

DOI:10.13602/j.cnki.jcls.2020.04.05

2 株不同序列分型耐黏菌素大肠埃希菌耐药机制分析*

曹星卫, 肖艳萍, 钟桥石, 杭亚萍, 陈艳慧, 方雪瑶, 刘艳华, 胡龙华 (南昌大学第二附属医院检验科, 江西省检验医学重点实验室, 南昌 330006)

摘要: **目的** 探讨 2 株黏菌素耐药大肠埃希菌的耐药机制。 **方法** 采用 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定药敏系统鉴定细菌及检测常见抗菌药物敏感性, 并检测菌株是否产超广谱 β -内酰胺酶 (ESBLs); 用三维试验检测菌株是否产 AmpC 酶; 用微量肉汤稀释法测定菌株对黏菌素的最低抑菌浓度 (MIC); 用 PCR 及测序检测耐药基因; 多位点序列分型 (MLST) 和脉冲场凝胶电泳 (PFGE) 分析菌株的分子分型和同源性; 接合试验和 S1 酶切脉冲场凝胶电泳 (S1-PFGE) 对菌株的质粒特征进行分析。 **结果** 2 株菌均对碳青霉烯类药物敏感, 对黏菌素耐药, 其中 N408 对头孢类药物耐药; PCR 扩增和测序分析显示 2 株菌均携带 *mcr-1* 基因, 且 N408 和 N433 分别携带 *bla*_{CIT} 和 *bla*_{TEM-1} 基因; 2 株菌质粒接合试验均成功, 接合子均检测到 *mcr-1* 基因; MLST 分析显示 N408 为 ST453 型, N433 为 ST8900 型, PFGE 显示为不同条带。 S1-PFGE 显示 N408 有 2 个质粒, N433 有 1 个质粒。 **结论** 本地区已出现携带 *mcr-1* 基因黏菌素耐药大肠埃希菌, 且可通过质粒在不同菌株间水平播散, 应引起临床的重视, 加强此类菌株的检测。

关键词: 大肠埃希菌; 黏菌素耐药; *mcr-1*; 质粒接合

中图分类号: R446.5

文献标志码: A

Study on drug resistance mechanism of two strains of colistin-resistant *Escherichia coli* with different sequence type

CAO Xingwei, XIAO Yanping, ZHONG Qiaoshi, HANG Yaping, CHEN Yanhui, FANG Xueyao, LIU Yanhua, HU Longhua (Department of Clinical Laboratory of the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Jiangxi Provincial Key Laboratory of Laboratory Medicine, Nanchang 330006, Jiangxi, China)

Abstract: **Objective** To explore the mechanism of colistin resistance in two *Escherichia coli* (*E. coli*) strains. **Methods** Vitek 2 Compact full-automatic microbial identification and drug sensitivity analysis system was used to identify the bacteria and the sensitivity for common antibacterial drugs, and detect whether the studied *E. coli* strains produced extended spectrum β -Lactamase (ESBLs). 3D experiment was used to detect whether the *E. coli* strains produced AmpC enzymes. The minimal inhibitory concentration (MIC) of colistin for the *E. coli* strains was determined by micro-broth dilution method. The drug-resistance genes were detected by polymerase chain reaction (PCR) and sequencing. The molecular typing and homology of the strains were analyzed by multilocus sequence typing (MLST) and pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) assay. The plasmid characteristics of the strains were analyzed by conjugation experiments and S1 digestion pulsed-field gel electrophoresis (S1-PFGE). **Results** Both the *E. coli* strains were sensitive to carbapenems and resistant to colistin, of which strain N408 was resistant to cephalosporins. PCR amplification and sequencing analysis revealed that both strains carried *mcr-1* gene, and strain N408 carried *bla*_{CIT} and strain N433 carried *bla*_{TEM-1} gene. The plasmids conjugation tests for the two strains were all successful, and the *mcr-1* gene was detectable in their zygote. MLST analysis showed that the strain N408 was ST453 type and strain N433 was ST8900 type. The two stains showed different bands in PFGE. S1-PFGE showed that strain N408 contained two plasmids and strain N433 only contained one plasmid. **Conclusion** The colistin-resistant *E. coli* strains carrying *mcr-1* gene has emerged in our region and can be disseminated horizontally among different strains by plasmids, which should cause attention in clinical practice and strengthen the detection for such strains.

