

• 论 著 •

多重耐药弗劳地枸橼酸杆菌的基因组及耐药机制分析^{*}

黄 蓉^{1,2}, 段小女¹, 芮勇宇^{1△}

1. 南方医科大学附属南方医院检验科, 广东广州 510000; 2. 广州市番禺区妇幼保健院检验科, 广东广州 511490

摘要:目的 对多重耐药弗劳地枸橼酸杆菌进行全基因组分析, 为研究其耐药机制提供依据。方法 采用含美罗培南的 MH 培养基对粪便标本进行初筛, 经 BD Phoenix100 全自动微生物鉴定仪进行菌种鉴定及药敏试验, 提取耐药菌总 DNA 进行二代测序和细菌多位点序列分型(MLST), 经质粒全基因组序列分析检测质粒的组分和功能, 并与参考质粒进行比较, 通过质粒接合转移实验分析耐药质粒传递情况。结果 413 份粪便标本中分离出 1 株多重耐药弗劳地枸橼酸杆菌, 该菌株对头孢菌素类、碳青霉烯类抗菌药物、复方磺胺甲噁唑的耐药率均为 100%, 对氨曲南、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素等抗菌药物呈现不同程度耐药; MLST 分型的耐药弗劳地枸橼酸杆菌为 ST22 型, 该菌株共含有 5 412 个基因, 含耐药基因 367 个, 包括碳青霉烯酶类耐药基因、AmpC 酶基因、大环内酯类耐药基因、氨基糖苷类耐药基因、喹诺酮类耐药基因等。质粒的全基因组分析结果显示, 该质粒含碳青霉烯类耐药基因 blaNDM-1、blaSHV12, 该质粒与泄殖腔肠杆菌菌株 ECN49 质粒和肺炎克雷伯菌菌株质粒 pA575-NDM 有极高的同源性; 质粒接合实验显示, blaNDM-1 和 blaSHV-12 可以通过质粒转移。**结论** 弗劳地枸橼酸杆菌耐药的主要原因之一是含有 blaNDM-1、blaSHV-12 等耐药基因, 并且该耐药性可通过质粒进行水平转移。

关键词: 弗劳地枸橼酸杆菌; 全基因组分析; 耐药基因; 质粒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2024.07.005

文章编号: 1673-4130(2024)07-0785-05

中图法分类号: R446.5

文献标志码: A

Genome and resistance mechanism analysis of multidrug-resistant *Citrobacter freundii*^{*}

HUANG Rong^{1,2}, DUAN Xiaonyu¹, RUI Yongyu^{1△}

1. Department of Clinical Laboratory, Nanfang Hospital Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Panyu Maternal and Child Care Service Centre of Guangzhou, Guangzhou, Guangdong 511490, China

Abstract: Objective To analyze the whole genome of multidrug resistant *Citrobacter freundii* and to provide a basis for the study of its drug resistance mechanism. **Methods** The fecal samples were screened with MH medium containing meropenem, strains were identified and drug susceptibility tested by BD Phoenix100 automatic microbial identification apparatus. The total DNA of drug-resistant bacteria was extracted for second-generation sequencing and bacterial multi-site sequence typing (MLST). The components and function of the plasmids were detected by whole genome sequence analysis. Compared with the reference plasmid, plasmid conjugation transfer assay was used to analyze the transmission of drug-resistant plasmid. **Results** One strain of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* was isolated from 413 fecal samples. The resistance rate of the strain to cephalosporins, carbapenems and compound sulfa methoxazole was 100%, and it showed different degrees of resistance to amtronom, ciprofloxacin, levofloxacin and gentamicin. The drug-resistant *Citrobacter freundii* of MLST type was ST22. The strain contained 5 412 genes, including 367 drug-resistant genes, including carbapenem enzyme resistance genes, AmpC enzyme genes, macrolide resistance genes, aminoglycoside resistance genes, quinolone resistance genes, etc. The whole genome analysis of the plasmid showed that the plasmid contained carbapenem resistance genes blaNDM-1 and blaSHV12. The plasmid had high homology with *Enterobacter cloacae* strain ECN49 and *Klebsiella pneumoniae* pA575-NDM. Plasmid conjugation experiments showed that blaNDM-1 and blaSHV-12 could be transferred by plasmid. **Conclusion** One of the main causes of drug resistance of *Citrobacter freundii* is that it contains blaNDM-1, blaSHV-12 and other resistance genes, and the resistance can be transferred horizontally through the plasmid.

