

网络出版时间:2020-08-13 15:30 DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2021.02.002
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200812.1345.006.html

牛源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药性分析

王丽娟¹,王宁宁¹,王 乐¹,李 芬^{1,2},刘晓强¹,王 妍¹,李勤凡^{1,2}

(1 西北农林科技大学 动物医学院,陕西 杨凌 712100;2 新疆农业大学 动物医学院,新疆 乌鲁木齐 830052)

【摘 要】 【目的】了解牛源大肠杆菌对氟喹诺酮类药物的耐药特征,为临床合理用药提供理论依据。【方法】从不同牛场采集腹泻犊牛粪样分离鉴定大肠杆菌,采用微量肉汤稀释法测定大肠杆菌对环丙沙星、恩诺沙星和诺氟沙星 3 种氟喹诺酮类药物的最小抑菌浓度(MIC),PCR 检测质粒介导的喹诺酮类耐药(PMQR)基因(*qnrA*、*qnrB*、*qnrD*、*qnrS*、*aac(6')-Ib* 和 *qepA* 基因)及喹诺酮耐药决定区(QRDR)突变(*gyrA* 和 *parC* 基因),并选择 2 株携带 PMQR 基因的大肠杆菌经恩诺沙星诱导后检测 QRDR 的 *gyrA* 和 *parC* 基因突变。【结果】分离鉴定得到 75 株大肠杆菌,其中 60.00% 的菌株对至少 2 种 FQs 耐药,40.00% 的菌株对环丙沙星、恩诺沙星和诺氟沙星均耐药,且对恩诺沙星的耐药程度较为严重。75 株大肠杆菌均未检测到 *qnrA*、*qnrD* 和 *qepA* 基因,但检测出 *qnrS*、*aac(6')-Ib* 亚型 *aac(6')-Ib-cr* 和 *qnrB* 基因,61.33% 的菌株至少携带 1 个 PMQR 基因,其中以 *qnrS* 和 *aac(6')-Ib-cr* 最为常见。58.67% 的大肠杆菌发生了 QRDR 突变,主要突变方式为 *GyrA*: (Ser⁸³ Leu + Asp⁸⁷ Asn) + *ParC*: Ser⁸⁰ Ile,发生突变且携带 PMQR 基因的大肠杆菌对环丙沙星、恩诺沙星和诺氟沙星均耐药。恩诺沙星诱导后,PMQR 阳性菌的 *gyrA* 基因发生 5 处碱基突变,PMQR 阴性菌无碱基突变。【结论】大肠杆菌耐氟喹诺酮类药物主要与 QRDR 突变密切相关,因此兽医临床上应合理使用氟喹诺酮类药物来减缓大肠杆菌的耐药性。

【关键词】 牛源大肠杆菌;氟喹诺酮类药物;PMQR 基因;QRDR 突变;耐药性

【中图分类号】 S852.61⁺4

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)02-0008-06

Resistance of *Escherichia coli* from dairy to fluoroquinolones

WANG Lijuan¹, WANG Ningning¹, WANG Le¹, LI Fen^{1,2},

LIU Xiaoqiang¹, WANG Yan¹, LI Qinfan^{1,2}

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 College of Animal Medicine, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: 【Objective】The resistance characteristics of *E. coli* from feces of diarrhea calves to fluoroquinolones isolated were investigated to improve its clinical rational use. 【Method】*E. coli* was collected from fecal samples of diarrhea calves in different cattle farms. Their MICs to three fluoroquinolones of ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin were determined by the micro-broth dilution method. PMQR genes (*qnrA*, *qnrB*, *qnrD*, *qnrS*, *aac(6')-Ib* and *qepA* genes) and QRDR mutations (*gyrA* and *parC* genes) were detected by PCR. Two *E. coli* strains with PMQR gene were selected to detect mutation of QRDR after enrofloxacin induction. 【Result】Seventy-five *E. coli* isolates were identified with 60.00% resistant to two or more fluoroquinolones (FQs) and 40.00% resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin simultaneously. The *qnrA*, *qnrD* and *qepA* genes were not detected in any of the 75 *E. coli* strains, while *qnrS*, *aac(6')-Ib* subtypes *aac(6')-Ib-cr* and *qnrB* were detected. At least one PMQR gene was detected in 61.33%

【收稿日期】 2020-02-04

【基金项目】 陕西省农业重点研发项目(2017ZDXM-NY-079);中国农业大学-新疆农业大学科研合作基金项目(2019TC167)

