

网络出版时间:2022-05-27 12:16

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2022.12.001

网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20220525.1551.001.html

福建省猪源多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 阳性细菌的 耐药特性及分布特征

车勇良,陈秋勇,陈如敬,吴学敏,王隆柏,刘玉涛,周伦江

(福建省农业科学院 畜牧兽医研究所/福建省畜禽疫病防治工程技术研究中心,福建福州 350013)

【摘 要】 【目的】了解福建省猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的流行性、耐药特性及分布特征。【方法】从福建省 7 个地市的 21 个猪场采集 313 份粪便样本,应用 PCR 方法筛选、分离和鉴定 *mcr-1* 基因阳性细菌;采用 K-B 琼脂扩散试验进行药敏检测,分析 *mcr-1* 基因阳性细菌的耐药性,并使用 PCR 方法分析其耐药表型;进一步采用多位点序列分型 (MLST) 方法鉴定 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的类型,使用脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析方法对 *mcr-1* 阳性大肠杆菌进行聚类分析,探明其分布特征和亲缘关系。【结果】从 313 份猪粪便中共分离获得 43 株 *mcr-1* 基因阳性细菌,其中大肠杆菌 39 株。耐药性结果显示,分离菌株对磺胺甲异恶唑、氟苯尼考、链霉素、强力霉素、恩诺沙星、新霉素、阿莫西林、头孢噻肟、林可-壮观、亚胺培南、呋喃妥因、利奈唑胺和替加环素的耐药率分别为 90.1%,83.7%,74.4%,67.4%,67.4%,58.1%,53.5%,39.5%,34.9%,11.6%,4.6%,0 和 0。磺胺类耐药基因中的 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 基因检出率较高,分别达到 81.4%,90.7% 和 74.4%;喹诺酮类耐药基因中仅有 *qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 被检出,其检出率分别为 51.2% 和 30.2%;氯霉素类耐药基因中 *Cat2* 和 *cmlA* 基因的检出率较高,分别达到 86.0% 和 74.4%;氟苯尼考耐药基因 (*floR*) 的检出率为 83.7%;金属 β -内酰胺酶耐药基因 (*NDM-1*) 的检出率为 23.2%;多药耐药基因 (*cfr*) 的检出率为 7.0%;而替加环素耐药基因 (*tet(X)*) 未被检出。39 株 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌除了 4 株不能分型外,其他 35 株共分为 19 个 ST 型,具有高度多样性,其中 ST10 为优势型,共有 9 株菌株。PFGE 图谱显示,39 株 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌共获得 30 种 PFGE 谱型,具有多态性特征,分为 6 组克隆群。【结论】福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌主要为大肠杆菌,少部分为肠杆菌科其他菌株,且分离菌株具有明显的多重耐药性;*mcr-1* 基因阳性大肠杆菌在地域分布上具有多态性和高度多样性特点。

【关键词】 多黏菌素;耐药性;耐药基因;猪源 *mcr-1* 基因阳性菌;福建省

【中图分类号】 S859.7

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2022)12-0001-08

Resistance characteristics and distribution of polymyxin-resistant *mcr-1* gene positive bacteria from swine in Fujian

CHE Yongliang, CHEN Qiuyong, CHEN Rujing, WU Xuemin, WANG Longbai,
LIU Yutao, ZHOU Lunjiang

(Institute of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, Fujian Academy of Agricultural Sciences/Fujian Animal
Diseases Control Technology Development Center, Fuzhou, Fujian 350013, China)

Abstract: 【Objective】 This study aims at understanding the resistance characteristics and distribution of *mcr-1* gene positive bacteria in Fujian. 【Method】 A total of 313 fecal samples from 21 pig farms in 7 cities of Fujian were collected, and *mcr-1* gene positive bacteria was screened, isolated and identified by PCR.

【收稿日期】 2021-12-01

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31872502);福建省农业科学院科研项目(AGY2018-6);福建省 5511 协同创新工程重点项目(XTCXGC2021008)

【作者简介】 车勇良(1976—),男,江西抚州人,副研究员,硕士,主要从事猪病的预防与控制研究。E-mail: cyl19760810@163.com

【通信作者】 周伦江(1973—),男,福建宁德人,研究员,博士,主要从事猪病预防与控制研究。E-mail: lunjiang@163.com

The drug sensitive was tested by K-B agar diffusion test, and the resistance phenotype was analyzed by PCR method. The sequence type (ST) of *mcr-1* gene positive *E. coli* was determined by multilocus sequence typing (MLST) method, and cluster analysis using pulsed field gel electrophoresis (PFGE) was performed to determine the distribution and phylogenetic relationships of *mcr-1* gene positive *E. coli*. 【Result】 A total of 43 strains of *mcr-1* gene positive bacteria were isolated from 313 pig manure, including 39 strains of *E. coli*. The drug sensitive test showed that the resistance rates of these isolates to sulfamethoxazole, florfenicol, streptomycin, doxycycline, enrofloxacin, neomycin, amoxicillin, cefotaxime, linco spectacular, imipenem, nitrofurantoin, linezolid and tegacyclin were 90. 1%, 83. 7%, 74. 4%, 67. 4%, 67. 4%, 58. 1%, 53. 5%, 39. 5%, 34. 9%, 11. 6% and 4. 6%, 0 and 0, respectively. The detection rates of *sul1*, *sul2* and *sul3* genes were 81. 4%, 90. 7% and 74. 4%, respectively. Among quinolone resistance genes, only *qnrS* and *aac(6')-Ib-cr* were detected with detection rates of 51. 2% and 30. 2%. The detection rates of *Cat2* and *cmlA* genes in chloramphenicol resistance genes were 86. 0% and 74. 4%. The detection rate of florfenicol resistance gene was 83. 7%. The detection rates of *NDM-1* and *cfp* gene were 23. 2% and 7. 0%. The tegacyclin resistance gene (*tet(X)*) was not detected. Among the 39 strains, 35 of *mcr-1* gene positive *E. coli* with high diversity were divided into 19 ST types. The ST10 type was dominant with a total of 9 strains. PFGE map showed that these 39 *mcr-1* gene positive *E. coli* obtained 30 PFGE patterns in 6 clone groups with polymorphic characteristics. 【Conclusion】 The *mcr-1* gene positive bacteria from swine in Fujian were mainly *E. coli* with multiple drug resistance and a few were other strains of *Enterobacteriaceae*. The *mcr-1* gene positive *E. coli* showed characteristics of polymorphism and high diversity in regional distribution.