Key words: *Citrobacter freundii*; whole genome analysis; drug-resistant genes; plasmid

* 基金项目: 广东省自然科学基金项目(2021A1515012249)。

作者简介: 黄蓉, 女, 主管技师, 主要从事临床检验与微生物检验研究。 △ 通信作者, E-mail: yongyuruigroup@sina.com。

弗劳地枸橼酸杆菌(以下简称 CF)属于肠道菌属,条件致病,在自然环境中广泛分布,人、畜、鱼类也可正常携带^[1]。该菌主要引起呼吸道和尿路感染,近年来也经常有报道 CF 导致聚集性腹泻的案例^[2]。老年人、重症、新生儿等免疫力低下者易感,且感染的后果相对严重^[3]。此外,该菌对医院的常规消杀具有一定抵抗作用,是院内感染重要病原菌之一^[4],尤其是创伤性手术后的院内感染,重症率较高,病情严重^[5]。CF 的致病机制主要有黏附、侵袭、免疫逃逸、细胞毒性^[6]等,耐药机制有产生耐药酶、改变药物靶点结构、调节细胞膜的通透性、减少药物的摄取及药物外排等^[7]。这些功能主要由 CF 的毒力基因和耐药基因调控^[8]。由于耐药基因可以通过整合子、质粒、转座子等可移动性基因元件水平传播,近年来临床感染 CF 的比例也有所增高^[9]。

全基因组测序是近年来发展很快的一种基因检测技术^[10],此技术可对菌株的遗传信息进行分析,进一步检测耐药基因、毒力基因等,并能够预测未知的潜在的耐药基因和毒力基因。目前,全基因组测序应用较广的是二代测序和三代测序,二代测序单碱基检测准确率高,但读长短,拼接和扩增过程易引入错配碱基,三代测序读长较长,但单碱基错误率很高,因此,本研究将二代和三代测序技术结合起来,以实现高质量的组装和测序^[11]。本研究拟分析多重耐药 CF 的质粒,探讨质粒所含的耐药基因与毒力基因、分子遗传与传播方式等,为 CF 感染的防控提供理论依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2017 年 7 月至 2019 年 6 月南方医科大学附属南方医院检验科 413 例就诊者的 413 份粪便剩余标本。将标本分别接种于含 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南的 MH 培养基(自配)对碳青霉烯类抗菌药物美罗培南不敏感的革兰阴性杆菌进行初筛,共筛选出 5 株耐碳青霉烯类细菌(CRE),筛选出的菌株经纯培养后采用纸片法冻存于-80 °C 冰箱。

1.2 仪器与试剂 BD Phoenix™ 全自动微生物分析系统、Phoenix™ PMIC/ID 革兰阳性菌鉴定/药敏复合板(美国 BD 公司);美罗培南(北京索莱宝科技有限公司);MH 琼脂粉(青岛高科园海博生物技术有限公司);替加环素 E-test[天康信(北京)科技有限公司];Ezup 柱式细菌 DNA 提取试剂盒(上海生工生物工程股份有限公司);PCR 仪(德国 Eppendorf 公司);核酸蛋白分析仪 Nanodrop 2000(美国 Thermo 公司);QIAGEN 细菌全基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒(北京天康信科技有限公司);PCR、测序试剂(上海生工生物工程股份有限公司、深圳海一时代基因科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 菌株的鉴定和药敏试验 复苏保存的 5 株 CRE,纯培养活化后配制成 0.5 麦氏浓度的菌悬液,

使用 BD Phoenix™ 全自动微生物分析系统和 Phoenix™ PMIC/ID 革兰阴性菌鉴定/药敏复合板进行菌种鉴定及药敏试验获得最低抑菌浓度(MIC),并加做替加环素 E-test 药敏试验,筛选出多重耐药的 CF 1 株。质控菌株:大肠埃希菌 ATCC 25922、铜绿假单胞菌 ATCC 27853。试验操作过程严格按照说明书和标准作业程序(SOP)操作。

