DOI:10.12138/j.issn.1671－9638.20263378

·论著·

佳木斯市临床分离肠杆菌目细菌耐药基因流行及克隆－质粒复合体传播模式分析

孟庆敏[1],付　宇[1],欧阳凤菊[2],闫　军[2],薛成玉[2],孟敏芝[1],苏明明[1],邢　辉[1],马永娟[1],王　彬[1],包名家[3]
(1. 佳木斯市疾病预防控制中心微生物检验科,黑龙江 佳木斯　154007; 2. 黑龙江省疾病预防控制中心细菌检验所,黑龙江 哈尔滨　150030; 3. 黑龙江省疾病预防控制中心主任办公室,黑龙江 哈尔滨　150030)

[摘　要] **目的**　了解某地区临床分离肠杆菌目细菌耐药基因的流行特征,并分析耐药菌株克隆传播与耐药基因水平转移的模式。**方法**　收集 2023 年 3 月—2024 年 10 月佳木斯市哨点医院 133 株来源于血及粪便标本的肠杆菌目细菌临床分离株,进行药敏试验和全基因组测序。基于基因组数据开展耐药基因、质粒复制子、多位点序列分型(MLST)及系统发育分析,并通过接合转移试验评估耐药质粒的水平转移能力。**结果**　肺炎克雷伯菌中,bla_{SHV}(93.68%)、*oqx*AB(97.89%)、*fos*A(86.32%)为最高频检出的耐药基因,ST23 为优势流行型别(30.53%),该型别在 IncH(pNDM-MAR)质粒中占比为 61.7%。在致泻性大肠埃希菌 DEC 中,bla_{CTX-M}(57.69%)、bla_{TEM}(61.54%)和 *qnr*(38.46%)为主要耐药基因,IncF 型质粒广泛存在(92.31%),且 80.00%的供体菌株表现出耐药质粒接合转移能力。**结论**　该地区肠杆菌目细菌传播可能由 ST23-IncH(pNDM-MAR)复合体克隆扩张与 IncF 型质粒水平转移两种模式共同驱动,加强对高风险克隆－质粒复合体的分子监测,对于控制医院感染播散至关重要。

[关　键　词] 肠杆菌目细菌;耐药基因;质粒;多位点序列分型;克隆传播
[中图分类号] R181.3+2　R378.2

Epidemic of antimicrobial resistance genes and transmission mode of clone-plasmid complex in clinically isolated *Enterobacterales* in Jiamusi City

MENG Qingmin[1], *FU Yu*[1], *OUYANG Fengju*[2], *YAN Jun*[2], *XUE Chengyu*[2], *MENG Minzhi*[1], *SU Mingming*[1], *XING Hui*[1], *MA Yongjuan*[1], *WANG Bin*[1], *BAO Mingjia*[3] (1. *Department of Microbial Laboratory, Jiamusi Center for Disease Control and Prevention, Jiamusi* 154007, *China*; 2. *Institute of Bacterial Laboratory, Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin* 150030, *China*; 3. *Director's Office, Heilongjiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Harbin* 150030, *China*)

[**Abstract**] **Objective**　To understand the epidemiological characteristics of antimicrobial resistance genes in clinically isolated *Enterobacterales* in a region, and to analyze the model of clonal transmission and horizontal transfer of antimicrobial resistance genes in resistant strains. **Methods**　133 clinical isolates of *Enterobacterales* from blood and fecal specimens from a sentinal hospital in Jiamusi from March 2023 to October 2024 were collected for antimicrobial susceptibility testing and whole genome sequencing. Analyses of resistance gene and plasmid replicon, multilocus sequence typing (MLST), and phylogenetic analysis were conducted based on genomic data. Horizontal transfer ability of resistant plasmids was evaluated through conjugation transfer test. **Results**　In *Klebsiella pneumoniae*, bla_{SHV}(93.68%), *oqx*AB (97.89%), and *fos*A (86.32%) were the most frequently detected resistance genes, while ST23 was the dominant epidemic type (30.53%), with a percentage of 61.7% in the IncH (pNDM-MAR)