Key words: *Escherichia coli*; colistin resistance; *mcr-1*; plasmid junction

近年来,革兰阴性杆菌临床分离株多重耐药性严重,尤其耐碳青霉烯类肠杆菌科细菌(carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE)上升趋势明显,2017 年全国 CRE 检出率高达 9.4%^[1]。黏菌素是目前国际上推荐用于治疗多重耐药革兰阴性杆菌感染的“最后一道防线”^[2]。随着黏菌素在

临床使用量的增加,耐黏菌素肠杆菌科细菌已开始出现。2015 年我国学者报道从人和动物分离的肠杆菌科细菌中发现质粒介导的黏菌素耐药基因 *mcr-1*,自此揭开对黏菌素耐药机制的新认识^[3]。目前在多个国家和地区人和动物源的分离菌株中发现了该基因,且携带该基因的菌种分布广,肠杆菌科细

* 基金项目:江西省科学技术厅江西省重点研发计划项目(20181BBG70030)。

作者简介:曹星卫,1992 年生,男,技师,硕士研究生,主要从事细菌耐药机制研究。

通信作者:胡龙华,主任技师,教授, E-mail:longhuahu@163.com。

菌中大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、阴沟肠杆菌、产气肠杆菌、阪崎肠杆菌、宋内志贺菌及肠炎沙门菌等均有分离报道^[3-4]。本研究就我院临床分离的 2 株 *mcr-1* 阳性大肠埃希菌的耐药特征和传播机制进行研究。

1 材料与方法

1.1 菌株来源 收集 2017 年 1—12 月南昌大学第二附属医院分离的 90 株非重复大肠埃希菌,用 E-test 法对菌株进行黏菌素药敏初筛试验,共筛出 2 株黏菌素耐药菌株,其中 1 株(编号 N408)于 2017 年 1 月分离自 1 名重症监护病区男性患者腹水标本,另 1 株(编号 N433)于 2017 年 2 月分离自 1 名肿瘤科病区男性患者血液标本;质控菌株大肠埃希菌 ATCC25922、肺炎克雷伯菌 ATCC700603、阴沟肠杆菌 029M、耐叠氮钠大肠埃希菌 J53 以及沙门菌 H9812 菌株均为本实验室保存。

1.2 主要仪器及试剂 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪及 Vitek MS 质谱仪(法国生物梅里埃公司),PCR 仪(杭州朗基科学仪器公司),CHEF.DR11 型脉冲场电泳系统及普通电泳仪(美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(上海天能公司),ABI 3730XL 测序仪(杭州擎科生物公司);2×PCR Master Mix、EB 染液、常规琼脂糖、TBE 液、琼脂糖凝胶回收试剂盒(上海生工公司),DNA marker(北京天根生化公司),S1 酶、*Xba* I 酶及蛋白酶 K(日本 TaKaRa 公司),黏菌素、叠氮钠(北京索莱宝公司),SeaKem Gold Agarose(美国 Cambrex 公司),药敏纸片(英国 Oxoid 公司),黏菌素 E-test 药敏条(意大利利飞驰公司)。

1.3 菌株鉴定及药物敏感性试验 用 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪和 Vitek MS 质谱仪进行菌种鉴定,用 AST-GN16 药敏卡进行药敏检测,结果根据 2018 年美国临床和实验室标准化协会(CLSI)标准^[5]进行判断。利用微量肉汤稀释法测定黏菌素的最低抑菌浓度(MIC),大肠埃希菌 ATCC25922 用于质控,药敏折点参照 EUCAST 7.0 版判读标准(敏感:MIC≤2 μg/mL)^[6]。

1.4 产酶表型确证试验 用 Vitek 2 Compact 全自动微生物鉴定仪检测实验菌株是否产 ESBLs,肺炎克雷伯菌 ATCC700603 和大肠埃希菌 ATCC25922 为 ESBLs 检测的阳性和阴性质控菌株;根据文献[7]进行三维试验检测 AmpC 酶:提取酶粗提物于 -80 ℃ 反复冻融,将调成 0.5 麦氏浊度单位的大肠埃希菌 ATCC25922 菌液涂布 M-H 琼脂培养基,将

头孢西丁纸片贴在培养基中心,沿纸片边缘向外划线加入酶粗提物,35 ℃ 孵育过夜,以阴沟肠杆菌 029M 和大肠埃希菌 ATCC25922 分别作为 AmpC 酶阳性和阴性质控菌株。