1.3.2 质粒耐药基因的检测 用 QIAGEN 细菌质粒试剂盒提取质粒后,对质粒 DNA 进行碳青霉烯类耐药基因的特异性 PCR 扩增,获取常见碳青霉烯酶基因扩增检测常见碳青霉烯酶基因 blaKPC、blaNDM、blaVIM、blaIMP、blaSPM、blaOXA-48 和常见的 ESBL 基因 blaCTX-M、blaTEM、blaSHV。

1.4 菌株的全基因组分析

1.4.1 二代测序法检测菌株耐药基因 使用 Ezup 柱式细菌 DNA 提取试剂盒提取该细菌 DNA,进行琼脂糖凝胶电泳, Nanodrop 检测 DNA 纯度分析。将 DNA 送公司测序,并通过细菌多位点序列分型(MLST)对 CF 进行同源性分型;使用 BLAST 软件,把目标基因输入 CARD 数据库进行比对,获取相关耐药基因并注释耐药信息。

1.4.2 质粒全基因组测序、组分与功能分析 将质粒 DNA 结合二代、三代测序技术进行全基因组测序、质粒组装,使用 Unicycler、Circos、SSPACE-LongRead 等软件分析并注释基因信息。

1.4.3 质粒的比较基因组分析 从 GenBank 数据库中下载 KP765744.1(泄殖腔肠杆菌菌株质粒 ECN49)、MH917283.1(肺炎克雷伯菌菌株质粒 pA575-NDM)、JN247852 质粒(肺炎克雷伯菌质粒 pIncX-SHV)的全基因组序列,与本质粒 pNFYY061 进行比较及基因组学分析,主要有共线性分析、单核苷酸多态性(SNP)检测、注释 InDel 检测及共有和特有基因分析、基因家族分析、物种进化分析和同源性分析。

1.5 质粒接合转移实验 利用肉汤法将筛选出的 CF 作为供体菌、EJ53 为受体菌进行质粒接合转移。首先,将供体菌和受体菌分别接种于含有 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南的 MH 平板上和含 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 叠氮化钠的 MH 平板上,置于 35 °C, 5% CO₂ 的恒温孵箱中过夜培养后,挑取供体菌和受体菌的单个纯菌落分别接种于已高压灭菌的 5 mL LB 肉汤中,置于 35 °C, 150 r/min 恒温摇床中 16~18 h;第二步,分别吸取肉汤培养的供体菌和受体菌各 0.5 mL 菌悬液,分别再接种 4.5 mL 新鲜 LB 肉汤培养基中,供体菌静止培养 4 h,受体菌摇床培养 4 h;第三步,混合培养:将供体菌和受体菌各 0.5 mL 菌悬液加入至 4 mL LB 肉汤中,静止培养 18 h;第四步,取 100 μL 接合前和接合后原菌液,以及稀释 10 倍、100 倍菌液均匀涂布于含抗菌药物的 MH 琼脂平板上(2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 美罗培南和 150

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 的叠氮化钠), 35 °C 孵箱过夜培养; 第五步, 挑取单个菌落接种于筛选平板, 纯化后保存菌种; 第六步, 进行接合菌的鉴定及药敏试验, 将接合菌纯菌落制备成 0.5 麦氏浓度菌悬液, 使用 BD Phoenix™ 全自动微生物分析系统进行菌种鉴定及药敏试验; 第七步, PCR 法进行接合菌耐药基因的检测。

2 结 果

2.1 鉴定结果 413 份粪便标本中筛选出的 5 株 CRE, 检出率为 1.21% (5/413), 5 株 CRE 分别来源于不同科室, 其中肺炎克雷伯菌 2 株, 大肠埃希菌 2 株, 耐碳青霉烯类 CF(CRCF)1 株。

2.2 药敏结果 BD Phoenix™ 上机结果、K-B 法以及 E-test 显示, 5 株 CRE 对头孢菌素类、碳青霉烯类抗菌药物、复方磺胺甲噁唑均耐药, 对氨曲南、环丙沙星、左氧氟沙星、庆大霉素等抗菌药物呈现不同程度耐药, 其中, 鉴定为 CF 菌的菌株对阿米卡星敏感, 但对以上抗菌药物均耐药。见表 1。