[收稿日期]　2025－12－30
[基金项目]　黑龙江省科学技术厅重点研发计划项目(2024ZX12C34);黑龙江省卫生健康委科研项目(2025121220347)
[作者简介]　孟庆敏(1970－),女(汉族),黑龙江省佳木斯市人,主任技师,主要从事病原微生物检测及耐药研究。
[通信作者]　包名家　　E-mail:cmubmj@163.com

plasmid. In diarrheal *Escherichia coli* DEC, bla_{CTX-M} (57.69%), bla_{TEM} (61.54%), and *qnr* (38.46%) were the main resistance genes. IncF plasmids were widely present (92.31%), and 80.00% of donor strains exhibited the ability to conjugate and transfer resistant plasmids. **Conclusion** The transmission of *Enterobacterales* in this region may be driven by two modes: ST23 IncH (pNDM-MAR) complex clone expansion and IncF plasmid horizontal transfer. Strengthening molecular monitoring of high-risk clone-plasmid complex is crucial for controlling the transmission of healthcare-associated infection.

[**Key words**] *Enterobacterales*; antimicrobial resistance gene; plasmid; multilocus sequence typing; clone transmission

细菌耐药性已成为全球重大公共卫生挑战。肠杆菌目细菌是医院感染的主要病原体之一[1]，其耐药性传播主要由染色体基因突变及可移动遗传元件介导[2]。质粒是耐药基因的重要传播载体，质粒复制子类型与宿主菌序列型(sequence type, ST)之间的适配关系可形成“高风险克隆-质粒复合体”[3]。尤其是在肺炎克雷伯菌中，高风险克隆常与其毒力及耐药性相关联[4]。对临床菌株进行分子流行病学联合分析是揭示地区耐药性流行特征和传播规律的重要手段[5]。本研究对 133 株来源于血液及粪便的临床肠杆菌目细菌进行耐药基因检测、ST 分型、质粒复制子分型及接合转移能力分析，旨在揭示其关键传播模式，为临床防控提供依据。

1 材料与方法

1.1 菌株收集 收集 2023 年 3 月—2024 年 10 月佳木斯市哨点医院来源于血及粪便标本的肠杆菌目分离株，共 133 株，包括肺炎克雷伯菌 95 株、大肠埃希菌 26 株及其他肠杆菌目细菌 12 株(阴沟肠杆菌 4 株、柠檬酸杆菌 2 株、奇异变形杆菌 2 株，产气克雷伯菌 2 株、肺炎克雷伯菌臭鼻亚种 1 株、黏质沙雷菌 1 株)，已排除同一患者重复分离株(包括同一患者不同部位)。

1.2 仪器与试剂 哥伦比亚血琼脂平板、LB 琼脂及 LB 肉汤(广东环凯生物科技有限公司)用于菌株培养；接合试验受体菌为大肠埃希菌 EC600(宝赛生物科技有限公司)。细菌鉴定采用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱(MALDI-TOF MS，安图生物)；药敏试验使用全自动药敏分析仪(复星诊断)，药敏结果依据美国临床实验室标准化协会(Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) M100-S32(2022)标准进行判读[6]。

1.3 全基因组测序及分析 133 株分离株均进行全基因组测序，其中 100 株由北京诺禾致源科技股份有限公司完成(Illumina NovaSeq X Plus 平台，PE150)，其余 33 株在本实验室完成(齐碳 Qitan 6K)。使用 ResFinder 4.1 结合综合性抗生素耐药性数据库(Comprehensive Antibiotic Resistance Database, CARD)获取耐药基因类型；使用 PlasmidFinder 2.0 数据库分析质粒复制子类型；通过 PubMLST 数据库进行多位点序列分型(MLST)；使用 IQ-TREE 软件构建最大似然法系统进化树，并通过 iTOL 在线平台进行可视化。

