

宏基因组测序在 ICU 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染暴发 精准溯源中的应用

吴晓琴*, 李 瑾, 石理冉, 郭 风, 薛 景, 阚红侠, 李艾英

江苏省徐州市贾汪区人民医院感染管理科 江苏徐州

【摘要】目的 探讨宏基因组测序(mNGS)技术在 ICU 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌(CRKP)医院感染暴发调查中的应用。**方法** 2024 年 4 月 3~26 日, 某院 ICU 在 23 天内检出 6 例 CRKP 菌株, 应用传统病原学培养及 mNGS 基因测序对检出的 CRKP 菌株进行病原学鉴定以明确感染源, 同时对床单元及可能污染的环境进行环境卫生学采样和进行病原微生物培养和鉴定, 并采取床边隔离、手卫生等综合预防控制措施评价其效果。**结果** mNGS 检测结果发现 6 例患者标本均携带 β -内酰胺酶类耐药基因 CTX, 经专家判定 4 例为医院感染、1 例为社区感染、1 例为定植; 环境卫生学监测结果显示, 在患者床栏、枕头等 96 个点位中检出 4 例 CRKP, 阳性率 4.16%。采取单间隔离、强化手卫生等措施后, 手卫生依从率从 43.67% 提升 82.6%, 患者预后良好。**结论** mNGS 测序技术具有精准度高、耗时短, 可有效用于 CRKP 感染暴发溯源, 持续采取手卫生、床边隔离, 环境物体表面的清洁、消毒是防控 CRKP 感染的重要措施。

【关键词】 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌; 宏基因组测序; 医院感染; 防控; 耐药基因

【基金项目】 徐州市科技局重大科研项目基金资助(项目编号: KC23142); 徐州市卫生健康委科技项目基金资助(项目编号: XWKYHT20240090); 江苏省医院协会创新管理课题(项目编号: JSYGY-3-2023-288)

【收稿日期】 2025 年 8 月 16 日

【出刊日期】 2025 年 9 月 19 日

【DOI】 10.12208/j.ijcr.20250415

Application of metagenomic sequencing in precise tracing of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection outbreaks in ICU

Xiaoqin Wu*, Jin Li, Liran Shi, Feng Guo, Jing Xue, Hongxia Kan, Aiyong Li

Department of Infection Control, The people's hospital of Jiawang of Xuzhou, Xuzhou, Jiangsu

【Abstract】 Objective To explore the application of metagenomic next-generation sequencing(mNGS) technology in the investigation of hospital infection aggregation caused by Carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* (CRKP). **Methods** Using mNGS and traditional pathogen cultivation methods, pathogen detection and tracing were conducted on 6 patients with CRKP infection in a comprehensive ICU of a hospital from April 3-26, 2024. Environmental hygiene monitoring was carried out on bed units and potentially contaminated environments, and comprehensive control measures such as isolation, hand hygiene, and surface cleaning and disinfection of objects were taken to evaluate their prevention and control effects. **Results** The mNGS results reported that the β -lactam resistance gene CTX was isolated from the samples of 6 patients. After comprehensive expert judgment, 4 patients were diagnosed with hospital infection, 1 patient was found to have sample contamination, and 1 patient was brought in from outside the hospital after colonization. this event is considered a hospital infection outbreak. The results of environmental hygiene monitoring showed that 4 cases of CRKP were detected in the environment, with a positive rate of 4.16% (4/96), mainly concentrated on the patient bed rails, pillows, ECG monitor knobs, and the surface of urine collection bags. After implementing multidisciplinary joint infection control measures, the compliance rate of doctors' hand hygiene increased from 43.67% (38/87) to 82.6% (76/92), and the

*通讯作者: 吴晓琴, 女, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 感染控制。

prognosis of patients was good. No new cases were found in subsequent monitoring **Conclusion** mNGS has the characteristics of high precision, short time consumption, and high accuracy, which can be applied to the prevention and control of hospital infection outbreaks and the study of drug resistance genomes.