【作者简介】 王丽娟(1993—),女,甘肃平凉人,硕士研究生,主要从事动物临床疾病研究。E-mail:1012374301@qq.com

【通信作者】 李勤凡(1968—),男,甘肃天水人,教授,博士生导师,主要从事动物临床疾病研究。E-mail:liqf1131@163.com

strains, and *qnrS* and *aac* (6')-Ib-cr were the most common. QRDR mutations were detected in 58.67% isolates, and main mutations were GyrA: (Ser⁸³ Leu + Asp⁸⁷ Asn) + ParC: Ser⁸⁰ Ile. All *E. coli* isolates with QRDR mutation and PMQR genes were resistant to ciprofloxacin, enrofloxacin and norfloxacin. Five base mutations occurred in *gyrA* of PMQR positive bacteria under enrofloxacin pressure, while no base mutations occurred in PMQR negative bacteria. 【Conclusion】 The resistance of *E. coli* to fluoroquinolones was closely related to QRDR mutations, so fluoroquinolones should be reasonably used in veterinary clinic to reduce the resistance of *E. coli*.

Key words: bovine *E. coli*; fluoroquinolones; PMQR gene; QRDR mutation; resistance

大肠杆菌是常见病原体,尤其是在水清洁度不够及畜舍卫生条件差的养殖场^[1]。粪便中的大肠杆菌易通过气溶胶扩散到外部环境,污染附近的空气、水和土壤,进一步对公共环境和人类健康构成潜在威胁^[2]。氟喹诺酮类药物(fluoroquinolones, FQs)作为一类广谱抗生素,在治疗由革兰氏阴性菌引起的疾病中发挥着重要作用^[3]。然而, FQs 的广泛使用和滥用,导致耐药大肠杆菌出现和快速传播^[4]。细菌耐 FQs 的最常见机制包括喹诺酮耐药决定区(quinolone resistant determining region, QRDR)基因突变和质粒介导的喹诺酮类耐药(plasmid-mediated quinolone resistant, PMQR)基因流行^[5-6]。对大肠杆菌而言,耐 FQs 的原因主要是 QRDR 突变,尤其是 *gyrA* 和 *parC* 基因编码的氨基酸突变^[7]。PMQR 基因最早于 1998 年被发现^[8],研究表明, *qnrS*、*aac* (6')-Ib-cr 是最常见的 PMQR 基因^[2,9]。虽然 PMQR 基因仅赋予大肠杆菌低 FQs 抗性,但其在肠杆菌中可以水平扩散,并且被认为是 QRDR 突变产生的有利条件^[10]。

由于 PMQR 基因可以通过相互接触、水及土壤污染从动物传播给人类,同时该基因可以增加 QRDR 的突变机率,因此其对人或动物大肠杆菌病的防治有重要影响。目前,关于牛源大肠杆菌 PMQR 基因和 QRDR 突变的检测研究较少。本试验从犍牛粪便分离鉴定大肠杆菌,通过测定其对 3 种常用 FQs 的最小抑菌浓度(minimum inhibitory concentration, MIC),检测 PMQR 基因与 QRDR 突变,为合理用药提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集 选取陕西宝鸡、渭南、咸阳和杨凌 4 个规模化奶牛养殖场的腹泻犍牛进行采样。首先对犍牛肛门周围进行消毒,随后用无菌棉签采集腹泻犍牛直肠内粪便,将沾有粪便的棉签放入无菌

