )。新生儿 CRKP 肠道定植继发感染的独立危险因素为使用碳青霉烯类抗生素( $OR = 19.869, 95\%CI: 1.778 \sim 222.029, P = 0.015$ )和住院时间延长( $OR = 1.118, 95\%CI: 1.082 \sim 1.157, P < 0.001$ )。耐药基因结果显示 CRKP 菌株产碳青霉烯酶基因均为  $bla_{KPC-2}$ , 且同属于 ST11 型。同源性关系结果分析显示肠道 CRKP 定植与定植后继发感染菌株高度同源。**结论** 新生儿住院期间 CRKP 肠道定植可能会增加 CRKP 感染的风险。因此, 可通过重点关注新生儿肠道定植及定植后继发感染的危险与保护因素, 并采取相应的预防控制措施, 减少 CRKP 医院感染的发生和传播。

**[关键词]** 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 定植; 感染; 新生儿; 保护因素; 危险因素; 同源性

**[中图分类号]** R181.3<sup>+</sup>2

## Influencing factors for intestinal colonization and secondary infection of CRKP in neonates

ZHAI Yu, LI Qing-rong, LI Jiang, HE Wei, HE Ping-an, LYU Mei, YANG Xu (Department of Laboratory Medicine, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650032, China)

**[Abstract]** **Objective** To analyze the influencing factors for intestinal colonization and secondary infection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) in neonates, and provide a basis for formulating prevention and control strategies for CRKP infection. **Methods** Neonates who were admitted to the neonatal ward of a hospital from January 2021 to October 2022 were selected as the study subjects, and the first screening of CRKP was conducted within 48 hours after admission. In addition, active anal swab screening for carbapenem-resistant *Enterobacteriales* (CRE) was performed weekly during hospitalization, and the infection status of CRKP strains was mo-

[收稿日期] 2023-05-19

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82060669); 云南省科技厅基础研究专项面上项目(202101AT070256); 云南省教育厅科学研究基金项目(2023Y0641); 昆明医科大学第二附属医院院内科计划项目(2021yk002); 昆明医科大学 2023 年硕士研究生创新基金立项项目(2023S315)

[作者简介] 翟誉(1996-), 女(汉族), 河南省汝南县人, 研究生在读, 主要从事临床微生物检验及细菌耐药机制研究。

[通信作者] 杨旭 E-mail: yx8250696@163.com

nitored. Clinical data of neonates in the colonization group, non-colonization group, and infection group were analyzed. Intestinal colonized strains and the non-repetitive CRKP strains isolated from clinical specimens of neonates with secondary infection after colonization were performed carbapenemase gene detection, multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) analysis. **Results** A total of 1 438 neonates were actively screened for CRE, 174 were CRKP positive, CRKP colonization rate was 12.1%. Among 174 neonates, 35 were with secondary infection, with the incidence of 20.1%. The independent risk factors for neonatal CRKP intestinal colonization were cesarean section ( $OR = 2.050$ , 95% $CI$ : 1.200 - 3.504,  $P = 0.009$ ), use of cephalosporins ( $OR = 1.889$ , 95% $CI$ : 1.086 - 3.288,  $P = 0.024$ ), nasogastric tube feeding ( $OR = 2.317$ , 95% $CI$ : 1.155 - 4.647,  $P = 0.018$ ). Protective factors were breast-feeding ( $OR = 0.506$ , 95% $CI$ : 0.284 - 0.901,  $P = 0.021$ ), oral probiotics ( $OR = 0.307$ , 95% $CI$ : 0.147 - 0.643,  $P = 0.002$ ), and enema ( $OR = 0.334$ , 95% $CI$ : 0.171 - 0.656,  $P = 0.001$ ). Independent risk factors for secondary infection after intestinal colonization of neonatal CRKP were carbapenem antibiotic use ( $OR = 19.869$ , 95% $CI$ : 1.778 - 222.029,  $P = 0.015$ ) and prolonged hospital stay ( $OR = 1.118$ , 95% $CI$ : 1.082 - 1.157,  $P < 0.001$ ). The detection results of drug resistance genes showed that carbapenemase-producing genes of CRKP strains were all *bla*<sub>KPC-2</sub>, all belonged to type ST11. Homologous analysis showed that intestinal CRKP colonization was highly homologous with the secondary infection strains after colonization. **Conclusion** CRKP intestinal colonization during neonatal hospitalization may increase the risk of CRKP infection. Risk and protective factors of neonatal intestinal colonization and secondary infections after colonization should be paid attention, and corresponding preventive and control measures should be taken, so as to reduce the occurrence and transmission CRKP healthcare-associated infection.