Key words: polyxycin; resistance characteristics; resistance gene; *mcr-1* gene positive bacteria from swine; Fujian province

由于抗生素的滥用,细菌对抗生素的耐药性日趋严重,尤其是多重耐药细菌或“超级”细菌的产生,导致临床上无药可用,给全世界的公共卫生安全带来严峻挑战^[1-2]。耐药性病原菌引起的感染性疾病的发生率和死亡率大大增加,给人类和动物的健康造成了巨大威胁^[3]。多黏菌素是一种阳离子多肽,临床上主要包括多黏菌素 B 和多黏菌素 E,其因对机体有一定的肾毒性,导致在临床上的使用受限,以前仅用于肠道感染严重的病例。然而近年来,多黏菌素作为治疗病原菌感染的最后一道防线,常用于治疗一些多重耐药、尤其是感染产碳青霉烯酶菌株的患者。多黏菌素的使用已有几十年的历史,但由于其未曾广泛用于临床,因此有关其耐药性问题仅有一些零星报道。近几年,由于多重耐药菌株的增多,多黏菌素的使用也随之增加,有关其耐药情况的报道亦随之增多^[4-7]。据报道,细菌对多黏菌素耐药的主要机制是,细菌染色体编码的二元调控系统 *pmrAB* 和 *phoPQ* 的突变以及相关调控基因 *mgrB* 的失活导致细菌脂多糖上的脂质 A 被修饰,从而降低了细菌对多黏菌素的亲和力,引起耐药^[8]。2015 年底多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 首次被发现^[9],该基因是由质粒介导、可以在不同细菌间水平传播的耐

药基因。*mcr-1* 耐药基因一经报道,就引起了世界公共卫生领域研究者的广泛关注,但对 *mcr-1* 基因阳性菌的耐药特性和分布特征却报道甚少。因此,掌握多黏菌素耐药菌的耐药特性和分布特征,对预防和控制此类耐药菌的感染有重要意义。本研究从福建省 7 地市的 21 家猪场采集粪便样品,应用 PCR 方法筛选、分离和鉴定 *mcr-1* 基因阳性细菌,采用 K-B 琼脂药敏试验和 PCR 方法分析其耐药性和耐药表型,用多位点序列分型 (multilocus sequence typing, MLST) 方法鉴定 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的类型,并用脉冲场凝胶电泳分析 (pulsed field gel electrophoresis, PFGE) 方法对这些大肠杆菌进行聚类分析,探明细菌间的亲缘关系,旨在为多黏菌素耐药菌的防控提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料

1.1.1 粪便样本和药敏试验质控菌 2017—2021 年,从福建省南平、龙岩、三明、平潭、宁德、漳州和福州等 7 个地市的 21 个猪场,用专用粪便收集管采集猪粪便样本 313 份;药敏试验质控菌株为大肠杆菌 ATCC25922,购自中国兽医药品监察所。

1.1.2 主要试剂 TSA、TSB 培养基,购自 OX-
OID 公司;绵羊血,购自郑州九龙生物科技有限公司;PCR 试剂、蛋白酶 K,均购自 Promega 公司;限制
性内切酶 *Xba* I,购自宝生物(大连)有限公司;细
菌基因组 DNA 提取试剂盒,购自北京天根科技有
限公司;Gelred,购自美国 Biotium 公司。

1.1.3 药敏纸片 阿莫西林、链霉素、头孢噻肟、氟
苯尼考、亚胺培南、林可-壮观、利奈唑胺、新霉素、多
黏菌素 B、磺胺甲基异恶唑、替加环素、万古霉素、强
力霉素、恩诺沙星、呋喃妥因药敏纸片,均购自温州
市康泰生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 *mcr-1* 基因阳性细菌的分离与鉴定 将采
集的新鲜猪粪便在 24 h 内低温运送至实验室,向每
份粪便管中加入 2 mL 无菌 TSB 培养基,振荡器振
摇 2 min,用接种环挑取粪便液划线接种于体积分

数 10%绵羊血平板,倒置于 37 ℃ 培养箱培养 36~
48 h。挑取培养后的混合菌于 1.5 mL 离心管(预置
1 mL 的无菌 PBS 缓冲液),振荡器振摇混匀 2 min,
加热煮沸 5 min,12 000 r/min 离心 5 min,吸出上清
液于新的离心管中,-20 ℃ 保存备用。以获得的上
清液为 DNA 模板,采用 PCR 检测 *mcr-1* 基因,试验
所用引物见表 1。PCR 反应体系为:2×PCR mix
12.5 μL,无菌水 9.5 μL,上游引物(20 nmol/L) 0.5
μL,下游引物(20 nmol/L) 0.5 μL,DNA 模板 2
μL。反应程序为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1
min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min,4 ℃ 保
存。对 *mcr-1* 基因阳性的混合菌样品进行纯化筛
选,获得单一 *mcr-1* 基因阳性细菌,并通过 16S
rRNA 序列测定、同源性比较鉴定该细菌种属。将
纯化后的细菌于-80 ℃ 冻存备用。

