

## 四川省食品动物源大肠杆菌 *mcr-1* 与 *ESBLs* 基因共转移分析

仇剑宇 舒刚 杨承霖 甘婷 林居纯\*

(四川农业大学 动物医学院,成都 611130)

**摘要** 为了解四川省食品动物源大肠杆菌 *mcr-1* 耐药基因流行情况,及其与超广谱  $\beta$ -内酰胺酶基因(*ESBLs*)共存和共转移的特征,采用微量肉汤稀释法检测菌株对不同抗菌药物的敏感性;采用 PCR 检测菌株 *mcr-1*,以及 *mcr-1* 阳性菌株中 *ESBLs* 基因类型;采用质粒接合转移试验分析了 *mcr-1* 与 *ESBLs* 基因共转移的耐药机制。结果显示:190 株大肠杆菌的 *mcr-1* 检出率为 36.84%,75.71% *mcr-1* 阳性菌株中同时检出 *ESBLs* 基因,主要以 *bla*<sub>TEM-1</sub>、*bla*<sub>CTX-M-55</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 为优势基因;*mcr-1* 阳性菌对氨曲南(ATM)、头孢噻肟(CTX)和多黏菌素 E(COL)耐药率极显著高于 *mcr-1* 阴性菌( $P < 0.01$ );质粒转移率为 47.14%,其中获得 *mcr-1* 和 *ESBLs* 基因共转移的接合子表现出与供体菌相同的耐药表型及耐药基因。综上,在四川省食品动物源大肠杆菌中,*mcr-1* 与 *ESBLs* 基因共存现象广泛存在,且耐药基因易发生水平传播,对菌株多重耐药性的产生具有重要意义。

**关键词** 食品动物; 大肠杆菌; *mcr-1*; *ESBLs* 基因; 共转移

中图分类号 S852.61

文章编号 1007-4333(2021)12-0129-08

文献标志码 A

## Analysis of co-transfer of *mcr-1* and *ESBLs* genes in *Escherichia coli* isolates from food-producing animals in Sichuan Province

QIU Jianyu, SHU Gang, YANG Chenglin, GAN Ting, LIN Juchun\*

(College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract** The aim of this study was to investigate the prevalence of *mcr-1* and the co-transfer of *mcr-1* with *ESBLs* genes in *Escherichia coli* from food-producing animals in Sichuan Province. The sensitivity of *mcr-1* to different antibiotics was detected by broth microdilution method; The *ESBLs* gene type of *mcr-1* positive strains were detected by PCR; The drug resistance mechanism of co-transfer of *mcr-1* and *ESBLs* gene was analyzed by plasmid conjugation transfer test. The results showed that: The detection rate of *mcr-1* in 190 *E. coli* isolates was 36.84%, and 75.71% *mcr-1* positive strains was detected *ESBLs* gene simultaneously, mainly *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-55</sub> and *bla*<sub>CTX-M-14</sub> as the dominant genes; The resistant rate of *mcr-1* positive strains to aztreonam, cefotaxime and colistin was very significantly higher than that of negative strains ( $P < 0.01$ ); The rate of plasmid conjugation was 47.14%. The transconjugants with *mcr-1* and *ESBLs* of co-transfer had acquired resistant phenotype and genotypes from parental strains. In conclusion, in the food-producing animals source of *E. coli* in Sichuan Province, the coexistence of *mcr-1* and *ESBLs* genes is widespread and the resistant genes is easy to spread horizontally, which is of great significance to the production of multiple drug resistance of strains.

**Keywords** food-producing animals; *Escherichia coli*; *mcr-1*; *ESBLs* genes; co-transfer

多黏菌素类是医学临床上治疗多重耐药阴性菌感染的关键抗生素,被认为是临床用药最后一道防

线<sup>[1]</sup>。上世纪 80 年代初,多黏菌素在我国被批准用于养殖业,作为药物饲料添加剂以防治动物肠道感

收稿日期: 2020-11-24

基金项目: 西南野生动植物资源保护教育部重点实验室开放基金项目(XNYB18-07)