[**Key words**] carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*; colonization; infection; neonate; protective factor; risk factor; homology

肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*, KP)是社区和医院中常见的一种病原菌。近年来随着临床对碳青霉烯类抗生素的过度使用,耐碳青霉烯类细菌的检出率不断增加。据中国细菌耐药监测网数据显示,我国新生儿 2019、2020、2021 年耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)的检出率分别为 14.5%、15%和 13.4%,远高于老年组(>65 岁)、成人组(14~65 岁)和儿童组(<14 岁)<sup>[1]</sup>。复旦大学附属儿童医院的一项研究<sup>[2]</sup>表明,新生儿 CRKP 感染发生率较高,是新生儿健康的一大威胁,严重危害公共卫生安全<sup>[3]</sup>。胃肠道定植是 CRKP 感染的潜在危险因素<sup>[4]</sup>,新生儿因肠道屏障功能和免疫功能不全而易于定植 CRKP,使 CRKP 肠道定植成为继发感染的潜在原因<sup>[5]</sup>。虽然已有新生儿 CRKP 定植及其分子流行病学的相关报道<sup>[6]</sup>,但对新生儿 CRKP 肠道定植及定植后继发感染的相关因素与同源性关系的研究较少,定植与定植后继发感染的相关因素尚不明确,且无新生儿 CRKP 肠道定植的保护因素的探究,因此,了解新生儿肠道定植及定植后继发感染的影响因素有利于医院感染控制措施的完善与实施。

本研究旨在通过收集某院新生儿科的临床病历

信息,分析新生儿 CRKP 肠道定植及定植后继发感染的危险及保护因素,并通过多位点序列分析(MLST)与脉冲场凝胶电泳(PFGE)的方法来探究新生儿肠道定植转为感染的 CRKP 菌株之间的同源性关系。研究定植及定植后继发感染的影响因素,控制危险因素,加强保护因素,降低新生儿 CRKP 肠道定植和定植后继发感染的发生率。

## 1 对象与方法

1.1 研究对象 选取 2021 年 1 月—2022 年 10 月昆明医科大学第二附属医院入住新生儿科的新生儿为研究对象。

### 1.2 研究方法

1.2.1 研究分组 新生儿入院后 48 h 内进行一次耐碳青霉烯类肠杆菌(CRE)主动筛查,并在住院期间每周进行一次 CRE 肛拭子主动筛查。纳入标准:CRKP 肠道定植组,粪便培养或肛周拭子 CRE 筛查阳性且鉴定为 CRKP;非 CRKP 肠道定植组,48 h 内两次粪便培养或肛周拭子 CRE 筛查阴性。CRKP 肠道定植后继发感染组:已发生 CRKP 肠道定植,明确有临床感染症状且标本中分离出 CRKP

菌株。排除标准,入院后 48 h 内未进行粪便/肛拭子主动筛查的新生儿和入院前有证据表明存在 CRKP 定植或已发生临床感染症状的新生儿。

在定植相关因素分组中将发生 CRKP 肠道定植的新生儿作为定植组,共 174 例,采用随机抽样的分层抽样法对非定植新生儿抽样,保证定植组和非定植组在相同时间段入院,最终筛选出 174 例无 CRKP 肠道定植的新生儿作为非定植组。定植组与非定植组两组的病例基础状态一致。同时在分析定植继发感染的相关因素中,将研究对象分为感染组与非感染组,感染组为 35 例已确诊肠道 CRKP 定植且在住院期间发生 CRKP 临床感染的新生儿;非感染组为 139 例已确诊肠道 CRKP 定植但在随后住院期间未发生 CRKP 临床感染的新生儿。

**1.2.2 诊断标准** CRKP 定植定义为新生儿仅有直肠拭子分离培养阳性,但未表现出临床体征和/或症状。因 CRKP 菌株分离自新生儿肠道,因此定植来源为内源性。根据 2001 年卫生部颁发的《医院感染诊断标准(试行)》<sup>[7]</sup>。CRKP 感染定义为新生儿至少有一份临床分离阳性标本,并且表现出临床感染阳性体征和/或症状和有相应的其他实验室阳性指标。本研究将整个住院时间作为 CRKP 发生定植到感染的随访时间。且将确定为 CRKP 肠道定植 48 h 后出现的临床感染定义为筛查标本和临床标本之间的“后续”感染。

**1.2.3 资料收集及菌株来源** 新生儿临床资料均从电子病历系统查阅获得。定植相关因素纳入时间为发生定植前 3 天,定植继发感染相关因素的纳入时间为定植后到发生继发感染症状前。相关因素内容包括:(1)新生儿因素。性别、低体重(<2 500 g)、极低体重(<1 500 g)、早产儿、试管婴儿、母乳喂养、羊水污染、Apgar 评分≤7 分、腹泻、低蛋白血症[清蛋白(Alb)<35 g/L]、中性粒细胞减少症(外周血中性粒细胞绝对值<1.5×10<sup>9</sup>/L)、神经系统疾病、消化道出血(有相应的临床症状、符合消化道出血的实验室检查、影像学检查结果)、鼻胃管喂养、气管插管、机械通气、灌肠、口服益生菌,以及使用糖皮质激素、氟康唑、碳青霉烯类抗生素、氨基糖苷类抗生素、头孢菌素类抗生素、青霉素类抗生素。(2)母亲因素。多胎妊娠、胎膜早剥、剖宫产、高龄(>35 岁)、妊娠高血压、妊娠糖尿病。(3)环境因素。入住新生儿重症监护病房(NICU)、总住院时间。同时对定