1.4 接合转移试验 采用滤膜接合法进行质粒接合转移试验。供体菌为 5 株大肠埃希菌临床分离株，这些菌株同时产超广谱 β-内酰胺酶(ESBL)，表型对头孢噻肟、环丙沙星及阿米卡星耐药，部分携带喹诺酮及氨基糖苷类耐药基因 *aac*(6′)-*Ib-cr*。受体菌为大肠埃希菌 EC600(对链霉素耐药，对阿米卡星敏感)。筛选接合子后进行药敏试验及全基因组测序，以验证质粒的成功转移。

1.5 统计学方法 应用统计软件 SPSS 26.0 分析数据。计数资料采用频数(百分比)[n(%)]表示，组间比较采用 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法，接合频率以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。$P \leqslant 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 菌株分布与碳青霉烯类耐药情况 本研究共收集 133 株肠杆菌目细菌，包括肺炎克雷伯菌 95 株(71.43%)、大肠埃希菌 26 株(19.55%)及其他肠杆菌目细菌 12 株(9.02%)。标本来源以血为主，共 106 株(79.70%)，粪便来源 27 株 (20.30%)。菌株主要分布于重症监护病房(ICU)、内科及外科病区，分别检出 45 株(33.83%)、43 株(32.34%)及 45 株(33.83%)。药敏结果显示，2 株菌株对头孢他啶/阿维巴坦(CZA)耐药，同时携带 bla_{NDM} 基因，且均对美罗培南、厄他培南耐药。

2.2　耐药基因、克隆谱系与质粒的联合分析

2.2.1　肺炎克雷伯菌　95 株肺炎克雷伯菌 ST23 为优势流行克隆(30.53%,29 株),该型别在 IncH(pNDM-MAR)质粒中占比为 61.70%(29/47),ST23 型在该质粒携带群体中的分布高于其在肺炎克雷伯菌株中的自然分布(61.70% VS 30.53%),差异有统计学意义($P<0.001$)。ST23-IncH(pNDM-MAR)克隆-质粒复合体在血液与粪便标本中均有分布,在肺炎克雷伯菌株中 bla_{SHV}、*oqx*AB、*fos*A 耐药基因检出率较高,分别为 93.68%(89 株)、97.89%(93 株)、86.32%(82 株),见图 1。29 株 ST23 型且携带 IncH(pNDM-MAR)质粒的菌株在三类病房均有分布,其中内科病房检出占比最高(41.38%,12 株),外科病房及 ICU 分别为 20.69%(6 株)、37.93%(11 株),见图 2。