表 1 福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌耐药基因检测中所用引物的信息

Table 1 Information of primers used in *mcr-1* gene positive bacteria from swine in Fujian

基因 Gene	引物序列(5'→3') Sequence of primers(5'→3')	退火温度/℃ Annealing temperature	目的片段/bp Target fragment
<i>dfrA1</i>	F:CGGTCGTAACACGTTCAAG,R:AGAGGCGAAGTCTTGGGTA	58	257
<i>dfrA3</i>	F:CAATGTTGTCTGTAGTCGCA,R:CTTATCGTCAGCAGGATGC	57	268
<i>dfrA5</i>	F:GCCTTGACGTACAACCAGT,R:TCCGGCTCAATATCAATCGT	53	269
<i>dfrA7</i>	F:AATGGCGTAATCGGTAATGG,R:TATCACCTTCAACCTCAACG	56	343
<i>dfrA12</i>	F:GAACCTCGGAATCAGTACGC,R:TGTATATCTCAGCTCCGCC	57	323
<i>dfrA</i>	F:CAAGGCAATCCACTCCGAC,R:GATGGCGTCAATCTCCAC	58	367
<i>sul1</i>	F:GGTTCTGAAATCCATCCCTG,R:CTCTCATCGAAGAAGGAGTC	56	251
<i>sul2</i>	F:CGGCATCGTCAACATAACC,R:CCGAATGCATAACGACGAG	57	368
<i>sul3</i>	F:AAACGAATCCGGAAGAGGT,R:CAAGAGTTGGTGCTAAACGA	57	279
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	F:GGAGAGCCGATTGGGTATG,R:TGGCGTGTTGAACCATG	57	320
<i>qepA</i>	F:TGGATCCTGGACATCTACGG,R:GAAAACGCGGCGATCCAC	59	290
<i>qnrA</i>	F:GATGTACTTCTGCTCGGCT,R:TCCGGCAGCACTATTACTC	57	321
<i>qnrB</i>	F:TACAAATATGGCTCTGGCAC,R:TTGGCGTAGCTTAGATTGGT	56	381
<i>qnrC</i>	F:CAGGCAAACCTTGTTAATC,R:TACGAGGTTCTAAGCCAT	54	271
<i>qnrD</i>	F:TCAGGGGTTGATTAACTG,R:TATCACAGTGCCATTCCAG	54	430
<i>qnrS</i>	F:ATCGGCACCACAACCTTTTC,R:ACGCACGGAACCTATACC	57	252
<i>cmlA</i>	F:GTGACATTTACGCAGGTCG,R:GCGACACCAATACCCACTA	57	583
<i>fexA</i>	F:CCGACAATTAACCGGCAG,R:ATCGGCTCAGTAGCATCAC	57	728
<i>fexB</i>	F:TATGAGCTTCGTAGCAGG,R:CACGATGCACGTAATGGT	57	304
<i>pexA</i>	F:CAGCGCTTTGGTTTGATGA,R:GGCGAACATAATCAGGGCT	57	321
<i>Cat1</i>	F:GTTACCCCTTGTTACACCG,R:ATGAACCTGAATCGCCAGC	56	315
<i>Cat2</i>	F:GCGGATTACAGCTGACCA,R:CCTGTACAGAAACAGGTA	54	483
<i>Cat3</i>	F:ATATTCTGTTGTTGTCAAC,R:CTTCCGAAAAATAAGACC	54	221
<i>tet(X)1</i>	F:GACAATCCTGAAATAAACAG,R:CTTATTCAAAAATGCAATGC	54	383
<i>tet(X)2</i>	F:GACAATCCTGAAATAAACAG,R:CATTTCGAATTTCTGTTTGAG	54	795
<i>mcr-1</i>	F:AGTCCGTTTGTCTTGTTGGC,R:AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	58	320
NDM-1	F:CAATGCGTTGTGCAACCAG,R:GCCGTATGAGTGATTGCGG	60	366
<i>cfr</i>	F:GACTTTCGGCACCGGTAAT,R:CAGTAGTCCATTTCATATTTG	52	1 298
<i>floR</i>	F:ATGACCACCACACGCCCCGC,R:TTAGACGACTGGCGACTTCT	58	1 215

1.2.2 分离细菌的药物敏感性试验 按照 K-B 纸
片琼脂扩散方法对分离细菌进行药物敏感性试验,

并根据 CLSI(美国临床和实验室标准协会)第 4 版
(VET01-A4)推荐的方法^[10]进行结果判断。使用大

肠杆菌 ATCC25922 作为质控菌株。计算耐药率(耐药菌株数占 *mcr-1* 基因阳性菌株数的比例)。

1.2.3 细菌基因组 DNA 的提取 复苏细菌,挑取冻存细菌接种于绵羊血琼脂平板,37 ℃ 培养箱培养过夜;挑取培养后的单个菌落接种于 TSB 液体培养基,37 ℃ 摇床振荡培养至菌液在 260 nm 处吸光度(OD_{260})为 0.6,8 000 r/min 离心 5 min,弃掉上清,沉淀用 PBS 重悬后转移到 1.5 mL 离心管,8 000 r/min 再次离心 5 min,弃上清,应用细菌 DNA 提取试剂盒提取沉淀细菌的 DNA。