离心管保存,立即低温运输至实验室进行大肠杆菌分离。

1.1.2 药物和试剂 恩诺沙星(ENR)、环丙沙星(CIP)和诺氟沙星(NOR),购自索来宝公司;麦康凯琼脂培养基购自北京奥博星生物技术有限责任公司;酵母提取物、胰蛋白粉、氯化钠购自 OXOID 公司;琼脂糖购自 Hydra Gene 公司;DL2000 DNA Marker 和 2×rTaq Mix 购自 TaKaRa 公司;大肠杆菌 ATCC 25922 购自杭州滨和微生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 大肠杆菌的分离鉴定及药敏试验 将粪便样品稀释并涂布至麦康凯培养基上,37℃培养 24 h,挑取粉红色菌落进一步分离和纯化,最后使用大肠杆菌 *phoA* 基因特异性引物^[11](表 1)进行鉴定。PCR 反应体系为:菌液 2 μL,上游引物(F)0.5 μL,下游引物(R)0.5 μL,2×rTaq Mix 10 μL,双蒸水 7 μL,总体积 20 μL。将菌液替换为双蒸水设立阴性对照,其他体系不变。PCR 反应程序:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃终延伸 10 min。对 PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测。分离的大肠杆菌用体积分数 25%甘油于-80℃保存备用。以大肠杆菌 ATCC 25922 作为质控菌,根据美国临床实验室标准委员会(CLSL)推荐的微量肉汤稀释法^[12],测定 ENR、CIP、NOR 3 种 FQs 对大肠杆菌分离株的 MIC。3 种 FQs 的 MIC 耐药折点分别为:恩诺沙星(ENR)≥2 μg/mL,环丙沙星(CIP)≥4 μg/mL,诺氟沙星(NOR)≥16 μg/mL。

1.2.2 牛源大肠杆菌 PMQR 基因及 QRDR 突变的检测 本试验涉及的 PMQR 基因包括 *qnr* 家族基因 *qnrA*、*qnrB*、*qnrD* 和 *qnrS*,氨基糖苷乙转移酶基因 *aac* (6')-Ib 和喹诺酮类药物特异性外排泵基因 *qepA*;QRDR 突变基因包括编码 DNA 旋转酶的 *gyrA* 和编码拓扑异构酶Ⅳ的 *parC*。备检基因引物序列^[13]由生工生物工程股份有限公司(生工)合成

(表 1)。PCR 反应体系及阴性对照的设立同 1. 2. 1 节。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 15~40 s(*gyrA* 17 s,*parC* 17 s,*qnrA* 38 s,*qnrB* 30 s,*qnrD* 35 s,*qnrS* 40 s,*aac*(6′)-*Ib* 30 s,*qepA* 15 s),30 个循环;72 ℃ 终延伸 10 min。对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。将 *aac*(6′)-*Ib* 基因 PCR 产物送生工进

行测序,并通过 NCBI 网站比对确定其亚型(*aac*(6′)-*Ib-cr*)。将 *gyrA* 和 *parC* 的 PCR 产物送至生工进行测序,将测序所得核酸序列通过 ExPASy (<https://web.expasy.org/protparam/>) 翻译为氨基酸序列,并通过 DNAMAN 软件与 NCBI 数据库录入的 *E. coli-k12* 的 *gyrA* 和 *parC* 氨基酸序列进行比对,分析 QRDR 突变情况。

表 1 试验所用引物的信息
Table 1 Sequences of primers used in this study

基因名称 Gene	引物序列(5′→3′) Primer sequence (5′→3′)	产物长度/bp Product length
<i>phoA</i>	F:GGTAACGTTTCTACCGCAGAGTTG,R:CAGGGTTGGTACACTGTCATTACG	468
<i>gyrA</i>	F:TGCCAGATGTCCGAGAT,R:GTATAACGCATTGCCGC	268
<i>parC</i>	F:TATGCGATGTCTGAACTGGG,R:GCTCAATAGCAGCTCGGAA	264
<i>qnrA</i>	F:TCAGCAAGAGGATTTCTCA,R:GGCAGCACTATTACTCCCA	627
<i>qnrB</i>	F:GATCGTGAAAGCCAGAAAGG,R:ACGATGCCTGGTAGTTGTCC	469
<i>qnrD</i>	F:CGAGATCAATTTACGGGGAATA,R:AACAAGCTGAAGCGCCTG	582
<i>qnrS</i>	F:CAATCATACATATCGGCACC,R:TCAGGATAAACAACAATACCC	642
<i>aac</i> (6′)- <i>Ib</i>	F:TAAATTGGCACCTGTAGGC,R:CTCGAATGCCTGGCGTGTTT	482
<i>qepA</i>	F:GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG,R:CTTCTGCCCGAGTATCGTG	218

1. 2. 3 恩诺沙星(ENR)诱导试验 选取携带 PMQR 基因且 QRDR 未突变(2 株)、不携带 PMQR 基因且 QRDR 未突变(2 株)的大肠杆菌在含 ENR 的 LB 液体培养基中进行诱导,ENR 初始诱导质量浓度为 0. 25 μg/mL,若菌株生长良好,第 2 天 ENR 浓度 2 倍递增继续诱导,以此类推直至第 10 天;在不加 ENR 的 LB 液体培养基中培养至第 10 天的菌株作为对照。PCR 扩增诱导和对照菌株的 *gyrA*、*parC* 基因,将 PCR 产物送至生工测序后比对分析 *gyrA* 和 *parC* 基因是否发生突变。