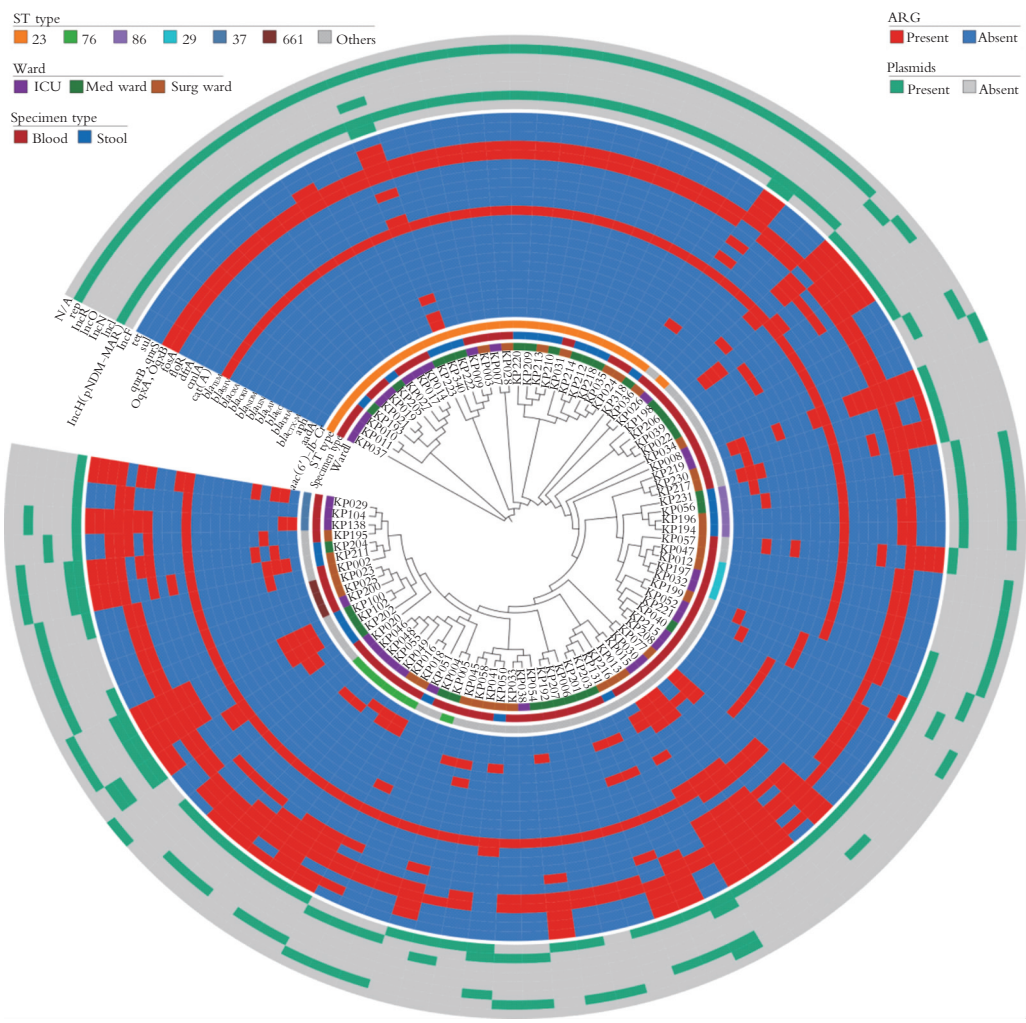

图 1　95 株肺炎克雷伯菌耐药基因、ST 分型及质粒复制子分型的系统发育热图

Figure 1　Phylogenetic heatmap of resistance genes, ST, and plasmid replicon typing of 95 strains of *Klebsiella pneumoniae*

2.2.2　大肠埃希菌　26 株大肠埃希菌 ST 分型呈多样性,未发现优势流行克隆。IncF 质粒检出率为 92.31%(24 株),bla_{CTX-M} 检出率为 57.69%(15 株),bla_{TEM} 检出率为 61.54%(16 株),*qnr* 检出率为 38.46%(10 株),另有 4 株(15.38%)检出 *aac*(6′)-*Ib-cr* 氨基糖苷类耐药基因。接合试验成功率为 80.00%(4/5)。24 株携带 IncF 质粒的菌株在三类病房均有检出,其中内科病房检出 6 株(25.00%),外科病房检出 10 株(41.67%),ICU 检出 8 株(33.33%),见图 3。