1.5 耐药基因检测 用加热煮沸法^[8]提取细菌 DNA 并作为模板。根据文献[8]和 Permer Primer 5.0 软件设计引物,序列见表 1,由杭州擎科生物公司合成。用 PCR 检测超广谱 β-内酰胺酶(ESBLs)基因(*bla*_{TEM}、*bla*_{SHV}、*bla*_{CTX-M}),AmpC 酶基因(*bla*_{AAC}、*bla*_{CIT}、*bla*_{DHA}、*bla*_{EBC}、*bla*_{FOX}、*bla*_{MOX}),质粒介导喹诺酮耐药基因[*qnrA*、*qnrB*、*qnrS*、*acc*(6')-*Ib-cr*]和黏菌素耐药基因 *mcr-1*。PCR 反应体系 50 μL,其中 DNA 模板 1 μL、上、下游引物(10 μmol/L)各 2 μL、ddH₂O 20 μL、2×PCR Master Mix 25 μL。PCR 反应条件:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,退火(各基因退火温度见表 1)30 s,72 ℃ 延伸 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并观察结果。所有扩增阳性产物经切胶纯化后送杭州擎科生物公司采用桑格测序技术进行测序,测序结果经拼接后与 GenBank 序列进行比对(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>),确定耐药基因。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物长度

基因名称	引物序列(5'→3')	产物长度(bp)	退火温度(℃)
<i>mcr-1</i>	F:ATCAGCCAAACCTATCCC R:TAGACACCGTTCTCACCC	1 300	54
<i>bla</i> _{TEM}	F:ATGAGTATTCAACATTTCGG R:CCAATGCTTAATCAGTGAGG	857	54
<i>bla</i> _{CTX-M}	F:CGCTTTATGCGCAGACGA R:GATTCTCGCCGCTGAAGC	784	57
<i>bla</i> _{SHV}	F:ATGCGTTATATTGCGCTGTG R:TTAGCGTTGCCAGTGCTCG	851	58
<i>bla</i> _{ACC}	F:AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA R:TTCCGCCGAATCATCCCTAGC	346	59
<i>bla</i> _{CIT}	F:TGGCCAGAAGTACAGGCAAA R:TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462	58
<i>bla</i> _{DHA}	F:AACCTTCACAGGTGTGCTGGGT R:CCGTACGCATACTGGCTTTGCG	405	57
<i>bla</i> _{EBC}	F:TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG R:CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302	59
<i>bla</i> _{FOX}	F:AACATGGGGTATCAGGGAGATG R:CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190	59
<i>bla</i> _{MOX}	F:GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT R:CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520	60
<i>qnrA</i>	F:TTCAGCAAGAGGATTTCTCA R:GGCAGCACTATTACTCCCAA	627	55
<i>qnrB</i>	F:CCTGAGCGGCACTGAATTTAT R:GTTTGCTGCTCGCCAGTCGA	408	58
<i>qnrS</i>	F:CAATCATACATATCGGCACC R:TCAGGATAAACAATAACACC	641	51
<i>acc</i> (6')- <i>Ib-cr</i>	F:TGACCTTGGCATGCTCTATG R:TTAGGCATCACTGCGTGTTTC	509	57

1.6 接合试验 参照文献[8]的方法,将 2 株大肠埃希菌和 J53 菌株接种在血琼脂平板上,37 ℃ 过夜培养,分别挑取单菌落接种至 5 mL LB 培养基,37 ℃ 220 r/min 12 h。分别吸取供体菌(2 株大肠埃希菌)200 μL 和受体菌(J53)100 μL 于 4 mL LB 培养基中,37 ℃ 静置 24 h。吸取混合菌悬液 100 μL 均匀涂布于含黏菌素(2 μg/mL)和叠氮钠(200 μg/mL)的 LB 平板上。供体菌和受体菌同样涂布含抗菌药物 LB 平板,37 ℃ 培养过夜,挑取筛选平板上单个菌落,转种血琼脂平板,37 ℃ 培养过夜,对接合子进行鉴定和药敏试验、表型筛选试验以及后续的耐药基因检测。