植后继发感染的 35 例新生儿于 2022 年 1—10 月采集粪便/肛拭子和血/痰标本进行培养,从中培养、分离非重复 CRKP 菌株。将这些非重复 CRKP 菌株纯化、冷冻干燥,保存于 -80℃ 冰箱备用。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 主要仪器与试剂** 仪器:VITEK 2 Compact 全自动微生物分析仪(法国梅里埃公司);基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)(德国布鲁克公司);Thermo Series II Water Jacket CO<sub>2</sub> 温箱;法国生物梅里埃 DENSICHEK 电子比浊仪;郎基聚合酶链式反应(PCR)基因扩增仪 A300(杭州郎基科学仪器有限公司);君意 JY300C 通用型电泳仪(北京君意仪器公司);凝胶成像分析系统-JY04S-3C(北京君意仪器公司);高速冷冻离心机(大龙兴创实验仪器有限公司);恒温金属浴(杭州奥盛);海尔 -80℃ 冰箱。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922。试剂:VITEK 2 GN 鉴定卡和 VITEK 2 AST-GN334 药敏卡(法国生物梅里埃公司);麦康凯培养基、Mueller-Hinton 培养基(郑州安图生物工程股份有限公司);PCR 扩增试剂(1×TSE101 金牌 mix、ddH<sub>2</sub>O、引物)、5 000 bp DNA 分子量标准(DNA Marker)、含蛋白酶 K 的细胞裂解液、EB 染料、琼脂糖、LB 琼脂平板(北京擎科生物科技公司)。

**1.3.2 菌株鉴定** 使用 VITEK 2 全自动微生物分析仪对所有分离菌株进行鉴定。同时采用 MALDI-TOF MS 对平板上的单个菌落进行复核,确保试验菌株为 CRKP 菌株。

**1.3.3 DNA 提取** 采用煮沸法提取菌株 DNA。挑取 3 个纯菌落置于含有 500 μL 含有灭菌双蒸水的 EP 管中,充分混匀制成菌悬液后于金属浴中加热 10 min,使用高速离心机 13 000 r/min 离心 5 min,离心后所得上清液即为 DNA 模板。

**1.3.4 碳青霉烯酶基因检测** 参照 GeneBank 中目标基因的标准序列并查阅相关文献<sup>[8]</sup>选取引物,采用聚合酶链式反应(PCR)扩增 35 例新生儿分离的 CRKP 菌株 DNA 模板中的碳青霉烯酶耐药基因(*bla*<sub>KPC-2</sub>、*bla*<sub>NDM-1</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>)。将得到的扩增产物送至北京擎科生物科技公司进行测序,测序结果在 NCBI BLAST 网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对。引物序列见表 1。

**表 1** CRKP 菌株 PCR 扩增耐药基因引物序列及产物大小  
**Table 1** Primer sequences and produce size of PCR amplification for drug-resistant genes

引物名称	序列(5'-3')	片段长度(bp)
KPC-2	F:GTTTGTGATTGGCTAAAGG R:TGTGCTTGTTCATCCTTGTTA	203
NDM-1	F:CAGCACACTTCATCTCTC R:CCGCAACCATCCCCTCTT	292
OXA-48	F:GCGTGTATTAGCCTTATCGG R:TTTTCTGTTGAGCACTTC	783
IMP	F:GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC R:CCAAACCACTACGTTATC	587

1.3.5 MLST 检测 参照 MLST 网站([https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers\\_used.html](https://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/primers_used.html))提供的引物序列,扩增 KP 的 7 个管家基因(*gapA*、*infB*、*mdh*、*pgi*、*phoE*、*rpoB*、*tonB*),将扩增产物送至北京擎科生物科技公司测序。

1.3.6 PFGE 检测 为更详细地分析 CRKP 菌株之间的同源性,进行 PFGE 检测。首先将标本接种于 LB 琼脂平板,37℃ 过夜,用 bioMérieux DENSI-MAT 比浊仪调整细菌悬液浓度,使浊度为 3.8~4.2。加入 1% Seakem Gold 胶,混匀制备胶块。使用含蛋白酶 K 的细胞裂解液(CLB)消化 2 h。纯水清洗胶块 2 次;TE(10 mmol/L Tris;1 mmol/L EDTA,pH 值 8.0)清洗胶块 4 次。使用 XbaI 内切酶进行酶切,在 37℃ 孵育 4 h。在 CHEF-DRIII (Bio-Rad Laboratories 公司)电泳仪中进行 PFGE。电泳后将胶放入含 1 μg/mL 溴化乙啶(EB)染色 25~30 min,置纯水中脱色至少 90 min,每 30 min 换一次纯水。在读胶仪中成像。

将获得的 PFGE 图像录入 BioNumerics (Version 8.0, Applied Maths, Belgium)软件包进行处理,经统一的分子质量标准,分子量标准用沙门菌 H9812 经过 XbaI 酶切后的片段标定条带位置,识别图像条带,必要时进行手工校正,<20.5 Kbp 的条带忽略不计。每两个图像之间的相似性系数用 Dice 系数(Dice coefficient)表示,根据每两个图像之间的相似性系数,用非加权配对算术平均法(unweighted pair-group method using arithmetic averages, UPGMA)进行聚类,构建聚类树。