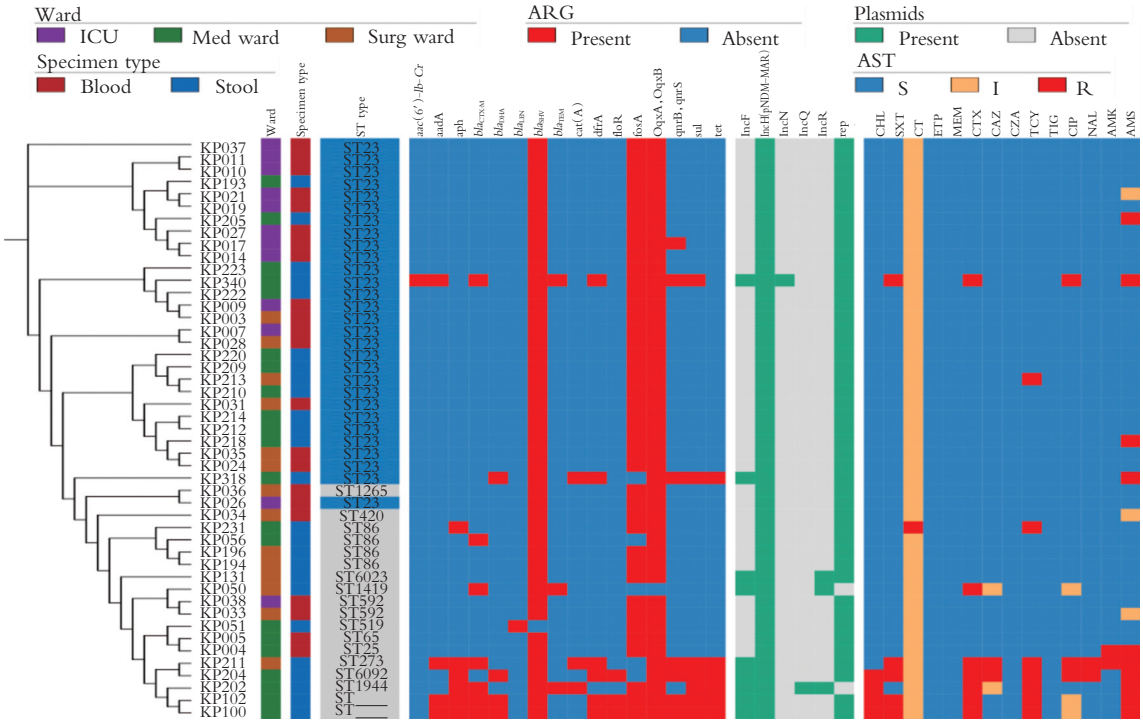

图 2　ST23-IncH(pNDM-MAR)克隆谱系的系统发育聚类热图

Figure 2　Phylogenetic clustering heatmap of ST23-IncH(pNDM-MAR) clone lineage

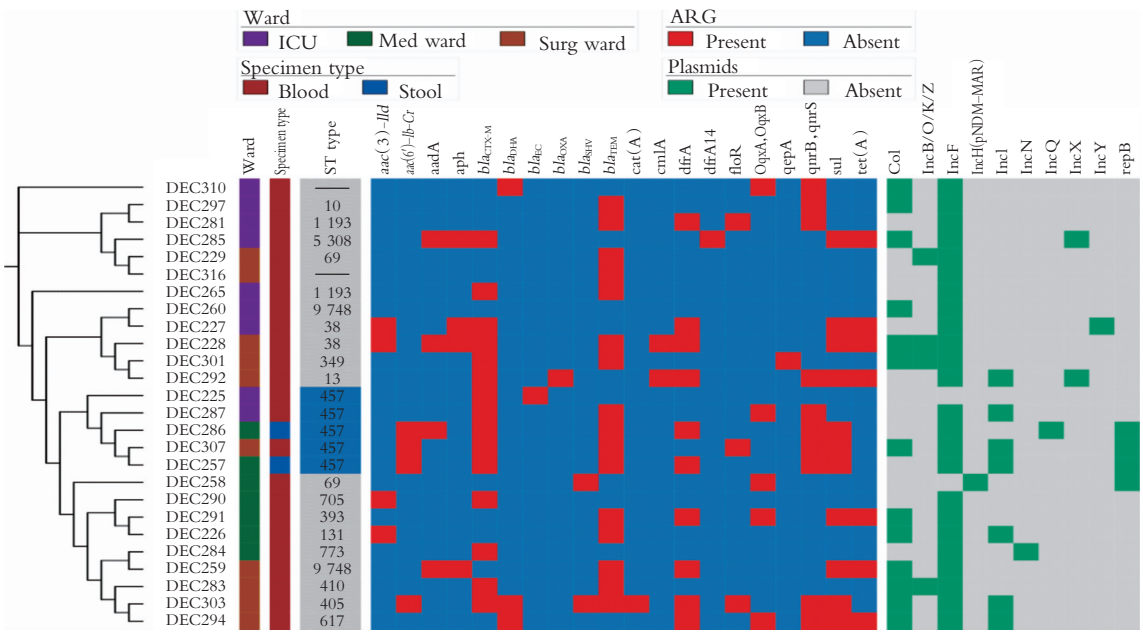

图 3　26 株大肠埃希菌耐药基因、ST 分型及质粒复制子分型的系统发育聚类热图

Figure 3　Phylogenetic clustering heatmap of resistance genes, ST, and plasmid replicon typing of 26 strains of *Escherichia coli*