1.7 多位点序列分型(multilocus sequence typing, MLST) 参照网站(<http://mlst.warwick.ac.uk/MLst/dbs/Ecoli> for Ecoli)合成大肠埃希菌 7 对管家基因引物(*adhA*、*fumC*、*gyrB*、*icd*、*mdh*、*purA*、*recA*),并根据相应条件进行 PCR 扩增,阳性产物送杭州擎科公司进行测序并拼接,将序列提交至 MLST 数据库进行比对,获得每个管家基因的等位编号及序列分型(sequence type, ST)。

1.8 脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel

electrophoresis, PFGE) 将 H9812 菌株、2 株大肠埃希菌菌液与低熔点胶混匀后灌模,蛋白酶 K 消化 2 h,使用 *Xba* I 内切酶消化 4 h。配制 10 g/L SeaKem Gold 凝胶,在 CHEF-DR11 型脉冲场电泳系统上进行 PFGE。电泳参数 6 V/cm,脉冲时间 4~40 s,0.5×TBE 电泳缓冲液,电场角度 120°,电泳时间 19 h。电泳后胶块经 EB 染色后成像观察。

1.9 S1 酶切脉冲场凝胶电泳(S1-PFGE) 将 H9812 菌株、J53、2 株大肠埃希菌及接合子分别灌模制胶,用 *Xba* I 内切酶酶切 H9812 后作为 marker, S1 酶对 J53、2 株大肠埃希菌及接合子进行酶切;电泳参数同 1.8,电泳后胶块经 EB 染色后成像观察。

2 结果

2.1 菌株鉴定及药敏结果 2 株菌均为大肠埃希菌。药敏结果显示 N408 及接合子 JN408 对除头孢吡肟和碳青霉烯类外的其他 β-内酰胺类、喹诺酮类、黏菌素耐药,对氨基糖苷类和替加环素敏感。N433 及接合子 JN433 对大多数 β-内酰胺类、替加环素敏感,而对喹诺酮类及黏菌素耐药。见表 2。

表 2 供体菌、受体菌及接合子的药敏试验结果(μg/mL)

抗菌药物	N408	N433	JN408	JN433	J53
氨苄西林	≥32	≥32	≥32	≥32	4
阿莫西林/克拉维酸	≥32	8	≥32	8	4
哌拉西林/他唑巴坦	≥128	≤4	≥128	≤4	≤4
头孢唑啉	≥64	≤4	≥64	≤4	≤4
头孢西丁	≥64	≤4	≥64	≤4	≤4
头孢曲松	≥64	≤1	≥64	≤1	≤1
头孢吡肟	8	≤1	8	≤1	≤1
氨曲南	≥64	≤1	≥64	≤1	≤1
厄他培南	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5
亚胺培南	≤1	≤1	≤1	≤1	1
阿米卡星	≤2	≤2	≤2	≤2	≤2
庆大霉素	≤1	≤1	≤1	≤1	2
妥布霉素	≤1	≤1	≤1	≤1	≤1
环丙沙星	≥4	≥4	≥4	≥4	≤0.25
左氧氟沙星	≥8	≥8	≥8	≥8	≤0.25
呋喃妥因	128	≤16	128	≤16	≤16
复方磺胺甲噁唑	≥320	≥320	≤20	≤20	≤20
替加环素	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.5	≤0.25
黏菌素	4	8	4	4	1

注:JN408 和 JN433 分别为 N408 和 N433 的阳性接合子。

2.2 产酶表型结果 N408 和 N433 及其接合子检测产 ESBLs 试验结果均为阴性;N408 及其接合子三维试验阳性,N433 及其接合子为阴性。

2.3 耐药基因结果 PCR 扩增及测序比对结果显

示 N408 和 JN408 均携带 *mcr-1* 和 *bla_{CTT}* 基因;N433 携带 *mcr-1* 和 *bla_{TEM-1}* 基因,JN433 仅携带 *mcr-1* 基因,其余基因检测结果均为阴性。见图 1。