1.4 统计学方法 应用 SPSS 26.0 统计软件进行

录入与分析。对于符合正态分布的计量资料采用 *t* 检验,对于非正态分布的计量资料采用非参数检验(Mann-Whitney 秩和检验),总住院时间以中位数(四分位数间距)[ $M(P_{25}, P_{75})$ ]表示;计数资料采用卡方检验或 Fisher 确切概率法,以例或百分比(%)表示。影响因素分析时,先对各种可能因素进行单因素分析,再将单因素分析中  $P \leq 0.05$  的因素纳入多因素分析,多因素分析采用二元 logistic 回归模型。 $P \leq 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 新生儿 CRKP 肠道定植的影响因素 共有 174 例定植组与 174 例非定植组新生儿进行 CRKP 肠道定植相关因素的分析。2021 年 1 月—2022 年 10 月该院新生儿肠道 CRKP 总定植率为 12.1%(174/1438)。单因素分析结果表明,低体重(<2500 g)、早产儿、多胎、Apgar 评分  $\leq 7$  分、剖宫产、母乳喂养、入住 NICU、鼻胃管喂养、机械通气、气管插管、肠外营养、灌肠、低蛋白血症、消化道出血、口服益生菌、总住院时间长、使用糖皮质激素,以及使用碳青霉烯类、氨基糖苷类、头孢菌素类、青霉素类抗生素和氟康唑在定植组和非定植组间比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 2。

将单因素分析中有统计学意义的变量进行二元 logistic 回归分析,剖宫产、使用头孢菌素类抗生素、鼻胃管喂养是新生儿发生 CRKP 定植的独立危险因素(均  $OR > 1, P < 0.05$ )。母乳喂养、口服益生菌、灌肠是保护因素(均  $OR < 1, P < 0.05$ )。见表 3。

2.2 新生儿 CRKP 肠道定植后继发感染的影响因素 2021 年 1 月—2022 年 10 月,该院新生儿科 CRKP 定植后继发感染的新生儿共 35 例,占新生儿科所有 CRKP 肠道定植新生儿的 20.1%(35/174)。感染组 35 例新生儿与非感染组 139 例新生儿进行 CRKP 肠道定植后继发感染相关因素的分析。CRKP 肠道定植后继发感染危险因素的单因素分析结果显示:极低体重(<1500 g)、早产儿、母乳喂养、入住 NICU、低蛋白血症、神经系统疾病、消化道出血、鼻胃管喂养、气管插管、机械通气、灌肠、总住院时间长、使用糖皮质激素,以及使用碳青霉烯类、氨基糖苷类抗生素、氟康唑在感染组和非感染组间

表 2 新生儿 CRKP 定植影响因素的单因素分析[例(%)]

Table 2 Univariate analysis on influencing factors for CRKP colonization in neonates (No. of cases [%])

因素	定植组 (n = 174)	非定植组 (n = 174)	$\chi^2/U$	P	因素	定植组 (n = 174)	非定植组 (n = 174)	$\chi^2/U$	P
性别(男)	106(60.9)	88(50.6)	3.774	0.052	中性粒细胞减少症	5(2.9)	0(0)	5.073	0.061
低体重(<2 500 g)	80(46.0)	30(17.2)	33.231	<0.001	消化道出血	22(12.6)	2(1.1)	17.901	<0.001
多胎	37(21.3)	19(10.9)	6.895	0.009	腹泻	10(5.7)	8(4.6)	0.234	0.628
早产儿	91(52.3)	37(21.3)	36.036	<0.001	鼻胃管喂养	91(52.3)	26(14.9)	54.401	<0.001
试管婴儿	14(8.0)	9(5.2)	1.164	0.281	机械通气	60(34.5)	8(4.6)	49.422	<0.001
胎膜早破(>18 h)	25(14.4)	17(9.8)	1.733	0.188	气管插管	25(14.4)	2(1.1)	21.241	<0.001
胎盘早剥	5(2.9)	0(0)	5.073	0.061	肠外营养	100(57.5)	51(29.3)	28.088	<0.001
羊水污染	21(12.1)	19(10.9)	0.113	0.737	灌肠	66(37.9)	48(27.6)	4.227	0.040
剖宫产	98(56.3)	56(32.2)	20.547	<0.001	口服益生菌	25(14.4)	50(28.7)	10.623	0.001
Apgar 评分≤7 分	33(19.0)	9(5.2)	15.597	<0.001	总住院时间 [M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	8(5.17)	5(3.6)	7.332	0.001
入住 NICU	52(29.9)	8(4.6)	38.989	<0.001	使用糖皮质激素	16(9.2)	0(0)	16.771	<0.001
母乳喂养	37(21.3)	97(55.7)	43.688	<0.001	使用碳青霉烯类抗生素	50(28.7)	6(3.4)	41.202	<0.001
产妇高龄(>35 岁)	20(11.5)	26(14.9)	0.902	0.342	使用氨基糖苷类抗生素	16(9.2)	0(0)	16.771	<0.001
妊娠高血压	19(10.9)	17(9.8)	0.124	0.725	使用头孢菌素类抗生素	94(54.0)	47(27.0)	26.338	<0.001
妊娠糖尿病	25(14.4)	17(9.8)	1.733	0.188	使用青霉素类抗生素	78(44.8)	55(31.6)	6.438	0.011
低蛋白血症	61(35.1)	15(8.6)	35.622	<0.001	使用氟康唑	39(22.4)	4(2.3)	32.505	<0.001