第一作者: 仇剑宇,硕士研究生,E-mail: qiujiu2018@163.com

通讯作者: 林居纯,教授,主要从事兽医药理与毒理研究,E-mail: juchunlin@126.com

染和促进生长<sup>[2]</sup>。在较长一段时间,临床检测发现细菌对多黏菌素的耐药性维持在较低水平,且耐药性由染色体介导,只能垂直传播<sup>[3]</sup>。近年来,耐药性监测发现食品动物源细菌对多黏菌素耐药率明显上升。2015年Liu等<sup>[4]</sup>首次从猪源大肠杆菌携带的质粒中检出 *mcr-1* 基因,且发现该基因编码的MCR-1蛋白能导致细胞质膜上脂质A被磷酸乙醇胺共价修饰,使细菌细胞外膜与多黏菌素亲和力下降,导致对多黏菌素类耐药。此后,在全球各地,包括患者、环境、食品、家养和野生动物源分离菌中均检出 *mcr-1*<sup>[5]</sup>。回顾性监测发现,早在上世纪80年代,我国鸡源大肠杆菌中就存在 *mcr-1*。随时间推移,该基因检出率呈爆发式上升,尤其在食品动物源菌株中检出率非常高<sup>[3,5]</sup>,如2018年我国猪源大肠杆菌中 *mcr-1* 检出率高达76.2%<sup>[6]</sup>。通过动物源和人源 *mcr-1* 阳性菌株分子特性比较发现,通过食物链、水等自然环境或与动物直接接触,该基因存在从动物扩散到人的可能,这给公共安全造成了威胁<sup>[5]</sup>。

研究表明,携带 *mcr-1* 的质粒类型具有多样性,最常见有 IncI2, IncHI2 和 IncX4 型质粒。这些质粒可以在肠杆菌科细菌间发生接合转移,其中 IncI2 和 IncHI2 可同时携带 *ESBLs*、*PMQR* 和其他耐药基因,导致多耐药基因共转移<sup>[7-8]</sup>。多耐药基因共转移会造成在使用其他抗生素时,也会对 *mcr-1* 产生选择作用,使得 *mcr-1* 的扩散和耐药问题更加严重。四川省是中国畜牧业大省,养殖规模逐年扩大,多重耐药菌株的出现严重威胁着畜牧生产的健康发展。大肠杆菌作为食品动物体内最常见的致病菌和共栖菌,是耐药性传播的重要细菌,也是目前报道最易携带 *mcr-1* 的菌种,约占 *mcr-1* 阳性菌株91%<sup>[5]</sup>,可将多耐药基因传递给其他致病菌,甚至通过环境、食品等再传播给其他动物和人类。因此,调查大肠杆菌中耐药基因的流行情况,对四川省的耐药性检测是非常重要的。本次研究以四川省各地收集的不同动物源大肠杆菌为对象,检测 *mcr-1* 以及超广谱β-内酰胺酶 *ESBLs* 基因流行情况,通过质粒接合转移试验揭示耐药基因发生共转移的耐药机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株

190株大肠杆菌于2017—2018年从四川省不同养殖场患病猪、鸡、兔体内分离鉴定获得,其中

156株鸡源大肠杆菌,25株猪源大肠杆菌,9株兔源大肠杆菌;质控菌 ATCC25922 和耐叠氮钠大肠杆菌 J53 AZ<sup>r</sup> 由中国农业大学基础兽医学系兽医药理学教研室惠赠。

### 1.2 主要试剂

氨曲南等购自四川制药制剂有限公司;小量质粒提取试剂盒购自 OMEGA 公司;2×Taq PCR MasterMix 等购自成都擎科梓熙生物技术有限公司。

### 1.3 药物敏感性试验

采用微量肉汤稀释法检测190株大肠杆菌对氨苄西林(AMP)、头孢噻肟(CTX)、氨曲南(ATM)、庆大霉素(GEN)、阿米卡星(AMK)、环丙沙星(CIP)和多黏菌素E(COL)最小抑菌浓度(MIC),以大肠杆菌 ATCC25922 株作为质控菌株。药敏折点参考 CLSI-M100-S29<sup>[9]</sup> 和 EUCAST9.0 标准判读<sup>[10]</sup>。

### 1.4 菌株 *mcr-1* 及 *ESBLs* 基因检测

采用 E. Z. N. A.® Plasmid DNA Mini Kit I 提取190株大肠杆菌的质粒DNA。*mcr-1* 阳性菌株的 *ESBLs* 基因(*bla*<sub>TEM</sub>、*bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>、*bla*<sub>CTX-M-2 group</sub>、*bla*<sub>CTX-M-9 group</sub>、*bla*<sub>CTX-M-8/25 group</sub>、*bla*<sub>SHV</sub> 和 *bla*<sub>OXA</sub>) 采用 PCR 检测,靶基因、引物序列等见表1。PCR 扩增产物经1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测后送至成都擎科梓熙生物测序,将获得的耐药基因序列和 GenBank 核酸序列进行 BLAST 比对。