【**Keywords**】 Carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae; Metagenomic next-generation sequencing; Hospital infection; Prevention and control; Resistant gene

伴随抗菌药物的过度使用, 细菌耐药成为迫切需要关注和解决的热点问题及难题, 在临床面临的诸多耐药菌中, 最重要的是碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌中的耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (Carbapenem-resistant klebsiella pneumoniae, CRKP), 自 2001 年, 2007 年美国、中国首次报道 CRKP 以来^[1,2], 紧接着全球很多地域的不同国家陆续报道了 CRKP 感染病例, CRKP 的检出在全球范围内呈快速增长趋势^[3-5]。2022 年中国细菌耐药监测网 (CHINET) 数据显示^[6]: CRKP 医院感染发生率和定植率呈逐年上升趋势^[7], 医疗机构时常会出现 CRKP 医院感染暴发, 患者一旦感染 CRKP 住院费用明显增加, 致死率高达 40%~70%^[8]。针对 CRKP 检出率呈现快速上升趋势, CRKP 感染造成的较高的死亡率及 CRKP 感染的暴发流行, 迫切需要加强对 CRKP 医院感染的前瞻性监测, 特别是医疗机构 CRKP 暴发流行对医院感染防控提出了更高的要求及挑战, 为积极应对微生物耐药带来的挑战, 近年来, 宏基因组二代测序技术 (metagenomic next-generation sequencing, mNGS) 在临床感染性疾病的诊断中应用越来越广泛, 医学界也在探讨如何获得感染性疾病的病原学依据, 但是在医院感染防控中应用还比较少。2024 年 4 月 3~26 日本院微生物室报告, ICU 在 23 天内检出 6 例 CRKP 菌株, 医院感染管理科立即启动医院感染暴发应急处置预案, 进行流行病学调查和 mNGS 快速溯源, 控制 CRKP 感染暴发, 保障了患者安全, 现报告如下:

1 资料与方法

1.1 病例资料

该院 ICU 在 2024 年 4 月 3~26 日期间共收治 32 名危重症患者, 此 32 名患者均在入院当天进行了肛拭子 CRE 主动筛查, 肛拭子主动筛查发现 1 例 CRKP 定植患者, 而 5 名进行呼吸机辅助通气的患者出现咳嗽、咳痰等感染征象, 遂从声门下吸气管采集深部痰标本送检, 也检测出 CRKP 菌株, 为进行溯源和精准抗感染治疗, 将上述 6 例患者标本进 mNGS 检测。本研究通过该院伦理审查委员会批准[2024 伦申第 (006)]。

1.2 标本采集及实验室检测方法

1.2.1 病原学检测及药敏试验

微生物室采用法国生物梅里埃公司 VITEK-2 全自动细菌鉴定及药敏分析系统对临床各科室送检的血液、痰液、尿液、分泌物等标本进行细菌鉴定和药敏分析, 质控菌株为肺炎克雷伯菌 ATCC700603。结果判读参照美国临床实验室标准化协会标准^[9]。

1.2.2 标本采集

①主动筛查: 由经过培训的床位医生或床位护士采集肛拭子并送检获得定植菌。②按照病情需要进行采集血、痰液、肺泡灌洗液、引流液、尿液等标本采集并送检, 标本采集及送检流程参照《临床微生物标本采集和送检指南》^[10]进行。

1.2.3 mNGS 检测

将 6 例患者的标本送至华大基因进行 mNGS 二代测序, 分析标本中微生物并与数据库原核酸序列进行比较、鉴定。

1.3 调查方法

1.3.1 现场流行病学调查

2023 年 4 月 23 日, 微生物室人员从送检标本中检测出 5 株 CRKP 菌株, 立即电话报告感染管理科, 医院感染管理科立即成立调查小组, 启动医院感染暴发应急处置预案。