表 1 供体菌 CF 对 10 种抗菌药物的 MIC 及药敏试验结果

抗菌药物	CF(mg/L)	药敏判断
头孢唑啉	64	耐药
头孢吡肟	64	耐药
氨曲南	64	耐药
阿米卡星	2	敏感
庆大霉素	16	耐药
环丙沙星	4	耐药
左旋氧氟沙星	8	耐药
复方磺胺甲噁唑	320	耐药
阿莫西林/克拉维酸	32	耐药
亚胺培南	16	耐药

2.3 质粒耐药基因检测 经特异性 PCR 法检测该菌株质粒上耐碳青霉烯类抗菌药物耐药相关基因有 blaNDM-1、blaSHV-12。

2.4 CF 菌株 DNA 测序和 MLST 分型 经 MLST 分型该菌株属于 ST22 型, 共含有 5 412 个基因, 注释 CARD 的耐药基因一共有 367 个。其中, 碳青霉烯酶

类耐药基因、AmpC 酶基因、大环内酯类耐药基因、氨基糖苷类耐药基因、喹诺酮类耐药基因等。见表 2。

2.5 质粒全基因组测序、组分与功能分析

2.5.1 质粒组装结果 样品组装后得到 1 条成环质粒 NFYY061 和 1 个质粒片段 NFYY061-P1seg。见表 3。

2.5.2 基因组分与功能分析结果 成环质粒 pNFYY061 共预测到 69 个编码基因, 有耐药基因 2 个, 为金属 β -内酰胺酶 (MBL) 基因 blaNDM-1 和超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs) 基因 blaSHV-12, 其他致病相关基因 15 个; NFYY061 还预测到 2 个基因岛: GIs01 长 10 506 bp, 包括 13 个基因, 此岛上有如 blaSHV12、热休克蛋白家族 HSP60 的伴侣蛋白 GroEL 等一些耐药和毒力相关的基因; GIs02 长 7 793 bp, 包含 15 个基因, 只注释到了一个起始密码子, 其余都是假设蛋白。质粒片段 NFYY061-P1seg 共预测到 65 个编码基因, 其中耐药基因 0 个, 毒力相关的基因有 30 个, 这个质粒片段上也预测到了 2 个基因岛: GIs01 长 7 319 bp, 含 9 个蛋白, 主要编码膜转运相关蛋白, 有 2 个致病相关基因; GIs02 长 9 737 bp, 含 14 个基因, 主要编码致病相关的汞离子转运蛋白。

表 2 CF 的耐药基因携带情况

耐药基因类型	耐药基因名称
碳青霉烯酶耐药基因	TEM-1、SHV-12、BRP (MBL)、LRA-19、NDM-1
AmpC 酶基因	CMY-48、CMY-49
大环内酯类耐药基因	mphA、Mrx
氨基糖苷类耐药基因	AAC(3)-Iia、AadA、APH(6)-Ic、arlR
喹诺酮类耐药基因	QnrB61、QnrS1
磺胺类耐药基因	Sul1、Sul2、Sul4
四环素耐药基因	tet(59)、tet(D)、Tet32、tet34、tetA、tetM、tetT、tetS
氯霉素耐药基因	CmlB
甲氧苄啶耐药基因	dfrA1、dfrA12、dfrA3
利福平耐药基因	iri

表 3 质粒组装结果

质粒 ID	全长(bp)	是否成环	基因大小(bp)	基因个数(个)	累加长度(bp)	平均长度(bp)	编码长度比例(%)
pNFYY061	54 034	成环	54 034	69	46 446	673	85.96
NFYY061-P1seg	57 192	不成环	57 192	65	47 385	729	82.85