1.2.4 *mcr-1* 基因阳性细菌耐药基因的检测 应用 PCR 方法对如下耐药基因进行检测:磺胺类耐药基因(*dfrA1*、*dfrA3*、*dfrA5*、*dfrA7*、*dfrA12*、*dfrA*、*sul1*、*sul2*、*sul3*)、喹诺酮类耐药基因(*aac(6')*-*Ib-cr*、*qepA*、*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qnrS*)、氯霉素耐药基因(*cmlA*、*fexA*、*fexB*、*pexA*、*Cat1*、*Cat2*、*Cat3*)、替加环素耐药基因(*tet(X)1*、*tet(X)2*)、多黏菌素耐药基因(*mcr-1*)、金属 β 内酰胺酶耐药基因(*NDM-1*)、多药耐药基因(*cfr*)、氟苯尼考耐药基因(*floR*)。PCR 所用引物信息见表 1。

1.2.5 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的 MLST 分型试验 参照 MLST 数据库^[11] 确定分离细菌 ST、反应体系及参数。首先选取与大肠杆菌分型相关的 7 个管家基因(*adk*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*MDH*、*purA*、*recA*)作为目的基因,分别进行 PCR 扩增与测序,各基因引物来自 MLST 数据库。反应体系为: *Taq* PCR Mix 25 μ L,上游引物(10 μ mol/L)1 μ L,下游引物(10 μ mol/L)1 μ L,加双蒸水补足至 50 μ L。反应参数为:94 ℃ 5 min;94 ℃ 40 s,50~55 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 产物经琼脂

糖凝胶电泳后,采用胶回收试剂盒回收目的片段,送至福州尚亚生物科技有限公司测序。

将 7 个不同管家基因序列提交至 MLST 数据库中进行检索比对,得到每种等位基因的序列号,即序列分型号(ST)。

1.2.6 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的 PFGE 同源聚类分析 根据美国 CDC 大肠杆菌标准化实验室 PFGE 分子分型操作规程^[12],先采用限制性内切酶(*XbaI*)对细菌基因组进行酶切,然后进行脉冲场凝胶电泳(PFGE)分析,使用 Gelred 染液染色后成像,用 BioNumerics 软件包(Version 8.0, Applied Maths, Belgium)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,必要时进行人工校正。每两个图像之间的相似性系数用 Dice 系数表示,出现不同条带即判为不同的型别。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。

2 结果与分析

2.1 猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的分离与鉴定

福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌分离鉴定结果见表 2。由表 2 可知,从福建省南平、龙岩、三明、平潭、宁德、漳州和福州 7 个不同地市 21 个猪场的 313 份猪粪便中,分离鉴定得到 *mcr-1* 基因阳性的细菌共 43 株,分离率达到 13.7%(43/313),猪场阳性率达到 47.6%(10/21)。这 43 株菌均为肠杆菌科的细菌,其中大肠杆菌 39 株、肺炎克雷伯菌 1 株、弗格森埃希菌 2 株和坂崎肠杆菌 1 株。

表 2 福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的分离与鉴定

Table 2 Isolation and identification of *mcr-1* gene positive bacteria from swine in Fujian

地区 District	采样猪场数 Number of pig farm	阳性猪场数 Number of positive farms	采集样品数 Number of samples	阳性样品数 Number of positive samples
南平 Nanping	6	4	71	11
龙岩 Longyan	4	2	121	23
三明 Sanming	3	2	39	5
平潭 Pingtan	2	1	42	3
宁德 Ningde	2	1	18	1
漳州 Zhangzhou	2	0	7	0
福州 Fuzhou	2	0	15	0
总计 Total	21	10	313	43

2.2 猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的药敏试验

由表 3 可以看出,*mcr-1* 基因阳性细菌对磺胺类抗生素(磺胺甲基异恶唑)的耐药率最高,达到了 90.1%;其次是氟苯尼考、氨基糖苷类抗生素(链霉

素),耐药率分别为 83.7%和 74.4%;再次是四环素类抗生素(强力霉素)、喹诺酮类抗生素(恩诺沙星)、 β -内酰胺类抗生素(阿莫西林),耐药率分别达到了 67.4%,67.4%和 53.5%;对头孢噻肟、林可-壮观的

耐药率分别达到了 39.5%和 34.9%;对碳青霉烯类 药率分别只有 11.6%和 4.6%;对替加环素、利奈唑
抗生素(亚胺培南)、呋喃类抗生素(呋喃妥因)的耐 胺完全敏感。

表 3 福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的药敏试验结果

类别 Category	抗生素 Antibiotic	抑菌圈直径/mm Diameter of inhibition zone			耐药菌株数 Resistance number	耐药率/% Resistance ratio
		耐药 Resistant	中敏 Middle	敏感 Sensitive		
β-内酰胺类 β-lactams	阿莫西林 Amoxicillin	≤13	14~16	≥17	23	53.5
	头孢噻肟 Cefotaxime	≤19	20~22	≥23	17	39.5
氨基糖苷类 Aminoglycosides	新霉素 Neomycin	≤12	13~14	≥15	25	58.1
	链霉素 Streptomycin	≤10	11~13	≥14	32	74.4
四环素类 Tetracycline	强力霉素 Doxycycline	≤10	11~13	≥14	29	67.4
	替加环素 Tigecycline	≤20	21~22	≥23	0	0.0
磺胺类 Sulfonamides	磺胺甲基异恶唑 Sulfisomazole	≤10	11~15	≥16	39	90.1
林可酰胺类 Lincosamides	林可-壮观 Linco-Hydro	≤14	15~17	≥18	15	34.9
酰胺醇类 Chloramphenicol	氟苯尼考 Florfenicol	≤14	15~19	≥20	36	83.7
喹诺酮类 Quinolones	恩诺沙星 Enrofloxacin	≤15	16~20	≥21	29	67.4
呋喃类 Furanes	呋喃妥因 Nitrofurantion	≤14	15~16	≥17	2	4.6
恶唑烷酮类 Oxadixyl	利奈唑胺 Linezolid	≤20	21~22	≥23	0	0.0
碳青霉烯类 Carbapenem	亚胺培南 Imipenem	≤19	20~22	≥23	5	11.6
黏菌素类 Costin	多黏菌素 BPolymyxin B	≤12	13~19	≥20	43	100.0