1.3.2 结果判定

根据《医院感染诊断标准 (试行)》^[11]和《医院感染暴发控制指南》^[12], 判断是医院感染暴发还是医院感染聚集或是假暴发。

1.3.3 环境卫生学监测

感染管理专职人员立即对可疑污染的 ICU 床单元、护士站电脑键盘、鼠标、门把手以及医务人员手等点位进行环境微生物采样, 用浸有相应中和剂的无菌拭子进行涂抹采样, 采样后立即送至微生物室置于 37℃ 温箱培养 48 小时, 观察菌落情况, 对可疑菌株进行菌株鉴定和药敏试验。

1.3.4 医院感染控制措施

①立即成立由医务处、护理部、感染管理科及 ICU 科室医务人员组成的多学科协作小组; ②进行单间或床边隔离; ③严格执行手卫生; ④合理使用耐碳青霉烯类药物; ⑤医疗用品专人专用; ⑥规范处置医疗废物;

⑦环境卫生清洁消毒。

1.4 统计学方法

应用 SPSS21.0 行数据统计，计数资料、计量资料分别采用 χ^2 、t 检验，以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 流行病学特征

2.1.1 人群分布

ICU 在 2024 年 4 月 3~26 日共收治 32 名患者，年龄 45~92 岁，平均年龄（64±1.16）岁，标本情况：4 例为声门下吸引深部痰标本、1 例为肺泡灌洗液的标本、1 例是入院即主动筛查 CRE 肛拭子标本（定植患者）。上述 6 例患者均接受气管插管辅助通气和进行

声门下吸引，基本情况见表 1。

2.1.2 时间分布

4 月 1 日，病例 1 由医养结合院转入 ICU，入院当日送检痰培养，首次检出 CRKP 时间<48h（判断为社区感染），病例 2、4、5、6 检出时间相对较集中，在<1W 内检出。结合临床症状，病例 3 判定为定植。见表 1。

2.1.3 空间分布

6 例 CRKP 定植及感染患者在 ICU 的空间分布如图 1 所示：6 例患者均住在敞开式的大房间左右 2 个区域。病例 1 于 4 月 3 日检出（社区感染），病例 3 于主动筛查检出即搬至 14 床、病例 5 检出 CRKP 后，病例 5 搬至隔离单间，各患者病床周转情况及分布见图 1。

表 1 ICU 检出 6 例 CRKP 患者的基本信息

序号	年龄	性别	入 ICU 时间	标本类型	检出时间	气管插管	使用碳青霉烯类药物	疾病转归
病例 1	92	女	2024 年 4 月 1 日	痰	4 月 3 日	是	是	死亡
病例 2	68	男	2024 年 4 月 14 日	痰	4 月 20 日	是	是	出院
病例 3	45	男	2024 年 4 月 17 日	肛拭子	4 月 19 日	是	否	出院
病例 4	71	女	2024 年 3 月 19 日	痰	4 月 8 日	是	是	出院
病例 5	53	男	2024 年 4 月 4 日	痰	4 月 16 日	是	是	转科
病例 6	56	男	2024 年 4 月 15 日	肺泡灌洗液	4 月 20 日	是	是	出院