MIC 试验结果(表 2)表明,60. 00%(45/75)的菌株对至少 2 种 FQs 耐药,其中 40. 00%(30/75)的菌株对 ENR、CIP、NOR 均耐药,且对 ENR 的耐药程度较为严重(60. 00%)。

2. 2 PMQR 基因及 QRDR 突变检测结果

PMQR 基因 PCR 扩增结果表明,75 株大肠杆菌均未检测到 *qnrA*、*qnrD*、*qepA*,检测出 *qnrS*(642 bp)、*aac*(6′)-*Ib* 亚型 *aac*(6′)-*Ib-cr*(482 bp)和 *qnrB*(469 bp),部分菌株的 PMQR 基因检测结果见图 2。61. 33%(46/75)的大肠杆菌菌株至少携带 1 个 PMQR 基因,其中以 *qnrS*(45. 33%, 34/75)和 *aac*(6′)-*Ib-cr*(21. 33%, 16/75)最为常见(表 2)。

2 结果与分析

2. 1 大肠杆菌的鉴定及药敏试验结果

试验共分离到 75 株菌,经 PCR 检测均扩增到 468 bp 的 *phoA* 基因,故确定其均为大肠杆菌,部分大肠杆菌 *phoA* 基因的鉴定结果见图 1。

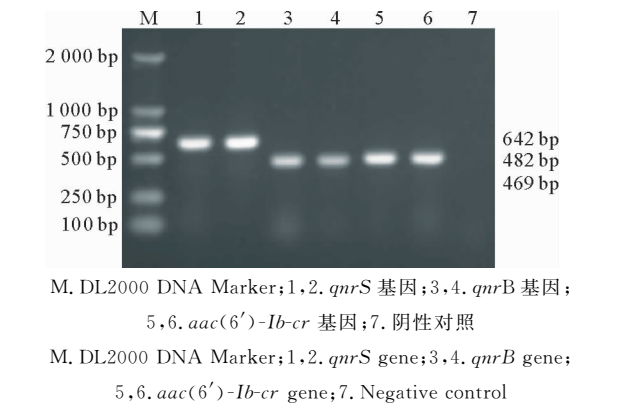
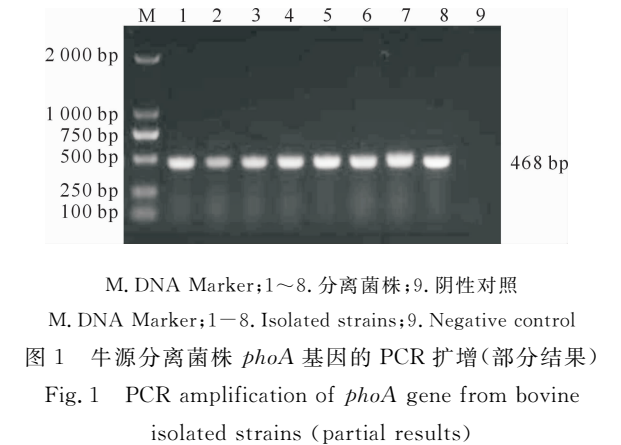
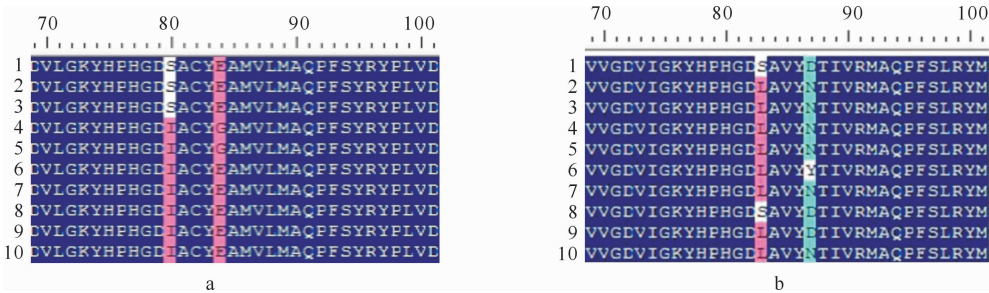