表 3 新生儿 CRKP 定植影响因素的 logistic 回归分析

Table 3 Logistic regression analysis on influencing factors for CRKP colonization in neonates

因素	$\beta$	$S_b$	Wald $\chi^2$	OR(95%CI)	P
剖宫产	0.718	0.273	6.894	2.050(1.200~3.504)	0.009
鼻胃管喂养	0.840	0.355	5.595	2.317(1.155~4.647)	0.018
使用头孢菌素类抗生素	0.636	0.283	5.068	1.889(1.086~3.288)	0.024
口服益生菌	-1.181	0.377	9.815	0.307(0.147~0.643)	0.002
母乳喂养	-0.682	0.295	5.349	0.506(0.284~0.901)	0.021
灌肠	-1.095	0.344	10.155	0.334(0.171~0.656)	0.001

比较,差异均有统计学意义(均  $P < 0.05$ )。见表 4。

将单因素分析中有统计学意义的变量进行二元 logistic 回归分析,使用碳青霉烯类抗生素、总住院时间长是 CRKP 定植后继发感染的独立危险因素(均  $OR > 1, P < 0.05$ )。见表 5。

2.3 碳青霉烯酶耐药基因检测结果 将从感染组分离的 CRKP 菌株耐药基因序列与 NCBI 网站(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)比对,结果显示感染组 CRKP 菌株产碳青霉烯基因均为

*bla*<sub>KPC-2</sub>。同时未发现携带 *bla*<sub>NDM-1</sub>、*bla*<sub>IMP</sub>、*bla*<sub>OXA-48</sub> 耐药基因类型的 CRKP 菌株。部分 CRKP 菌株的 KPC-2 耐药基因型检测结果见图 1。

2.4 MLST 结果 将测序结果在 MLST 网站上进行比对,获得每个管家基因的等位基因编号。参照 MLST 网站比对 CRKP 分离菌株的等位基因编号,其编号为 3-3-1-1-1-1-4,根据分析得出肠道 CRKP 定植菌与定植后继发感染 CRKP 菌株的序列分型全部为 ST11 型。

表 4 CRKP 继发感染影响因素单因素分析[例(%)]

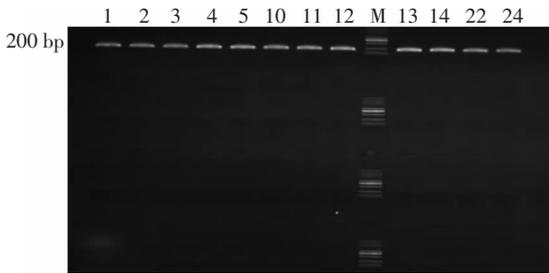
Table 4 Univariate analysis on influencing factors for CRKP secondary infection (No. of cases[%])

因素	感染组 (n = 35)	非感染组 (n = 139)	$\chi^2/U$	P	因素	感染组 (n = 35)	非感染组 (n = 139)	$\chi^2/U$	P
极低体重(<1 500 g)	23(65.7)	16(11.5)	47.238	<0.001	机械通气	32(91.4)	41(29.5)	44.037	<0.001
早产儿	33(94.3)	68(48.9)	23.628	<0.001	灌肠	25(71.4)	39(28.1)	22.618	<0.001
母乳喂养	0(0)	37(26.6)	11.833	0.001	口服益生菌	2(5.7)	22(15.8)	2.405	0.171
入住 NICU	31(88.6)	33(23.7)	50.538	<0.001	总住院时间 [M(P <sub>25</sub> , P <sub>75</sub> )]	44(30,58)	7(5,14)	372.000	<0.001
低蛋白血症	29(82.9)	49(35.3)	25.620	<0.001	使用糖皮质激素	14(40.0)	11(7.9)	23.396	<0.001
中性粒细胞减少症	4(11.4)	4(2.9)	4.661	0.053	使用碳青霉烯类抗生素	34(97.1)	40(28.8)	53.466	<0.001
神经系统疾病	7(20.0)	9(6.5)	6.125	0.021	使用氨基糖肽类抗生素	19(54.3)	12(8.6)	39.798	<0.001
消化道出血	15(42.9)	17(12.2)	17.474	<0.001	使用头孢菌素类抗生素	20(57.1)	70(50.4)	0.515	0.473
鼻胃管喂养	34(97.1)	60(43.2)	32.797	<0.001	使用青霉素类抗生素	16(45.7)	60(43.2)	0.074	0.786
气管插管	27(77.1)	17(12.2)	62.358	<0.001	使用氟康唑	24(68.6)	24(17.3)	36.842	<0.001

表 5 CRKP 继发感染影响因素的 logistic 回归分析

Table 5 Logistic regression analysis on influencing factors for CRKP secondary infection

因素	$\beta$	$S_b$	Wald $\chi^2$	OR(95%CI)	P
使用碳青霉烯类抗生素	2.989	1.231	5.892	19.869(1.778~222.029)	0.015
总住院时间	0.112	0.017	42.593	1.118(1.082~1.157)	<0.001