2.6 比较基因组分析结果

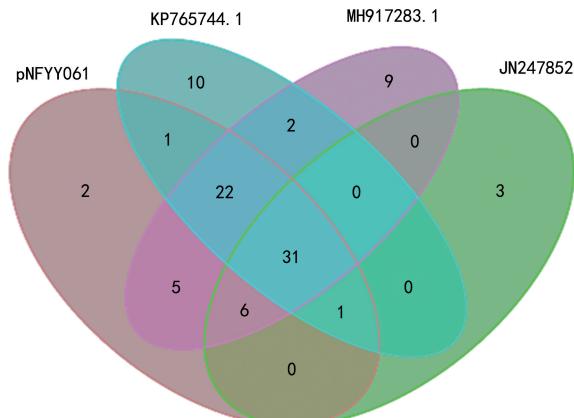
2.6.1 共线性分析结果 CF 质粒基因组与参考质粒 JN247852、KP765744.1、MH917283.1 基因组之间均具有较强的共线性关系。

2.6.2 SNP 检测及 InDel 检测结果 与参考质粒比

较, 耐药基因 blaSHV2 上有 11 个 SNP 位点, 5 个 InDel 位点。

2.6.3 共有和特有基因分析结果 通过比较质粒 pNFYY061 基因组和参考质粒基因组的蛋白序列, 构建了基因组间的 Core 和 Pan 基因集, 质粒 pNFYY061

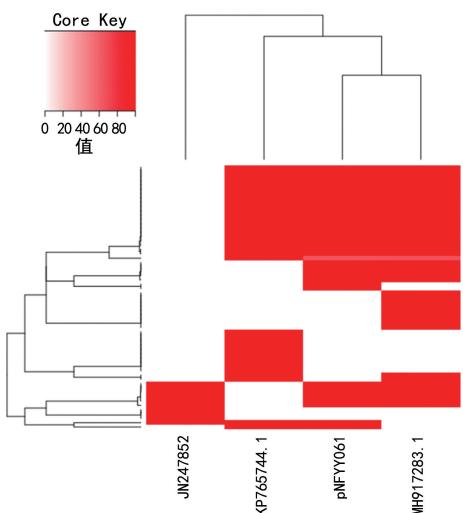
FY061 基因组和参考质粒 JN247852、KP765744. 1、MH917283. 1 基因组的共有和特有基因关系见 Venn 图(图 1)。



注:每个椭圆表示一个样品,每个区域上的数据表示在且仅在此区域的样品中出现的 cluster 的个数,一个 cluster 表示一组具有大于 40% 相似性、序列长度差异低于 0.4 的基因集。

图 1 基因组的 Core/Pan 基因数目 Venn 图

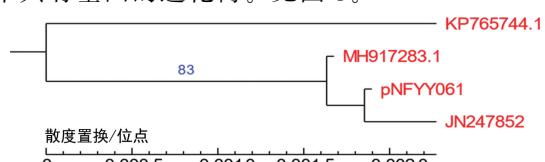
根据非共有基因在不同样品中的分布绘制热图,见图 2。由此可知,非共有基因在质粒 pNFYY061 中的分布与参考质粒 KP765744. 1、MH917283. 1 较近,与参考质粒 JN247852 较远。



注:图片下方对应每个样品 ID,左方为非共有基因的聚类树,上方为样品的聚类树,中间为基因覆盖度热图,不同覆盖度以不同颜色表示,颜色与覆盖度的对应关系见图例。

图 2 非共有基因在不同样本中的分布热图

2.6.4 物种进化分析结果 基于质粒 pNFYY061 和参考质粒 JN247852、KP765744. 1、MH917283. 1 的 31 个共有基因的进化树。见图 3。



注:分支上的数字表示分支可信度,值越接近 100 表示可信度越高;分支长度表示进化距离的大小,进化距离以平均每个核苷酸的替换次数来计算。

图 3 基于 pNFYY061 与参考质粒共有基因的进化关系图

2.6.5 同源性分析结果 比较 pNFYY061 的基因组和参考质粒 KP765744. 1、MH917283. 1 基因组之间的同源性关系,其同源性结果见表 4。由此可知,质粒 pNFYY061 和参考质粒 KP765744. 1、MH917283. 1 间的同源性较高(ANI>95%)。

表 4 pNFYY061 同源性分析结果(%)

质粒序列号	KP765744. 1	MH917283. 1	pNFYY061
ANI 值(BLAST)			
KP765744. 1	*	99.69	99.68
MH917283. 1	99.74	*	100
pNFYY061	99.72	100	*
ANI 值(MUMmer)			
KP765744. 1	*	99.72	99.71
MH917283. 1	99.72	*	99.99
pNFYY061	99.71	99.99	*