2.3 猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌的耐药基因检测 检测结果见表 4。

福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌不同耐药基因的

表 4 福建猪源 *mcr-1* 基因阳性细菌不同耐药基因的检出率

药物 Drug	耐药基因 Resistance gene	检出数 Detection number	检出率/% Ratio
磺胺类药物 Sulfonamides	<i>dfrA1</i>	2	4.6
	<i>dfrA3</i>	0	0.0
	<i>dfrA5</i>	1	2.3
	<i>dfrA7</i>	16	37.2
	<i>dfrA12</i>	27	62.8
	<i>dfrA</i>	0	0.0
	<i>sul1</i>	35	81.4
	<i>sul2</i>	39	90.7
	<i>sul3</i>	32	74.4
	<i>aac(6')-Ib-cr</i>	13	30.2
喹诺酮类药物 Quinolones	<i>qepA</i>	0	0.0
	<i>qnrA</i>	0	0.0
	<i>qnrB</i>	0	0.0
	<i>qnrC</i>	0	0.0
	<i>qnrD</i>	0	0.0
	<i>qnrS</i>	22	51.2
	<i>cmlA</i>	32	74.4
氯霉素类药物 Chloramphenicols	<i>fexA</i>	0	0.0
	<i>fexB</i>	0	0.0
	<i>pexA</i>	15	34.9
	<i>Cat1</i>	0	0.0
	<i>Cat2</i>	37	86.0
替加环素 Tigecycline	<i>Cat3</i>	0	0.0
	<i>Tet(X)1</i>	0	0.0
多黏菌素 Polymyxin	<i>Tet(X)2</i>	0	0.0
	<i>mcr-1</i>	43	100.0
金属 β-内酰胺酶药物 Metal β-lactams	<i>NDM-1</i>	10	23.2
多药耐药 Multidrug resistance	<i>cfr</i>	3	7.0
氟苯尼考 Florfenicol	<i>floR</i>	36	83.7

由表 4 可知,磺胺类耐药基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 的检出率分别达到 81.4%,90.7% 和 74.4%,*dfrA12*、*dfrA7* 的检出率分别达到 62.8% 和 37.2%,*dfrA3* 和 *dfrA* 未检出。喹诺酮类耐药基因 *qnrS*、*aac(6′)-Ib-cr* 的检出率分别达到 51.2% 和 30.2%,*qnrA*、*qnrB*、*qnrC*、*qnrD*、*qepA* 未检出。氯霉素类耐药基因 *Cat2*、*cmlA* 和 *pexA* 的检出率分别达到 86.0%,74.4% 和 34.9%。替加环素耐药基因未检出。氟苯尼考耐药基因 *floR* 的检出率为 83.7%,金属 β -内酰胺酶耐药基因 *NDM-1* 的检出

率为 23.2%,多药耐药基因 *cfr* 的检出率为 7.0%。

2.4 猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的 MLST 分型

应用大肠杆菌的 7 个管家基因序列,对福建 39 株猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌进行 MLST 分型,结果(表 5)发现 39 株大肠杆菌中,除 4 株不能分型外,其他 35 株共分为 19 个 ST 型,其中 ST10 型的菌株最多,共有 9 株菌,ST29 和 ST2505 各有 3 株菌,ST156、ST602、ST410 和 ST101 各有 2 株菌,其他 ST 型各有 1 株菌。

表 5 福建 39 株猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的多位点序列分型(MLST)结果
Table 5 MLST of 39 *E. coli* of *mcr-1* gene positive bacteria from swine in Fujian

ST 类型 ST type	菌株数 Number	ST 类型 ST type	菌株数 Number	ST 类型 ST type	菌株数 Number
ST641	1	ST117	1	ST410	2
ST790	1	ST763	1	ST101	2
ST1011	1	ST617	1	ST29	3
ST20	1	ST331	1	ST2505	3
ST4214	1	ST11117	1	ST10	9
ST9399	1	ST156	2	未知 Unknow	4
ST5699	1	ST602	2		

2.5 猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌同源性聚类分析

应用脉冲场凝胶电泳分析(PFGE)方法,对福建 39 株猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌菌株进行分型和聚类分析。PFGE 图谱(图 1)显示,39 株菌共获得 30 种 PFGE 谱型,具有高度多样性,形成了 6 组克隆群。ST10 型中的 6 株细菌(菌株编号 EC6、EC7、EC8、EC9、EC10 和 EC11)表现出同一克隆关系,2 株 ST410(菌株编号 EC33 和 EC37)和 2 株 ST2505(菌株编号 EC35 和 EC38)类型菌株也分别表现出同一克隆关系,但 3 株 ST29 型菌株中有 1 株(菌株编号 EC17)与 ST117 和 ST5699 类型菌株表现出同一克隆关系。ST10 菌株主要分布在福建龙岩地区,其他 ST 类型菌株没有明显的地域性。*mcr-1* 基因阳性细菌主要分布在福建龙岩和南平地区,在福建省其他地区分布较少。