注：病例 3 入院 24 进行主动筛查 CRKP 定植，病例 1 由医养结合院转入 ICU，入院即采集痰标本检出 CRKP（社区感染）

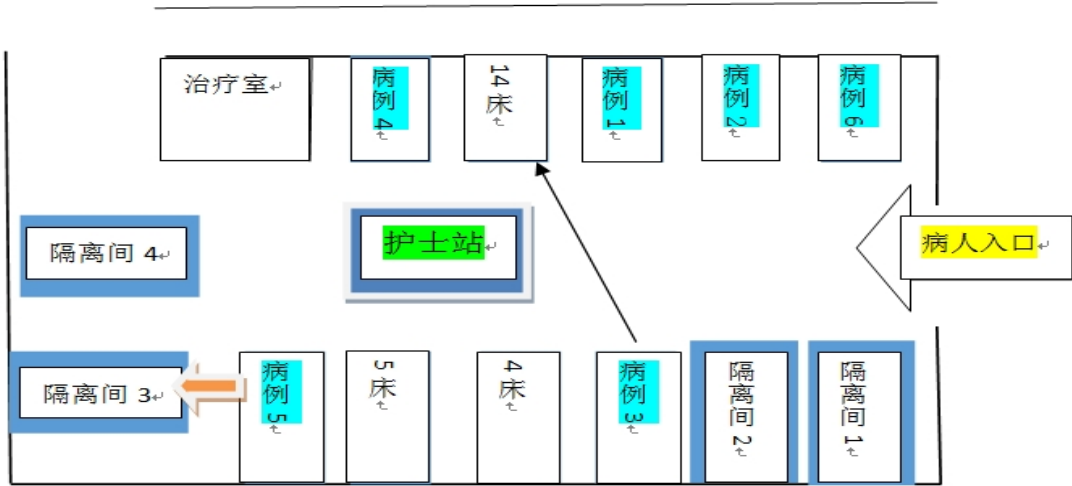


图 1 ICU 6 例检出 CRKP 患者的空间分布图

2.2 主动筛查菌株情况

自 2024 年 1 月开始，在 ICU 新入院患者开展 CRE 肛拭子主动筛查，至 4 月 30 日共筛查了 156 名病人 182 份标本，其中 CRE 阳性率为 2.19%（4/182），其中 CRKP 阳性率 0.55%（1/182）。

2.3 mNGS 检测结果

6 例患者的标本培养分离出 β -内酰胺酶类耐药基因 CTX，经专家综合判断 4 例患者为医院感染，1 例患者社区感染，1 例定植。

2.4 环境卫生学监测结果

专职人员对 ICU 环境物体表面采样共 96 份标本, 其中有 4 份标本中检出 CRKP 菌株, 阳性率为 4.16%, 主要集中在患者床单元床栏、枕头、高频接触表面心电图监护仪旋钮, 集尿袋表面。医务人员手卫生依从性 82.6% (76 / 92)。

2.5 感染控制措施实施效果

通过感染控制措施的实施。除 1 名社区感染的高龄患者死亡, 5 例患者预后较好, 相继出院和转出 ICU。患者疾病专柜情况见图 1。

3 讨论

近年来, 多家医疗机构出现了 CRKP 医院感染聚集或医院感染暴发^[13-15], 但因同源性鉴定技术和设备不完善, 确定医院感染暴发较为困难, 本研究在本院微生物室提示 23 天内检出了 6 株 CRKP, 有医院感染暴发的可能, 立即启动医院感染暴发现场处置预案, 并开展了 mNGS 在耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染暴发精准溯源及传播路径追踪的应用研究科技重大项目研究, 研究结果显示: 6 例患者的标本培养分离出 β -内酰胺酶类耐药基因 CTX, 其中 1 例是社区感染, 而且此患者高龄, 是本时间段内检出的第 1 例 CRKP 感染患者, 可能是感染源。因此, 提醒感染控制部门不但要做好 CRKP 医院获得性感染, 同时, 也不要忽视社区获得感染 CRKP, 加强对社区感染 CRKP 的关注。本研究 6 例 CRKP 感染的患者。其中 1 例是在 ICU 新入院患者的行肛拭子主动筛查的患者中检出, 对主动筛查的 CRKP 定植的患者也应引起高度的重视, 一旦检出 CRKP 定植病例, 也要及时采取隔离、手卫生, 适时去定植等措施的干预, 可减少院内交叉感染传播的风险^[16,17]。

当出现感染暴发时, 对于暴发的风险科室则需要开展环境、物体表面及床单元的主动筛查和适当的增加筛查的频次^[18,19]。本研究共采集 96 份环境标本, 4 份检出 CRKP, 阳性率为 4.16%, 主要集中在患者床单元床栏、枕头、高频接触表面心电图监护仪旋钮, 集尿袋表面。从环境卫生学采样结果也暴露出 ICU 对环境清洁消毒的重视度不够, 有研究显示^[20,21], 洗手池及水龙头也是碳青霉烯类耐药的革兰阴性杆菌重要的污染源, 因此, 在出现 CRKP 医院感染暴发时, 除对患者居住床单元周围的环境、物体表面进行采样外, 还需对洗手池的内、外表面、水龙头和排水管等部位进行全面细致的筛查, 并做好平时的清洁消毒处理。