### 1.5 质粒接合转移试验

将 *mcr-1* 阳性大肠杆菌(供体菌)与大肠杆菌 J53 AZ<sup>r</sup>(受体菌)进行肉汤接合试验。接合子用含药(2 μg/mL 多黏菌素 E 和 200 μg/mL 叠氮钠)胰蛋白胨大豆琼脂平板进行筛选<sup>[14]</sup>。采用微量肉汤稀释法检测接合子药物敏感性,提取接合子质粒DNA扩增相关耐药基因。

### 1.6 数据统计及分析

使用 SAS9.0 软件 FREQ 程序进行耐药率组间差异性分析, $P>0.05$  为差异不显著, $P<0.05$  为差异显著, $P<0.01$  为差异极显著。

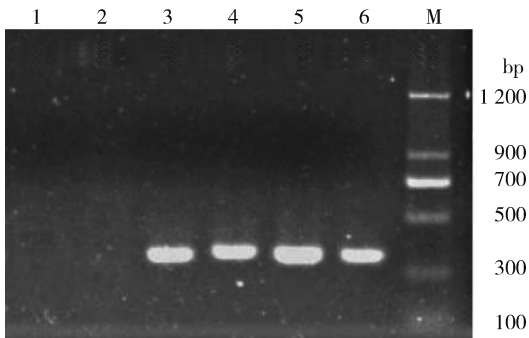
## 2 结果与分析

### 2.1 菌株 *mcr-1* 基因检测及耐药分析

190株大肠杆菌的 *mcr-1* 检出率为36.84%(70/190)(图1),其中,鸡源和猪源菌株 *mcr-1* 检出率分别为41.67%(65/156)和20.00%(5/25),尚未在兔源菌中检出该基因。

表 1 *mcr-1* 及 *ESBLs* 基因扩增引物信息Table 1 Information of specific primers for *mcr-1* and *ESBLs* genes

靶基因 Target gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	产物大小/bp Amplification size	退火温度/°C Annealing temperature	参考文献 References
<i>mcr-1</i>	F:CTCGGTCAGTCCGTTTGT R:CTTGGTCGGTCTGTAGGG	311	56	[4]
<i>bla<sub>TEM</sub></i>	F:CATTTCCGTGTGCGCCCTTATTC R:CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	800	52	[11]
<i>bla<sub>SHV</sub></i>	F:AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC R:ATCCCGCAGATAAAATCACCAC	713	55	[11]
<i>bla<sub>CTX-M-1</sub> group</i>	F:AGGAAGTGTGCCGCTGTATGC R:CATTGCCCGAGGTGAAGTGGT	505	59	[12]
<i>bla<sub>CTX-M-2</sub> group</i>	F:ATGATGACTCAGAGCATTCCG R:TCAGAAACCGTGGGTTACGA	876	55	[13]
<i>bla<sub>CTX-M-9</sub> group</i>	F:CGCAGATAATACGCAGGTGCT R:CCGGTTCGTATTGCCTTTGAG	495	57	[12]
<i>bla<sub>CTX-M-8/25</sub> group</i>	F:AACACGCAGACGCTCTAC R:TCGAGCCGGAAGGTGTCAT	326	56	[11]
<i>bla<sub>OXA</sub></i>	F:GGCACCAGATTCAACTTTCAAG R:GACCCCAAGTTTCTCGTAAGTG	564	56	[11]



M, DNA 标记 DL 2 000; 1~2, *mcr-1* 阴性菌株;  
3~6, *mcr-1* 阳性菌株

M, DNA Marker DL 2 000; 1-2, *mcr-1* negative strain;  
3-6, *mcr-1* positive strain

图 1 部分鸡源大肠杆菌 *mcr-1* 基因 PCR 扩增Fig. 1 PCR amplifications of *mcr-1* of *E. coli* in chickens

药敏试验显示, 190 株菌除对庆大霉素 (GEN) 耐药率为 27. 37%, 对其余药物的耐药率均超过 30%, 其中对氨基西林 (AMP) 高达 95. 79%, 其次是氨基青 (ATM) 65. 26%、多黏菌素 E (COL)