3 讨 论

多黏菌素作为一种多肽类抗生素,被认为是治疗革兰氏阴性菌感染的“最后一道防线”^[13]。然而,多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 自从 2016 年被发现以来^[9],已在全世界多种病原菌中广泛传播^[14],严重影响了该药的临床应用效果^[15]。为了防止多黏菌

素耐药菌的进一步泛滥,我国在 2016 年 7 月份,禁止在饲料中添加多黏菌素,以期降低该抗生素的耐药率;在 2020 年 7 月份,禁止在饲料中添加任何抗生素^[16],防止出现无药可用的局面。

本研究在 2017—2021 年从福建省 7 个地市采集了 313 份粪便样品,从中共分离获得 43 株 *mcr-1* 基因阳性细菌,阳性率达到 13.7%,其中 39 株为大肠杆菌,其余 4 株为肠杆菌科的其他菌属,这与前人相关研究得出的 *mcr-1* 基因仅存在于肠杆菌科细菌中的结论^[9,17-21]一致。*mcr-1* 基因阳性率偏高的原因是,携带 *mcr-1* 基因的细菌可随食物、水环境和土壤进行传播扩散^[22-24]。

多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 的发展趋势自 2016 年以来,一直受到研究者的广泛关注,而对 *mcr-1* 基因阳性细菌的耐药性和耐药趋势却研究甚少。本研究的药敏试验结果显示,磺胺甲基异恶唑、氟苯尼考、链霉素、新霉素、强力霉素、恩诺沙星和阿莫西林的耐药菌率均达到 50% 以上,且二重或多重耐药现象严重,这是因为这些药物在猪场使用频繁,导致猪源细菌的耐药率居高不下;而亚胺培南、呋喃妥因、替加环素和利奈唑胺的耐药率很低或无耐药性,这是因为这些药物均为人医使用抗生素,而不是兽用抗生素,因此猪源细菌对这些抗生素的耐药率很低。

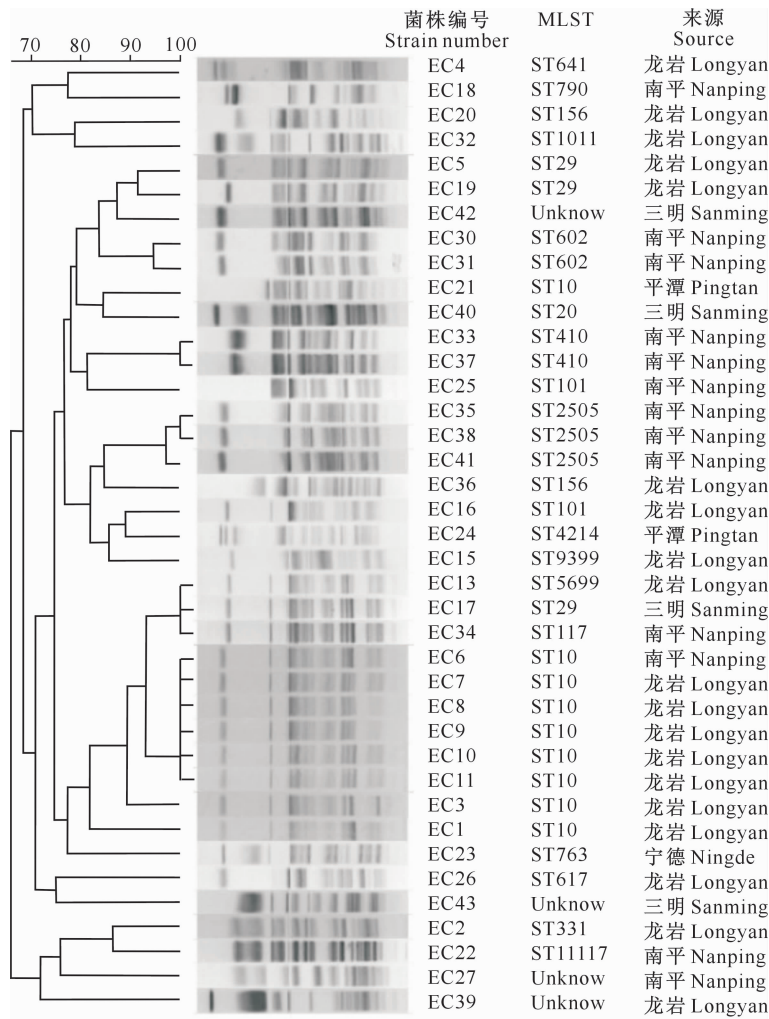


图 1 福建猪源 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的同源聚类结果

Fig. 1 Homologous clustering map of *mcr-1* gene positive *E. coli* from swine in Fujian

mcr-1 基因阳性细菌的耐药性多种多样,且其耐药机制复杂。为了阐明 *mcr-1* 基因阳性细菌的耐药机制,首先必须掌握这些细菌的耐药基因。本研究中,磺胺类抗生素耐药基因 *sul1*、*sul2* 和 *sul3* 的检出率较高,均在 74% 以上;喹诺酮类抗生素耐药基因仅有 *qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 被检出;氯霉素类抗生素耐药基因中, *Cat2* 的检出率最高, *cmlA* 和 *pexA* 也被检出;值得注意的是,氟苯尼考耐药基因 *floR* 的检出率高达 83.7%,但其在 *mcr-1* 基因阴性细菌中的检出率却较低;金属 β -内酰胺酶耐药基因 *NDM-1* 的检出率达 23.2%,这可能是由于饲料中禁用抗生素后,猪细菌性疫病暴发,因此大量头孢类抗生素及其他抗生素被使用,引发了超级耐药菌的出现;多药耐药基因 *cfr* 的检出率很低,这与其他研究报道^[25]一致。