注: * 表示同一质粒不进行比较。

2.7 质粒接合转移实验 阳性接合子经 PCR 法可检测到 blaNDM-1、blaSHV-2,且药敏试验显示对美罗培南的 MIC 大于 2 μ g/mL,对碳青霉烯类抗菌药物耐药。

3 讨 论

CF 为条件致病菌,机体抵抗力下降时可引起腹泻和肠道外感染如脑膜炎、败血症、泌尿道、呼吸道以及创伤感染等^[12],尽管新生儿和免疫功能低下患者感染枸橼酸杆菌的风险已引起了临床的关注^[13],但相较于其他肠杆菌,枸橼酸杆菌的发病率较低。近年来,枸橼酸杆菌引起的感染逐渐增加,呈现出多重耐药的特性,但据中国耐药监测网显示,其发病率仅占肠杆菌感染的 3%~6%,占所有革兰阴性感染的 0.8%^[14],远低于肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等常见致病性的肠杆菌,所以 CF 的感染仍然不受临床重视。目前,国内外对枸橼酸杆菌尤其是 CF 的相关研究报道仍然比较少。本研究从大量患者粪便标本中分离鉴定获得 CF,并进行菌株药敏试验、菌株与质粒 DNA 耐药基因检测和测序、MLST 分型、质粒接合实验、质粒全基因组测序来对多重耐药的 CF 进行全基因组分析。

本研究中显示,413 份临床粪便标本中,只分离出了 1 株 CRCF,表明 CRCF 在人群中的定植率比较低。该 CF 菌株药敏结果显示,该菌株以多重耐药为特点,对临床常用抗菌药物高度耐药;检测到的耐药基因与药敏结果基本相符;该菌株携带的多种耐药基因,包括 β -内酰胺酶类(ESBLs、AmpC 和碳青霉烯类)耐药基因、喹诺酮类和氨基糖苷类耐药基因等,与报道的肺炎克雷伯菌的耐药模式相似^[15];但由于该 CF 对阿米卡星敏感,阿米卡星可能是治疗多耐药 CF 的一种有效药物。在 2017 年《广泛耐药革兰阴性菌

感染的实验诊断、抗菌治疗及医院感染控制中国专家共识》中明确提出,广泛耐药肠杆菌科细菌感染常采用 2 种或 3 种药物联合治疗,即以替加环素及多黏菌素为基础的联合其他类药物的治疗方式来治疗。

本研究采用 MLST 的方法对 CF 进行分型,结果显示该 CF 菌株为 ST22 型,与最近报道的全球流行型 CF 菌株结果一致^[16]。经过二代测序发现,该 CF 菌株上存在多种 β -内酰胺酶类基因,其中 B 类 β -内酰胺酶基因 blaCMY-48 和 blaCMY-49 同时出现在该 CF 菌株上。

本研究对这株多重耐药 CF 的质粒进行了全基因组分析,发现该质粒为 incX3 型,质粒环上同时携带 blaNDM-1 和 blaSHV12,这 2 个基因同时存在于 CF 质粒上,接合实验中,可检测到阳性接合子 blaNDM-1 和 blaSHV-12,且表达出对碳青霉烯类抗菌药物耐药,表明耐药基因位于质粒上,有水平转移的可能。且该质粒与 MH917283.1(肺炎克雷伯菌菌株质粒 pA575-NDM)处于同一进化树分支上,表明该质粒与肺炎克雷伯菌中发现的携带 NDM-1 的质粒有较近的亲缘关系,同时,该质粒与泄殖腔肠杆菌菌株 ECN49 质粒和肺炎克雷伯菌菌株质粒 pA575-NDM 有极高的同源性,说明可能该质粒可在菌种间横向转移。

人体肠道是包括耐药菌的多种细菌的主要储存库,也是重要的抗性基因库,CF 是肠道常见的定植菌和环境菌,这些 CF 本身毒力不高,但是容易累积耐药基因,尤其当宿主暴露在抗菌药物下或长期住院时^[17],除了耐药基因,它们还是累积基因捕获和传播的手段,如整合子、转座子、质粒等,且 CF 对表面活性剂、化学消毒剂、紫外线照射等具有一定抵抗作用,常规消杀不易将其从医疗设备上清除干净,这些累积的基因,可以转移至毒力更高的菌株上,有可能促成细菌病原体的进化^[18]。因此,呼吁相关部门要加强对此类细菌的防控,防止暴发流行。

参考文献

[1] SOLEIMANI M, MASOUMI A, TABATABAEI S A, et al. Citrobacter keratitis: predisposing factors and clinical characteristics [J]. J Ophthalmic Inflamm Infect, 2023, 13(1):3.