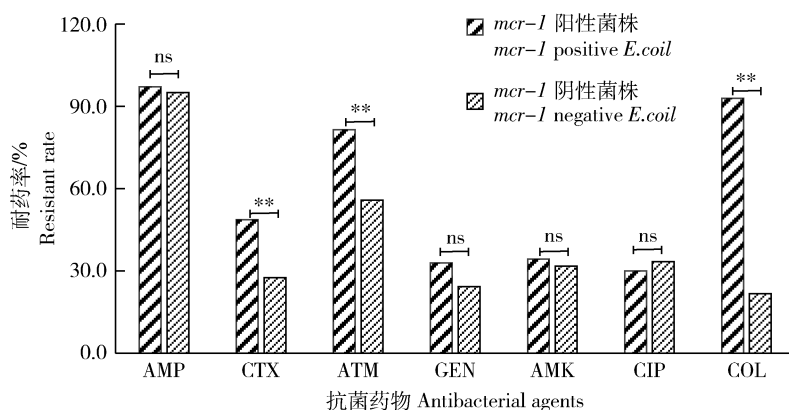
47. 89%、头孢噻肟 (CTX) 35. 26%、阿米卡星 (AMK) 32. 63% 和环丙沙星 (CIP) 32. 11%。比较 *mcr-1* 阳性和阴性菌株的耐药性可见, *mcr-1* 阳性菌株对氨基青 (ATM)、头孢噻肟 (CTX) 和多黏菌素 E (COL) 耐药率极显著高于 *mcr-1* 阴性菌 ( $P < 0. 01$ ), 对其他药物的耐药率差异均不显著 ( $P > 0. 05$ ) (图 2), 其中 *mcr-1* 阳性大肠杆菌对多黏菌素 E (COL) 耐药率高达 92. 9%。

## 2.2 *mcr-1* 阳性菌的 *ESBLs* 基因检测

70 株 *mcr-1* 阳性菌携带质粒大小约为 2 kb > 15 kb, 75. 71% 菌株检出了 *ESBLs* 基因。测序结果显示, *bla<sub>TEM-1</sub>*、*bla<sub>CTX-M-55</sub>* 和 *bla<sub>CTX-M-14</sub>* 的检出率分别为 71. 43%、22. 86% 和 17. 14%, 未检出其他 *ESBLs* 基因 (图 3)。

## 2.3 *mcr-1* 阳性菌株的质粒接合转移分析

*mcr-1* 阳性菌株质粒接合转移率为 47. 14% (33/70)。33 株 *mcr-1* 阳性接合子及其供体菌的 MICs、耐药率比较可见, 接合子及其供体菌对多黏



\*\* 表示差异极显著 ( $P < 0.01$ ), ns 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

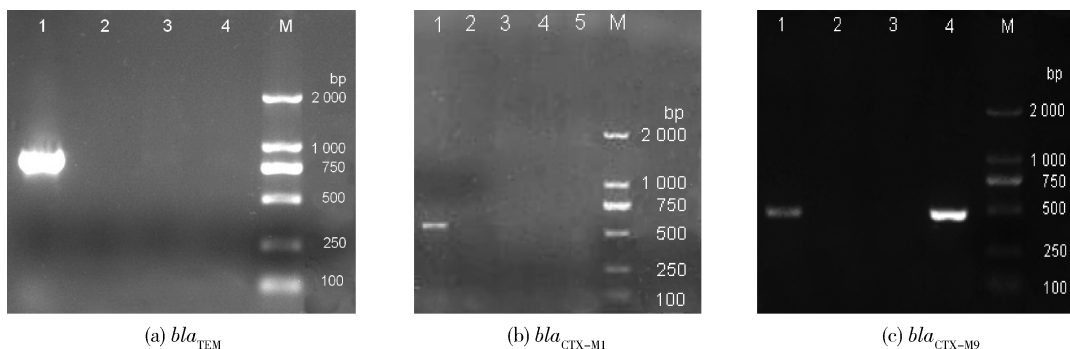
\*\* indicates extremely significant difference ( $P < 0.01$ ). ns indicates no significant difference ( $P > 0.05$ ).

AMP: 氨苄西林; CTX: 头孢噻肟; ATM: 氨曲南; GEN: 庆大霉素; AMK: 阿米卡星; CIP: 环丙沙星; COL: 多黏菌素 E

AMP: ampicillin; CTX: cefotaxime; ATM: aztreonam; GEN: gentamicin; AMK: amikacin; CIP: Ciprofloxacin; COL: Colistin

图2 *mcr-1* 阳性和阴性菌株耐药率比较

Fig. 2 Comparison of resistant rates between *mcr-1* positive and negative strains



(a)  $bla_{TEM}$

(b)  $bla_{CTX-M1}$

(c)  $bla_{CTX-M9}$

M, DNA 标记 DL2 000; (a)-1、(b)-1、(c)-1、(d)-4 为阳性菌株; 其余为阴性菌株。

M, DNA Marker DL2 000; (a) -1, (b) -1, (c) -1 and (d) -4 were positive strains; The rest were negative strains.