2.2.3　其他肠杆菌目细菌　12 株分离株中，5 株未能获得有效 MLST 结果，其余 7 株的 ST 型分别为 ST23、ST530、ST254、ST281、ST1580、ST636、ST45。耐药基因检测结果显示，1 株携带 bla_{NDM}，4 株携带 bla_{CTX-M}，3 株携带 bla_{OXA} 基因。见图 4。

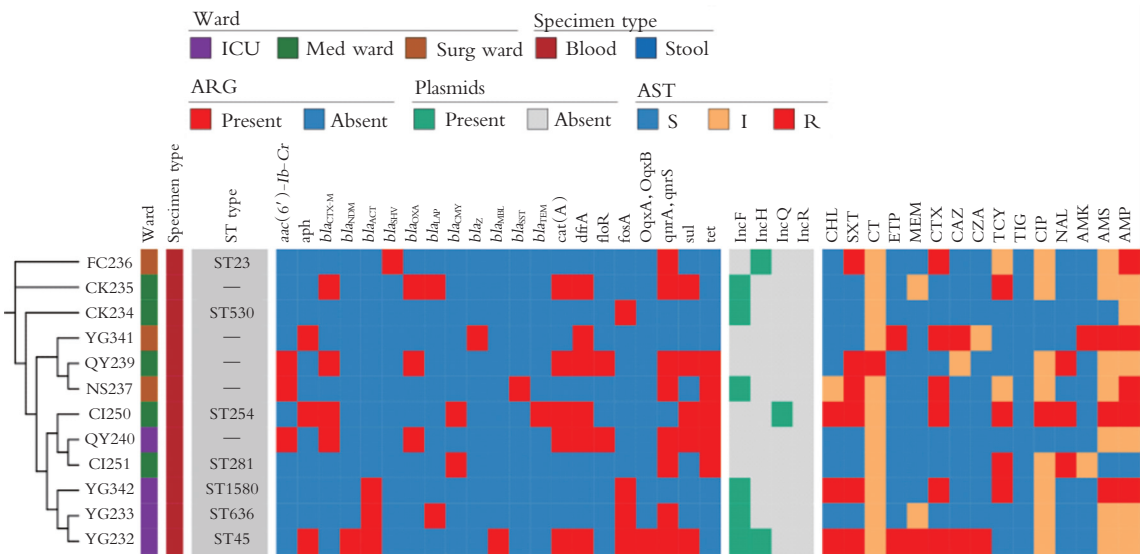

图 4　12 株其他肠杆菌目细菌耐药基因、ST 分型、质粒复制子分型及药敏表型的系统发育聚类热图

Figure 4　Phylogenetic clustering heatmap of resistance genes, ST, plasmid replicon typing, and antimicrobial susceptibility phenotypes of 12 strains of other *Enterobacterales*

2.3　质粒接合转移试验　5 株携带 IncF 质粒的大肠埃希菌供体菌中，4 株成功将耐药基因转移至受体菌 EC600。接合子获得与供体菌一致的耐药基因[$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM} 及 *aac*(6′)-*Ib-cr*]及相似的耐药表型，见表 1。

表 1　供体菌、受体菌及接合子的耐药表型、耐药基因型及接合转移频率

Table 1　Resistance phenotypes, resistance genotypes, as well as conjugation and transfer frequency of donor bacteria, recipient bacteria, and conjugates

菌株编号	最低抑菌浓度(μg/mL)				β-内酰胺酶耐药基因	氨基糖苷类耐药基因	接合频率
	头孢噻肟	阿米卡星	链霉素	环丙沙星			
EC600	≤0.25	≤4	≥32	0.25	/	/	/
DEC303	8	32	8	2	bla_{SHV}、$bla_{\text{CTX-M}}$ bla_{TEM}、bla_{DHA}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	/
pDEC303	8	32	8	2	bla_{SHV}、$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	$(4.2\pm0.3)\times10^{-5}$
DEC307	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	/
pDEC307	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	$(2.5\pm0.2)\times10^{-5}$
DEC257	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	/
pDEC257	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	$(1.8\pm0.1)\times10^{-4}$
DEC286	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	/
pDEC286	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	*aac*(6′)-*Ib-cr*	$(6.3\pm0.5)\times10^{-4}$
DEC283	>16	32	8	>2	$bla_{\text{CTX-M}}$、bla_{TEM}	-	/
pDEC283	/	/	/	/	/	/	0