mNGS 目前在临床感染性疾病的诊断中应用越来越广泛, 基因组测序的应用包括确定病原体种类, 进行同源性分析, 通过同源性分析, 可以发现和确认传染源,

进行精准溯源, 如 Buytaers 等^[22]第一次在沙门菌食源性暴发调查中提出使用宏基因组方法研究食品污染, 并将食物来源与病原体联系起来, Mu 等^[23]结合四核苷酸频率谱的方法对医院内感染耐碳青霉烯肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 患者的粪便样本和直肠拭子样本进行宏基因组检测, 该研究基于宏组方法确定了样本中肺炎克雷伯菌的多位点序列分型为 ST258, 与纯培养分离株的型别一致; 成功实现了宏基因组菌株水平的院内感染暴发溯源分析。本研究结果显, 6 例患者的标本培养分离出 β -内酰胺酶类耐药基因 CTX, 基于株水平的宏基因组学方法进行疫情暴发病原体溯源分析, 不仅能准确识别菌株间亲缘关系, 还能节省样本分离纯培养时间^[24], 同时有助于更全面发现具有潜在风险的细菌物种, 在传染病监测和疫情防控等方面具有重要的应用价值。

目前, 大家都高度重视医院感染问题, 但有时候这仅是表面现象, 实际上对于院感发生的原因没有调查清楚。如何预防及控制多重耐药菌是感控工作的重点环节, 如何从全流程及重点环节做好多重耐药菌防控也是我们需要思考的问题。因此, 在院感工作中要充分应用目前比较成熟的基因检测技术, 慎重、准确、明智地应用当前所能获得的所有科学证据, 以及最佳研究依据, 结合指南和当地医院的具体情况, 采取个体化的院感防控措施, 实施精准院感防控。对于感染侵入性操作多、住院时间长、使用免疫抑制剂等高风险人群可采取主动筛查的方法, 有条件可开展 mNGS/PFGE 等分子流行病学根据同源性判断克隆株传播情况, 合理、有效、科学落实接触隔离医嘱, 使用科学循证思想根据科研实验结果因地制宜的制定适合自身医疗机构的感染防控策略。

展望, 基因组测序的应用包括确定病原体种类, 进行病原体同源性分析。通过同源性分析, 可以发现和确认传染源, 追踪耐药菌如 CRKP 在不同医院之间 (区域内) 的传播以及医院内部之间的传播, 还可通过对 CRKP 感染的暴发基因测序, 以确认 CRKP 院感的发生到底是输入的细菌引起的传播还是院内已经存在的一个持续传播的耐药菌性对患者及环境中的 CRKP 细菌基因组存不存在同源性, 都需要通过对院感关键环节的监测, 利用新技术、新理念为院感工作赋能, 来解决当前多重耐药菌等感染性疾病的难点问题。因此, 在 CRKP 感染患者中早期筛查出 CRKP 定植菌及感染, 利用 mNGS 进行同源性检测, 早发现、早隔离、进行精准防控及治疗, 在降低 CRKP 感染发病率及控制 CRKP 感染暴发起到关键的作用。