MLST 是一种常用的细菌分子分型方法,在细菌学研究领域应用广泛,具有分辨率高、重复性强、

可积累等优势^[26-27]。本研究对分离自福建省部分地市的 39 株猪源大肠杆菌进行 MLST 分型,除 4 株细菌不能分型外,其他 35 株共分为 19 种不同序列型,这表明同一地市的 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌具有高度多样性。在这 35 株细菌中,ST10 型菌株最多,共有 9 株,其他类型菌株均少于等于 3 株,可见 ST10 是优势型。PFGE 也是一种微生物基因分型方法,具有重复性好、特异性强、分辨率高等特点,被广泛应用于微生物的分型和溯源^[28-29]。有研究以相似性 80% 作为同一谱型的划分依据^[30],即谱型系数大于 80% 为有克隆关系,低于 80% 则视为无克隆关系。本研究 PFGE 分型结果显示,39 株 *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌分离株共有 30 种 PFGE 谱型,表明这些分离株带型具有多态性;且由 EC13、EC17、EC34、EC23 和大部分 ST10 菌株(EC6、EC7、EC8、EC9、EC10、EC11、EC3、EC1)组成的克隆群为 ST10 型菌株占优势的克隆群(ST10 克隆群)。EC13

(ST5699, 龙岩)、EC17 (ST29, 三明) 和 EC34 (ST117, 南平) 菌株虽然 ST 类型不同, 但都来源于龙岩的优势克隆群 ST10, 这可能是因为生猪引种引起了细菌传播^[26]。EC5 (ST29, 龙岩)、EC19 (ST29, 龙岩)、EC42 (未知型, 三明)、EC30 (ST602, 南平)、EC31 (ST602, 南平) 也都具有克隆关系, 表明这 3 地也可能存在同一细菌的互相传播。而不能定型的菌株 EC27、EC39 和 EC43 与其他已定型菌株的同源性较差, 亲缘关系较远, 是 3 株新发现的分离株。

4 结 论

从福建省分离的猪源 *mcr-1* 基因阳性菌株绝大部分为大肠杆菌, 只有少部分为肠杆菌科其他细菌。这些分离株分别对磺胺甲基异恶唑、氟苯尼考和链霉素等具有严重的共同耐药特性, 尤其是对氟苯尼考共同耐药。*mcr-1* 基因阳性菌株的磺胺类抗生素耐药基因以 *sul* 为主, 喹诺酮类抗生素耐药基因以 *qnrS* 和 *aac* (6')-*Ib-cr* 为主, 氯霉素抗生素耐药基因以 *Cat2* 为主。*mcr-1* 基因阳性大肠杆菌的 ST 类型复杂多样, 其中以 ST10 为优势序列型。PFGE 谱型表明, *mcr-1* 基因阳性大肠杆菌带型具有多态性, 其在地市的分布也具有高度多样性。

[参考文献]

- [1] Boucher H W, Talbot G H, Bradley J S, et al. Bad bugs, no drugs; no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America [J]. Clin Infect Dis, 2009, 48(1): 1-12.
- [2] Pham T D, Thanh T H, Turen H, et al. Inducible colistin resistance via a disrupted plasmid-borne *mcr-1* gene in a 2008 Vietnamese *Shigella sonnei* isolate [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(8): 2314-2317.
- [3] Nordmann P, Poirel L. Plasmid-mediated colistin resistance: an additional antibiotic resistance menace [J]. Clin Microbiol Infect, 2016, 22(5): 398-400.
- [4] Arduino S M, Quiroga M P, Ramirez M S, et al. Transposons and integrons in colistin-resistant clones of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* with epidemic or sporadic behavior [J]. J Med Microbiol, 2012, 61(10): 1417-1420.
- [5] Cannatelli A, D'andrea M M, Giani T, et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the *PhoQ/PhoP* regulator [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(11): 5521-5526.
- [6] Gunn J S. The *Salmonella PmrAB* regulon: lipopolysaccharide modifications, antimicrobial peptide resistance and more [J]. Trends Microbiol, 2008, 16(6): 284-290.
- [7] Kempf I, Fleury M A, Drider D, et al. What do we know about resistance to colistin in *Enterobacteriaceae* in avian and pig production in Europe [J]. Int J Antimicrob Agents, 2013, 42(5): 379-383.
- [8] Falagas M E, Rafailidis P I, Matthaiou D K. Resistance to polymyxins: mechanisms, frequency and treatment options [J]. Drug Resist Updat, 2010, 13(4-5): 132-138.
- [9] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin-resistance mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological study and molecular biology study [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(2): 161-168.
- [10] Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals: Vet01-A4 [S]. 4th ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2013.
- [11] Wirth T, Falush D, Lan R, et al. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective [J]. Mol Microbiol, 2006, 60(5): 1136-1151.
- [12] 杜银菊, 梁胜楠, 段 瑶, 等. 2015—2017 年聊城市腹泻病例中沙门氏菌分子分型及耐药性研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2019, 35(1): 915-921.
Du Y J, Liang S N, Duan Y, et al. Molecular typing and antimicrobial resistance test of *Salmonella* from diarrheal cases in Liaocheng city, China, from 2015—2017 [J]. Chinese Journal of Zoonoses, 2019, 35(1): 915-921.
- [13] Biswa S, Brunel J M, Dubus J C, et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century [J]. Exp Rev Anti Infect Ther, 2012, 10(8): 917-934.
- [14] El Garch F, DE Jong A, Bertrand X, et al. *mcr-1*-like detection in commensal *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. from food-producing animals at slaughter in Europe [J]. Vet Microbiol, 2018, 213: 42-46.
- [15] Schwarz S, Johnson A P. Transferable resistance to colistin: a new but old threat [J]. J Antimicrob Chemother, 2016, 71(8): 2066-2070.
- [16] Walsh T R, Wu Y. China bans colistin as a feed additive for animals [J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(10): 1102-1103.
- [17] Ling Z, Yin W, Shen Z, et al. Epidemiology of mobile colistin resistance genes *mcr-1* to *mcr-9* [J]. J Antimicrob Chemother, 2020, 75(11): 3087-3095.
- [18] Wang Y, Xu C, Zhang R, et al. Changes in colistin and *mcr-1* abundance in *Escherichia coli* of animal and human origins following the ban of colistin-positive additives in China: an epidemiological comparative study [J]. Lancet Infect Dis, 2020, 20(10): 1161-1171.
- [19] Shen C, Zhong L L, Ma F, et al. Genomic patterns and characterizations of chromosomally-encoded *mcr-1* *Escherichia coli* populations [J]. Gut Pathog, 2020, 12(1): 55.
- [20] Liang Z, Pang J, Hu X, et al. Low prevalence of *mcr-1* among clinical *Enterobacteriaceae* isolates and cotransfer of *mcr-1* and *bla_{NDM-1}*: from separate donors [J]. Micro Drug Resist, 2021, 27(4): 476-484.