图3  $\beta$ -内酰胺类基因 (*ESBLs*) PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplifications of  $\beta$ -lactamase genes (*ESBLs*)

菌素 E 的 MIC 在  $2 \sim 8 \mu\text{g}/\text{mL}$ , 说明菌株对多黏菌素 E (COL) 呈低水平耐药。接合子对头孢噻肟 (CTX)、氨曲南 (ATM)、庆大霉素 (GEN)、阿米卡星 (AKM)、环丙沙星 (CIP) 和多黏菌素 E (COL) 的  $\text{MIC}_{50}$  值低于供体菌, 但两者的  $\text{MIC}_{90}$  值和耐药率无显著性差异 (表 2)。

对 33 株接合子基因检测显示, 19 株接合子只检出 *mcr-1* 基因, 14 株同时检出 *mcr-1* 和 *ESBLs* 基因, 其中同时检出  $bla_{TEM-1}$  (13 株)、 $bla_{CTX-M-55}$  (9 株) 和  $bla_{CTX-M-14}$  (2 株); 与供体菌相比, 尽管 14 株共转移接合子对庆大霉素 (GEN)、阿米卡星 (AKM)、环丙沙星 (CIP) 等药物的 MIC 值仅为供体菌的  $1/2$  或  $1/32$ , 但却是受体菌 J53 AZ<sup>r</sup> 的几十甚至几百倍, 而且保留了对多黏菌素、 $\beta$ -内酰胺类药物

较高的耐药率 (表 3); 分析接合子质粒可见, 大小分别约为 5、8 和  $>15$  kb 质粒, 其中  $\sim 5$  kb 质粒仅携带 *mcr-1*,  $\sim 8$  和  $\sim >15$  kb 质粒同时携带 *mcr-1* 和 *ESBLs* 基因 (表 3)。

### 3 讨论与结论

随着抗生素的长期使用或滥用, 耐药性问题已成为全球公共安全最严重的威胁之一。“One health”理念中, 动物在“人类-动物-环境”整体健康中占重要地位。目前对食品动物源细菌耐药性监测, 更注重那些在医学临床使用的关键药物, 如第三代头孢、氟喹诺酮类和多黏菌素等<sup>[15]</sup>。本研究耐药性检测结果显示, 四川省食品动物源大肠杆菌除对氨苄西林、庆大霉素、环丙沙星等兽医临床常用药物

表 2 33 株接合子 (TCs) 及其供体菌的 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> 及耐药率Table 2 MIC<sub>50</sub>, MIC<sub>90</sub> and resistant rate of 33 transconjugants and their donors

抗菌药物 Antimicrobials	MIC <sub>50</sub> / (μg/mL)		MIC <sub>90</sub> / (μg/mL)		耐药率 / % Resistant rate	
	供体菌	接合子	供体菌	接合子	供体菌	接合子
	Donors	TCs	Donors	TCs	Donors	TCs
AMP	>256	>256	>256	>256	100.00	100.00
CTX	32	1	128	128	60.61	42.42
ATM	128	16	128	128	72.73	51.52
GEN	16	2	64	64	51.52	30.30
AMK	16	2	32	32	30.30	15.15
CIP	1	0.25	8	4	36.36	21.21
COL	4	2	8	4	100.00	100.00

表 3 14 株供体菌和接合子 (TCs) 的 MICs、携带质粒大小及 *ESBLs* 基因Table 3 The MICs, plasmid size and *ESBLs* gene of 14 donors and their transconjugants (TCs)

菌株编号 Strain number	MIC / (μg/mL)							质粒 Plasmid	<i>ESBLs</i> 基因 <i>ESBLs</i> gene
	AMP	CTX	ATM	GEN	AMK	CIP	COL		
EPZC17-73	>256	>256	>256	16	16	4	16	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
TC EPZC17-73	>256	>256	>256	8	8	2	8	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
EPZC17-110	>256	>256	>256	1	128	<0.25	2	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC17-110	>256	128	>256	1	64	<0.25	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC17-116	>256	32	>256	0.5	<0.25	1	2	~2 kb, ~3 kb, ~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC17-116	>256	32	128	<0.25	<0.25	<0.25	2	~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
EPZC17-119	>256	32	>256	8	0.5	32	8	~2 kb, ~3 kb, ~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC17-119	>256	16	128	8	0.5	16	8	~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC17-124	>256	64	128	>256	2	1	4	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
TC EPZC17-124	>256	32	64	>256	2	0.5	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
EBCC18-1	>256	>256	>256	64	32	16	2	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>