参考文献

- [1] Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel hydrolyzing beta lactamase, KPC1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001, 45(4):1151-1161.
- [2] Wei Z Q, Du XX, Yu YS, et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China [J]. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51(2):763-765
- [3] 胡必杰. 中国碳青霉烯耐药革兰阴性菌(CRO)感染预防与控制技术指引[J]. *中华医院感染学杂志*, 2019, 29(13): 2075-2080.
- [4] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3):318-327.
- [5] 彭雪儿, 李六亿, 孙立颖. 2011-2017 年北京某三级综合医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染流行病学特征 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2020; 30(22):3366-3371.
- [6] CHINET. 肺炎克雷伯菌对亚胺培南和美罗培南的耐药变迁 [EB/OL]. (2022-01-01) [2022-12-31]. <http://www.chinets.com/Data/GermYear/2022> 年 CHINET 三级医院细菌耐药监测. PPT.
- [7] Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis [J]. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18(3):318-327.
- [8] 胡小品, 袁国航, 吴瑶瑶, 等. 中国西南地区 3 所综合性医院耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌流行病学特征及耐药性 [J]. *中国感染控制杂志*, 2022, 21(2):121-127.
- [9] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing-30th edition [EB/OL]. [2022-11-12]. <https://webstore.ansi.org/standards/cls/clsim100ed30>.
- [10] 中华预防医学会医院感染控制分会. 临床微生物标本采集和送检指南 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2018, 28(20): 3192-3200.
- [11] 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]. (2001-11-07).
- [12] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 医院感染暴发控制指南: WS/T524-2016 6 [S] 北京: 中国标准出版社, 2016.
- [13] 文江力, 易竟, 梅涛, 等. 神经外科耐碳青霉烯类肠杆菌医院感染耐药特征及危险因素 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2022, 32(21):3273-3277.
- [14] 王鹏, 谢晖, 杨文娟, 等. 某医院 ICU 疑似耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌医院感染暴发调查与控制 [J]. *安徽预防医学杂志*, 2023, 29(5):389-393.
- [15] 韩颖, 赖晓全, 徐敏, 等. 神经内科 ICU 耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌感染疑似暴发调查与控制 [J]. *中国感染控制杂志*, 2023, 22(5):569-573.
- [16] 郭琳雯, 黄文治, 曾妮, 等. 我国医疗机构院内碳青霉烯类耐药菌预防与控制策略的 Meta 分析 [J]. *华西医学*, 2024, 39(3):392-398
- [17] 刘银梅, 王欣, 杨惠英, 等. 成人肠道 CRE 定植病例医院感染发病率的 meta 分析 [J]. *中国感染控制杂志*, 2024, 23(5): 592-599.
- [18] 白寒霜, 吴晓琴, 郭文丹, 等. 耐碳青霉烯类肠杆菌主动筛查及多学科协作管理模式研究进展 [J]. *中华医院感染学杂志*, 2023, 33(22):3499-3504.
- [19] World Health Organization. Guidelines for the Prevention and control of carbapenem-resistant strain of *Enterobacteriaceae* *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* in healthcare facilities [EB/OL]. (2018-02-23) [2023-07-11]. <http://www.who.int/infection-prevention/publications/guidelines-cre/em/>.
- [20] 中国碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染诊治与防控专家共识编写组, 中国医药教育协会感染疾病专业委员会, 中华医学会细菌感染与耐药防控专业委员会. 中国碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌感染诊治与防控专家共识 [J]. *中华医学杂志*, 2021, 10(36):2850-2860.
- [21] Qiao F, Wei L, Feng Y, et al. Hand washing sink contamination and carbapenem-resistant and *Klebsiella* infection in the intensive care unit: a prospective multicenter study [J]. *Clin Infect Dis*, 2020, 71(suppl(4)):S379-S385
- [22] Buytaers FE, Saltykova A, Mattheus W, et al. Application of a strain-level shotgun metagenomics approach on food samples: resolution of the source of a *Salmonella* food-borne outbreak [J]. *Microb Genom*, 2021, 7(4):000547.
- [23] Mu A, Kwong JC, Isles NS, et al. Reconstruction of the genomes of drug-resistant pathogens for outbreak investigation through metagenomic sequencing [J]. *mSphere*, 2019, 4(1):e00529-18.
- [24] 范鹏超, 刘贺, 巴婧翀, 等. 宏基因组二代测序在耐碳青霉烯类鲍曼不动杆菌医院感染暴发中的应用 [J]. *中国感染控制杂志*, 2024, 23(2):182-187.

版权声明: ©2025 作者与开放获取期刊研究中心 (OAJRC) 所有。本文章按照知识共享署名许可条款发表。

<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



OPEN ACCESS