图 2 牛源大肠杆菌 PMQR 基因的 PCR 扩增(部分结果)
Fig. 2 PCR amplification of PMQR gene from bovine *E. coli* (partial results)

GyrA 和 *ParC* 氨基酸序列比对分析的部分结果如图 3 所示。



a. ParC 氨基酸比对; b. GyrA 氨基酸比对。1. *E. coli*-k12; 2~10. 不同的菌株。
S. 丝氨酸, D. 天冬氨酸, L. 亮氨酸, N. 天冬酰胺, Y. 酪氨酸, I. 异亮氨酸, E. 谷氨酸, G. 甘氨酸
a. ParC amino acid alignment; b. GyrA amino acid alignment. 1. *E. coli*-k12; 2~10. Different strains.
S. Serine; D. Aspartic acid, L. Leucine, N. Asparagine, Y. Tyrosine, I. Isoleucine, E. Glutamic acid, G. Glycine

图 3 牛源大肠杆菌 *parC* 和 *gyrA* 基因编码氨基酸的突变分析(部分结果)
Fig. 3 Mutation analysis of amino acids encoded by *parC* and *gyrA* genes from bovine *E. coli* (partial results)

由表 2 可知, 58.67% (44/75) 的大肠杆菌发生了 QRDR 突变; 43 株菌发生了 GyrA 氨基酸的突变, 其中 90.70% (39/43) 为 Ser⁸³ Leu + Asp⁸⁷ Asn 突变, 6.70% (3/43) 为 Ser⁸³ Leu + Asp⁸⁷ Tyr 突变, 2.33% (1/43) 为 Ser⁸³ Leu 单突变; 43 株菌发生了 ParC 氨基酸突变, 其中 93.02% (40/43) 为 Ser⁸⁰ Ile 单突变, 6.98% (3/43) 为 Ser⁸⁰ Ile + Glu⁸⁴ Gly 突变。在发生 QRDR 突变的大肠杆菌中, 有 95.45% (42/44) 的菌株同时发生了 GyrA 和 ParC 氨基酸突变, 其中最常见突变组合为 GyrA: (Ser⁸³ Leu + Asp⁸⁷ Asn) + ParC: Ser⁸⁰ Ile。

表 2 75 株牛源大肠杆菌的耐药表型、PMQR 基因及 QRDR 突变检测结果
Table 2 Results of resistant phenotypes, PMQR genes, and QRDR mutations in 75 *E. coli* strains

PMQR 基因 PMQR gene	QRDR 突变 Mutation in QRDR	菌株数 Number	最小抑菌浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) MIC		
			ENR	CIP	NOR
/	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile	13	≥ 8	≥ 4	≥ 8
/	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile + Glu ⁸⁴ Gly	3	≥ 8	≥ 16	≥ 32
/	GyrA: Ser ⁸³ Leu	1	4	4	8
/	—	12	≤ 0.125	≤ 0.125	≤ 0.25
<i>qnrS</i>	—	14	≤ 0.125	≤ 2	≤ 0.25
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	—	1	≤ 1	≤ 0.125	≤ 0.25
<i>qnrS</i> + <i>qnrB</i>	—	3	≤ 1	≤ 0.5	≤ 2
<i>qnrS</i> + <i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	—	1	2	4	8
<i>qnrS</i>	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile	13	≥ 16	≥ 8	≥ 32
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile	7	≥ 16	≥ 16	≥ 32
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Tyr ParC: Ser ⁸⁰ Ile	3	≥ 16	≥ 8	≥ 32
<i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile	2	≥ 64	≥ 32	≥ 128
<i>qnrB</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	GyrA: Ser ⁸³ Leu + Asp ⁸⁷ Asn ParC: Ser ⁸⁰ Ile	1	64	64	> 256
<i>qnrS</i> + <i>aac(6')-Ib-cr</i>	ParC: Ser ⁸⁰ Ile	1	32	16	128
合计 Amount		75			

注: /, 不携带 PMQR 基因; —, 未发生 QRDR 突变; Ser, 丝氨酸, Leu, 亮氨酸, Asn, 天冬酰胺, Asp, 天冬氨酸, Tyr, 酪氨酸, Ile, 异亮氨酸, Glu, 谷氨酸, Gly, 甘氨酸; ENR, 恩诺沙星, CIP, 环丙沙星, NOR, 诺氟沙星。
Note: /, Doesn't carry PMQR gene; —, No QRDR mutation; Ser, Serine, Leu, Leucine, Asn, Aspartic acid, Asp, Aspartic acid, Tyr, Tyrosine, Ile, Isoleucine, Glu, Glutamic acid, Gly, Glycine; ENR, Enrofloxacin, CIP, Ciprofloxacin, NOR, Norfloxacin.