表3(续)

菌株编号 Strain number	MIC/( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )							质粒 Plasmid	ESBLs 基因 ESBLs gene
	AMP	CTX	ATM	GEN	AMK	CIP	COL		
TC EBCC18-1	>256	64	>256	32	0.5	16	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-14</sub>
EBCC18-2	>256	<0.25	8	32	16	4	4	~2 kb, 3 kb, ~8 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EBCC18-2	>256	<0.25	8	16	2	4	4	~8 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EBCC18-12	>256	>256	128	16	128	8	4	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EBCC18-12	>256	>256	64	<0.25	64	<0.25	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC18-3	>256	>256	>256	8	2	1	2	~3 kb, ~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC18-3	>256	>256	128	4	0.5	1	2	~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC18-27	>256	>256	>256	>256	<0.25	8	16	~2 kb, 3 kb, ~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC18-27	>256	>256	>256	>256	<0.25	8	8	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC18-32	>256	<0.25	<0.25	1	32	1	2	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
TC EPZC18-32	>256	<0.25	0.5	1	32	1	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub>
EPZC18-34	>256	>256	128	8	2	2	4	~2 kb, ~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC18-34	>256	64	32	4	1	<0.25	2	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC18-44	>256	256	64	>256	16	16	16	~3 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC18-44	>256	256	64	>256	2	8	4	~>15 kb	<i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
EPZC18-45	>256	64	>256	64	16	16	8	~3 kb, ~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
TC EPZC18-45	>256	32	128	64	8	16	8	~8 kb, ~>15 kb	<i>bla</i> <sub>TEM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-55</sub>
J53 AZ'	0.5	<0.25	<0.25	2	2	<0.25	<0.25	—	—

耐药外,对头孢噻肟、氨基曲南、阿米卡星等兽医临床未批准使用的药物也呈严重耐药性(耐药率范围 32.63%~65.26%)。这说明耐药性的产生不仅与抗菌药物使用强度有关,可能还与不同抗菌药物间存在交叉或共耐药相关<sup>[16]</sup>。

本研究中 190 株食品动物源大肠杆菌中 *mcr-1* 检出率达 36.84%,其中鸡源和猪源菌株中 *mcr-1* 检出率分别为 41.67%和 20.00%,高于华东地区鸡源菌株检出率 36.66%<sup>[17]</sup>,与广东等 5 省 2011—2014 年猪源菌株检出率 21%接近<sup>[4]</sup>,低于我国其他省份猪、鸡源菌株该基因的检出率(43.86%~76.20%)<sup>[6,18]</sup>,说明在我国食品动物源大肠杆菌中 *mcr-1* 广泛存在,但该基因流行存在地区差异。

研究表明,*mcr-1* 可以与其他耐药基因共存<sup>[19]</sup>。本研究从 70 株 *mcr-1* 阳性菌中检出 75.71% 菌株携带 *ESBLs* 基因,这与其他报道认为 *mcr-1* 常与 *ESBLs* 共存和共转移一致<sup>[19-21]</sup>。这也诠释了 *mcr-1* 阳性菌株比阴性菌株对第三代头孢类具有更强的耐药性的原因。目前,在我国食品动物源大肠杆菌中 *bla*<sub>CTX-M</sub> 是 *ESBLs* 最主要的基因型,其中以 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 为主<sup>[17,22]</sup>。本研究在 *mcr-1* 阳性菌株中 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 的检出率分别达 22.86%和 17.14%,与本研究发现的 2010—2016 年菌株 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因流行以 *bla*<sub>CTX-M-55</sub> 和 *bla*<sub>CTX-M-14</sub> 为优势基因型相符,所编码的 CTX-M 酶介导对青霉素类和第 3 代头孢菌素耐药<sup>[23]</sup>。此外,*mcr-1* 阳性大肠杆菌中 *bla*<sub>TEM-1</sub> 检出率高达 71.43%,说明 *bla*<sub>TEM-1</sub> 在四川省食品动物源大肠杆菌中已经获得了稳固存在和传播的能力。尽管 *bla*<sub>TEM-1</sub> 介导窄谱  $\beta$ -内酰胺酶,但由于该基因容易发生突变导致新的 TEM 酶出现,扩大水解底物谱,导致多重耐药菌株流行<sup>[24]</sup>。