注：- 表示未检出；/表示无内容；接合频率 =（接合子数量/供体菌数量）；pDEC303、pDEC307、pDEC257、pDEC286 为接合子。

3　讨论

本研究对 133 株临床分离肠杆菌目细菌进行全基因组测序与分子流行病学分析，揭示了该地区耐药基因的流行特征及两类主要传播模式：ST23-IncH(pNDM-MAR)复合体的克隆扩张与 IncF 型质粒介导的水平转移。

本研究中肺炎克雷伯菌 ST23 型占比达 30.53%，既往研究报道该 ST 型与高毒力表型相关[7-8]，且与 IncH(pNDM-MAR)质粒高度关联，可形成稳定的“克隆－质粒复合体”。该复合体在血与粪便标本中均有检出，并分布于多个病房，且存在从定植向感染转化的潜在风险。其中，bla_{SHV}、*oqx*AB 等耐药基因的携带率均超过 90%，提示该克隆兼具耐药性与潜在毒力特征，存在较高的临床风险。

大肠埃希菌 ST 型呈高度多样性，未发现明显优势克隆，提示其耐药传播主要依赖质粒介导的水平转移[9]。IncF 型质粒检出率达 92.31%，接合转移试验成功率达 80.00%，证实其具备较强的水平转移能力。携带 IncF 质粒的 ST457 型菌株在三类病房均有检出，提示该质粒可能存在同一 ST 型菌株的跨病房分布。此类水平转移模式的防控更具挑战性，需开展以质粒型别为核心的分子监测。

在其他肠杆菌目细菌中检测到 bla_{NDM}、bla_{CTX-M}、bla_{OXA} 等多种耐药基因，部分菌株与肺炎克雷伯菌及大肠埃希菌在系统进化树上呈现较近的亲缘关系，提示可能存在跨菌种的耐药基因水平传播。尽管部分菌株未能完成 MLST，但其携带的质粒复制子类型与主要菌株存在重叠，进一步支持可移动元件在耐药传播中的重要作用，提示可能存在低频克隆的局部流行。

另外，本研究在 2 株菌中检出 bla_{NDM} 基因，分别为粪便来源的肺炎克雷伯菌 KP051(ST1914)和血标本来源的未分型阴沟肠杆菌 YG232。两株菌均对美罗培南、厄他培南及头孢他啶/阿维巴坦耐药，呈现碳青霉烯类耐药表型。虽然 bla_{NDM} 阳性菌株在本研究中检出率较低(1.50%)，但其临床意义不容忽视：首先，NDM 酶可水解几乎所有 β-内酰胺类药物(除氨曲南外)，导致治疗选择极为有限；其次，bla_{NDM} 基因通常定位于可移动质粒，具备较高的水平转移潜力[10]；第三，本研究中 NDM 菌株分别分离自粪便与血标本，提示其既可定植于肠道，亦可引发侵袭性血流感染。鉴于本地区此前 NDM 菌株报道较少，此次检出应视为重要的预警信号，建议加强对碳青霉烯类耐药菌株的主动筛查，特别是对重症患者、移植患者等高危人群的肠道定植监测。

综合来看，本研究结果提示该地区肠杆菌目细菌耐药传播的两种主要模式：一是以 ST23-IncH(pNDM-MAR)为代表的克隆扩增，二是以 IncF 型质粒为载体的水平转移。建议将“高风险克隆－质粒复合体”的分子监测纳入医院感染控制体系，结合粪便筛查与血流感染监测，早期识别高风险定植个体并实施精准干预。

作者贡献声明：孟庆敏负责研究设计、论文撰写，付宇、孟敏芝、邢辉、苏明明负责实验数据采集，王彬、马永娟负责数据整理及复核，欧阳凤菊、薛成玉、闫军负责结果分析及初稿修订，包名家负责研究指导、论文修改及经费支持。

利益冲突：所有作者均声明不存在利益冲突。

[参 考 文 献]

[1] Sands K, Carvalho MJ, Portal E, et al. Characterization of antimicrobial-resistant gram-negative bacteria that cause neonatal sepsis in seven low- and middle-income countries[J]. Nat Microbiol, 2021, 6(4): 512－523.