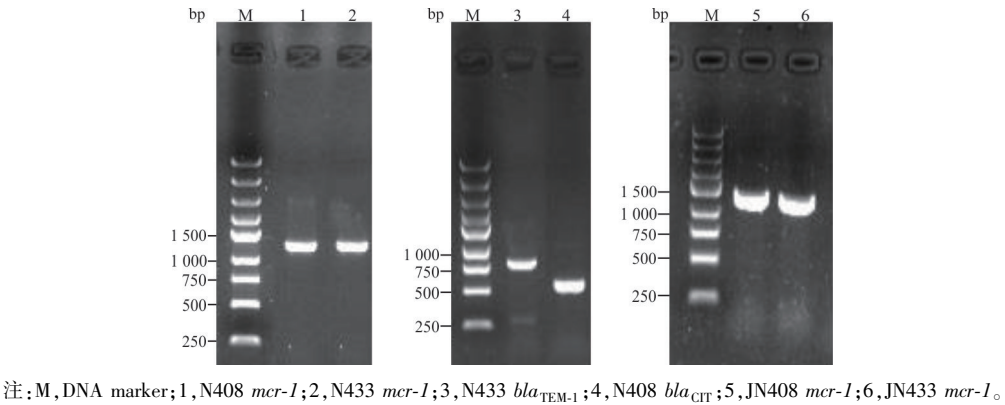
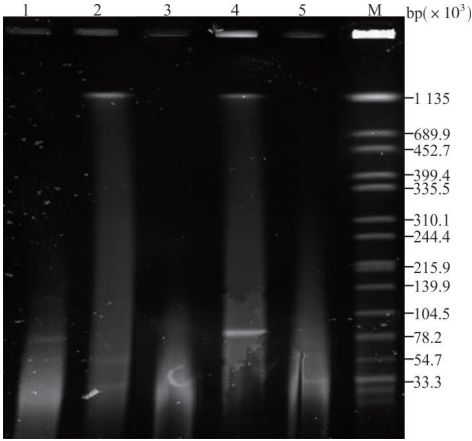


图 1 PCR 扩增产物电泳分析

2.4 接合试验结果 接合子 JN408 和 JN433 均能在含黏菌素和叠氮钠的平板上生长,表明接合试验成功。2 株接合子均对黏菌素耐药,且均检测到 *mcr-I* 基因。

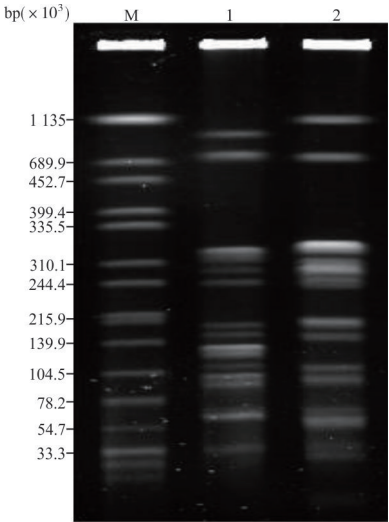
2.5 MLST 结果 N408 为 ST453 型, N433 为 ST8900 型。

2.6 PFGE 和 S1-PFGE 结果 PFGE 结果显示 2 株菌条带明显不同,见图 2。S1-PFGE 结果显示 N408 含有 2 个质粒,质粒大小分别为 78 000 bp 和 138 000 bp 左右, JN408 仅含 1 个 78 000 bp 左右的质粒; N433 和 JN433 均含 1 个 33 000 bp 左右的质粒,见图 3。



注: M, H9812; 1, N408; 2, N433; 3, J53; 4, JN408; 5, JN433。

图 3 S1-PFGE 电泳



注: M, H9812; 1, N408; 2, N433。

图 2 PFGE 电泳

3 讨论

本研究发现 2 株携带 *mcr-I* 基因的耐黏菌素大肠埃希菌,为江西地区首次报道。研究报道黏菌素耐药临床分离菌株通常呈现多重耐药性^[3]。但本研究的 2 株菌株对碳青霉烯类药物均敏感,尤其是菌株 N433 除对氨苄西林、喹诺酮类及黏菌素耐药外,对其余 16 种检测药物均敏感,表明临床分离黏菌素耐药菌株也可呈现对多种抗菌药物敏感,这同浙江地区报道类似^[9]。虽然对黏菌素耐药,但对碳青霉烯类、替加环素等抗菌药物保持敏感性。对于这类菌株感染的患者仍有可选的抗菌药物可供治疗。对 2 株菌株分别检测 ESBLs 类、AmpC 类、喹诺酮类及黏菌素类等 14 种耐药基因,检测结果与耐药表型一致,2 株菌均检出 *mcr-I* 基因,菌株 N408 同时检出 *bla*_{CIT} 基因;而对氨苄西林耐药,对其他 β-内酰胺类敏感的菌株 N433 仅检出窄谱 β-内酰胺酶基因 *bla*_{TEM-1}。2 株菌接合试验均成功将 *mcr-I* 基因转移到受体菌中,表明 *mcr-I* 基因可通过质粒在菌种之间水平传播,这与目前研究的黏菌素耐药机制一致^[3]。同时提示临床应该加强对此类细菌的监测,