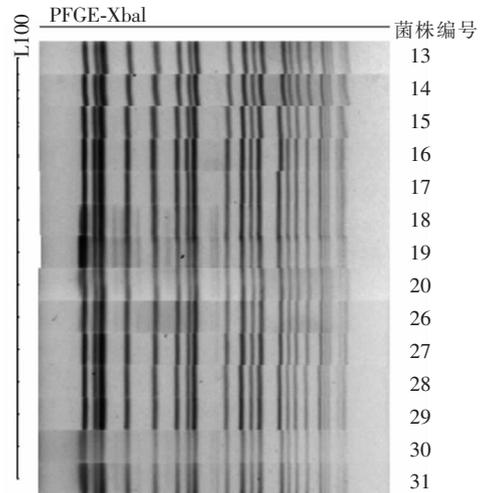


注: M 为 DNA Marker; 1、2、3、4、5、10 为部分新生儿的粪便(肛拭子)标本分离的定植菌; 11、12、13、14、22、24 为感染后其血或痰标本分离的感染菌。

图 1 部分菌株 KPC-2 耐药基因 PCR 产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis of PCR products of KPC-2 resistance gene of some strains

2.5 PFGE 结果 对感染组中来自粪便(肛拭子)标本、痰或血标本中的菌株进行复苏,共成功复苏 7 株肛拭子标本和 7 株对应新生儿的痰或血标本中的 CRKP 菌株。将 14 株成功复苏的 CRKP 菌株进行 PFGE 分型,PFGE 聚类分析图谱显示,此 14 株 CRKP 菌株属于同一型别,且同源率为 100%。见图 2。



注: 13、14、15、16、17、18、19 为感染组中 7 例新生儿粪便(肛拭子)标本中分离的菌株即定植株; 20、28、29、30、31 为感染组 7 例新生儿痰标本分离的菌株即感染株; 26、27 为其对应的从血标本分离的菌株即感染株。

图 2 CRKP 菌株的 PFGE 分型结果

Figure 2 PFGE typing results of CRKP strains

### 3 讨论

新生儿 CRKP 的检出率随临床碳青霉烯类抗生素的大量应用日益增加<sup>[9]</sup>。研究<sup>[2]</sup>表明,新生儿 CRKP 感染率逐年增高。新生儿 CRKP 的高检出率及感染率引起了人们的关注。CRKP 定植是感染的潜在危险因素<sup>[10]</sup>,无论是成人还是新生儿。有关成人 CRKP 定植后继发感染的研究<sup>[11]</sup>显示,CRKP 定植者中 CRKP 感染率为 8.8%~42%。定植后继发感染的差异可能是因为纳入的患者群体和所在环境不同,以及对感染控制措施的实施不同。研究<sup>[12]</sup>采用新生儿肛拭子和咽拭子标本,CRKP 定植新生儿继发临床感染的风险为 19.1%,本研究采用肛拭子主动筛查,结果表明该院 CRKP 定植新生儿中 20.1% 后续出现临床感染症状。胃肠道是最常用的耐药菌筛查部位,特别是直肠或肛周拭子<sup>[13]</sup>,但该院新生儿肠道定植后继发 CRKP 感染的概率与研究<sup>[12]</sup>中新生儿由定植继发为感染的概率相近,殷丽军等<sup>[12]</sup>研究对象为 NICU 中新生儿,NICU 中新生儿病情危重,侵入性操作或抗菌药物应用频繁,机体免疫力差,黏膜屏障功能减弱,更易发生 CRKP 感染。

CRE 在新生儿中的感染率不断增加<sup>[14]</sup>,新生儿感染 CRE 后会引发各种并发症,严重的会诱发死亡,因此了解新生儿感染 CRE 尤其是 CRKP 的危险及保护因素尤为重要。

新生儿由于吮吸吞咽及胃肠蠕动功能不完善,需要鼻胃管喂养。鼻胃管喂养为侵入性操作,可造成新生儿黏膜损伤导致其防御功能减弱易于 CRKP 定植。抗菌药物的使用是新生儿 CRKP 定植的独立危险因素,与研究<sup>[15]</sup>结果相同。其中头孢菌素类抗生素的使用是 CRKP 定植的独立危险因素,与 Qin 等<sup>[13]</sup>研究结果相同。而头孢菌素类抗生素可抑制或杀灭大多数细菌,导致胃肠道菌群紊乱,易于细菌在肠道内定植。剖宫产也是新生儿 CRKP 定植的独立危险因素,分娩方式会影响新生儿肠道菌群定植。剖宫产出生的新生儿肠道菌群与母亲皮肤和医院环境微生物群相似<sup>[16]</sup>,这些细菌对各种抗菌药物具有抗药性。因此,CRKP 更容易在剖宫产出生的新生儿肠道中定植。

母乳喂养是新生儿 CRKP 定植的保护因素<sup>[14]</sup>。除此之外,益生菌的使用也是 CRKP 定植的保护因素,但目前尚未有益生菌使用的相关报道。母乳中