(4):128-136.

Chen Y T,Luo Y Z,Shen H N,et al. Response of biomass and antioxidant enzyme activity of *Medicago sativa* cv. Xinjiang daye to soil water stress [J]. Journal of Gansu Agricultural University,2020,55(4):128-136.

[25] 张银敏. 行距与施肥对紫花苜蓿和蒙农红豆草种子产量及质量的影响 [D]. 北京:中国农业科学院,2010.

Zhang Y M. Effect of fertilizer and row spacing on the seed yield and seed quality of *Medicago sativa* L. and *Onobrychis viciaefolia* Scop. cv. Mengnong [D]. Beijing:Chinese Academy of Agricultural Science,2010.

[26] 杜旭,黄平升,杨梅. 不同磷肥对尾巨桉 DH3229 苗木生长及抗性生理的影响 [J]. 森林与环境学报,2020,40(5):526-533.

Du X, Huang P S, Yang M. Phosphorus fertilizers on the growth and resistance physiology of *Eucalyptus urophylla* × *Eucalyptus grandis* DH3229 seedlings [J]. Journal of Forest and Environment,2020,40(5):526-533.

(上接第 8 页)

[21] Nakano A,Nakano R,Nishisouzu R,et al. Prevalence and relatedness of *mcr-1*-mediated colistin-resistant *Escherichia coli* isolated from livestock and farmers in Japan [J]. Front Microbiol,2021,12:664931.

[22] Chen K,Chan E W,Xie M,et al. Widespread distribution of *mcr-1*-bearing bacteria in the ecosystem, 2015 to 2016 [J]. Euro Surveill,2017,22(39):1-11.

[23] Zhou H W,Zhang T,Ma J H,et al. Occurrence of plasmid- and chromosome-carried *mcr-1* in waterborne *Enterobacteriaceae* in China [J]. Antimicrob Agents Chemother,2017,61(8):e00017-17.

[24] Sun P,Bi Z,Nilsson M,et al. Occurrence of *bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M}* and *mcr-1* in *Enterobacteriaceae* from well water in rural China [J]. Antimicrob Agents Chemother,2017,61(4):e02569-16.

[25] Mazb,Liu J,Chen L,et al. Rapid increase in the IS26-mediated *cfr* gene in *E. coli* isolates with *IncP* and *IncX4* plasmids and coexisting *cfr* and *mcr-1* genes in a swine farm [J]. Pathogens,2021,10(1):33.

[26] Olkkola S,Nyka S,Raulo S,et al. Antimicrobial resistance and multilocus sequence types of finish *Campylobacter jejuni* isolates from multiple sources [J]. Zoonoses Public Health,2016,63(1):10-19.

[27] Kovanen S M,Kivisto R I,Rossi M,et al. A combination of MLST and CRISPR typing reveals dominant *Campylobacter jejuni* types in organically farmed laying hens [J]. J Applied Microbiol,2014,117(1):249-257.

[28] 游兴勇,刘成伟,朱应飞,等. 江西省食源性沙门菌血清分型及脉冲场凝胶电泳指纹图谱研究 [J]. 中国食品卫生杂志,2014,26(6):528-532.

You X Y,Liu C W,Zhu Y F,et al. Serotyping and PFGE type of *Salmonella* isolates from food in Jiangxi Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene,2014,26(6):528-532.

[29] Bakhshi B,Kalantar M,Rastegar-Lari A,et al. PFGE genotyping and molecular characterization of *Campylobacter* spp. isolated from chicken meat [J]. Iran J Vet Res,2016,17(3):177-183.

[30] Tenover F C,Arbeit R D,Goering R V,et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing [J]. J ClinMicrobiol,1995,33(9):2233-2239.