防止 *mcr-1* 转移至其他耐药菌株间,产生泛耐药菌株。S1-PFGE 结果显示接合子 JN408 和 JN433 均检测到一个质粒,大小分别约为 78 000 bp 和 33 000 bp,由于未进行 Southern blot 杂交实验,但接合子菌均仅含 1 个质粒,可初步推测这 2 株菌的 *mcr-1* 基因位于上述质粒上。其中编号 N433 菌株中 *mcr-1* 位于约 33 000 bp 大小的质粒上,与黄旭等^[10]报道的 1 例大肠埃希菌中携带 *mcr-1* 基因的质粒大小一致。

2 株携带 *mcr-1* 基因大肠埃希菌 ST 型分别为 ST453 和 ST8900,与国内外报道的 ST156、ST167、ST648、ST10、ST2736 等^[3,11-13]有所不同,是新发现的携带 *mcr-1* 基因不同 ST 型大肠埃希菌。这可能是导致黏菌素耐药菌株对其他药物敏感性不同于其他黏菌素耐药菌株对多种药物耐药的原因。2 株菌的 MLST 分型和 PFGE 结果均不同,提示菌株同源性不高,且分属不同的克隆种群,表明 2 株菌为非克隆传播。查阅 2 名患者的住院病历,发现感染患者分别入住不同科室,且 2 个科室分别在不同住院大楼,2 名患者住院时间也无交集,患者近期也没有外出旅行史,提示菌株来源不明确,存在散发传播的可能。

4 参考文献

- [1] 胡付品, 郭燕, 朱德妹, 等. 2017 年 CHINET 中国细菌耐药性监测[J]. 中国感染与化疗杂志, 2018, 18(3): 241-251.
- [2] Liu YY, Wang Y, Walsh TR, *et al.* Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study[J]. Lancet Infect Dis, 2016, 16(2): 161-168.
- [3] Quan J, Li X, Chen Y, *et al.* Prevalence of *mcr-1* in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* recovered from bloodstream infections in China: a multicentre longitudinal study[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(4): 400-410.
- [4] Zeng KJ, Doi Y, Patil S, *et al.* Emergence of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in colistin-resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2016, 60(6): 3862-3863.
- [5] CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, 28th Edn[S]. CLSI supplement M100S. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018.
- [6] Wang Q, Zhang P, Zhao D, *et al.* Emergence of tigecycline resistance in *Escherichia coli* co-producing MCR-1 and NDM-5 during tigecycline salvage treatment[J]. Infect Drug Resist, 2018, 11: 2241-2248.
- [7] Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(5): 1791-1796.
- [8] 俞凤, 邓林强, 胡龙华, 等. 发现 1 株产 NDM-1 型碳青霉烯酶非脱羧胺克菌[J]. 临床检验杂志, 2018, 36(1): 25-28.
- [9] 何杰, 全晶晶, 王燕飞, 等. 浙江省 23 家医院血流感染患者多黏菌素耐药基因 *mcr-1* 流行情况[J]. 中华微生物和免疫学杂志, 2017, 37(10): 725-728.
- [10] 黄旭, 孙鹏飞, 夏文颖, 等. 1 株同时携带 *mcr-1* 和 NDM-6 基因的泛耐药大肠埃希菌研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018, 34(14): 1696-1699.
- [11] Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes[J]. Clin Microbiol Rev, 2017, 30(2): 557-596.
- [12] Nukui Y, Ayibieke A, Taniguchi M, *et al.* Whole-genome analysis of EC129, an NDM-5-, CTX-M-14-, OXA-10- and MCR-1-co-producing *Escherichia coli* ST167 strain isolated from Japan[J]. J Glob Antimicrob Resist, 2019, 18: 148-150.
- [13] Shen Y, Wu Z, Wang Y, *et al.* Heterogeneous and flexible transmission of *mcr-1* in hospital-associated *Escherichia coli*[J]. mBio, 2018, 9(4): e00943-18.

(收稿日期:2019-11-28)

(本文编辑:周万青,刘群)