含有一些益生菌<sup>[17]</sup>,母乳喂养可刺激细菌增殖,有助于建立正常的肠道菌群,从而促进肠道成熟,增强免疫保护<sup>[18]</sup>。益生菌是一类活性微生物菌,进入人体后可通过刺激其他微生物生长,调节胃肠道黏膜及全身系统的免疫反应,防止 CRKP 菌株在胃肠道的定植,从而阻遏 CRKP 由定植进一步发展为感染。

本研究发现灌肠是 CRKP 定植的保护因素。新生儿胃肠道未发育完全,肠道蠕动功能差,可以通过灌肠的方式刺激肠蠕动,促进粪便排泄。灌肠是首次被报道为 CRKP 定植的保护因素,灌肠可能是通过改善肠道内环境,减少肠道内有害菌数量,减少细菌在新生儿肠道的定植与继发感染。

本研究结果表明,新生儿 CRKP 定植继发感染的独立危险因素与碳青霉烯类抗生素的使用相关,与其他研究<sup>[12]</sup>不同。碳青霉烯类抗生素在 CRKP 从定植发展为感染的过程中会破坏肠道的微生态平衡,从而使相互竞争的病原菌被消除,最终导致 CRKP 大量增殖。此外,Lin 等<sup>[19]</sup>研究表明碳青霉烯类抗生素的长期使用可诱导获得性 KPC 酶的产生,而产 KPC 酶定植患者更容易发生 CRKP 感染。同时该院夏晴<sup>[20]</sup>研究也发现新生儿的感染病原菌为产 KPC 酶的 CRKP 菌株,进一步表明碳青霉烯类抗生素的长期使用会成为新生儿 CRKP 定植继发感染的独立危险因素。研究<sup>[21]</sup>表明住院时间延长是 CRKP 感染的危险因素,在本研究中总住院时间是肠道定植新生儿继发感染的独立危险因素。随着住院时间的延长,新生儿机体免疫力差,黏膜屏障功能受损,肠道定植细菌 CRKP 较易发生移位,导致 CRKP 感染。

国内外对于胃肠道定植与感染关系研究相对普遍,2017 年国外一项探讨胃肠道定植与感染之间关系的研究<sup>[22]</sup>表明,与肠道非定植患者相比,胃肠道定植患者易感染肺炎克雷伯菌。对基于基因组学进行的两项研究的结果中也表明定植菌株与感染菌株的同源性可高达 80%<sup>[23]</sup>。*bla<sub>KPC-2</sub>* 是我国成人 CRKP 菌株的主要耐药基因型,而我国新生儿流行的耐药基因型主要为 NDM-1 型<sup>[24]</sup>。该院新生儿主要感染产 KPC-2 酶 KP<sup>[20]</sup>,与文献<sup>[23]</sup>报道不一致。研究<sup>[13]</sup>显示环境可作为人类获得 KP 的贮菌源,无论是定植还是感染。因此,推测此次该院新生儿流行的 KPC-2 的 CRKP 菌株可能是由成人病房传播或因医院环境污染引起,也可能是新生儿免疫力低发生的宿主菌自身性感染,需要进一步研究。

为进一步验证 CRKP 定植与感染菌株之间的

同源性,本研究对定植和感染菌株进行了 PFGE 分析。虽然 MLST 和 PFGE 均可以用作细菌分型,但相比较而言,PFGE 检测分辨率高、分型能力强。而 MLST 检测分辨率较低,难以对细菌进行准确的同源性分析。因此通过使用 MLST 和 PFGE 两种分子检测方法能更好确定其同源性,以便进一步的分析研究。PFGE 结果显示,14 株 CRKP 菌株同源性为 100%,与 MLST 结果一致,表明肠道定植与继发感染的 CRKP 菌株间具有同源性。

本研究仍具有一定的局限性,首先没有将新生儿感染的 CRKP 菌株与医院其他科室流行的 CRKP 菌株进行比较,对传播流行的原因不清楚。其次,护理人员与同一病房住院新生儿之间的个人接触是最可能的传播途径,但没有对医院的环境及人员进行微生物检测,不能排除环境或者护理人员手卫生消毒不彻底这一传播因素。最后,目前为止仍然无法确定这种克隆型菌株是如何传播至新生儿病房,未来有待进一步研究。

总之,本研究通过分析 CRKP 定植及定植继发感染的影响因素,可为降低新生儿科 CRKP 感染率提供科学依据。在新生儿科定期主动筛查 CRE,及时监测耐药菌及其分子流行病学特征,尽早开始母乳喂养与使用益生菌,并采取医院感染防控措施,有助于避免 CRKP 在新生儿病房中的暴发流行。