分析 75 株大肠杆菌的耐药表型与 PMQR 基因及 QRDR 突变的关系, 结果表明发生 QRDR 突变且携带 PMQR 基因的菌株对 ENR、CIP、NOR 均耐药; PMQR 基因单独存在的菌株耐药性不强, 但是

QRDR 突变与 PMQR 基因共存时, NOR、ENR 和 CIP 的 MIC 较仅发生 QRDR 突变的菌株分别增加了 4~32, 4~16 和 2~16 倍(表 2)。

2.3 恩诺沙星诱导结果

恩诺沙星(ENR)诱导试验结果表明, 携带 PMQR 基因且 QRDR 未突变的 1 株菌, 在 ENR 诱导第 2 天时 *gyrA* 基因第 521、539 位的碱基由 T 变为 C, 另 1 株菌在诱导第 3 天时 *gyrA* 基因第 567、599 位的碱基由 C 变为 T、第 513 位的碱基由 T 变为 G; 对照菌株仅在培养第 2 天时有 1 株菌 *gyrA* 基因第 521 位的碱基由 T 变为 C, 另 1 株菌 *gyrA* 基因第 599 位的碱基由 C 变为 T。以上碱基突变并未引发氨基酸突变, 为沉默突变。携带 PMQR 基因且 QRDR 未突变的菌株, 经恩诺沙星诱导后 *parC* 基因未发生突变。不携带 PMQR 基因且 QRDR 未突变的菌株, 在恩诺沙星诱导后未发生任何突变。

3 讨论与结论

自 1960 年以来, 在临床上由大肠杆菌引起的疾病多使用 FQs 治疗^[13], 该类抗生素主要通过抑制细菌 DNA 旋转酶和拓扑异构酶-IV 的活性而抑制细菌 DNA 合成, 从而发挥抑菌作用^[14]。研究表明, 随着 FQs 的大量使用甚至滥用, 多数病原体对 FQs 的敏感性逐渐降低^[15-17], 导致临床治疗面临极大的挑战。本试验从腹泻犊牛粪便中分离得到 75 株大肠杆菌, 其中 60.00%(45/75)的菌株至少耐 2 种 FQs, 40.00%的菌株对 ENR、CIP、NOR 均耐药, 其中对 ENR 的耐药程度较为严重(60.00%), 这可能与 ENR 作为动物专用药在养殖场使用较为频繁有关。

QRDR 突变是大肠杆菌耐 FQs 的主要原因, 其主要通过抑制 FQs 与细菌 DNA 和酶复合物的结合, 导致细菌耐药。*gyrA* 基因编码的氨基酸突变位点通常为第 67~106 位^[18-19], *parC* 基因编码的氨基酸突变位点通常发生于第 71~110 位^[20]。研究表明, *gyrA* 基因编码的第 83、87 位以及 *parC* 基因编码的第 80、84 位氨基酸的突变与 FQs 耐药密切相关^[21-22]。本研究结果显示, 牛源大肠杆菌有 58.67%(44/75)发生了 QRDR 的突变, 其中 95.45%(42/44)的菌株同时发生了 *GyrA* 和 *ParC* 氨基酸突变。赵凤菊等^[23]研究表明, 动物源大肠杆菌 *GyrA* 氨基酸突变主要为 Ile⁸⁷ Val、Leu¹⁰¹ Met, *ParC* 氨基酸突变主要为 Ser⁸⁰ Ile; 曹立亭等^[24]研究表明, 养殖环境中大肠杆菌的 *GyrA* 突变以 Ser⁸³ Leu、Asp⁸⁷

Asn 最常见。Nishikawa 等^[25]研究表明, 日本鸡源大肠杆菌 *GyrA* 突变以 Ser⁸³ Leu、Asp⁸⁷ Asn 为主, *ParC* 以 Ser⁸⁰ Ile 最盛行。综上可知, QRDR 突变多出现在 *GyrA*、*ParC* 的氨基酸上, 且以 *GyrA* 第 83、87 位及 *ParC* 第 80 位居多, 与本试验结果一致。