[2] 曹妍,任兴钊,苟丽华,等.一起由弗劳地枸橼酸杆菌引起感染性腹泻暴发疫情调查[J].职业卫生与病伤,2018,33(5):4.

[3] 朱玉,张龙,魏取好.弗劳地枸橼酸杆菌的临床分布及其耐药性分析[J].齐齐哈尔医学院学报,2022,43(12):1109-1113.

[4] DZIRI R, KUSKUCU M A, 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]. Mi-crob Drug Resist, 2022, 28(1):18-22.

[5] 周晶,姚杨,田璐,等.2016—2020 年某三甲医院呼吸重症监护室耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌检出、分布及耐药情况分析[J].临床医学研究与实践,2022,7(22):15-19.

[6] HASHIMOTO M, MOGI K, SAKURAI M, et al. Rupture of a dissecting thoracoabdominal aortic aneurysm due to Citrobacter freundii infection[J]. Clin Case Rep, 2021, 9(9):e04719.

[7] WANG L, LI Z, XIAO N, et al. Genetic characterization of bla NDM-1-carrying citrobacter portucalensis sequence type 328 and Citrobacter freundii sequence type 98[J]. Infect Drug Resist, 2022, 15:2235-2242.

[8] ZHANG T, LIN Y, LI P, et al. Characterization of plasmid co-harboring NDM-1 and SHV-12 from a multidrug-resistant Citrobacter freundii strain ZT01-0079 in China [J]. Infect Drug Resist, 2021, 14:947-952.

[9] 张磊,常清利,明朝瑞,等.河南省某三甲医院 980 株碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌分布与耐药性分析[J].河南预防医学杂志,2022,33(5):362-365.

[10] 高雯雯,王莹,梁倩,等.1 株屎肠球菌的全基因组序列测定及比较基因组分析[J].中国现代应用药学,2021,38(21):2639-2646.

[11] 荀秋凤,代富英,曹康,等.全基因组测序后质粒的组装与鉴定研究进展[J].成都医学院学报,2022,17(4):525-529.

[12] 谷美,刘慧敏,孟璐,等.全基因组测序技术在细菌耐药性检测中的研究进展[J].中国乳品工业,2019,47(5):26-31.

[13] LEE R, CHOI S M, JO S J, et al. Clinical characteristics and antimicrobial susceptibility trends in Citrobacter bacteremia: an 11-year single-center experience [J]. Infect Chemother, 2019, 51(1):1-9.

[14] 张磊,常清利,明朝瑞,等.河南省某三甲医院 980 株碳青霉烯耐药肠杆菌科细菌分布与耐药性分析[J].河南预防医学杂志,2022,33(5):362-365.

[15] LESKI T, VORA G J, TAITT C R. Multidrug resistance determinants from NDM-1-producing Klebsiella pneumoniae in the USA[J]. Int J Antimicrob Agents, 2012, 40(3):282-284.

[16] OSEI SEKYERE J, RETA M A. Global evolutionary epidemiology and resistome dynamics of Citrobacter species, Enterobacter hormaechei, Klebsiella variicola, and Proteae clones [J]. Environ Microbiol, 2021, 23 (12): 7412-7431.

[17] 刘真真,贾楠,李笃军,等.新生儿重症监护室分离的碳青霉烯类耐药阴沟肠杆菌的分子流行病学[J].中华医院感染学杂志,2019,29(18):2855-2860.

[18] REZAEI M, AKYA A, ELAHI A, et al. The clonal relationship among the Citrobacter freundii isolated from the main hospital in Kermanshah, west of Iran[J]. Iran J Microbiol, 2016, 8(3):175-180.