[2] El-Zamkan MA, Mohamed HMA. Antimicrobial resistance, virulence genes and biofilm formation in *Enterococcus* species isolated from milk of sheep and goat with subclinical mastitis [J]. PLoS One, 2021, 16(11): e0259584.

[3] 熊流新，黄志伟，钟建辉，等. 基于全基因组分析的肺炎克雷伯菌耐药性与流行病学特征分析[J]. 临床检验杂志，2022，40(8)：582－588.
Xiong LX, Huang ZW, Zhong JH, et al. Drug resistance and epidemiological characteristics of *Klebsiella pneumoniae* based on whole genome sequencing analysis[J]. Chinese Journal of Clinical Laboratory Science, 2022, 40(8): 582－588.

[4] 饶玉婷，姜蕾，葛茹，等. 基于全基因组测序的耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌的流行病学特征与耐药及毒力基因研究[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(10)：1367－1376.
Rao YT, Jiang L, Ge R, et al. Epidemiological characteristics, antimicrobial resistance genes, and virulence genes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a study based on whole genome sequencing[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2025, 24(10): 1367－1376.

[5] 储雯雯，刘周，李昕，等. 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌全基因组测序及黏菌素耐药分析[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(1)：37－44.
Chu WW, Liu Z, Li X, et al. Whole-genome sequencing and colistin resistance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2025, 24(1): 37－44.

[6] 李兵兵，陈大伟，刘靓，等. 临床分离高黏液肺炎克雷伯菌耐药性及基因组特征分析[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(1)：113－120.
Li BB, Chen DW, Liu L, et al. Drug resistance and genomic characteristics of clinically isolated hypermu-coviscous *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2025, 24(1): 113－120.

[7] 卓超，徐英春，俞云松，等. 临床产超广谱β-内酰胺酶肠杆菌目细菌感染应对策略专家共识(2025)[J]. 中国感染控制杂志，2025，24(9)：1191－1207.
Zhuo C，Xu YC，Yu YS，et al. Expert consensus on clinical management strategies for infections caused by extended-spectrum β-lactamase-producing *Enterobacterales* (2025)[J]. Chinese Journal of Infection Control，2025，24(9)：1191－1207.

[8] 谢斌云，刘媛，张伟，等. 产 ESBL 高毒力肺炎克雷伯菌的耐药机制及分子流行病学分析[J]. 江西医药，2020，55(6)：661－664，683.
Xie BY，Liu Y，Zhang W，et al. Risk factors，drug resistance mechanism and molecular epidemiology of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* infection[J]. Jiangxi Medical Journal，2020，55(6)：661－664，683.

[9] Wei QH，Jiang XF，Li M，et al. Transcription of integron-harboured gene cassette impacts integration efficiency in class 1 integron[J]. Mol Microbiol，2011，80(5)：1326－1336.

[10] World Health Organization. Antimicrobial resistance，hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*-global situation[EB/OL]. (2024－07－31)[2025－12－20]. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024－DON527.

（本文编辑：陈玉华）

本文引用格式：孟庆敏，付宇，欧阳凤菊，等. 佳木斯市临床分离肠杆菌目细菌耐药基因流行及克隆－质粒复合体传播模式分析[J]. 中国感染控制杂志，2026，25(7)：971－977. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20263378.

Cite this article as：MENG Qingmin，FU Yu，OUYANG Fengju，et al. Epidemic of antimicrobial resistance genes and transmission mode of clone-plasmid complex in clinically isolated *Enterobacterales* in Jiamusi City[J]. Chin J Infect Control，2026，25(7)：971－977. DOI：10.12138/j.issn.1671－9638.20263378.