虽然 PMQR 基因仅导致大肠杆菌对 FQs 低水平耐药, 但由于其通过质粒介导, 可以在不同菌株甚至不同种属间水平转移^[13], 这对人类和动物的健康来说都是一个不可忽视的隐患。本研究结果表明, 61.33%的大肠杆菌至少携带 1 个 PMQR 基因, 其中 *qnrS* 和 *aac*(6′)-*Ib-cr* 基因最常见; 并且存在多个 PMQR 基因共存于同一分离株中的现象, 这在很大程度上提高了大肠杆菌对 FQs 的抗性, 这与 Wu 等^[2]及 Mitra 等^[18]的研究结果一致。此外, QRDR 突变与 PMQR 基因共存菌株比仅有 QRDR 突变菌株对 FQs 的耐药性更强, QRDR 突变与 *qnrS*+*aac*(6′)-*Ib-cr* 共存的菌株比单独携带 *qnrS* 或 *aac*(6′)-*Ib-cr* 的菌株 MIC 更高, 这与 Piekarska 等^[26]的报道一致。

gyrA、*parC* 是 QRDR 最容易发生突变的 2 个基因, 已有研究表明含 PMQR 基因的接合子在 CIP 诱导后会出现 *GyrA* 蛋白第 83、87 位氨基酸突变^[16]。本研究通过 ENR 诱导试验发现, PMQR 阳性菌的 *gyrA* 基因出现 5 处碱基突变, 且皆为沉默突变, 未出现相应氨基酸的突变, 表明在低剂量 ENR 存在的情况下, PMQR 基因的存在一定程度上会影响 *gyrA* 基因序列的稳定性。PMQR 阴性菌未发生突变。

以上结果表明, QRDR 突变是大肠杆菌耐 FQs 的主要原因, PMQR 基因仅赋予其低 FQs 抗性, 但 QRDR 突变与 PMQR 基因共存一定程度上会加重耐药菌的耐药程度; 此外, PMQR 基因会增加 *gyrA* 基因序列的突变机率, 尤其是 ENR 存在的情况下。因此临床上合理使用该类药物就显得十分必要, 一旦造成致病性大肠杆菌发生 QRDR 突变, 将可能导致该类药物治疗无效。

[参考文献]

- [1] Sizemore D R, Roland K L, Ryan U S. Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches [J]. Expert Review of Vaccines, 2004, 3(5): 585-595.
- [2] Wu B, Qi Q, Zhang X D, et al. Dissemination of *Escherichia coli* carrying plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes from swine farms to surroundings [J]. Sci Total Environ, 2019, 665: 33-40.