R 质粒作为介导耐药基因转移的可移动元件,在耐药性水平传播中发挥重要作用。本研究中 70 株 *mcr-1* 阳性菌经质粒接合转移获 33 株接合子(转移率 47.14%),其中 14 株发生了 *mcr-1* 与 *ESBLs* 基因共转移,且参与菌株耐药性的表达,使受体菌对多黏菌素和  $\beta$ -内酰胺类药物产生耐药性。关于 37 株 *mcr-1* 阳性菌株未结合转移成功,可能是菌株携带的质粒属于非结合型质粒,需要通过转化或转导方式在不同菌株间传播。

综上所述,本研究表明在四川省食品动物源大肠杆菌耐药性较严重,且对医学临床使用的关键药

物也呈耐药性。耐药菌株中 *mcr-1* 流行率较高,与 *ESBLs* 基因共存存在较普遍,耐药基因借助质粒易发生水平传播,导致多重耐药菌株的产生和流行。这给动物、人类或环境造成巨大威胁,动物养殖业应加强 *mcr* 基因与其他耐药基因的监测,针对耐药性问题采取严格防控措施,谨慎和合理有效地使用抗生素,缓解耐药性的产生和传播,保障动物养殖健康发展和畜禽产品质量安全。

## 参考文献 References

- [1] Li J, Nation R L, Turnidge J D, Milne R W, Coulthard K, Rayner C R, Paterson D L. Colistin: The re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2006, 6(9): 589-601
- [2] 王新兴, 翟真真, 常维山, 王巧云, 蒋汉明. 多粘菌素耐药基因 *mcr-1* 的研究进展[J]. 中国动物传染病学报, 2020, 28(2): 110-114  
Wang X X, Zhai Z Z, Chang W S, Wang Q Y, Jiang H M. Advances in research on polymyxin resistance mechanism *mcr-1* [J]. *Chinese Journal of Animal Infectious Diseases*, 2020, 28(2): 110-114 (in Chinese)
- [3] 王政, 付玉林, 汪洋, 江海洋. 多黏菌素 E 耐药基因 *mcr-1* 在我国养殖场的流行及其传播扩散[J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(2): 191-196  
Wang Z, Fu Y L, Wang Y, Jiang H Y. Prevalence and transfer of colistin resistance gene *mcr-1* in Chinese livestock farms: A review[J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2019, 44(2): 191-196 (in Chinese)
- [4] Liu Y Y, Wang Y, Walsh T R, Yi L X, Zhang R, Spencer J, Doi Y, Tian G B, Dong B L, Huang X H, Yu L F, Gu D X, Ren H W, Chen X J, Lv L C, He D D, Zhou H W, Liang Z S, Liu J H, Shen J Z. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study[J]. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16(2): 161-168
- [5] Nang S C, Li J, Velkov T. The rise and spread of *mcr* plasmid-mediated polymyxin resistance[J]. *Critical Reviews in Microbiology*, 2019, 45(2): 131-161
- [6] Tong H X, Liu J X, Yao X H, Jia H Y, Wei J C, Shao D H, Liu K, Qiu Y F, Ma Z Y, Li B B. High carriage rate of *mcr-1* and antimicrobial resistance profiles of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolates in swine faecal samples collected from eighteen provinces in China [J]. *Veterinary Microbiology*, 2018, 225: 53-57
- [7] Sun J, Li X P, Yang R S, Fang L X, Huo W, Li S M, Jiang P, Liao X P, Liu Y H. Complete nucleotide sequence of an IncI2 plasmid cohabiting *bla*<sub>CTX-M-55</sub> and *mcr-1* [J].

- Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2016, 60(8): 5014-5017
- [8] Zając M, Sztromwasser P, Bortolaia V, Leekitcharoenphon P, Cavaco L M, Ziętek-Barszcz A, Hendriksen R S, Wasyl D. Occurrence and characterization of *mcr-1*-positive *Escherichia coli* isolated from food-producing animals in Poland, 2011-2016 [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 1753-1767
- [9] M100-S29. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-ninth informational supplement[S]. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019
- [10] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters[EB/OL]. (2019-01-01). <http://www.eucast.org>
- [11] Dallenne C, Da Costa A, Decré D, Favier C, Arlet G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae [J]. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(3): 490-495
- [12] 舒刚, 侯蓉, 林居纯, 钟钦卿, 刘颂蕊, 邓向东. 畜禽源大肠杆菌质粒介导  $\beta$ -内酰胺酶检测及其耐药基因特性研究[J]. 中国农业大学学报, 2016, 21(8): 92-97  
Shu G, Hou R, Lin J C, Zhong Q Q, Liu S R, Deng X D. Detection of *Escherichiacol* iplasmid-mediated  $\beta$ -lactamase from livestock and poultry and characterization of antimicrobial resistance [J]. *Journal of China Agricultural University*, 2016, 21(8): 92-97 (in Chinese)
- [13] 翁幸璧, 糜祖煌, 金辉. 多重耐药大肠埃希菌获得性耐药基因检测及指标聚类分析[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(3): 154-158  
Weng X B, Mi Z H, Jin H. Acquired resistance-related genes and index cluster analysis in multidrug-resistant *Escherichia coli* [J]. *Chinese Journal of Clinical Infectious Diseases*, 2011, 4(3): 154-158 (in Chinese)
- [14] Nguyen N T, Nguyen H M, Nguyen C V, Nguyen T V, Nguyen M T, Thai H Q, Ho M H, Thwaites G, Ngo H T, Baker S, Carrique-Mas J. Use of colistin and other critical antimicrobials on pig and chicken farms in southern Vietnam and its association with resistance in commensal *Escherichia coli* bacteria[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(13): 3727-3735
- [15] McEwen S A, Collignon P J. Cillignon P J. Antimicrobial resistance: A one health perspective [J]. *Microbiology Spectrum*, 2018, 6(2): 1-26
- [16] 赵凝秋, 刘聪, 薛云新, 王岱, 赵西林. 细菌对抗菌化合物的交叉与共耐药研究[J]. 中国抗生素杂志, 2021, 46(1): 11-19  
Zhao N Q, Liu C, Xue Y X, Wang D, Zhao X L. Cross-and co-resistance to antibacterial compounds [J]. *Chinese Journal of Antibiotics*, 2021, 46(1): 11-19 (in Chinese)
- [17] Shafiq M, Huang J H, Shah J M, Ali I, Rahman S U, Wang L P. Characterization and resistant determinants linked to mobile elements of ESBL-producing and *mcr-1*-positive *Escherichia coli* recovered from the chicken origin [J]. *Microbial Pathogenesis*, 2021, 150: 104722
- [18] Zhang J L, Chen L, Wang J W, Yassin A K, Butaye P, Kelly P, Gong J S, Guo W N, Li J, Li M, Yang F, Feng Z X, Jiang P, Song C L, Wang Y Y, You J F, Yang Y, Price S, Qi K Z, Kang Y, Wang C M. Molecular detection of colistin resistance genes (*mcr-1*, *mcr-2* and *mcr-3*) in nasal/oropharyngeal and anal/cloacal swabs from pigs and poultry [J]. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 3705-3714
- [19] Cao Y P, Lin Q Q, He W Y, Wang J, Yi M Y, Lv L C, Yang J, Liu J H, Guo J Y. Co-selection may explain the unexpectedly high prevalence of plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-1* in a Chinese broiler farm[J]. *Zoological Research*, 2020, 41(5): 569-575
- [20] Wu C M, Wang Y C, Shi X M, Wang S, Ren H W, Shen Z Q, Wang Y, Lin J C, Wang S L. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008-2014[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2018, 7(1): 1-10
- [21] Patil S, Chen H Y, Zhang X L, Lian M, Ren P G, Wen F Q. Antimicrobial resistance and resistance determinant insights into multi-drug resistant gram-negative bacteria isolates from paediatric patients in China [J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 3625-3634
- [22] Shafiq M, Huang J H, Ur Rahman S, Shah J M, Chen L, Gao Y, Wang M L, Wang L P. High incidence of multidrug-resistant *Escherichia coli* coharboring *mcr-1* and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> recovered from pigs[J]. *Infection and Drug Resistance*, 2019, 12: 2135-2149.
- [23] 杨承霖, 吴聪明, 王爽, 林居纯. 四川省食品动物源大肠埃希菌产 ESBLs 菌株 *bla*<sub>CTX-M</sub> 基因的分子流行特征[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2020, 46(4): 456-460  
Yang C L, Wu C M, Wang S, Lin J C. Molecular epidemiologic characteristics of *bla*<sub>CTX-M</sub> genes of ESBLs-producing *Escherichia coli* isolates from food animals in Sichuan Province [J]. *Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences*, 2020, 46(4): 456-460 (in Chinese)
- [24] Salverda M L M, De Visser J A G M, Barlow M. Natural evolution of TEM-1  $\beta$ -lactamase: Experimental reconstruction and clinical relevance[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2010, 34(6): 1015-1036