利益冲突:所有作者均声明不存在利益冲突。

## [参考文献]

- [1] 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.  
China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Epidemiological change in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: surveillance report from China Antimicrobial Resistance Surveillance in 2014 - 2019[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(2): 175 - 179.
- [2] Yin LJ, He LY, Miao J, et al. Actively surveillance and appropriate patients placements' contact isolation dramatically decreased carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection and colonization in pediatric patients in China[J]. J Hosp Infect, 2020, 105(3): 486 - 494.
- [3] Durante-Mangoni E, Andini R, Zampino R. Management of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections [J]. Clin Microbiol Infect, 2019, 25(8): 943 - 950.
- [4] Seesahai J, Church PT, Asztalos E, et al. Neonates with maternal colonization of carbapenemase-producing, carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a mini-review and a suggested guide for preventing neonatal infection[J]. Children (Basel), 2021, 8(5): 399.
- [5] Smith A, Anandan S, Veeraraghavan B, et al. Colonization of the preterm neonatal gut with carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* and its association with neonatal sepsis and maternal gut flora[J]. J Glob Infect Dis, 2020, 12(2): 101 - 104.
- [6] Dorman MJ, Short FL. Genome watch: *Klebsiella pneumoniae*: when a colonizer turns bad[J]. Nat Rev Microbiol, 2017, 15(7): 384.
- [7] 中华人民共和国卫生部. 关于印发医院感染诊断标准(试行)的通知: 卫医发[2001]2 号[EB/OL]. [2023 - 05 - 15]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/201304/37cad8d95582456d8907ad04a5f3bd4c.shtml>.  
Ministry of Health of the PRC. Notice on issuing the diagnosis standards for hospital infection (trial): Wei Yi Fa [2001] No. 2[EB/OL]. [2023 - 05 - 15]. <http://www.nhc.gov.cn/wjw/gfxwj/201304/37cad8d95582456d8907ad04a5f3bd4c.shtml>.
- [8] Du JK, Li PP, Liu HL, et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China[J]. PLoS One, 2014, 9(4): e95181.
- [9] 全国细菌耐药监测网. 2014 至 2017 年中国儿童及新生儿患者细菌耐药监测研究[J]. 中华医学杂志, 2018, 98(40): 3279 - 3287.  
China Antimicrobial Resistance Surveillance System. Surveillance of bacterial resistance in children and newborns across China from 2014 to 2017[J]. National Medical Journal of China, 2018, 98(40): 3279 - 3287.
- [10] Kontopoulou K, Iosifidis E, Antoniadou E, et al. The clinical significance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* rectal colonization in critically ill patients: from colonization to bloodstream infection[J]. J Med Microbiol, 2019, 68(3): 326 - 335.
- [11] Tamma PD, Kazmi A, Bergman Y, et al. The likelihood of developing a carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infection during a hospital stay [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2019, 63(8): e00757 - 19.
- [12] 殷丽军, 杨韦青, 缪瑾, 等. 新生儿重症监护患者耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌定植发展为感染的危险因素分析[J]. 中国感染控制杂志, 2022, 21(1): 15 - 21.  
Yin LJ, Yang WJ, Miao J, et al. Risk factors for development of infection from colonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in neonates in neonatal intensive care unit [J]. Chinese Journal of Infection Control, 2022, 21(1): 15 - 21.
- [13] Qin XH, WU S, Hao M, et al. The colonization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, resistance mechanisms, and risk factors in patients admitted to intensive care units in China[J]. J Infect Dis, 2020, 221(Suppl 2): S206 - S214.

- [14] Martin RM, Bachman MA. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2018, 8: 4.
- [15] Singh NP, Choudhury DD, Gupta K, et al. Predictors for gut colonization of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in neonates in a neonatal intensive care unit[J]. Am J Infect Control, 2018, 46(6): e31 – e35.
- [16] Coelho GDP, Ayres LFA, Barreto DS, et al. Acquisition of microbiota according to the type of birth; an integrative review [J]. Rev Lat Am Enfermagem, 2021, 29: e3446.
- [17] Łubiech K, Twarużek M. *Lactobacillus* bacteria in breast milk [J]. Nutrients, 2020, 12(12): 3783.
- [18] Pärnänen K, Karkman A, Hultman J, et al. Maternal gut and breast milk microbiota affect infant gut antibiotic resistome and mobile genetic elements[J]. Nat Commun, 2018, 9(1): 3891.
- [19] 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.
- [20] 夏晴. 新生儿耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌定植和继发感染危险因素研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2022.
- Xia Q. Risk factors of neonatal carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection[D]. Kunming: Kunming Medical University, 2022.
- [21] Liu P, Li X, Luo M, et al. Risk factors for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: a Meta-analysis[J]. Microb Drug Resist, 2018, 24(2): 190 – 198.
- [22] Gorrie CL, Mirceta M, Wick RR, 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.
- [23] Rossi M, Chatenoud L, Gona F, et al. Characteristics and clinical implications of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization and infection, Italy[J]. Emerg Infect Dis, 2021, 27(5): 1416 – 1426.
- [24] Yin D, Zhang L, Wang A, et al. Clinical and molecular epidemiologic characteristics of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection/colonization among neonates in China [J]. J Hosp Infect, 2018, 100(1): 21 – 28.

(本文编辑:陈玉华)

**本文引用格式:**翟誉,李庆蓉,李江,等. 新生儿肠道 CRKP 定植和继发感染的影响因素[J]. 中国感染控制杂志, 2024, 23(2): 133 – 141. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244493.

**Cite this article as:** ZHAI Yu, LI Qing-rong, LI Jiang, et al. Influencing factors for intestinal colonization and secondary infection of CRKP in neonates[J]. Chin J Infect Control, 2024, 23(2): 133 – 141. DOI: 10.12138/j.issn.1671-9638.20244493.