- [3] Shetty S S, Deekshit V K, Jazeela K, et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone resistance associated with extra-intestinal *Escherichia coli* isolates from hospital samples [J]. Indian J Med Res, 2019, 149(2): 192-198.
- [4] Chen K C, Dong N, Chan E W, et al. Transmission of ciprofloxacin resistance in mediated by a novel type of conjugative helper plasmids [J]. Emerg Microbes Infect, 2019, 8: 857-865.
- [5] Everett M J, Jin Y F, Ricci V, et al. Contributions of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* strains isolated from humans and animals [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1996, 40(10): 2380-2386.
- [6] Araujo B F, Campos P A, Royer S, et al. High frequency of the combined presence of QRDR mutations and PMQR determinants in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from nosocomial and community-acquired infections [J]. J Med Microbiol, 2017, 66(8): 1144-1150.
- [7] Hooper D C, Jacoby G A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance [J]. Ann NY Acad Sci, 2015, 1354(1): 12-31.
- [8] Martinze-martinez L, Pascual A, Jacoby G A. Quinolone resistance from a transferable plasmid [J]. Lancet, 1998, 351(9105): 797.
- [9] Wang Y, Zhang A, Yang Y, et al. Emergence of, *Salmonella enterica*, serovar Indiana and California isolates with concurrent resistance to cefotaxime, amikacin and ciprofloxacin from chickens in China [J]. Int J Food Microbiol, 2017, 262: 23-30.
- [10] Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance, interactions between human, animal, and environmental ecologies [J]. Front Microbiol, 2012, 3: 24.
- [11] 谢晓艳. 奶山羊乳房炎病原菌分离鉴定及多重 PCR 检测方法建立 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2017.
- Xie X Y. Identification of pathogenic of mastitis on dairy goat and establishment of multiplex PCR method [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2017.
- [12] Jorgensen J H. Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria, approved guideline [M]. United States: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015.
- [13] Liu X Q, Boothe D M, Thungrat K, et al. Mechanisms accounting for fluoroquinolone multidrug resistance *Escherichia coli* isolated from companion animals [J]. Vet Microbiol, 2012, 161: 1-2.
- [14] Basu S, Mukherjee M. Conjugal transfer of PMQR from uropathogenic *E. coli* under high ciprofloxacin selection pressure generates *gyrA* mutation [J]. Microb Pathog, 2019, 132: 26-29.
- [15] Hang B P T, Wredle E, Börjesson S, et al. High level of multi-drug-resistant *Escherichia coli* in young dairy calves in southern Vietnam [J]. Trop Anim Health Pro, 2019, 51(6): 1405-1411.
- [16] Li P, Liu D, Zhang X Z, et al. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance in gram-negative bacterial strains from animals and humans in China [J]. Microb Drug Resist, 2019, 25(7): 1050-1056.
- [17] 佟盼盼, 马凯琪, 刘争辉, 等. 新疆牛源志贺毒素大肠杆菌耐药性及其 ESBLs 基因鉴定 [J]. 畜牧兽医学报, 2019, 50(4): 887-892.
- Tong P P, Ma K Q, Liu Z H, et al. Characterization of antimicrobial resistance extended-spectrum β -lactamase genes in bovine origin shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Xinjiang [J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica, 2019, 50(4): 887-892.
- [18] Mitra S, Mukherjee S, Naha S, et al. Evaluation of co-transfer of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes and *bla_{NDM}* gene in *Enterobacteriaceae* causing neonatal septicemia [J]. Antimicrob Resist Infect Control, 2019, 8: 46.
- [19] Varughese L R, Rajpoot M, Goyal S, et al. Analytical profiling of mutations in quinolone resistance determining region of *gyrA* gene among UPEC [J]. PLOS ONE, 2018, 13(1): e0190729.
- [20] 夏蕊蕊, 国宪虎, 张玉臻, 等. 喹诺酮类药物及细菌对其耐药性机制研究进展 [J]. 中国抗生素杂志, 2010, 35(4): 255-261.
- Xia R R, Guo X H, Zhang Y Z, et al. Quinolones and mechanism of quinolone resistance in bacteria [J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2010, 35(4): 255-261.
- [21] Mirzaei M, Jamshidi S, Zamanzadeh M, et al. Determination of *gyrA* and *parC* mutations and prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from patients with UTI in Iran [J]. J Glob Antimicrob RE, 2018, 13: 197-200.
- [22] Vila J, Vargas M, Ruiz J, et al. Quinolone resistance in enterotoxigenic *Escherichia coli* causing diarrhea in travelers to India in comparison with other geographical areas [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2000, 44(6): 1731-1733.
- [23] 赵凤菊, 关 森, 李清竹, 等. 辽宁地区猪源大肠埃希菌喹诺酮类耐药基因的检测与分析 [J]. 河南农业科学, 2017, 46(12): 126-129.
- Zhao F J, Guan M, Li Q Z, et al. Detection and analysis of quinolone resistance genes in swine *Escherichia coli* from Liaoning area [J]. Journal of Henan Agricultural Sciences, 2017, 46(12): 126-129.
- [24] 曹立亭, 周晏丞, 仲崇华, 等. 养殖环境中耐氟喹诺酮类药物大肠杆菌 *gyrA* 基因的检测与序列分析 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2014, 36(9): 9-14.
- Cao L T, Zhou Y C, Zhong C H, et al. Detection and analysis of *gyrA* in fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* isolates collected from different breeding environment [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2014, 36(9): 9-14.
- [25] Nishikawa R, Murase T, Ozaki H. Plasmid-mediated quinolone resistance in *Escherichia coli* isolates from commercial broiler chickens and selection of fluoroquinolone-resistant mutants [J]. Poult Sci, 2019, 98(11): 5900-5907.
- [26] Piekarska K, Wolkowicz T, Zacharczuk K, et al. Co-existence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants and mutations in *gyrA* and *parC* among fluoroquinolone-resistant clinical *Enterobacteriaceae* isolated in a tertiary hospital in Warsaw, Poland [J]. Int J Antimicrob AG, 2015, 45(3): 238-243.